

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden

## **Autonome Parvoviren**

# **Entwicklung einer zweiten Generation von Vektoren für die Tumor-Gentherapie und Untersuchung des Einflusses der Infektion auf die zelluläre Genexpression**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der tiermedizinischen  
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Claudia Wrzesinski  
aus  
Kissing

München 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof Dr. R. Stolla
1.Referent:	Univ.-Prof Dr. O.-R. Kaaden
2. Referent:	Univ.-Prof Dr. E. Wolf
1. Koreferent:	Univ.-Prof Dr. W. Ahne
2. Koreferent:	Univ.-Prof Dr. Dr. F. Sinowatz
3. Koreferent:	Univ.-Prof Dr. J. Hirschberger

Tag der Promotion: 8. Februar 2002

***Meinen lieben Eltern***



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum</b>	<b>2</b>
2.1	Autonome Parvoviren	2
2.2	Taxonomie	3
2.3	MVMp und H1	4
2.4	Virus-Morphologie	5
2.5	Organisation des parvoviralen Genoms	5
2.6	Der virale Lebenszyklus	7
2.7	Parvoviraler Tropismus	8
2.8	Parvoviraler Replikationszyklus	11
2.9	Die nichtstrukturellen Proteine	13
2.10	Autonome Parvoviren in der onkologischen Gentherapie	17
2.10.1	Allgemeines zur Gentherapie	17
2.10.2	Rekombinante MVMp- und hH1- Vektoren als vielversprechende Vektoren in der Krebs-Gentherapie	22
2.10.3	Aufbau und Produktion rekombinanter parvoviraler Vektoren	23
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1	Mikrobiologische Methoden	27
3.1.1	Kultivierung und Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	27
3.1.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien	27
3.1.3	Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA: Elektroporation	28
3.2	Präparation, Analyse und Modifikation von DNA	28
3.2.1	Plasmide	28
3.2.2	Minipräparationen zur Gewinnung von Plasmid-DNA	29
3.2.3	Maxipräparationen zur Gewinnung von Plasmid-DNA	29
3.2.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	29
3.2.5	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	30
3.2.6	Restriktionsverdau	30

3.2.7	Agarosegelelektrophorese	30
3.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	31
3.2.9	Ligation	31
3.2.10	Extraktion von Virus-DNA aus Säugetierzellen	31
3.2.11	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit Zufallsoligomeren	32
3.2.12	Transfer von DNA ( <i>Souther-Blot</i> ) und Hybridisierung	33
<b>3.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
3.3.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Säugetierzellen	34
3.3.2	Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen nach der CaPO <sub>4</sub> -Methode	36
3.3.3	<i>In vivo</i> Markierung von Proteinen mit Trans <sup>35</sup> -S-label <sup>TM</sup> und Bestimmung des radioaktiven Einbaus	37
3.3.4	Synchronisierung der U937 Zellen mit Methotrexat	37
3.3.5	DAPI-Färbung der Zellkerne	38
<b>3.4</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS)</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Virologische Methoden</b>	<b>39</b>
3.5.1	Produktion rekombinanter Viren	39
3.5.2	Dichtezentrifugation über Iodixanolgradienten	40
3.5.3	Virusinfektion von Säugetierzellen	40
3.5.4	Hybridisierungs-Assay zur Titration rekombinanter Viren	41
3.5.5	Plaque-Assay	43
3.5.6	RCV-Amplifikation	44
3.5.7	Bestimmung der relativen Anzahl GFP-fluoreszierender Zellen	45
<b>3.6</b>	<b>Präparation und Analyse von Proteinen</b>	<b>45</b>
3.6.1	Herstellung von Proteinextrakten aus mit Trans <sup>35</sup> -S-label <sup>TM</sup> markierten Säugetierzellen	46
3.6.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Säugetierzellen für Western-Blots	46
3.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.6.4	Western-Blot-Analyse	48

3.6.5	Immunpräzipitation	49
3.6.6	Immunfluoreszenz und DAPI-Färbung	49
<b>3.7</b>	<b>Präparation und Analyse von RNA</b>	<b>50</b>
3.7.1	Total-RNA-Extraktion mit Trizol	50
3.7.2	DNase-Behandlung der Total-RNA	50
3.7.3	Überprüfung der RNA-Qualität auf einem denaturierenden Agarose-Gel	51
3.7.4	mRNA-Extraktion	51
3.7.5	Radioaktives Markieren der cDNA mit [ $\gamma^{32}$ P] -dATP, ausgehend von der vorher gewonnenen mRNA	52
<b>3.8</b>	<b>Hybridisierung und Auswertung der „human cancer 1.2 arrays“ von Clontech</b>	<b>52</b>
<b>3.9</b>	<b>Auswertung der Unigeneset-1-Filter</b>	<b>53</b>
<b>3.10</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Reduktion der Wildtypkontamination in parvoviralen Vektorstocks durch die Konstruktion von MVMP- und hH1-basierenden Chimären und Pseudotypen</b>	<b>54</b>
4.1.1	RCVs als Problem bei der Produktion parvoviraler Vektoren	54
4.1.1.1	Klonierung und Produktion der MVMP- und hH1-Chimären	56
4.1.1.2	Produktion der MVMP- und hH1-Pseudotypen	60
4.1.2	Vergleich der erreichbaren Titer bei Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen	61
4.1.3	Vergleich der RCV-Kontamination der Basisvektoren, der Chimären und der Pseudotypen	65
4.1.3.1	Detektion der RCV-Kontamination mit Plaque-Assay	65
4.1.3.2	Detektion der RCV-Kontamination mit VP-Hybridisierungs-Assay	69

<b>4.2</b>	<b>Zelltropismus der MVMp- und der hH1-Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen</b>	<b>71</b>
4.2.1	Die Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen in NB324K Zellen: Genom-Replikation und Expression	71
4.2.2	Die Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen in A9 Zellen: Genom-Replikation und Expression	73
4.2.3	Untersuchung des Genombereichs und seine Bedeutung für den A9 Zelltropismus in hH1- und MVMp-Vektoren	76
4.2.4	GFP-Expression der Pseudotypen in anderen Zelllinien: Ist der Tropismus kapsid- oder genomdeterminiert ?	81
<b>4.3</b>	<b>Interaktion des H1-Virus mit den humanen monozytischen U937 Zellen auf genregulatorischer Ebene</b>	<b>95</b>
4.3.1	Analyse der U937 Zellen während einer Infektion mit H1-Virus und nach Synchronisierung: Suche des geeigneten Zeitpunktes zum Vergleich infizierter und nichtinfizierter U937 Zellen	95
4.3.2	Vergleich H1-infizierter U937 Zellen mit nicht infizierten U937 Zellen auf genregulatorischer Ebene mit Hilfe von cDNA-Arrays	102
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>108</b>
<b>5.1</b>	<b>Chimären und Pseudotypen</b>	
5.1.1	Gefahren der RCVs und Strategien zu ihrer Minimierung	109
5.1.2	Wirtszelltropismus der Parvoviren	115
5.1.3	Pseudotypen als Chance für die wiederholte Applikation parvoviraler Vektoren	121
5.1.4	Einsatz der Parvoviren in der Krebstherapie als replikativ kompetente Viren	122
<b>5.2</b>	<b>Folgen einer H1-Infektion in U937 Zellen</b>	<b>124</b>
5.2.1	Interaktion des H1-Virus mit der humanen monozytischen U937 Zelllinie	124



5.2.2	Ergebnisse der cDNA-Arrays: Reaktion der U937 Zellen auf eine H1-Virus Infektion	125
5.2.3	cDNA-Arrays als vielversprechende Technik in der Parvovirologie	129
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>137</b>

# 1 Einleitung

Für die Tumor Gentherapie wurden verschiedene virale Vektorsysteme entwickelt, von denen allerdings keines allen Anforderungen gerecht wird. Die beiden Nagerparvoviren MVMP und H1 stellen auf Grund ihrer onkosuppressiven Eigenschaften und ihrer geringen Pathogenität attraktive Alternativen dar. Rekombinante Vektoren auf der Basis autonomer Parvoviren sind konstruiert worden, in denen an Stelle der Kapsidproteine ein therapeutisches Transgen eingebracht worden ist. Diese Vektoren können ihr Genom replizieren und das eingebrachte Transgen exprimieren, aber keine Nachkommen-Viren bilden. Zur Produktion solcher rekombinanten Viren werden die Kapsidproteine mittels Helferplasmiden durch Kotransfektion mit dem rekombinanten Vektorgenom *in trans* zur Verfügung gestellt. Hierbei können durch homologe Rekombination RCVs (*Replication Competent Viruses*) entstehen, die in der Lage sind, Kapsidproteine zu exprimieren und Nachkommenviren zu bilden. Ziel dieser Arbeit war es, die Entstehung von RCVs zu minimieren. Es wurden Chimären und Pseudotypen zwischen dem MVMP- und dem H1-Virus konstruiert, mit dem Ziel, die homologen Bereiche zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten viralen Genom zu reduzieren. Die konstruierten Vektoren konnten darüber hinaus benutzt werden, um den Einfluss des MVMP- bzw. H1-Kapsids und Genoms auf den Zelltropismus in humanen und murinen Zelllinien zu untersuchen. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind wichtig für ein mögliches gezieltes „targeting“ parvoviraler Vektoren. Außerdem ist Pseudotypisierung eine interessante Strategie, die negativen Auswirkungen induzierter neutralisierender Antikörper, die möglicherweise bei wiederholter Applikation parvoviraler Vektoren entstehen, zu umgehen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Effekt einer Infektion mit dem Parvovirus H1 von U937 Zellen auf genregulatorischer Ebene mittels cDNA-Arrays untersucht werden. Für diese Zellen wurde schon gezeigt, dass eine H1-Infektion zur Aktivierung der Kaspase3 und in ähnlicher Weise wie eine TNF $\alpha$ -Behandlung zum apoptotischen Absterben der Zellen führt. Mit der cDNA-Array-Technik sollten speziell Gene identifiziert werden, die mit der virus-induzierten Apoptose in Zusammenhang stehen, aber auch untersucht werden, welchen generellen Einfluß eine H1-Infektion auf die Genregulation dieser Zelllinie hat.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Autonome Parvoviren

Parvoviren (lat. *parvus* = klein) zählen mit einem Durchmesser von 18-26 nm zu den kleinsten bekannten Viren. Sie besitzen eine von einem hüllenlosen Kapsid umgebene einzelsträngige DNA. Da sie nur wenige regulatorische und strukturelle Proteine kodieren, zeigen sie eine extreme Abhängigkeit und ein enges Zusammenspiel mit ihrer Wirtszelle.

#### **Autonome Parvoviren in der Veterinärmedizin**

Seit langem sind autonome Parvoviren als Krankheitserreger in der Veterinärmedizin ein gut untersuchtes Forschungsgebiet. In Vertebraten sind sie Ursache verschiedener endemischer und epidemischer Erkrankungen, die große wirtschaftliche Konsequenzen mit sich bringen können. Dabei sind autonome Parvoviren in ihrer Pathogenität meist speziesspezifisch. Allerdings gibt es auch Vertreter, insbesondere die der Nagetiere, die in verschiedenen Wirtstierarten krankhafte Veränderungen bewirken können. Das Alter der Tiere, ihre Kondition, ihr Immunstatus und im Falle einer intrauterinen Infektion der Immunstatus des Muttertieres haben einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung. In der Labortierzucht und für tierexperimentelle Arbeiten zählen Infektionen mit Nagerparvoviren auch heute noch zu einem der größten Probleme. Nicht nur die Labortiere selbst, sondern auch die von ihnen gewonnenen Produkte, wie Zelllinien, Seren und transplantierbare Tumore können betroffen sein und sollten deshalb auf parvovirale Kontamination hin untersucht werden (Jakoby et al., 1996).

In jüngster Zeit erlangen Parvoviren ihre Bedeutung auf dem Gebiet der Gentherapie. Hier werden verschiedene Nagerparvoviren als alternative Vektoren zur Behandlung von Tumoren untersucht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit eben diesem Aspekt der Parvovirologie. Objekt der Forschung waren das murine Parvovirus MVMp und das Rattenparvovirus H1.

**Tab. 2-1: Veterinärmedizinisch bedeutsame Erkrankungen durch autonome Parvoviren:**

BVP: Bovines Parvovirus	Bovine Parvovirose
PPV: Porzines Parvovirus	SMEDI-Syndrom
CPV-2: Canines Parvovirus	Parvovirose des Hundes
FPV: Felines Parvovirus	Panleukopenie der Katze
MEV: Mink Enteritis Virus	Nerzenteritisvirus
ADV: Aleuten Nerzparvovirus	Aleutenkrankheit der Nerze
Anserines Parvovirus	Gänsehepatitis
Rat Parvovirus (RV, RPV, H1) Hamster Parvovirus (HaPV) Murine Parvoviren (MVM, MPV)	Labortierkrankungen

Nach Rolle-Mayr, 6. Auflage und Jakoby et al., 1996

## 2.2 Taxonomie

Die Familie der *Parvoviridae* gliedert sich in zwei Unterfamilien. Die Parvoviren der Vertebraten werden in der Unterfamilie der *Parvovirinae* zusammengefasst, die der Insekten in die Unterfamilie der *Densoviridae* (dargestellt in Tab. 2-2) (Berns et al., 1996; Murphy et al., 1995).

Die *Parvovirinae* unterteilen sich in drei Gattungen: (1) *Dependovirus*, (2) *Erythrovirus*, (3) *Parvovirus*.

*Dependoviren* umfassen die adenoassoziierten Viren (AAV), die für ihre Replikation von sogenannten Helferviren abhängig sind. Als solche können sowohl Adeno-, als auch Herpesviren fungieren (Atchison et al., 1965; McPherson & Rosenthal, 1985). Alternativ dazu können sie in Abwesenheit eines Helfervirus durch ortsspezifische Integration in das Wirtszellgenom eine latente Infektion etablieren (Berns et al., 1975).

Die Gattungen *Erythroviren* und *Parvoviren* beinhalten die autonomen Parvoviren, die keine Helferviren zur Replikation benötigen. Bisher wurde eine Integration autonomer Parvoviren in das Wirtszellgenom nicht beschrieben. Zu den *Erythroviren*, durch ihren Tropismus zu erythroiden Vorläuferzellen ausgezeichnet, gehört das bisher einzige bekannte humanpathogene Parvovirus B19, das bei einer akuten Infektion im Menschen zu Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) führen kann.

Tab. 2-2: Taxonomie der Parvoviridae

Unterfamilie	Gattung	Spezies
<b>Parvovirinae:</b> infizieren Vertebraten		
<b>autonome Parvoviren</b>		
	<b>Parvovirus</b>	Minute Virus of Mice H1 Parvovirus HB Parvovirus Kilham Rat Parvovirus Mouse Parvovirus Hamster Parvovirus Lull Virus Lapine Parvovirus Raccoon Parvovirus Feline Parvovirus Canine Parvovirus Canine Minute Virus Mink Enteritis Virus Aleutian Mink Disease Virus Porcine Parvovirus Bovine Parvovirus Goose Parvovirus Equine Parvovirus Tumor Virus X
		MVM H1 HBPV KRV MPV HaPV LuIII LPV RPV FPV CPV CMV MEV AMVD PPV BPV GPV EPV TVX
	<b>Erythrovirus</b>	B19 Virus Simian Parvovirus
		B19 SPV
<b>helferabhängige Parvoviren</b>		
	<b>Dependovirus</b>	Adeno Associated Virus 1-5
		AAV-1-5
<b>Densovirinae:</b> infizieren Arthropoden		
		Densovirus Icterivirus Contravirus
		JcDENV BmDENV AaDENV

### 2.3 MVMp und H1

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den beiden autonomen Parvoviren MVMp und H1, zwei der am besten untersuchten Parvoviren.

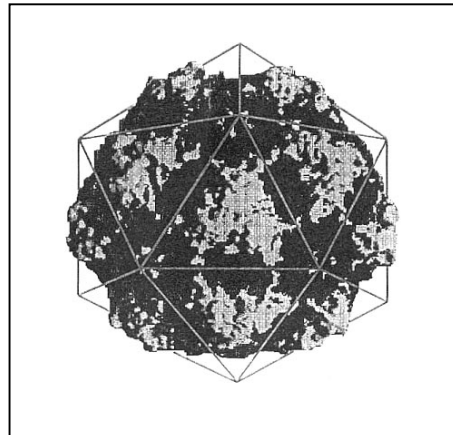
MVM lässt sich in zwei Stämme unterteilen. MVMp (p = prototyp) infiziert *in vitro* produktiv Fibroblasten, MVMi (i = immunosuppressiv) dahingegen T-Lymphozyten. MVMp zeigt, anders als MVMi, in seinem natürlichen Wirt, der Maus, keine pathogenen Erscheinungen (Tattersall & Cotmore, 1986).

Der natürliche Wirt des H1-Virus scheint die Ratte zu sein, aber auch Hamster und menschliche Zellen sind empfänglich. Während es besonders nach intrauteriner oder

neonataler Infektion bei Hamster und Maus zu schweren Erkrankungen kommen kann, gilt H1 als apathogen im Menschen (Jacoby and Ball-Goodrich, 1995).

## 2.4 Virus-Morphologie

Generell ist der Aufbau der Viruspartikel der verschiedenen Subfamilien gleich. Die ikosaedrischen Kapside haben einen Durchmesser von 18-26 nm und besitzen keine Hülle (Siegl et al., 1985). Je nach Virus-Spezies gibt es zwei bis vier verschiedene Arten der VPs (virale Kapsidproteine). Sowohl im MVMp-, als auch im H1-Virus setzt sich das Kapsid aus drei Kapsidproteinen zusammen: VP1 (83-86 kDa), VP2 (64-66 kDa) und VP3 (60-62 kDa).



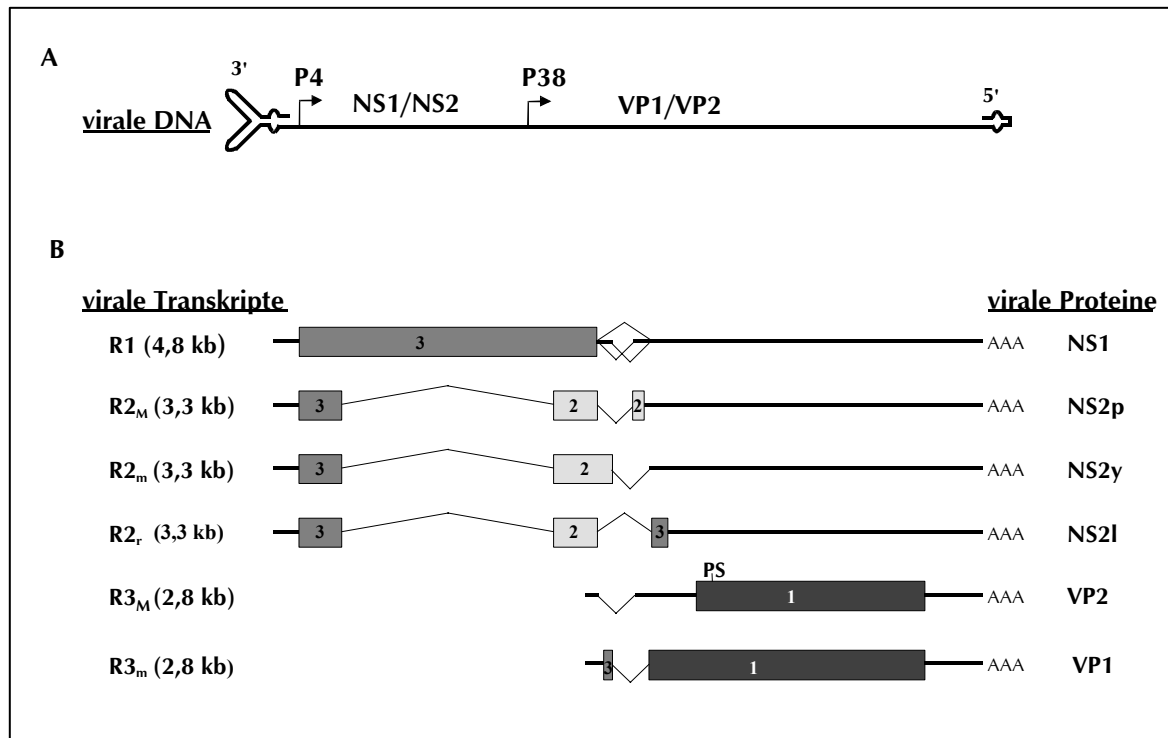
**Abb.2-1: Viruspartikel eines autonomen Parvovirus** (verändert nach Sgro und Spencer, *Encyclopedia of Virology*).

Hauptbestandteil der aus 60 Untereinheiten bestehenden Kapside ist VP2, das in einem Verhältnis 5:1 zu VP1 vorliegt. VP1 und VP2 stellen primäre Translationsprodukte dar (Cotmore et al., 1983, Rhode & Paradiso, 1983). Dagegen handelt es sich bei VP3 um ein proteolytisches Spaltungsprodukt von VP2, das nur in geringen Mengen entsteht (Tattersall et al., 1976). Die proteolytische Spaltung findet im Spätstadium der Infektion statt und wird nur bei infektiösen Partikeln beobachtet. Leere, nicht infektiöse Partikel zeigen dieses Spaltungsprodukt dagegen nicht (Paradiso, 1981; Santaren et al., 1993). Außen an den Viruspartikeln ist kovalent an das virale Genom ein NS1-Molekül gebunden (Cotmore & Tattersall, 1989).

## 2.5 Organisation des parvoviralen Genoms

Parvoviren besitzen eine ca. 5150 Basenpaare lange, einzelsträngige DNA negativer Polarität (Berns, 1996; Cotmore & Tattersall, 1987), s. Abb. 2-2. Am 3'- bzw. 5'-Terminus zeigt das parvovirale Genom nicht-identische, palindromische

Sequenzabschnitte, die als ITR-Regionen (*Inverted Terminal Repeats*) bezeichnet werden (Astell et al., 1983; Rhode & Paradiso, 1983). Diese falten sich zu Y- (3'-Ende) bzw. T-förmigen (5'-Ende) doppelsträngigen Sekundärstrukturen zurück, auch als Haarnadelschleifen bezeichnet. Sie beinhalten *cis*-aktive Sequenzen, die zur Replikation und Verpackung der DNA benötigt werden (Astell et al., 1985).



**Abb. 2-2: Genomorganisation der autonomen Parvoviren am Beispiel von MVMP**

**A:** Schematische Darstellung des einzelsträngigen parvoviralen Genoms negativer Polarität mit den beiden terminalen Haarnadelschleifen und den Promotoren P4 und P38 sowie den von ihnen kontrollierten Proteinen.

**B:** Das virale Genom kodiert für drei virale Transkriptklassen R1, R2 und R3, die durch die verschiedenen Spleißvarianten der kleinen Introns jeweils in drei Formen vorkommen (M, häufigste Transkriptform; m, seltenere Transkriptform; r, rare Transkriptform). Die viralen mRNAs kodieren für die Nichtstrukturproteine NS1, NS2<sub>p</sub>, NS2<sub>y</sub> und NS2<sub>l</sub> sowie für die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 in verschiedenen Leserastern (mit 1, 2, und 3 bezeichnet). AAA steht für den PolyA-Schwanz. PS: Proteolytische Schnittstelle von VP2, die zur Entstehung von VP3 führt.

Die 3'-Palindrome umfassen bei allen Vertretern der Gattung *Parvovirus* ca. 115 Nukleotide (nt) (Astell et al., 1979), während das 5'-Palindrom Speziesunterschiede zeigt. Im Falle von MVMP erstreckt es sich über 207 nt, im Falle von H1 über 245 nt (Astell et al., 1983; Rhode & Paradiso, 1983).

Das Genom unterteilt sich in zwei überlappende Transkriptionseinheiten mit jeweils einem Promotor (Abb.2-2 A; Cotmore & Tattersall, 1986; Cotmore & Tattersall 1987). Der „frühe“ Promotor P4 steuert die Synthese eines Transkripts, dessen Spleißvarianten

R1 und R2 (Abb. 2-2 B) für die regulatorischen nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2 kodieren. Unter der Kontrolle des „späten“ Promotors P38 wird das R3-Transkript (Abb. 2-2 B) abgelesen. Durch alternatives Spleißen entstehen hieraus die mRNAs für die Kapsidproteine VP1 und VP2 (Jongeneel et al., 1986; Labieniec-Pintel und Pintel, 1986; Morgan & Ward, 1986).

## 2.6 Der virale Lebenszyklus

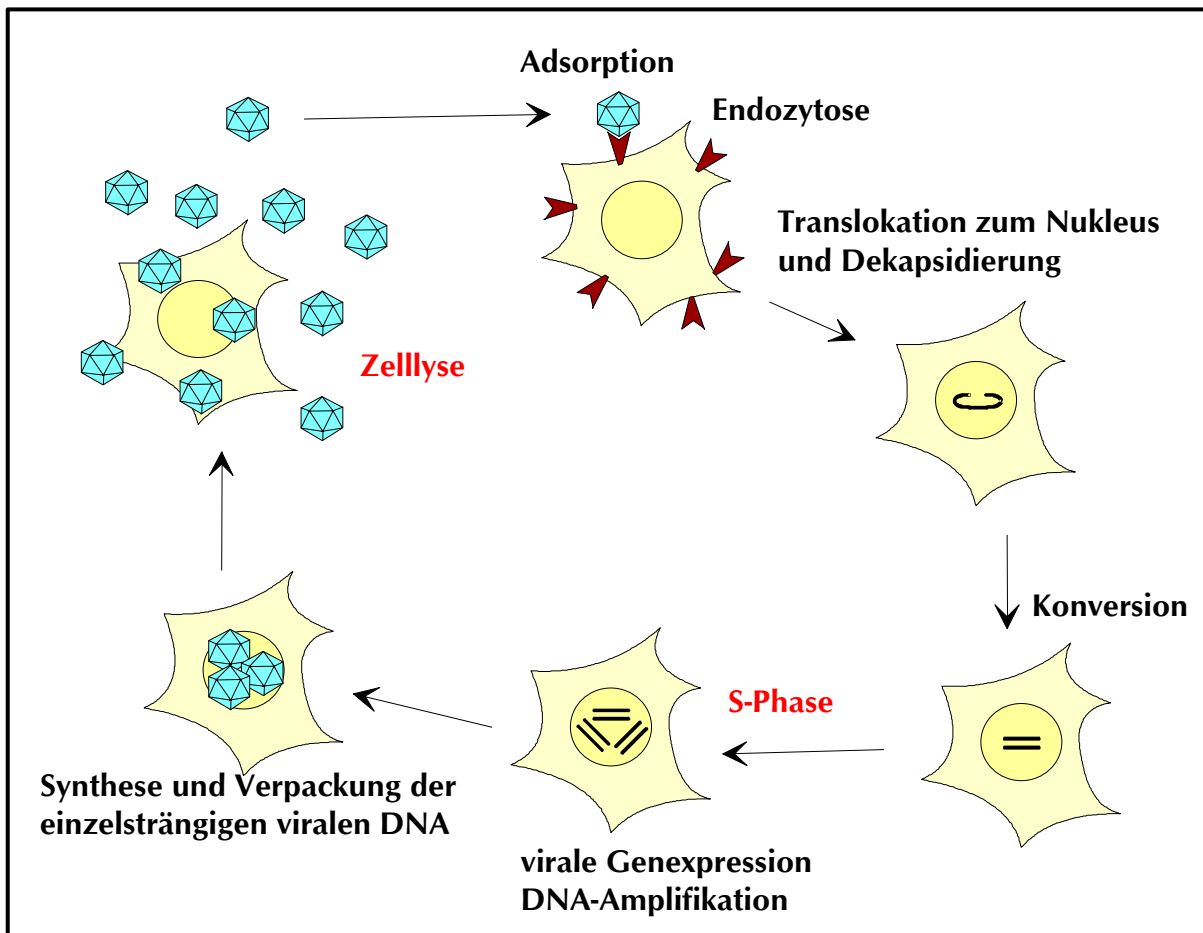


Abb.2-3: Der lytische Zyklus der autonomen Parvoviren

Der erste Schritt bei der Infektion permissiver Zellen ist die **Adsorption** der Virionen an Rezeptoren an der Zelloberfläche. Für MVMp ist das wahrscheinlich ein Protein mit *N*-Acetyl-Neuraminsäureresten, da es eine Sensitivität gegenüber Trypsin- und Neuraminasebehandlung zeigt (Cotmore & Tattersall, 1987). Dieser Rezeptor kommt auf unterschiedlichsten Zelltypen in großer Anzahl ( $1-5 \times 10^5$ ) vor (Linser et al., 1977; Spalholz und Tattersall, 1983). B19 benutzt das Blutgruppenantigen P als Rezeptor (Brown et al., 1993), das CPV den Transferrinrezeptor (Parker et al., 2001). Die Virusaufnahme erfolgt über dynamin-abhängige **Endozytose** (Parker & Parrish, 1997; &



2000), unabhängig von der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zelle gerade befindet (Rhode, 1973; Siegel & Gautschi, 1973). Über das frühe Endosom und weiter über das späte Endosom gelangt das Virus in den perinuklearen Bereich, von wo aus die virale DNA in den Nukleus gelangt. Hierfür wird die katalytische Phospholipase A<sub>2</sub>-Domäne des VP2-Proteins benötigt (Parker & Parish, 2000; Zádori et al., 2001). Dieser Vorgang wird als **Dekapsidierung** bezeichnet. Dabei scheinen die Kapsidproteine größtenteils im Zytoplasma zurück zu bleiben und die virale DNA gelangt in den Kern (Zádori et al., 2001). Die folgenden Schritte können erst mit Eintritt der Zelle in die S-Phase stattfinden (Wolter et al., 1980; Cotmore & Tattersall, 1987). Die nachfolgende **Konversion** ist Cyclin A abhängig (Bashir et al., 2000). Hier wird durch die Synthese des komplementären viralen DNA-Stranges aus dem einzelsträngigen Virusgenom eine doppelsträngige replikative Form gebildet. Erst jetzt kann die **Genexpression** beginnen und die **Amplifikation und Synthese einzelsträngiger Nachkommen-DNA** eingeleitet werden. Nach der **Verpackung** der einzelsträngigen DNA in die Kapside, werden bei einer produktiven Infektion die Virionen durch **Lyse** der Wirtszelle freigesetzt. Autonome Parvoviren sind nicht in der Lage, die von ihnen zur Replikation benötigte S-Phase zu induzieren, sondern können erst mit der DNA-Replikation beginnen, wenn die Wirtszelle selbst in die S-Phase eintritt. Die Akkumulation der Nichtstrukturproteine führt über noch ungeklärte Mechanismen zum Abschalten der zellulären DNA-Replikation. Vorstellbar ist dabei, dass das Parvovirus einen Großteil der in der Zelle vorliegenden dNTPs oder die zelluläre Replikationsmaschinerie für die eigene Replikation verwendet und sie deshalb nicht mehr der zellulären DNA-Replikation zu Verfügung stehen (Cotmore & Tattersall, 1987). Damit wird die Wirtszelle in der späten S-Phase arretiert (Op De Beeck et al., 1995; Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997; Corbau et al., 1999). In nicht proliferierenden Zellen können autonome Parvoviren über längere Zeit latent vorliegen, ohne in das Wirtszellgenom zu integrieren (Richards & Armentrout, 1979).

## 2.7 Parvoviraler Tropismus

Ein Parvovirus zeigt Tropismus für einen Zelltyp, wenn er verstärkt von diesen Zellen aufgenommen wird und dort repliziert.

Zwei verschiedene, aber gleich bedeutsame Aspekte sind zu beachten: zum einen der Tropismus des Parvovirus für bestimmte Zellarten, also Speziespezifität, aber auch

Gewebespezifität. Zum anderen die Abhängigkeit des Parvovirus von dem Zustand, in dem sich eine Zelle befindet, also der Zellzyklusphase und dem Differenzierungsgrad.

### **Spezies- und Gewebespezifität**

Autonome Parvoviren zeigen ein breites Wirtsspektrum. Sie können viele Vertebraten infizieren. Dabei gibt es einige Parvoviren, die sehr spezifisch nur bestimmte Zellarten einer bestimmten Spezies infizieren, wie z.B. B19, das auf Grund seines Rezeptors P Antigen Globosid spezifisch humane Erythrozyten infiziert (Brown et al., 1993). Andere Parvoviren, wie die in dieser Arbeit verwendeten Nagerparvoviren, das murine MVMp Virus und das Ratten Parvovirus H1, zeigen ein wesentlich breiteres Wirtsspektrum. Sie können nicht nur in Zellen ihres natürlichen Wirts replizieren, sondern auch in verschiedenen humanen Zelllinien, wie z.B. in Fibroblasten, in epithelialen und in hämatopoetischen Zellen; eine Eigenschaft, mit der sie für die Gentherapie bedeutsam werden (Rommelaere & Cornelis, 1991; Dupressoir et al., 1989; Chen et al., 1989; Cornelis et al., 1988; Cornelis et al., 1990; Rayet et al., 1998; Telerman et al., 1993; Bass & Hetric, 1978; Su et al., 1988; Faisst et al., 1989;). MVM liegt in zwei alotrophischen Stämmen vor, dem fibroblastischen MVMp-Stamm, der murine Fibroblasten (z.B. A9 Zellen) produktiv infiziert und dem MVMi-Stamm, der T-Lymphozyten produktiv infiziert. Den jeweiligen anderen Zelltyp können sie nicht produktiv infizieren (Tattersall & Bratton, 1983). Der Tropismus ist durch eine kleine Region im **Kapsid** determiniert. Der Austausch zweier Aminosäuren in diesem Bereich genügt um aus dem sonst lymphotropen MVMi-Virus eine fibrotrope Variante zu machen (Ball-Goodrich & Tattersall, 1992; Previsani et al., 1997; Gardiner & Tattersall, 1988). An Hand einer Pseudotypisierung des Lulll-Genoms mit MVMi- oder MVMp-VP1- und VP2-Kombinationen konnten Maxwell und Mitarbeiter zeigen, dass VP2 dabei die Hauptrolle spielt (Maxwell et al., 1993, 1995). Diese Restriktion findet ihre Ursache in der frühen Infektionsphase, nach der Penetration, aber vor der viralen Transkription. MVMp und MVMi binden an der Zelloberfläche und werden aufgenommen, unabhängig davon, ob die Zelle permissiv ist oder nicht (Spalholz et al., 1983; Previsani et al., 1997). MVMp scheint dann aber nicht in der Lage zu sein, die virale Transkription in Mäuse T-Lymphozyten zu initiieren (Previsani et al., 1997). Zusammen mit der Erkenntnis, dass nach Transfektion muriner Fibroblasten sowohl MVMp, als auch MVMi virale Replikation zeigen, ist anzunehmen, dass Dekapsidierungsprobleme dabei eine Rolle spielen könnten (Gardiner & Tattersall, 1988). Auch die Speziespezifität der caninen, porcinen

und feline Parvoviren wird durch das Kapsid determiniert (Truyen & Parrish, 1992; Spitzer et al., 1996; Vasudevacharya & Compans, 1992). Für das CPV wurde vor kurzem als Zellrezeptor der Transferrinrezeptor identifiziert (Parker et al., 2001). Auch der **Infektionsweg** hat Einfluss darauf, ob es zu einer produktiven Infektion kommt. So kann eine Behandlung, die den Transport von dem frühen in das späte Endosom blockiert, eine produktive Virusinfektion inhibieren (Vihinen-Ranta et al., 1998; Douar et al., 2001; Hansen et al., 2001).

Bei MVMp ist bekannt, dass **NS2** zu einer produktiven Infektion von Zellen der natürlichen Wirtsspezies benötigt wird (Naeger et al., 1990; Brownstein et al., 1992; Cater & Pintell, 1992).

In der **Gewebespezifität** der Parvoviren spiegelt sich ihre Abhängigkeit von schnell teilenden Zellen wieder. So wie aus einem breiten Zellspektrum bei fetalen Geweben ein engeres Zellspektrum in adulten Tieren, die infiziert werden können. Felines, wie auch canines Parvovirus findet sich bei einer Infektion adulter Tiere gehäuft in lymphoiden und intestinalen Geweben, also in Organen mit schnell replizierenden Zellen (Truyen, 1995) wieder.

### **Differenzierungs- und Proliferationsgrad der Zelle**

Das parvovirale Genom kodiert nur für vier Proteine. Aus diesem Grund sind Parvoviren in ihrem Replikationszyklus stark von zellulären Faktoren abhängig. Um die Replikation eines Parvovirus zu ermöglichen, muss sich die Zelle in der mitotischen **S-Phase** befinden, in der sie dann durch die parvovirale Replikation arretiert wird. (Siegl, 1984; Jaoby et al., 1996).

Andererseits spielt auch der **Differenzierungsgrad** einer Zelle eine wesentliche Rolle. Bei der differenzierungsabhängigen Restriktion wird die parvovirale Replikation in den meisten Fällen durch die Schritte gehemmt, die der Absorption folgen. (Spalholz & Tattersal, 1983; Takahashi et al., 1990; Segovia et al., 1995; Segovia et al., 1999).

Die ersten Parvoviren wurden aus Tumoren, Tumorzelllinien und Präparationen onkogener Viren isoliert (Kilham & Olivier, 1959; Lum & Schreier, 1963; Toolan et al., 1962). Nach anfänglichem Verdacht onkogen zu sein, stellte sich heraus, dass sie opportunistisch in den Neoplasien vorliegen. In Zellkulturversuchen konnte für Menschen- und Nagierzellen gezeigt werden, dass eine maligne **Transformation in vitro** durch verschiedene Behandlungen (Bestrahlung, Chemikalien, Onkogene) sowohl die virale DNA-Replikation und die Genexpression als auch den zytopathischen Effekt der

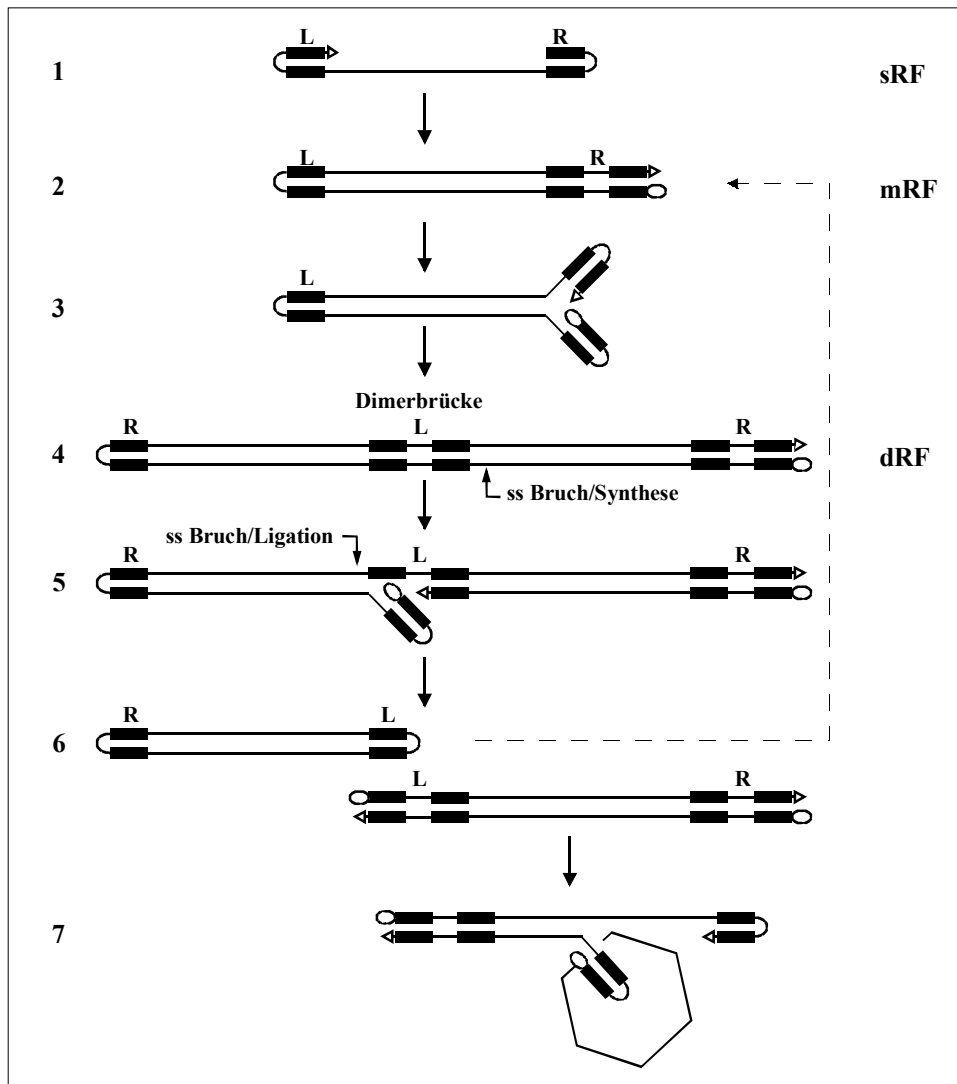
Parvoviren verstärkte. Die Menge der Virusaufnahme durch die Zelle blieb dabei unbeeinflusst. (Dupressoir et al., 1989; Chen et al., 1986, 1989; Cornelis et al., 1988a+b, 1990). Allerdings muss gesagt werden, dass transformierte Zellen mit ihrer höheren viralen DNA-Amplifikation nicht immer in der Lage sind, eine vollständige Infektion mit der Entstehung von Nachkommenviren zu ermöglichen (Cornelis et al., 1988; Guetta et al., 1990).

## 2.8 Parvoviraler Replikationszyklus

Die im Nukleus stattfindende parvovirale DNA-Replikation folgt einem unidirektionalen rollenden Haarnadelmechanismus (*rolling hairpin mechanism*) (Tattersall & Ward, 1976; Astell et al., 1985). Dabei sind sowohl die beiden terminalen Palindrome (Faust & Ward, 1979; Cotmore & Tattersall, 1994) sowie interne Replikationssequenzen am 5'-Ende des Genoms von Bedeutung (Astell et al., 1996; Brunstein & Astell, 1997). Im doppelsträngigen Stamm des 3'-Palindroms von MVM entsteht zwischen den Nukleotiden 25 - 26 und 88 - 91 eine Blase, die für die Initiation der viralen Replikation essentiell ist (Faust & Ward, 1979; Astell et al., 1985; Cotmore & Tattersall, 1987; Cotmore & Tattersall, 1994). Außerdem werden für die virale Replikation eine Reihe von zellulären Faktoren benötigt, die transient während der S-Phase exprimiert werden (Cotmore & Tattersall, 1987; Deleu et al., 1999).

In Abb. 2-4 ist die DNA-Replikation der autonomen Parvoviren schematisch dargestellt (Baldauf et al., 1997; Cotmore et al., 1995; Cotmore & Tattersall, 1998; Willwand et al., 1998). Im ersten Schritt, der Konversion, entsteht aus der einzelsträngigen Virus-DNA durch die Synthese des komplementären DNA-Stranges die doppelsträngige monomere replikative Form (mRF). Dabei dient die zurückgefaltete Haarnadelstruktur des 3'-Endes der zellulären DNA-Polymerase als Primer. Dieser Vorgang ist ausschließlich von zellulären Faktoren abhängig. Cyclin A aktiviert dabei die komplementäre DNA-Strang Synthese (Kollek et al., 1982; Deleu et al., 1999; Bashir et al., 2000). Die so entstandene mRF agiert als Matrize für die virale mRNA-Synthese. Somit kann das für die weiteren Schritte essentielle NS1-Protein exprimiert werden. Durch fortschreitende Einzelstrangverdrängungssynthese entsteht aus der mRF die dimere replikative Form (dRF), aus der durch fortlaufende Replikation tetramere Formen entstehen können (Cotmore & Tattersall, 1992). Anschließend werden aus diesen multimeren Formen

durch NS1-vermittelte sequenzspezifische Einzelstrangsnitte monomere einzelsträngige Genome herausgeschnitten (Cotmore & Tattersall, 1992; Cotmore & Tattersall, 1994; Nüesch et al., 1995), an deren 5'-Enden je ein NS1 kovalent gebunden bleibt (Cotmore & Tattersall, 1989).



**Abb.2-4: Modifizierte Rollende-Haarnadel-Replikation autonomer Parvoviren**

Das durch die Infektion eingebrachte einzelsträngige Genom (sRF, 1) wird von den Polymerasen der Wirtszelle verlängert. Nach Einzelstrangbruch durch NS1 und Replikation des ausgedehnten rechten Endes entsteht eine doppelsträngige monomere replikative Form (mRF, 2). Die Enden auf der rechten Seite falten sich zurück (3) und vom 3'-Strang ausgehend wird eine doppelsträngige dimere replikative Form (dRF, 4) synthetisiert. Das ausgedehnte linke Ende verbindet als „Dimerbrücke“ in der Mitte dieser Struktur zwei gegenläufig orientierte virale Genome. Anschließend wird die „Dimerbrücke“ durch einen ersten von NS1 eingeführten Einzelstrangbruch und Verdrängungssynthese des linken Endes (5), sowie durch einen zweiten von NS1 eingeführten Einzelstrangbruch und Ligation (6) asymmetrisch aufgelöst. Das kovalent geschlossene Molekül wird nach einem weiteren Einzelstrangbruch wieder verwertet. Das vollständig ausgedehnte Molekül wird verschiedenen Prozessen von Haarnadeltransfer und Verdrängungssynthese unterzogen, um schließlich die einzelsträngige DNA der Nachkommenviren zu bilden (7). Dicke Linien repräsentieren palindromische Sequenzen, ein Dreieck stellt die Richtung der DNA-Synthese und ein Oval das an den 5'-Enden kovalent gebundene NS1 dar. Das Hexagon symbolisiert die Verpackung in Kapside. ss-Bruch: von NS1 eingeführter Einzelstrangbruch; L = linkes (3') Ende, R = rechtes (5') Ende; sRF, mRF, dRF = einzelsträngige, monomere, und dimere replikative Form.

Für die Synthese einzelsträngiger Nachkommen-DNA ist die Anwesenheit vorgeformter Kapside von Nöten. Umgekehrt erfordert die Verpackung infektiöser Nachkommenviren fortlaufende DNA-Synthese (Hardt et al., 1983). Der Verpackungsmechanismus ist dabei noch ungeklärt. Interaktionen zwischen den Palindromen und dem Kapsid scheinen dabei eine Rolle zu spielen (Willwand & Hirt, 1991). Bei MVM und H1 wird hauptsächlich der zur RNA komplementäre Minusstrang verpackt (Bates et al., 1984). Für AAV wurde ein Modell entwickelt, wonach die Rep2-Proteine durch ihre Helikasefunktion die einzelsträngige Virus-DNA in die vorgeformten leeren Kapside „pumpt“ (King et al., 2001).

## **2.9 Die nichtstrukturalen Proteine**

### ***NS1***

NS1 ist ein 83-86 kDa schweres Protein mit einer Kernlokalisationssequenz (KLS), die in infizierten Zellen zu einer Akkumulation im Zellkern führt (Cotmore & Tattersall, 1987; Nüesch et al., 1992; Nüesch & Tattersall, 1993). NS1 ist ein zur Oligomerisation befähigtes Phosphorprotein (Nüesch & Tattersall, 1993; Pujol et al.; 1997), das viele verschiedene Funktionen, abhängig von seinem Phosphorylierungs-Status, über den gesamten parvoviralen Lebenszyklus hinweg hat. Für die virale DNA-Replikation ist es in allen permissiven Zellen essentiell (Cotmore & Tattersall, 1987; Tullis et al., 1988; Naeger et al., 1990). Zu seinen multifunktionellen Eigenschaften gehören ATP-Bindung, ATPase- und Helikase-Aktivität (Wilson et al., 1991; Christensen et al., 1995). Außerdem fungiert NS1 in der parvoviralen Replikation als strang- und sequenzspezifische Endonuklease (Cotmore et al., 1992; Nüesch et al., 1995; Christensen et al., 1997; Cotmore & Tattersall, 1998).

Als spezifische Bindungsstelle für das NS1-Protein wurde das DNA-Element [ACCA]<sub>2-3</sub> beschrieben, welches an mehreren Stellen des viralen Genoms zu finden ist (Cotmore et al., 1995; Christensen et al.; 1995). Dort kann NS1 im oligomerisierten Zustand unter Anwesenheit von ATP binden (Nüesch & Tattersall, 1993; Cotmore et al., 1995). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass NS1 mit verschiedenen Zellproteinen interagiert. Die biologische Funktion ist noch ungeklärt (Kradý & Ward, 1995; Cziepluch et al., 1998; Kordes et al., 1998; Harris et al., 1999)

## **NS1, ein zytotoxisches Protein**

Eine besonders interessante Eigenschaft von NS1 ist seine ausgeprägte Zytotoxizität, die auch in den parvoviralen Vektoren ausgenutzt wird. NS1 allein ist ausreichend, um das Absterben sensitiver Zellen zu induzieren (Caillet-Fauquet et al., 1990). Allerdings scheint in NB-E Zellen (humane SV 40 transformierte Nieren-Zelllinie) NS2 notwendig zu sein, um einen maximalen zytotoxischen Effekt zu erreichen (Brandenburger et al., 1990). Der Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von NS1 ist noch nicht geklärt, verschiedene Aktivitäten von NS1 könnten dabei eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang ist beschrieben worden, dass NS1 mit dem Zellzyklus und der Phosphorylierung zellulärer Proteine interferiert (Op De Beeck et al., 1995; Anouja et al., 1997), Einzelstrangbrüche in der zellulären chromosomalen DNA induziert (Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997), verschiedene zelluläre Promotoren transreguliert (Legendre & Rommelaere, 1994; Vanacker et al., 1996) und morphologische Veränderungen in der Zelle hervorruft (Caillet-Fauquet et al., 1990). Sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich des NS1-Proteins sind offenbar für den zytotoxischen Effekt von Bedeutung (Legendre & Rommelaere, 1992).

Interessanterweise sind neoplastisch transformierte Zellkulturen sensitiver gegenüber einer NS1-vermittelten Zytotoxizität als nicht-transformierte. Der Grund kann darin liegen, dass in transformierten Zellkulturen sowohl die virale DNA-Replikation als auch NS-Transkription und NS-Expression erhöht sind, was zur Akkumulation einer höheren Menge an NS-Proteinen in der Zellkultur führt (Cornelis et al., 1988; Mousset et al., 1994).

## **NS1 und seine transaktivierenden Eigenschaften: cDNA-Arrays, eine neue Chance**

Wie oben schon erwähnt, kann NS1 neben den beiden parvoviralen Promotoren P4 und P38 verschiedene zelluläre und heterologe virale Promotoren transaktivieren oder transinhibieren (Legrende & Rommelaere, 1994; Vanacker et al., 1996).

Sowohl unter dem Gesichtspunkt der Virologie als auch im Hinblick darauf, Parvoviren als Vektoren in der Gentherapie einzusetzen, ist es von wissenschaftlichem Interesse, zu erfahren, auf welche zellulären Gene das Parvovirus regulatorischen Einfluss nehmen kann oder von welchen zellulären Genen das Parvovirus abhängig ist. Dies könnte Antworten auf verschiedene Fragen im viralen Lebenszyklus geben. Eine besonders interessante Fragestellung, gerade im Hinblick auf die von uns benutzten Vektoren, welche die zytotoxische Wirkung von NS1 zusätzlich zur Transgenwirkung ausnutzen, ist die zytotoxische Wirkungsweise des NS1-Proteins nach Infektion. Zur Untersuchung einer solchen Fragestellung bietet sich eine erst in neuester Zeit entwickelte Methode an: die **c-DNA-Arrays**. Mit dieser Methode ist es möglich über einen semiquantitativen Mengenvergleich der zellulär exprimierten mRNA Aussagen über die Hoch- oder Herunterregulation bestimmter Gene zu machen, in unserem Falle verursacht durch eine parvovirale Infektion. Diese Methode kann in vielen Gebieten der modernen Biologie eingesetzt werden. Mit ihr können Grundfragen der Biologie untersucht werden: zum Beispiel die Funktion neuer uncharakterisierter Gene, die Annotation des humanen Genoms und das Erforschen biologischer Regulationswege, sowie Veränderungen in der zellulären Genexpression während der Entwicklung, bei krankhaften Veränderungen oder unter dem Einfluss verschiedener Substanzen. Dies ermöglicht einen Einsatz in der Medizin und Pharmazie, um im ersten Schritt Krankheitsmechanismen auf molekularer Ebene zu untersuchen, daran anschließend genauere Diagnosen zu erstellen, die dann eine gezielte und angemessene Therapie ermöglichen. So können in der Krebstherapie Tumormaker identifiziert werden, die zur Diagnose oder zur Prognose verwendet werden können (He & Friend, 2001; Young, 2000).



**NS1: zellzyklusabhängig und zellzyklusbeeinflussend**

Die Expression von NS1 findet in der S-Phase statt. Im Zusammenhang damit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des MVMp-P4-Promotors durch den Transkriptionsfaktor E2F reguliert wird und somit an die S-Phase des Zellzyklus gekoppelt ist (Deleu et al., 1998,1999). Ist NS1 exprimiert, akkumulieren die sensitiven Zellen einer Zellpopulation in der S- und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus (Op De Beeck et al., 1995; Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997). Infizierte Zellen zeigen also einen ungleich höheren Anteil an S- bzw. G<sub>2</sub>-Phase-Zellen als nicht infizierte Zellen.

**NS2**

Das wesentlich kleinere Phosphoprotein NS2 hat ein Molekulargewicht von 23-28 kDa und ist im Gegensatz zum NS1-Protein in phosphorilierter Form vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert, kann aber auch in nichtphosphorilierter Form im Zellkern vorgefunden werden (Cotmore & Tattersall, 1990).

Im Falle von MVMp gibt es drei, für H1 zwei, durch alternatives Spleißen der prä-mRNA entstehende Isoformen, die sowohl in phosphorilierter, wie auch in nicht-phosphorilierter Form in der Zelle vorliegen (Cotmore & Tattersall, 1990) und sich lediglich in 6-15 Aminosäuren im C-terminalen Bereich unterscheiden. Dabei sind die ersten 85 N-terminalen Aminosäuren von NS2 mit denen von NS1 identisch (Cotmore & Tattersall, 1986). Zu Beginn der Infektion ist NS2 auf Grund der wesentlich höheren Menge an NS2-Transkripten im Gegensatz zu NS1-Transkripten das dominierende virale Protein (Cotmore & Tattersall, 1990; Schoborg & Pintel, 1991). Mit fortschreitender Infektion sinkt die Aktivität des P4-Promotors und es kommt auf Grund der längeren Halbwertszeit von NS1 zu seiner Akkumulation, während NS2 mit einer einstündigen Halbwertszeit eher instabil ist (Schoborg & Pintel, 1991).

Durch Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass NS2 mit zwei Mitgliedern der 14-3-3 Proteinfamilie (Brockhaus et al., 1996) sowie mit CRM1 (*Chromosom Region Maintenance Protein 1*), einem nuklearen Transportfaktor, (Bodendorf et al., 1999) interagiert.

Die **Funktion** des NS2-Proteins ist nach wie vor noch ungeklärt. In menschlichen SV 40 transformierten Nierenzellen (NB-E) führt es zu einem verstärkten zytotoxischen Effekt

von NS1, NS2 allein allerdings besitzt nur eine sehr geringe zytotoxische Aktivität (Brandenburger et al., 1990). Für NS2 von MVMP wurde außerdem gezeigt, dass es für eine produktive Infektion von Zellen der natürlichen Wirtsspezies (Maus) essentiell ist (Naeger et al., 1990; Brownstein et al., 1992; Cater & Pintel, 1992). Dabei war die Replikationsrate von NS2-Deletionsmutanten verglichen mit dem Wildtyp wesentlich geringer. Auch die Translation der viralen Proteine und der Zusammenbau der Kapside waren bei diesen Mutanten erheblich beeinträchtigt (Li & Rhode, 1991; Cater & Pintel, 1992; Naeger et al., 1993; Cotmore et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist NS2 bei der Infektion menschlicher Zellen entbehrlich (Naeger et al., 1990; Naeger et al., 1993).

## **2.10 Autonome Parvoviren in der onkologischen Gentherapie**

Obwohl die ersten Parvoviren aus Tumoren isoliert wurden, stellte sich bald heraus, dass die Viren dort opportunistisch vorliegen und nicht Ursache des Tumors sind. Wegen ihrer lytischen Eigenschaften und der geringen Pathogenität der Nagerviren für adulte Tiere wurden Parvoviren zur Behandlung von Tumoren diskutiert. Diese Idee wurde in der Entwicklung der Gentherapie mit neuen Möglichkeiten wieder aufgenommen.

### **2.10.1 Allgemeines zur Gentherapie**

Ziel der Gentherapie ist es, Gene (Transgene) in eine Zelle einzubringen, deren Produkte eine Krankheit heilen oder zumindest deren Verlauf verlangsamen können. Dementsprechend ist die Gentherapie definiert als „Das Einschleusen neuen genetischen Materials in Zellen eines Individuums mit daraus folgendem therapeutischen Nutzen für das Individuum“ (Morgan & Anderson, 1993). Sie ist eine vergleichsweise junge Disziplin. Erst seit ca. 15 Jahren wird sie in der Humanmedizin angewandt und zeigte erst kürzlich klinische Erfolge, insbesondere auf dem Gebiet der Hämophilie, der kardiovaskulären Erkrankungen (Curiel et al., 2000) und des SCID (Severe Combined Immunodeficiency Syndrom) (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Auch in der Onkologie ist die Gentherapie eine häufig verfolgte Strategie im experimentellen Stadium.

## Vektoren

Die Vehikel, welche benutzt werden, um Gene in Zellen zu schleusen, nennt man Vektoren. In der Gentherapie gegen Krebs sollen sie in der Lage sein, gezielt Gene in die entarteten Zellen zu transferieren und dort zu einer transienten Genexpression zu führen. Die Produktion der Vektoren sollte im industriellen Maßstab möglich sein. Dabei ist auch eine Konzentrierbarkeit in geringen Endvolumina wünschenswert. Die Größe des zu benutzenden Transgens sollte nicht zu stark durch das benutzte Vektorsystem limitiert sein. Der benutzte Vektor sollte optimalerweise weder zu einer humoralen noch zu einer zellulären Immunreaktion führen, so dass er wiederholt appliziert werden kann. Die wichtigste Anforderung an ein Vektorsystem ist ein hohes Maß an Sicherheit und Kontrollierbarkeit. Keines der zur Zeit verfügbaren Vektorsysteme kann all diesen Ansprüchen genügen. Man kann zwischen viralen und nicht viralen Vektoren unterscheiden.

Bei den **nicht viralen Transfermethoden** kann unterschieden werden zwischen physikalischen (direkte DNA-Injektion, Elektroporation, Ballistik), chemischen (Kalzium-Phosphat-Präzipitation, Liposomen, Polylysin-Konjugate) und biologischen Methoden (künstliche Chromosome). Nicht virale Vektoren können in relativ großen Mengen produziert werden und zeigen kaum Toxizität oder Immunogenität. Ihr großer Nachteil liegt allerdings darin, dass sie einen relativ ineffizienten und unselektiven Gentransfer bewirken und nur zu einer transienten Genexpression führen (Nishikawa & Huang, 2001; Somia & Verma, 2000).

Eine meist größere Effizienz im Gentransfer zeigen genetisch modifizierte Viren, sogenannte **virale Vektoren**. Viren haben während ihrer Evolution sehr wirkungsvolle Strategien entwickelt, ihre Gene in Form von RNA oder DNA in humane Zellen einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen (Verma & Somia, 1997). Hierbei gibt es nicht-integrierende Viren (Adenoviren, autonome Parvoviren) und integrierende Viren (Retroviren, Lentiviren, adeno-assoziierte Viren (AAV)), die zu einer lebenslangen Expression des integrierten Gens führen können. In Tab. 2-3 sind die meist bekanntesten viralen Vektoren aufgelistet.

**Tab. 2-3: Virale Vektoren für die Gentherapie**

	Retro- Viren	Adeno- viren	Herpes- viren	Vaccinica- viren	AAV	Autonome Parvoviren
Max. Größe der Fremd-DNA	8 kb	8-35 kb	150 kb	> 30 kb	1-4,5 kb	1-4,8 kb
Titer	$>10^8$	$>10^{11}$	$>10^8$	?	$>10^{10}$	$> 10^7$
Integration in das Genom	ja	nein	nein	nein	ja*	nein
Onkogenität	ja	ja	?	?	nein	nein
Expression viraler Proteine	nein	ja	ja	ja	ja/nein	ja/nein
Anhaltende Trans- genexpression	lang- anhaltend	transient	transient (zpE)	transient (lytisch)	ja	transient
In vivo Transfer	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Transduktion ruhender Zellen	nein	ja	ja	ja	ja*	nein

*Kombiniert nach Verma und Somia (1997), Hodgson (1995) und Kestler et al. (1999)*

\*sehr ineffizient; zpE: zytopathogener Effekt

### Gentherapie in der Onkologie

Über 70% der klinischen Studien auf dem Gebiet der Gentherapie werden in der Onkologie durchgeführt. Das liegt zum einen daran, dass das Wissen über die Krankheit „Krebs“ wächst, zum anderen dass immer mehr therapeutische Gene verfügbar werden und dennoch oft alternative Therapien fehlen (Curiel et al., 2000). Drei verschiedene Ansätze werden in der gentherapeutischen Krebstherapie verfolgt: der

immuntherapeutische Ansatz, der Einsatz von Suizidgenen und die kausale Therapie. Ziel einer **Immuntherapie** ist das Immunsystem so zu unterstützen, dass es in der Lage ist, Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Dies kann durch die lokale Überexpression von Zytokinen, tumorspezifischen Antigenen oder durch den Transfer von Genen geschehen, die für kostimulatorische Moleküle kodieren. Das Prinzip der **Suizidgene** beruht auf der Umwandlung einer wenig toxischen systemisch zugeführten Prodrug durch das therapeutische Genprodukt in ein zytotoxisches Agens. Mit zunehmendem Verständnis der molekularen Ereignisse, die an der Karzinogenese beteiligt sind, eröffnen sich Möglichkeiten für eine **kausale Therapie**. Dabei versucht man die Komplementation eines defekten Tumorsuppressor-Gens durch die Übertragung einer intakten cDNA (Hause & Schackert, 2000).

### **Virale Vektoren in der onkologischen Gentherapie**

**Retrovirale Vektoren** sind die bis heute am häufigsten verwendeten Transfersysteme in Gentherapiestudien. Die gegenwärtig verwendeten Vektoren wurden von dem Murinen Leukämia Virus (MMLV) abgeleitet. Sie sind replikationsdefizient und tragen zur Sicherheitsvorsorge eine Reihe von Mutationen und Deletionen, welche Rekombinationen und die Bildung rekombinationskompetenter Viren verhindert (Miller, 1990). Durch die zufällige Integration in das humane Genom besteht das theoretische Risiko, dass es zur Aktivierung von Protoonkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommt und als Folge dessen, eine benigne Zelle in einen malignen Zustand transformiert wird (Donahue et al., 1992).

**Lentivirale Vektoren** sind eine Untergruppe der Retroviren. Sie können zusätzlich auch ruhende Zellen transduzieren, was sie für einen Einsatz in der Krebstherapie nur bedingt nutzbar macht (Lewis et al., 1992; Bukrinsky et al., 1993). Ein weiteres Sicherheitsrisiko ist die mögliche Rekombination, die zur Produktion pathogener Viren führen kann (Haubrich et al., 1995). Ein Risiko, welches mit der neuesten Generation lentiviraler Vektoren relativ gering geworden ist. Diese beinhalten nur noch 25% des viralen Genoms in den Verpackungs- und 5% in den Vektorkonstrukten (Somia & Verma, 2000).

Auch **adenovirale Vektoren** werden in der Krebstherapie eingesetzt. Sie besitzen ein weites Spektrum an infizierbaren Zellen und können ihre genetische Information auch in ruhende Zellen übertragen, was für eine Therapie von Gendefekten von Vorteil, für die Behandlung von Krebs aber von Nachteil ist (Le Gal La Salle et al., 1993; Smith et al., 1993). Außerdem ist die Verwendung adenoviraler Vektoren durch die Immunogenität der viralen Proteine eingeschränkt, weil sie eine Immunantwort gegen das Virus und die infizierten Zellen hervorruft. Dadurch kommt es zur Eliminierung der transfizierten Zellen. Eine wiederholte Infektion ist generell nicht erfolgreich (Brody & Crystal, 1994).

Die DNA des **AAV** Virus integriert sequenzspezifisch in eine definierte Region auf dem Chromosom 19. Diese Eigenschaft konnte bisher leider nicht in den AAV abgeleiteten Vektoren erhalten werden (Muzyczka, 1992). AAV zeigt onkosuppressive Eigenschaften (Kischstein et al., 1968), ein offensichtlicher Vorteil für die Krebstherapie. Allerdings werden sowohl ruhende als auch proliferierende Zellen transduziert, was dem Zweck einer zielgerichteten Tumortransduktion widerspricht. Adeno-assoziierte Viren gelten zwar als apathogen (Kotin, 1994), wurden aber mit Spontanaborten in den ersten Schwangerschaftswochen in Verbindung gebracht (Tobiasch et al., 1994). Außerdem haben neueste Studien gezeigt, dass in Abhängigkeit von der Applikation der AAV-Vektoren unerwünschte Immunreaktionen auftreten können (Zhang et al., 2000).

Einen anderen Ansatzpunkt haben die **onkolytischen Herpes-** und **Reoviren**. Sie werden als replikationsfähige Viren verwendet, die Nachkommenviren bilden können und den Tumor durch ihre onkolytische Aktivität zerstören. Hierbei ist ein äußerst genaues Targeting der Viren nötig. Im Falle der Reoviren, doppelsträngigen RNA-Viren, geschieht das durch die Abhängigkeit ihrer Replikation vom aktivierten Ras-Signal- Regulationsweg, was ihren Einsatz auf bestimmte Tumoren, wie zum Beispiel verschiedene maligne Gliome, beschränkt (Wilcox, 2001). Auch das neurotrope Herpesvirus wird für die Behandlung neuraler Tumore verwendet. Hierbei gestaltet sich das Targeting auf entartete Tumorzellen umständlicher. Es konnten mehrere Sequenzen deletiert werden, die für die Neurovirulenz verantwortlich sind, ohne die Replikation in und die Zerstörung von Tumorzellen zu verhindern. Außerdem stehen antivirale Herpesmedikamente zur Verfügung, falls es doch zu einer unerwünschten lokalen oder systemischen Infektionen kommt (Martuza, 2000).

Ideale Vektoren für die Krebstherapie sollten, neben einem hohen Maß an Sicherheit, auch eine gute Selektivität besitzen. Ihre antineoplastische Aktivität sollte sich spezifisch in den entarteten Zellen zeigen (Dinsart et al., 1996). Es ist auch keine Expression des therapeutischen Gens nach der erfolgreichen Bekämpfung des Tumors von Nöten, sie ist sogar unerwünscht (Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 1994). Keines der bisher untersuchten Vektorsysteme kann all diesen Anforderungen gerecht werden, was Alternativen wünschenswert macht. Einige Vertreter der **autonomen Parvoviren** zeigen onkolytische und onkosuppressive Eigenschaften. Sie integrieren nicht, was ihre Gentransduktion zeitlich begrenzt und werden als sichere Vektoren ohne erkennbare unerwünschte Nebenwirkungen eingestuft (Dinsart et al., 1996; Kirn & McCormick, 1996). Mit diesen Eigenschaften sind Parvoviren eine vielversprechende Alternative in der Gentherapie bei Krebs-Erkrankungen.

### **2.10.2 Rekombinante MVMp- und hH1-Vektoren als vielversprechende Vektoren in der Krebs-Gentherapie**

Ein wichtiges Kriterium für die Benutzung eines Vektorsystems ist seine **Sicherheit**. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Nagerparvoviren MVMp, das für den Einsatz in immunkompetenten Mausmodellen verwendet wird und H1, das das Nacktmausmodell und die Therapie des Menschen zum Ziel hat, sind unter dem Gesichtspunkt der **geringen Pathogenität** sehr interessant. H1 führt nach *in vivo* Applikation im Menschen zwar zu einer Virämie mit Serokonversion, ohne aber zu irgendwelchen klinischen Symptomen zu führen. Sogar Krebspatienten tolerierten eine H1-Injektion (Toolan et al., 1965). Es konnte auch keine Verbindung zwischen einer humanen Erkrankung und einer früheren H1-Infektion hergestellt werden (Siegl, 1984). Wie schon erwähnt gilt MVMp in der adulten Maus als apathogen (Tattersall und Cotmore, 1986). Bei autonomen Parvoviren konnte bisher **keine Integration** in das Wirtszellgenom festgestellt werden, wodurch das Risiko einer insertionalen Mutagenese auszuschließen ist. Rekombinante Parvoviren können somit als **sichere Vektoren** eingestuft werden (Kirn & McCormick, 1996).

Ein weiterer Vorteil dieser beiden Viren ist ihr **breites Wirtsspektrum**, was die Möglichkeit eines breiten Behandlungsspektrums eröffnet und den Entwurf eines gezielten Vektor-Targetings zulässt.

Ein anderer Vorteil ist die hohe **Stabilität** von Parvoviren. MVM-Wildtypvirus hat z.B. bei simpler Aufbewahrung in einem 8°C kalten Kühlschrank eine Halbwertszeit von neun Monaten (Palmer & Tattersall, 2000), eine Eigenschaft, die die Handhabung und den Einsatz dieser Vektoren stark vereinfacht. Allerdings muss noch überprüft werden, ob rekombinante Viren dieselbe Stabilität besitzen.

Zwar tritt in Patienten nach H1-Injektion mit Beenden der virämischen Phase eine Serokonversion auf (Toolan et al., 1965), aber es scheint keine natürliche Infektionsroute für Menschen zu geben. Denn in serologischen Untersuchungen hat sich gezeigt, dass nur ein **geringer Prozentsatz der Bevölkerung seropositiv** (maximal 5%) für Nagerparvoviren ist (Siegl, 1984). Das ist ein nicht zu unterschätzender Vorteil gegenüber z.B. den Vektoren humaner Adenoviren, gegen die ca. 80% der Bevölkerung Antikörper aufweisen. Diese Tatsache erschwert die Applikation solcher Vektoren, sowohl wegen der Gefahr unerwünschter Nebenreaktionen als auch auf Grund der Eliminierung eines großen Anteils der applizierten Vektoren.

Besonders interessant für einen Einsatz als Vektoren in der Krebstherapie sind Nagerparvoviren wegen ihrer **onkosuppressiven Eigenschaften**. Sie hemmen die Entwicklung spontaner, induzierter oder transplantierter Tumore in Versuchstieren (Toolan et al., 1982; Dupressoir et al., 1989; Guetta et al., 1986). Mit der sogenannten **Onkolyse** zeigen Parvoviren *in vitro* einen stärkeren zytotoxischen Effekt in transformierten Zellkulturen als in nicht-transformierten Zellkulturen (Chen et al., 1989; Cornelis et al., 1988a; Cornelis et al., 1988b; Mousset et al., 1986; Mousset et al., 1994; Salome et al., 1990). Die schon unter Tropismus beschriebene Eigenschaft der Parvoviren, nach Transformation verschiedener Nager- und Menschenzelllinien eine erhöhte DNA-Amplifikation und Genexpression zu zeigen, wird als **Onkotropismus** bezeichnet. Das soll aber nicht bedeuten, dass Parvoviren nur in diesen Zellen vorzufinden sind.

### **2.10.3 Aufbau und Produktion rekombinanter parvoviraler Vektoren**


Unveränderte Parvoviren reichen zur effektiven Krebsbekämpfung nicht unbedingt aus. Gründe dafür können sein, dass sie je nach Tumorart nicht genügend Tumorzellen infizieren oder nicht genügend stark replizieren und zu einer zu geringen NS1-Expression



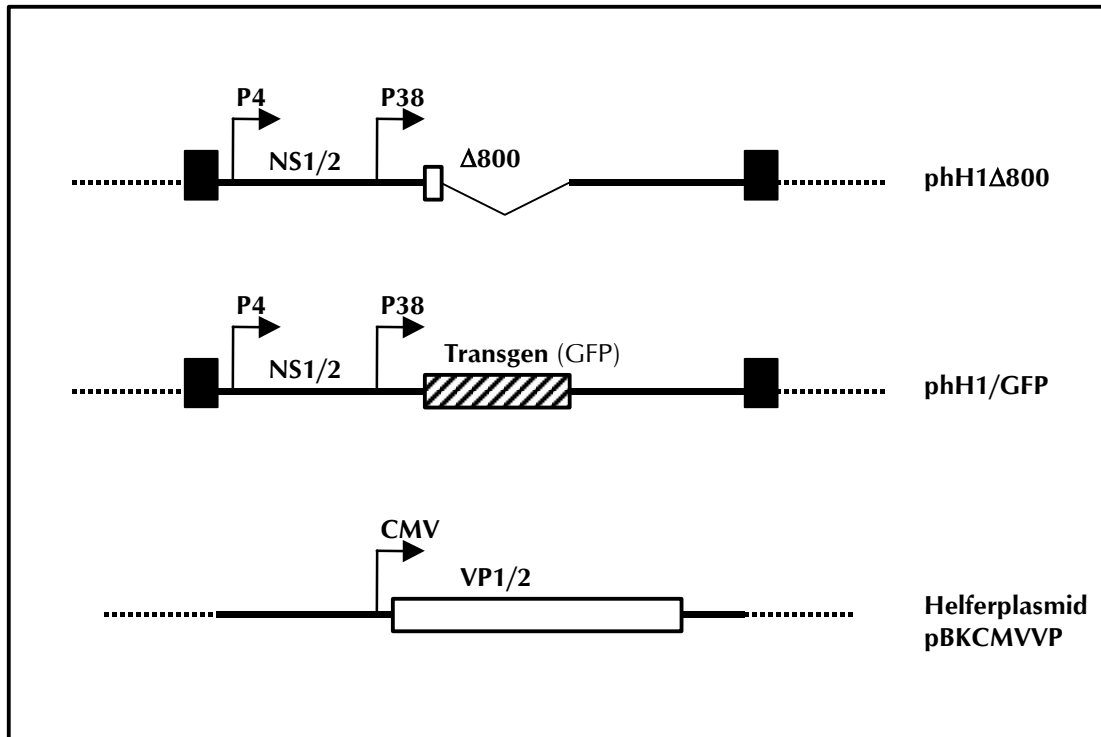
führen, um einen zytotoxischen Effekt zu erreichen. Oder aber NS1 allein genügt in bestimmten Tumorzellen nicht, um diese abzutöten. Deshalb sollen zusätzliche positive Eigenschaften eines gewählten Transgens, wie z.B. eines Zytokins oder Suizidgens, benutzt werden, welches in das Vektorgenom eingebracht wird. Bei einer Verlängerung des parvoviralen Genoms um über 6% sinken die Titer der produzierten Vektoren. Deshalb muß ein Transgen im Austausch gegen einen Teil des parvoviralen Genoms integriert werden (Kestler et al., 1999). Eine Möglichkeit zur Konstruktion solcher Vektoren besteht darin, dass alle Bereiche (alles außer den palindromischen Sequenzen) aus dem viralen Genom entfernt werden, die nicht essentiell für die Replikationsinitiation sind. Statt der entfernten viralen Sequenzen wird ein Transgen eingebaut, das entweder unter der Kontrolle des autologen P4-Promotors oder eines heterologen, neu eingeführten, Promotors steht. Dadurch können Transgene bis zu einer Größe von 4,8 kb aufgenommen werden (Maxwell et al., 1993). Allerdings gehen in diesen Vektoren die NS1-kodierende Sequenz und die damit verbundenen Vorteile verloren. Ein zweites Konstruktionsprinzip, welches bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren benutzt wurde, ist das Ersetzen von Teilen der VP-Gene durch das Transgen, welches in diesem Falle nur eine Länge bis zu 1,6 kb aufweisen darf. In diesen sogenannten NS<sup>+</sup>VP-Vektoren bleiben so wichtige Eigenschaften wie Onkotropismus und NS1-Zytotoxizität vollkommen erhalten (Dupont et al., 1994; Russell et al., 1992). Die Kapsidproteine müssen bei der Vektorproduktion durch ein sogenanntes Helferplasmid *in trans* zugegeben werden. Dabei wird das rekombinate Vektorgenom in Form eines Plasmids zusammen mit dem Helferplasmid in 293T Zellen kotransfiziert. Bei dieser Produktionsmethode werden nach Iodixanolaufreinigung Titer um die  $5 \times 10^7$  Replikationseinheiten pro ml erreicht (Kestler et al., 1999). Ein wichtiger Faktor für das Erreichen solch hoher Titer war das Einführen einer NS1-Einzelbruchstelle am 3'-Palindrom (Kestler et al., 1999), welche durch Cotmore und Tattersall charakterisiert worden war (Cotmore & Tattersall, 1994). Dies macht das Ausschneiden des viralen Genoms aus dem Vektorplasmid effizienter. Die gleiche Sequenz wurde auch in den H1-basierenden Vektor inkloniert und es entstand der hH1-Vektor. Der hH1-Vektor ist ein Hybridvektor, dessen erste 991 Basenpaare aus dem MVMP-Genom stammen.

Ein Nachteil bei der Produktion der Vektoren durch Kotransfektion ist die Entstehung von replikationsfähigen Revertanten (*Replication Competent Virus*, RCV) durch Rekombination zwischen den homologen Sequenzen des rekombinanten Vektor-

Genoms und des VP-tragenden Helferplasmids (Brandenburger & Russell, 1996). Mehrere Strategien wurden angewandt, um eine Lösung für dieses Problem zu finden, wie das Entwickeln einer Verpackungszelllinie (Brandenburger & Russell, 1996; Bakkouri et al., 2000); die Reduktion überlappender DNA-Sequenzen zwischen dem Helferplasmid und der Vektor-DNA (Kestler et al., 1999); die Minimierung der Homologie der überlappenden Bereiche durch die Einführung von Punktmutationen (Dupont et al., 2001). Die hier vorgelegte Arbeit verwendete dabei die Strategie der Herstellung von Chimären und Pseudotypen zwischen den beiden nahe verwandten Nagerparvoviren H1 und MVMp, um die Homologien zu reduzieren. Dazu wurde von den von MVMp- und hH1-abstammenden NS<sup>+</sup>VP-Vektoren, den sogenannten Basisvektoren, ausgegangen (Kestler et al., 1999). In der Abbildung 2-5 wird das Vektorsystem am Beispiel des hH1-Vektors schematisch dargestellt.

Der erhaltene P4-Promotor ist in S-Phase stimuliert und führt zur Expression der NS1- und NS2-Proteine, was somit hauptsächlich in schnell proliferierenden Zellen geschieht. NS1 bewirkt eine starke Replikation der viralen DNA und transaktiviert den P38-Promotor. Dadurch kommt eine hohe Transgenexpression zustande. Diese effiziente und bevorzugte Expression des Transgens in transformierten Zellen konnte in Zellkultur bestätigt werden (Russell et al., 1992; Dupont et al., 1994). Zusätzlich zu der Transgenwirkung entwickelt NS1 seine zytotoxische Wirkung. Die multiple Klonierungsstelle zur Insertion des Transgens (  ) wurde am Translationsstart von VP2 eingefügt (Kestler et al., 1999). Da diese Vektoren keine Kapsidproteine und somit auch keine Nachkommenviren produzieren können, kommt es zu einer „single hit“-Infektion. Das bedeutet, dass es zu keiner weiteren Verbreitung kommt, was sich unter dem Gesichtspunkt der Tumorzerstörung nachteilig auswirken mag, für die Sicherheit dieser Vektoren aber ein bedeutender Vorteil ist.

Mit den beschriebenen Vektoren können Transgene bis zu 1kB problemlos verpackt werden. Auch die Produktion rekombinanter Viren mit einem 1,6kB langen Transgen ist möglich, allerdings verbunden mit gesenkten Titern. Als Grund wird vermutet, dass durch das Entfernen NS1-bindender DNA-Motive, welche über das gesamte Genom verteilt sind und als Verpackungssignale dienen können, die Verpackungseffizienz vermindert wird (Kestler et al., 1999; Brandenburger et al., 1999; Cotmore et al., 1995). Ein Gedanke, der auch bei jeglicher Manipulation der Vektor-DNA im Auge behalten werden muss.



**Abb. 2-5: Schematische Darstellung der NS<sup>+</sup>VP-parvoviralen Vektoren am Beispiel der hH1-Vektoren**

Die rekombinanten hH1-Vektoren liegen in einem pUC19-Plasmid (---) als doppelsträngige Form vor. Ausgehend von dem infektiösen DNA-Klon phH1 wurden 800bp der VP-kodierenden DNA-Sequenz deletiert. Am Transkriptionsinitiationscodon von VP2 wurde eine multiple Klonierungsstelle (□) eingeführt, in die dann das gewünschte Transgen (schraffiertes Rechteck) einkloniert werden kann. Die für die Replikation und Verpackung wichtigen Palindrome (■), sowie die beiden viralen Promotoren P4 und P38 bleiben erhalten. Die beiden Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 können von dem rekombinanten parvoviralen Vektor exprimiert werden, wohingegen die beiden Kapsidproteine VP1 und VP2 in trans von einem Helferplasmid, unter einem CMV-Promotor stehend, zu Verfügung gestellt werden müssen. Rekombinante Viren werden nun über eine Kotransfektion von rekombinantem Genom und Helferplasmid in 293T Zellen produziert.

Deshalb haben wir zur Reduktion des Homologiegrades zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Vektorgenom die Herstellung von Chimären und Pseudotypen zwischen zwei eng verwandten Parvoviren, MVMp und H1, gewählt. Zu überprüfen war, ob die Produktion der Chimären und Pseudotypen mit zu den Basisvektoren vergleichbaren Titern möglich war und inwieweit die RCV-Kontamination gesenkt werden konnte. Außerdem musste festgestellt werden, welchen Effekt die vorgenommenen Änderungen auf den Tropismus der neuen Konstrukte haben. Wie oben schon beschrieben, nutzten unsere Vektoren den zytotoxischen Effekt von NS1. Durch die Anwendung der Gene-Expression-Profiling-Methode, cDNA-Arrays, wollten wir diesen Effekt auf dem mRNA-Level genauer untersuchen. Dafür wählten wir mit den U937 Zellen ein Zellsystem, das sehr sensitiv gegenüber der zytotoxischen Wirkung von NS1 ist.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

Bakterienstämme

*E.coli* SURE

*E.coli* XL1-Blue

*E.coli* JM109

Stratagene

Stratagene

Promega

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

Die *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium oder auf Agarplatten über Nacht bei 37°C kultiviert. Suspensionskulturen wurden über Nacht bei ca. 200 rpm geschüttelt. Unter diesen Bedingungen befinden sich die Bakterien nach 16h in der stationären Phase. Um Kulturen zur Plasmidgewinnung zu nutzen, wurde Chloramphenicol zu einer Endkonzentration von 34 µg/l dazugegeben und die Bakterien für weitere 6 h auf dem Schüttler gelassen. Dadurch erhöht sich die Ausbeute an Plasmiden. Zur Kryokonservierung wurde die Kultur mit 10% sterilem Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C aufbewahrt.

LB-Medium:            5g NaCl  
                              5g Hefeextrakt  
                              5g Bacto-Trypton  
                              ad 1000ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren, pH 7,0

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

Selektionszusätze    100µg/ml Ampicillin  
                              12,5 µg/ml Tetracyclin  
                              25 µg /ml Kanamicin

#### 3.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Eine frische *E.coli* Über-Nacht-Kultur wurde 1:100 in 1 l LB-Medium verdünnt, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 37°C geschüttelt und dann 15 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden 10 min bei 4000 x g in einem vorgekühlten Rotor abzentrifugiert, je einmal in 1 l bzw. 500 ml H<sub>2</sub>O (4°C) sowie in 20 ml 10%-igem Glycerol (4°C) gewaschen und jeweils wie oben angegeben abzentrifugiert. Nach der letzten

Zentrifugation wurde das Pellet in 2-3 ml LB-Medium mit 10% Glycerol aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.3 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNA: Elektroporation

Elektrokompetente Bakterien, zur Herstellung der Chimären *E.coli* SURE-Bakterien, wurden auf Eis aufgetaut. 40 $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension wurden mit 1-2  $\mu\text{l}$  (10-100 ng) DNA-Lösung gemischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand, qeqelab) überführt. Die Probe wurde dann bei 200 $\Omega$ , 1,8 kV und 25  $\mu\text{F}$ d in einem *E. coli*-Pulser elektroporiert. Nach Zugabe von 1ml antibiotikum-freiem LB-Medium inkubierten die Bakterien für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Danach wurden die Bakterien 1 Minute abzentrifugiert und in 50  $\mu\text{l}$  LB-Medium aufgenommen, auf LB Selektionsplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

## 3.2 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

### 3.2.1 Plasmide

pMVMp $\Delta$ 800	Kestler et al., 1999) <i>MVMp-basierender Vektor mit einer Deletion von 800bp zu Beginn von VP2</i>
pMVMp/GFP	C.Kornfelder Diplomarbeit, 1997) <i>MVMp-basierender Vektor mit einklonierter GFP-Sequenz im Bereich der Deletion</i>
hH1 $\Delta$ 800	(Kestler et al, 1999) <i>hH- basierender Vektor mit einer Deletion von 800bp zu Beginn von VP2</i>
phH1/GFP	(Wetzel et al., 2001) <i>hH1-basierender Vektor mit einklonierter GFP-Sequenz im Bereich der Deletion</i>
pC-MVMp $\Delta$ 800	vorliegende Arbeit
pC-MVMp/EGFP	vorliegende Arbeit
pC-hH1 $\Delta$ 800	vorliegende Arbeit
pC-hH1/EGFP	vorliegende Arbeit
pCMVVP	(C. Kornfelder Diplomarbeit, 1997) <i>MVMp-Kapsidproteine exprimierender Vektor, unter Kontrolle des frühen Promotors des Cytomegalievirus</i>
pBK-CMVVP	(Kestler et al., 1999) <i>hH1-Kapsidproteine exprimierender Vektor, unter Kontrolle des frühen Promotors des Cytomegalievirus</i>



### 3.2.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Diese Methode wurde angewendet, wenn ein Doppelrestriktionsverdau von Plasmid-DNA nötig war, aber die Puffer der beiden Enzyme nicht kompatibel waren oder um DNA zu konzentrieren. Dazu wurden der DNA 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol<sub>abs</sub> zugegeben und 30 min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch 15-minütliches Zentrifugieren bei 1300 rpm pelletiert (Tischzentrifuge von Eppendorf) . Der Überstand wurde entfernt und das Pellet luftgetrocknet, bevor die DNA in dem gewünschten Volumen im TE-Puffer aufgenommen wurde.

### 3.2.6 Restriktionsverdau

Für die DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen (Gibco BRL, Boehringer Mannheim, New England Biolabs) wurden die Restriktionsbedingungen nach Angaben der Enzym-Hersteller gewählt. In der Regel wurde pro 0,5 µg DNA 5 Enzymeinheiten eingesetzt, für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und durch anschließende Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

### 3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken wurde die DNA je nach Größe der zu trennenden Fragmente in 0,8-2,0% (w/v) Agarosegelen (Agarose NA, Pharmacia) bei einer Stromstärke von 3,6-6 mV/cm in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Durch die Zugabe von 1mg/ml Ethidiumbromid (Sigma) in das Gel konnten die DNA-Banden mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz im UV-Licht bei 254 nm mit einer Polaroidkamera (Image master VDS, Pharmacia) fotografisch festgehalten werden. Zu präparativen Zwecken geschah das Ausschneiden der Banden auf Leuchtplatten mit langwelligem UV-Licht (366 nm).

1x TAE	0,04 M Tris-Acetat, pH 8,0 0,001 M EDTA, pH 8,0	
DNA Größenstandards	<i>λ</i> /Hind III <i>λ</i> /Hind III/EcoRI 1kb ladder	Appligene Appligene Appligene

### 3.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel und Ausschneiden des gewünschten DNA-Fragments wurde die DNA mittels *Qiaquick Gel Extraktionskit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 3.2.9 Ligation

Für die Ligation kohäsiver Enden wurden in der Regel 100 ng Vektor-DNA mit der 3 bis 20-fachen molaren Menge an Insert-DNA und 1U T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) in dem mitgelieferten Puffer bei 14 °C ü.N. inkubiert.

### 3.2.10 Extraktion von Virus-DNA aus Säugetierzellen

Die Extraktion von Virus DNA aus Säugetierzellen erfolgte nach dem Verfahren von Hirt (Hirt, 1967). Es ermöglicht die Isolierung niedermolekularer DNA aus infizierten oder transfizierten Zellen. Die transfizierten A9 Zellen wurden von der Petrischale (Nunc) abgeschabt, in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert (4°C, 1500 rpm, 4 min). Nach Waschen mit PBS und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 1 ml TE resuspendiert und durch die Zugabe von 1ml 2x Hirt-Extraktionspuffer lysiert. Dazu wurden 100 mg/ml Proteinase K (Stock: 10 mg/ml) zugegeben und 4-6 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde ¼ Volumen 5 M NaCl zugegeben, durch Kippen vermischt und über Nacht auf Eis gelagert. Dadurch wird die genomische DNA ausgefällt, während die niedermolekulare virale DNA in Lösung bleibt. Nach Abzentrifugieren (10000 rpm, 1h, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es wurden erst 10 µl RNase A (10mg/ml, Sigma), danach 20 µl Proteinase K (10 mg/ml, Sigma) für je 30 min bei 37°C zugegeben. Anschließend gab man 2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Sigma) dazu und vortexte die Mischung für 15 sec. Nach Zentrifugieren (3000 rpm, 2 min, 4°C) überführte man die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß, gab zur Fällung der DNA zwei Volumen Ethanol<sub>abs</sub> (Riedel-de-Häen) dazu und inkubierte bei -20°C über Nacht. Nach nochmaligem Zentrifugieren bei 10000 rpm und 4°C für 1h wurde der Überstand dekantiert, das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 100 µl TE gelöst.



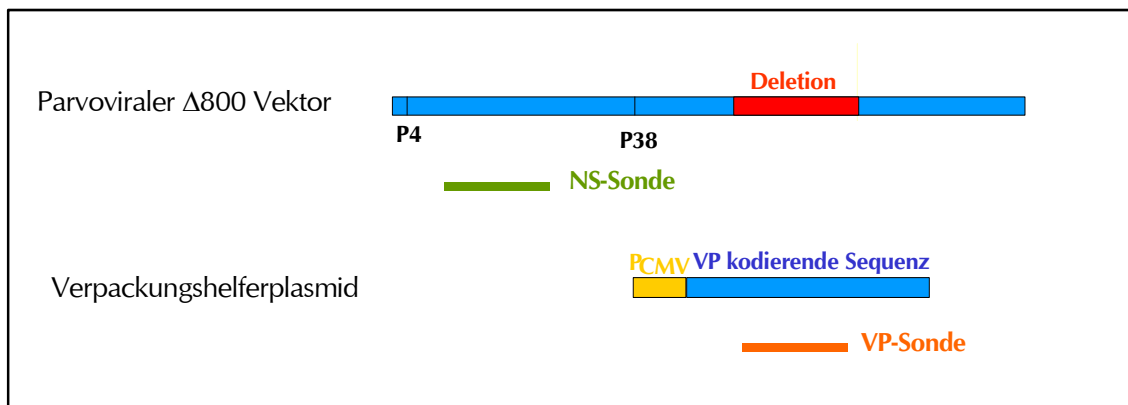
2 x Hirt-Extraktionspuffer: 20 mM Tris, pH7,4  
 20 mM EDTA  
 1,2 % SDS

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
 1 mM EDTA, pH8,0

### 3.2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit Zufallsoligomeren

#### verwendete Sonden:

- NS-Sonden aus hH1 und MVMp: *EcoRV* (bei nt 381) und *EcoRI* (bei 1084)
- VP-Sonden aus hH1 und MVMp: MVMp: BglI und Bgl II: 580 bp  
 H1: PflM1 und BspMI: 548bp



**Abb. 3-1: Darstellung der Bereiche des parvoviralen Genoms, aus denen die Sonden extrahiert wurden**  
 Die NS-Sonde liegt im NS-kodierenden Bereich von nt 381 bis 1084 und wurde sowohl für die Bestimmung der Titer der rekombinanten Viren als auch für die Hybridisierung der Southern-Blots verwendet. Dabei gibt es eine hH1- und eine MVMp-spezifische NS-Sonde.  
 Die VP-Sonde umfasst fast den gesamten Bereich von VP, der in dem rekombinanten Virusgenom deletiert ist, auch hier existiert eine hH1- und eine MVMp-spezifische VP-Sonde.

Sowohl für die Hybridisierung der Southern-Blots als auch für die Hybridisierungs-Assays wurden DNA-Fragmente (Sonden) mit dem *Megaprime™ DNA labelling system* (Amersham) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Dafür wurden ca. 50 ng der DNA auf Eis mit 5 µl der Primerlösung (Zufallsoligomere aus dem Kit) gemischt, auf 33 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 5 min auf 95°C erhitzt, danach weitere 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 10 µl Markierungspuffer (aus dem Kit) mit Desoxiribonukleotiden, 50 µCi [ $\alpha^{32}$  P] -dCTP und 2 µl Klenow-Enzym (aus dem Kit)

hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 150 µl TE-Puffer zur Volumenvergrößerung wurden nicht inkorporierte Nukleotide durch Passieren des Ansatzes über eine Sephadexsäule G-50 (Pharmacia) abgetrennt. Die Inkorporationsrate wurde über einen Cerenkov Counter (Bioscan) bestimmt und die radioaktiv markierte DNA nach 5 min Denaturierung bei 95°C als Sonde in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt.

### **3.2.12 Transfer von DNA (*Southern-Blot*) und Hybridisierung**

Durch Hirt-Extraktion (Kap. 3.2.10) gewonnene DNA wurde auf einem 0,8%-igem Agarosegel (Kap. 3.2.7) in 1x TAE aufgetrennt. Zur Depurination wurde das Gel 30 min in 0,25 M HCl geschwenkt, anschließend nach zweimaligem Abspülen mit H<sub>2</sub>O 2 x je 20 min in Denaturierungspuffer, dann 2 x je 20 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Für den Kapillartransfer wurde eine Wanne mit 20 x SSC gefüllt, eine Glasplatte als Plattform darüber gesetzt und drei Lagen 3MM Papier als Brücke so über die Glasplatte gelegt, dass beide Enden in den Laufpuffer tauchten. Auf diese Brücke wurde das Gel plaziert und die freien Bereiche an den Seiten mit Haushaltsfolie abgedichtet. Auf das Gel wurde eine zurechtgeschnittene, positiv geladene, in 20 x SSC getränkte Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham) luftblasenfrei aufgelegt und mit 3 Lagen in 20 x SSC getränktem Whatmanpapier sowie einem Stapel trockener Papiertücher und einer Glasplatte überschichtet. Nach Beschweren des Blots mit einem Gewicht (500g) erfolgte der DNA-Transfer über Nacht. Anschließend wurden Papierhandtücher und Whatmanpapier entfernt, die Lage der Taschen und die Orientierung des Gels auf der Nylonmembran markiert, die Membran luftgetrocknet und für 5 min zur Fixierung der DNA mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker®, UV Crosslinker). Die Membran wurde dann unter kontinuierlichem Schwenken bei 65°C für 1 h in Hybridisierungslösung mit 0,2 ng/ml gescherter aufgekochter Heringssperma-DNA (Boehringer Mannheim) inkubiert. Nach Zugabe einer radioaktiv markierten und denaturierten Sonde (mindestens 800000 cpm, Herstellung siehe Kap. 3.2.11) wurde die Hybridisierung bei 65°C über Nacht fortgesetzt. Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran 30 min mit Waschlösung 1, dann 2x 1h mit Waschlösung 2 bei 65°C gewaschen. Daraufhin wurde die Membran luftgetrocknet, in Haushaltsfolie eingeschlagen und für die Exposition eines Röntgenfilms verwendet.

Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl, pH 7,2 1mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M <i>tri</i> -Natriumcitrat pH 7,0
Hybridisierungslösung	3 x SSC 1% SDS 10 x Denhardts Lösung 5 mM EDTA
100 x Denhardt`s Lösung	2% Bovines Serumalbumin (w/v) 2% Ficoll 2% Polyvinylpyrrolidon ad 500 ml H <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Säugetierzellen

##### Kultivierung von Säugetierzellen

Die etablierten Säugetierzelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1:5 bis 1:30 passagiert. Erst wurden sie dafür mit PBS gewaschen, danach mit einer Trypsin-Lösung (0,25% Trypsin / 1 mM EDTA, GIBCO BRL) von der Kulturschale abgelöst und in frischem vorgewärmten Medium neu ausgesät. Dies wurde in der Regel zweimal pro Woche gemacht. Allen Medien wurden mit 2 mM l-Glutamin (GIBCO BRL), 100 g/ml Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL) und fötalem Kälberserum (FKS, GIBCO BRL) zugesetzt. Alle verwendeten Medien stammten von Sigma.

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium Zusätze</b>	<b>und Referenz</b>
A9, murin Bindegewebszelllinie, abstammend von L929	MEM, 5% FKS.	Tattersall & Bratton 1983
C3H/10T1/2, embryonale Zellen	DMEM, 10% FKS.	Hurta et al., 20001
Ehrlich Ascites, murin Karzinom	MEM, 5% FKS.	Boone et al., 1965
L929, murin Bindegewebszelllinie	MEM, 5% FKS.	American tissue collection Rockville, MD, USA.
K1735, murin Melanom	DMEM, 5% FKS.	Kripke, 1979
NB324K, human fötale Nierenzelllinie, SV 40 transformiert	MEM, 5% FKS.	Tattersall & Bratton 1983
293T, human Nierenzelllinie, SV40 und Ad5 transformiert	DMEM, 10% FKS.	Pear et al., 1993
U937, human Glioblastom, Astrozytom dritten Grades	RPMI, 10% FKS.	Sundstrom & Nilsson, 1976
HeLa, human Zervixkarzinomzelllinie	DMEM, 10% FKS.	Kennedy et al., 1995
MOLT-4, human T-Zellleukämie	RPMI, 10% FKS.	ATCC CRL 1582

### **Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen**

1-5 x 10<sup>6</sup> Zellen einer ca. 80% konfluenten Monolayer Kultur oder 1x10<sup>7</sup> Zellen einer Suspensionszellkultur wurden pelletiert (5 min, 900 rpm), in 1 ml auf 4°C gekühltes Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) vorsichtig resuspendiert und in Einfriereröhrchen überführt. Die Einfriergefäße wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter innerhalb von 24 h langsam auf -80°C abgekühlt und gelagert.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen schnell in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt und in ca. 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Dieses Medium wurde nach Zentrifugation (5 min, 900rpm) wieder entfernt und die Zellen in frischem Medium aufgenommen bevor sie in eine Zellkulturschale oder Zellkulturflasche überführt wurden.

### 3.3.2 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen nach der $\text{CaPO}_4$ -Methode

Zur Produktion rekombinanter Viren wurden am Vortag der Transfektion  $2 \times 10^6$  293T-Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät. Für die Transfektion wurden pro Schale 6 µg des rekombinanten viralen Genoms und 12 µg des Kapsidprotein exprimierenden Helfer-Plasmids in einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (250 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf ein Volumen von 450 µl eingestellt und unter Schütteln das gleiche Volumen 2 x HBSS-Puffer zugegeben. Zur Bildung der Calciumphosphatpräzipitate wurde der Ansatz 15 min bei RT inkubiert, dann vorsichtig auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken im Medium gleichmäßig verteilt.

2 x HBSS, pH 7,05	280 mM NaCl 50 mM HEPES 12mM (D) Glucose 10 mM KCL 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ der pH Wert wurde mit 5 M NaOH eingestellt, anschließend wurde die Lösung steril filtriert
-------------------	--

Für die Transfektion von A9 Zellen wurde genauso vorgegangen, allerdings wurden 25 µg DNA pro transfiziertes Konstrukt benutzt. Die Präzipitate wurden nach vier Stunden wieder von den Zellen abgenommen, die Zellen wurden 2 x mit komplettem Medium gewaschen und dann 30 s mit 2 ml Glycerollösung behandelt (Glycerolschock). Anschließend wurde 3 x mit PBS gewaschen, 10 ml komplettes Medium zugegeben und die Zellen für 18 h bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert

Glycerollösung:	DMEM 10% FS 20% Glycerol sterilfiltriert
-----------------	---

### 3.3.3 *In vivo* Markierung von Proteinen mit Trans<sup>35</sup>S-label<sup>TM</sup> und Bestimmung des radioaktiven Einbaus

#### *In vivo* Markierung von Proteinen mit Trans<sup>35</sup>S-label<sup>TM</sup>

Zur Herstellung *in vivo* markierter, infizierter oder nicht infizierter Säugetierzelleextrakte mit Trans<sup>35</sup>S-label<sup>TM</sup> (ICN) wurden die Zellen zuerst 15-20 min mit MEM-minus Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml frisches, 200µCi Trans<sup>35</sup>S-label<sup>TM</sup> enthaltendes MEM-minus Medium ersetzt. So wurden die Zellen für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig 2x mit 2-3 ml PBS gewaschen und dann für die Proteinextraktion auf Eis gestellt (beschrieben in Kap. 3.6.1).

MEM-minus Medium:           Cystein- und Methionin-freies MEM  
                                      5% dialysiertes FKS  
                                      1mM Natriumpyruvat  
                                      1% L-Glutamin  
                                      1% Gentamycin

#### Bestimmung des radioaktiven Einbaus

Zur Bestimmung des Einbaus von <sup>35</sup>S-Methionin und -Cystein in die Proteine wurden 5 µl Aliquots der fertigen Proteinextrakte in Szintillationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 5 ml Szintillationslösung ReadySafe (Beckmann) im Szintillationszähler TRI-CARB (Packard) gemessen.

### 3.3.4 Synchronisierung der U937 Zellen mit Methotrexat

Die U937 Zellen wurden mit 900 rpm für 5 min abzentrifugiert, das Medium entfernt und angewärmtes RPMI-Medium mit 10% FKS dazugegeben, so dass die Zellzahl 2x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml betrug. Die Synchronisierung wurde für 10 Stunden durchgeführt, dann für die Infektion unterbrochen, um sie danach für weitere 6 h fortzusetzen. Für die Infektion wurden die Zellen bei 900 rpm für 5 min abzentrifugiert, das Medium abgenommen und bei 37°C aufbewahrt. Für 1 h wurde nun die Infektion in DMEM-Medium mit 0,04 µM Methotrexat und 100µg/ml Hypoxanthin (Sen et al., 1990) durchgeführt (Kap. 3.5.3). Nach 1 h wurde das vorher abgenommene RPMI-Medium wieder zugesetzt und die

Synchronisierung für weitere 6 h fortgesetzt. Danach wurde das Medium nach Zentrifugation (900 rpm, 5min) entfernt (Release der Zellen) und die Zellen mit RPMI Medium (10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 g/ml Penicillin/Streptomycin) 2 mal gewaschen. Dieses Medium wurde dann auch zu den Zellen gegeben, so dass sie in einer Endkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml vorlagen.

### **3.3.5 DAPI-Färbung der Zellkerne**

Direkt anschließend an die Immunfluoreszenz, in Kap. 3.5.6 beschrieben, wurden die Zellkerne der auf mit Polylysin beschichteten Deckgläsern fixierten U937 Zellen mit DAPI angefärbt. Dafür wurden sie zum Abschluss der Immunfluoreszenz Färbung für 5 min in DAPI-Lösung, dann 5 min in  $H_2O$  danach 5 min in absolutes Ethanol getaucht, luftgetrocknet und mit Elvanol eingedeckelt (siehe dazu auch Kap. 3.5.6).

## **3.4 Durchfluss-Zytometrie (FACS)**

### Prinzip der Durchfluss-Zytometrie

Die Methode der Durchfluss-Zytometrie wurde verwendet, um die Zellzyklusverteilung in U937 Zellen zu ermitteln. Die Zellzyklusphasen werden bei dieser Methode auf der Basis des zellulären DNA-Gehaltes bestimmt.

$10^6$  U937 Zellen wurden aus der Kultur genommen und bei 2500 rpm für 7 min abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1ml 50 $\mu$ g/ml Propidiumjodid gelöst, in 0,1% Natriumacetat und 0,1% Triton X 100 resuspendiert. Die Proben wurden dann ü.N. auf Eis gestellt und am nächsten Morgen mit der FACS analysiert.

Propidiumjodid ist eine chemische Verbindung, die in die chromosomale DNA interkaliert und nach Anregung durch einen Argon-Ionenlaser (Wellenlänge 488 nm) fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität verhält sich dabei proportional zum relativen DNA Gehalt einer Zelle. Dementsprechend lassen sich G1-, S-, und G2/M- Phase aufgrund ihres jeweiligen DNA-Gehaltes von  $2n$ ,  $2n > 4n$  und  $4n$  unterscheiden. Darüber hinaus können mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie weitere Parameter, die über den Zustand der Zellen Auskunft geben wie z.B. Granularität, bestimmt werden.

Zur Durchführung der Messungen mit dem *Durchfluss-Zytometer FACSort* (Becton Dickinson) wurde das Computerprogramm *Cell Quest<sup>TM</sup>* (Becton Dickinson) verwendet.

## 3.5 Virologische Methoden

### 3.5.1 Produktion rekombinanter Viren

Zur Herstellung rekombinanter Viren wurden 293T Zellen, wie in Kap. 3.3.2 angegeben, ausgesät und transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen im Kulturmedium mit einem Gummischaber von der Schale gelöst und in einem 50 ml Falcongefäß pelletiert (10 min bei 1000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in VTE-Puffer aufgenommen; dabei wurde mindestens das vierfache Volumen des Pellets an VTE-Puffer zugesetzt. Durch drei Frier-Tauzyklen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und RT wurden die Zellen aufgeschlossen und die Viren freigesetzt. Danach wurden die Zelltrümmer bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand entfernt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das verbleibende Pellet wurde in einem Volumen VTE resuspendiert. Es folgten zwei weitere Frier-Tauzyklen, nach denen die Zelltrümmer wieder bei 3000 rpm abzentrifugiert wurden. Die beiden Überstände wurden zusammengegeben und im Falle einer „large scale“-Produktion über einen Iodixanol-Gradienten (Kap. 3.5.2) aufgereinigt. Virusstocks, die ausschließlich zur Überprüfung ihrer Titer und ihres RCV-Anteils produziert wurden, sind nicht durch Iodixanol aufgereinigt und konzentriert worden.

Für eine sogenannte „large scale“-Produktion, wie sie bei der Virusherstellung für die Durchführung von Tierexperimenten nötig sind und auch hier für alle Experimente außer den Titervergleichen und RCV-Ermittlungen durchgeführt wurde, wurden 30 Zellkulturschalen von 10 cm Durchmesser (Nunc) benutzt. Zur Herstellung kleinerer Virusmengen wurden fünf solcher Zellkulturschalen mit je  $2 \times 10^6$  293T Zellen ausgesät.

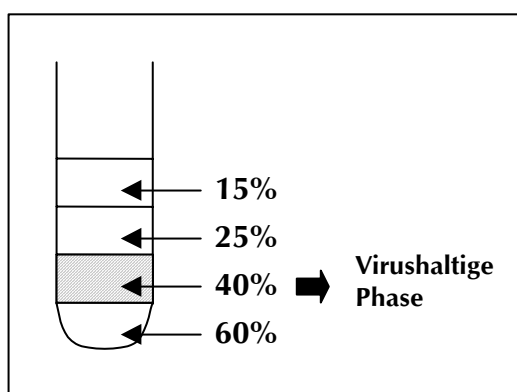
VTE:                    50mM Tris/HCl, pH 8,7  
                             0,5 mM EDTA



### 3.5.2 Dichtezentrifugation über Iodixanolgradienten

(nach Zolotukhin et al., 1999)

Zur Aufreinigung der rekombinanten Viren und zum Abtrennen der leeren Kapside wurde ein diskontinuierlicher Stufengradient aus Iodixanollösung (Sigma) hergestellt, der dann mit der aufzureinigenden Virussuspension überschichtet wurde. 15%-, 25%-, 40%- und 60%-iges Iodixanol wurde mit PBS mit 1mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5 mM KCl hergestellt. Um die einzelnen Schichten unterscheiden zu können, wurde der 60%- und der 25%-Phase Phenol-Rot (0,01 µg/ml) zugesetzt. Der 15%-igen Lösung wurde außerdem noch NaCl zu einer Endkonzentration von 1M zugegeben, um die Aggregation der Viruspartikel zu verhindern. Die Gradienten wurden 4,5 h bei 40000 rpm (TST41.14-Rotor, Beckmann) und 4°C zentrifugiert. Auf Grund ihrer Dichte sammeln sich volle Partikel in der 40%-Phase, während leere Kapside und Zellreste in der darüberliegenden 25%-Phase zu finden sind. Nun wurde die virushaltige 40%-Phase selektiv mit einer Spritze entnommen und bei 4°C gelagert.



**Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Iodixanolgradienten**

Aus jeweils 1,5 ml 15%-, 25%-, 40%- und 60%-iger Iodixanollösung wurde durch Unterschichten ein diskontinuierlicher Stufengradient angefertigt, der mit 6,5 ml Virussuspension überschichtet wurde. Nach 4,5-stündiger Zentrifugation bei 40000 rpm sammeln sich die vollen Viruspartikel in der 40%-igen Phase und können mit einer sterilen Spritze abgezogen werden.

### 3.5.3 Virusinfektion von Säugetierzellen

#### Monolayer-Zellkultur

Bei der Verwendung von Virussuspensionen bekannten Titers zur Infektion von Zielzellen wurde ein bestimmtes Verhältnis von Virus zu Zelle hergestellt.

Diese MOI (*Multiplicity Of Infection*) wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Zur Infektion wurde die entsprechende Virussuspension so in serumfreien MEM-Medium verdünnt, dass das Inokulum für eine 6 cm Schale 0,4 ml und für eine 10 cm Schale 1 ml betrug. Die für die Infektion benötigten Zellen wurden in gewünschter Zahl am Vorabend subkonfluent ausgesät, es wurde das Medium abgesaugt und das Inokulum zugegeben. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und die Schalen im Abstand von 10 min leicht geschwenkt, um die Virussuspension zu verteilen und eine gleichmäßige Infektion zu gewährleisten. In der Negativkontrolle, den sogenannten „mock“-infizierten Zellen, wurde anstelle der Virussuspension dem Inokulum virusfreier Puffer zugesetzt. Danach wurde komplettes Medium zugegeben und die Zellen weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Suspensionszellen**

Zur Infektion wurde die gewünschte Zellzahl für 5 min bei 900 rpm abzentrifugiert, die Zellen wurden dann in einem möglichst geringen Volumen (ca. 2x Pelletvolumen) serumfreies DMEM-Medium aufgenommen, dem das Virus in gewünschter Menge zugesetzt worden war. RPMI-Medium kann deshalb nicht zur Durchführung der Infektion benutzt werden, da es einen sehr geringen Ca<sup>2+</sup>-Gehalt hat, die parvovirale Infektion aber von Ca<sup>2+</sup> abhängig ist. Die Zellen wurden dann für 1h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und alle 10 min vorsichtig geschwenkt. Danach wurde komplettes RPMI-Medium zugegeben und die Zellen weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **3.5.4 Hybridisierungs-Assay zur Titration rekombinanter Viren**

Rekombinante Viren replizieren nach Infektion zwar ihr Genom, sie bilden aber keine infektiösen Nachkommen. Somit können rekombinante Viren nicht wie Wildtypviren im Plaque-Assay (Kap. 3.5.5) nachgewiesen werden, dessen Prinzip auf der lokalen Ausbreitung des zytopathischen Effekts durch Infektion von Nachbarzellen beruht. Bei dem Filterhybridisierungstest werden Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen der

Virussuspension infiziert, 2 Tage später werden die Zellen mit der replizierten Virus-DNA an Membranen gebunden und mit einer virustypischen Sonde hybridisiert.

Am Vorabend wurden  $5 \times 10^5$  NB324K oder  $2,4 \times 10^5$  A9 Zellen pro 6 cm Kulturschale ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die zu titrierenden Virussuspensionen in serumfreien MEM-Medium verdünnt. Pro Verdünnungsstufe wurden zwei Schalen mit 0,4 ml der einzelnen Verdünnung, wie in Kap. 3.5.3 beschrieben, infiziert. Nach zwei Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch das Auflegen einer Nitrozellulosemembran ( $\varnothing$  50 mm, Schleicher & Schuell) an diese gebunden. Diese Membranen wurden dann erst für 10 min auf ein in Denaturierungspuffer getränktes Whatman-Papier (3MM, Schleicher & Schuell) und danach 10 min auf ein in Neutralisierungspuffer getränktes Whatman-Papier gelegt, immer so, dass die Seite, an der die Zellen gebunden sind, nach oben zeigte. Danach wurde die DNA durch Backen bei  $80^\circ\text{C}$  für 2h an die Nitrozellulosefilter gebunden. Die Membranen wurden unter kontinuierlichem Schwenken bei  $65^\circ\text{C}$  für 1 h in Hybridisierungslösung mit 0,2 ng/ml gescherter aufgekochter Heringssperma-DNA (Boehringer Mannheim) inkubiert. Nach Zugabe einer radioaktiv markierten und denaturierten Sonde (mindestens 800000 cpm, Herstellung siehe Kap. 3.2.11) wurde die Hybridisierung bei  $65^\circ\text{C}$  über Nacht fortgesetzt. Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran 30 min mit Waschlösung 1, dann 2x 1h mit Waschlösung 2 bei  $65^\circ\text{C}$  gewaschen. Daraufhin wurden die Filter luftgetrocknet, auf einem Whatman-Papier aufgeklebt, in Haushaltsfolie eingeschlagen und für die Exposition eines Röntgenfilms verwendet. Nach Entwicklung des Filmes war jede infizierte Zelle als schwarzes Signal sichtbar.

Die Titer wurden wie folgt als RU (*Replication Unit*)/ml berechnet:

Titer (RU/ml) = Mittlere Anzahl der Signale  $\times$  7,5  $\times$  Verdünnung

Der Faktor 7,5 ergibt sich daraus, dass die Membran  $1/3$  der gesamten 6 cm Schale abdeckt und 0,4 ml der Virussuspension als Inokulum eingesetzt wurden.

### 3.5.5 Plaque-Assay

Beim Plaque-Assay werden die zytopathischen Eigenschaften der Parvoviren für ihre Quantifizierung benutzt. Nach initialer Infektion von Indikatorzellen mit verdünnter Virussuspension wird durch Überschichten mit halbfestem Nährmedium die Verbreitung der Nachkommenviren in der Zellkulturschale eingeschränkt. Die Infektion benachbarter Zellen bleibt jedoch möglich und führt, nach Durchlaufen mehrerer viraler Lebenszyklen, zur Ausbildung von Defekten im Zellrasen („Plaque“), die durch Färben mit Vitalstoffen sichtbar gemacht werden können. Bei passender Verdünnung geht jede Plaque auf ein einzelnes infektiöses und vermehrungsfähiges Virus zurück. Nur Wildtyp Viren und RCVs können zu einer Plaquebildung führen, rekombinante Viren dagegen nicht.

Am Vorabend wurden  $5 \times 10^5$  NB324K Zellen oder  $2,5 \times 10^5$  A9 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die zu titrierenden Virussuspensionen in serumfreien MEM-Medium verdünnt und pro Verdünnungsstufe zwei Schalen mit 0,4 ml der einzelnen Verdünnung, wie in Kap. 3.5.3 beschrieben, infiziert. Nach einer Stunde wurde das Inokulum abgenommen und die NB324K Zellen mit 8 ml NB324K-Zellen-Überzugs-Medium, die A9 Zellen mit 7 ml A9-Zellen-Überzugs-Medium überschichtet. Nach Erstarren des Überzugs-Mediums wurden die Zellen für sechs Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Am sechsten Tag wurden die Zellen mit 3 ml Neutralrot-Färbemedium (Merck) überschichtet und erneut über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am Morgen des darauffolgenden Tages wurde die Anzahl der Plaques pro Schale bestimmt und daraus die Titer der Wildtypviren oder der RCVs bestimmt in pfu (*plaque forming units*).

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques einer Verdünnungsstufe} \times \text{Verdünnung}}{\text{Inokulationsvolumen}}$$

Überzugsmedium A9: MEM 2x, komplett : Agar 2% = 4:3

Überzugsmedium NB324K: MEM 2x, komplett : Agar 1,7% = 5:3

Dabei wird MEM 2x komplett auf 37°C angewärmt und der Agar auf 48°C.

MEM, 2x, komplett:	MEM, 2x	77%
	FKS	17%
	Glutamin (200mM)	2%
	Gentamicin (10mg/ml)	2%
	Fungizone™ oder Nystatin	2%
Neutralrot-Färbemedium:	22,5 ml 2 x PBS	
	3 ml Neutral-Rot-Lösung (0,33% in H <sub>2</sub> O, steril)	
	wurde auf 37°C erwärmt und mit 22,5 ml auf 48°C erwärmten 2%-igem Bakto Agar gemischt.	
PBS, 2x	273,78 mM NaCl	
	5,36 mM KCl	
	9,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	3,57 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	pH 7,0	

### 3.5.6 RCV-Amplifikation

(siehe dazu auch Kap. 4.1.3.1 und Abb. 4-9)

In den Chimären und Pseudotypen Virusstocks lag der RCV-Anteil unter dem Detektionslevel des Plaque-Assays. Aus diesem Grund sollte möglichen vorhandenen RCVs Bedingungen geschaffen werden, in denen sie sich vermehren können und somit eine Anzahl erreichen, die im Plaque-Assay nachweisbar ist. Dazu wurden NB324K Zellen, wie in Kap. 3.5.3 beschrieben, mit einer 10-fachen Virusstockverdünnung infiziert, nach 48 h wurden die Zellen im Medium abgeschabt und anschließend folgten 5 Frier-Tauzyklen, wobei die geernteten Zellen bei -20°C tiefgefroren und bei RT wieder aufgetaut wurden. Danach wurde mit 400 µl Virussuspension entweder ein Plaque-Assay (Kap. 3.5.5) durchgeführt, der sogenannte F1-Plaque-Assay. Oder es wurde eine zweite RCV-Amplifikation mit 400 µl dieser gewonnenen Virussuspension durch eine zweite NB324K Zell-Infektion vorgenommen, auch hier wurden die Zellen wieder nach 48 h geerntet. Dann wurden 400 µl dieser Virussuspension für einen sogenannten F2-Plaque-Assay verwendet. Sowohl der F1- als auch der F2-Plaque-Assay lassen keine quantitativen Aussagen über den RCV-Gehalt der ursprünglichen Virusstock-Suspension zu. Sie geben nur Auskunft darüber, ob in der getesteten Virussuspension RCVs vorlagen oder nicht.

### 3.5.7 Bestimmung der relativen Anzahl GFP-fluoreszierender Zellen

Verschiedene Zelllinien wurden sowohl mit den Basisvektoren als auch mit den Chimären, sowie mit den Pseudotypen infiziert, um zu sehen, welche der Konstrukte am besten in den einzelnen Zelllinien zu einer GFP-Expression führen können. Dieser Versuch wurde in 96 Loch Platten vorgenommen. Zuerst wurde die optimale Anzahl der auszusäenden Zellen für jede Zelllinie ermittelt. Dafür wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät und über drei Tage jeden Tag die optimalen Verdünnungen markiert, bis einschließlich zum dritten Tag, an dem der Zellrasen gerade konfluent geworden oder aber noch leicht subkonfluent geblieben ist. Diejenige Zellzahl wurde gewählt, die zu keinem zu dichten Zellrasen am dritten Tag führte, aber bei der auch am ersten Tag die Zellen nicht zu vereinzelt vorlagen. Die gewünschte Zellzahl wurde am Vorabend ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgezogen, die gewünschte Menge an GFP-Virus in 20 µl serumfreien MEM-Medium zugesetzt und die Zellen für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden jeder Zelllinie 150 µl des kompletten Mediums zugegeben. 24 h, 48h und 72h später wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Gesamtzahl der Zellen in einem Feld wurde im Durchlicht, die GFP-positiven Zellen im Fluoreszenzlicht bestimmt. Dabei wurde solange gezählt, bis mindestens 200 GFP positive Zellen gezählt waren, daraus kann der Prozentsatz der infizierten Zellen ermittelt werden. Die Prozentsätze wurde dann für die einzelnen Konstrukte in einer Zelllinie miteinander verglichen. Wenn besonders am dritten Tag die Anzahl der nicht infizierten Zellen zum Zählen zu hoch war wurden entweder alle GFP-positiven Zellen in einem Loch gezählt oder aber, wenn das nicht möglich war, die GFP-positiven Zellen in 8-12 Gesichtsfeldern entlang des Randes und in einem Gesichtsfeld direkt in der Mitte gezählt. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen wurde für die verschiedenen Konstrukte in einer Zelllinie ins Verhältnis gesetzt.

### 3.6 Präparation und Analyse von Proteinen

#### Erstantikörper:

anti NS2 SP6 (polyklonal, Kaninchen)

anti NS1 SP7 (polyklonal, Kaninchen)

anti NS1/2 SP11 (polyklonal, Kaninchen)

Faisst et al., 1995

Faisst et al., 1995

Brockhaus et al., 1996

**Zweitantikörper:**

Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	Dianova
FITC (Fluorescein Isothiocyanat) konjugiert	
Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	BioRad
HPR ( <i>horse radish peroxidase</i> ) konjugiert	

**3.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus mit Trans-<sup>35</sup>S-label<sup>TM</sup> markierten Säugetierzellen**

Die Zellen wurden in der Kulturschale 1 x mit PBS gewaschen, auf Eis gestellt und mit 1 ml RIPA-Puffer (ohne SDS) bedeckt, dann wurden sie unter gelegentlichem Schwenken, für 30-60 min auf Eis extrahiert, anschließend die Zelltrümmer abgeschabt und zusammen mit dem Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min, 1500 rpm, 4°C) pelletiert, der Überstand als Zellextrakt abgenommen und bei -70°C gelagert.

RIPA-Puffer:	150 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1mM EDTA
	1% NP-40
	0,5% Na-Deoxycholat

**3.6.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugetierzellen für Western-Blots**

Die Zellen einer 10 cm Kulturschale wurden 2 x mit PBS gewaschen, dann in 1,5ml PBS abgeschabt, aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 2000rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100µl Lyse-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden 100µl 2x Western-Blot-Ladepuffer dazugegeben.

Western-Blot-Ladepuffer, 2x:	50mM Tris/HCl, ph 6,8
	12% Glycerin
	4% SDS
	2% β Mercaptoethanol
	0,1% Bromphenolblau

### 3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid (PAA)- Gele nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Sammelgele enthielten dabei 5% (w/v) Polyacrylamid und die Trenngele 10%. Die Gele wurden in die Gelkammer eingespannt und mit Elektrodenpuffer überschichtet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 (v/v) mit 2x Ladepuffer versetzt und dann 5 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese ü.N. bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel. Als Protein-Molekulargewichtsstandard diente der *Rainbow*<sup>TM</sup>-Marker (Amersham).

Trenngel:  
7,5 ml unterer Gelpuffer  
10 ml 30% Acrylamid (BioRad)  
11,9 ml H<sub>2</sub>O  
0,3 ml 10% APS (BioRad)  
12 µl TEMED (BioRad)

Unterer Gelpuffer: 1,5 M Tris  
1% (w/v) SDS  
pH 8,0

Sammelgel:  
2,5 ml oberer Gelpuffer  
3 ml 30% Acrylamid  
14,2 ml H<sub>2</sub>O  
0,2 ml 10% APS (BioRad)  
2 µl TEMED (BioRad)

Oberer Gelpuffer: 0,5 M Tris  
0,4% (w/v) SDS  
pH 6,8

Ladepuffer, 2x:  
50mM Tris/HCl, pH 6,8  
12% Glycerin  
4% SDS  
2% β Mercaptoethanol  
0,1% Bromphenolblau

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris  
192 mM (w/v) Glycin  
0,1% (w/v) SDS



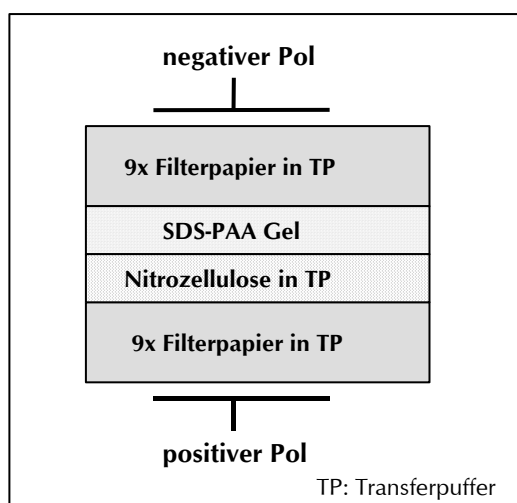
### 3.6.4 Western-Blot-Analyse

Der Elektrotransfer der auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte nach dem *Semi-Dry*-Verfahren mit einer *Trans-Blot*-Apparatur (BioRad).

Der Aufbau für den Elektrotransfer ist in Abb. 3-3 dargestellt. Transferiert wurde für 1,5 h mit 25V, 200 mA.

Anschließend wurde die Nitrozellulose zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (SP6 1: 500, SP7 1:2000 verdünnt in Blockierlösung) erfolgte entweder 1h bei RT oder ü.N. in 4°C. Nach dem Waschen der Nitrozellulosemembran für 3 x 20 min in PBS mit 0,5% Tween 20 wurde der zweite, Peroxidase gekoppelte Antikörper (1:10000 verdünnt in Blockierlösung) zugegeben und für 45 min bei RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen für 3 x 20 min in PBS, 0,5% Tween 20 folgte eine *enhanced-chemiluminescence* (ECL)-Detektion mit dem ECL-Kit von Amersham nach Angaben des Herstellers. Durch unterschiedliche Expositionszeiten der Nitrozellulose auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Blockierlösung: 10% Trockenmilch  
0,5% Tween  
in 1 x PBS



**Abb. 3-3: Aufbau einer Western-Blot-Apparatur für den Elektrotransfer eines SDS-PAA-Gels nach dem Semi-Dry-Verfahren**

Die Filterpapiere, die Nitrozellulose und das Gel wurden wie dargestellt nacheinander luftblasenfrei übereinander gestapelt und dann transferiert.

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

### 3.6.5 Immunpräzipitation

1 x 10<sup>7</sup> cpm <sup>35</sup>S-markierter Proteinextrakt (Kap. 3.6.1) wurde mit 2-5 µl SP11 Antikörper (Kap. 3.6) für 1-2 h bei 4°C auf einem rotierenden Überkopfschüttler in 300µl Extraktionspuffer (RIPA-Puffer ohne SDS) inkubiert. Danach wurden 50 µl in Extraktionspuffer äquilibrierte Protein A-Sepharose (1:1 v/v Extraktionspuffer: ProteinA-Sepharose-Kügelchen) zugegeben und nochmals 1 h über Kopf geschüttelt. Die ProteinA-Sepharose wurde dann mit den anhaftenden Komplexen 10 s in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C und maximaler Drehzahl pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde 5 x in 1 ml Extraktionspuffer gewaschen, nach erneutem Waschen in 50 µl Western-Blot-Ladepuffer (Kap. 3.6.2) aufgenommen, 5 min auf 95°C erhitzt und durch ein SDS-PAGE (Kap. 3.6.3) aufgetrennt. Die Immunpräzipitate wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurden die PAA-Gele zuerst 20 min in einer isopropanolhaltigen Fixierlösung geschwenkt und dann 20 min. mit Amplfy-Lösung (Amersham) behandelt, auf einem Gelrockner (Boi-RAD) getrocknet und mit einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) bei -70°C exponiert.

Isopropanol-Fixierlösung: 25% Isopropanol  
10% Essigsäure

### 3.6.6 Immunfluoreszenz und DAPI-Färbung

Ca. 5 x 10<sup>5</sup> U937 Zellen wurden aus der Suspensionskultur entnommen und bei 900 rpm für 5 min herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 30 ml PBS vorsichtig resuspendiert und auf zwei mit Polylysin überschichteten Deckgläsern verteilt. Sofort wurden diese in einer Feuchtkammer bei 4°C gelagert; 1h später wurde zur Fixierung der Zellen dasselbe Volumen an 4%-igem Formalin dazugegeben. Die Zellen wurden ü.N. bei 4°C belassen, so dass sie sich absetzen konnten. Am nächsten Tag wurden die Zellen zuerst für 5 min mit kaltem Methanol (-20°C) und dann 2 min mit kaltem Aceton (-20°C) behandelt. Zur Permeabilisierung wurde den Zellen 10 min 0,2%-iges Triton X 100 zugegeben, danach wurden die Zellen 1 x mit PBS/Tween 20 und 2x mit PBS/2 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Alle folgenden Schritte fanden in einer feuchten Kammer statt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 20 min mit Ziegenerum (1:100 in PBS/2 mM MgCl<sub>2</sub>) inkubiert. Vor dem Dazugeben des Erstantikörpers wurden die Zellen 1x mit PBS/2 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, dann wurde für

zwei Stunden der Erstantikörper SP7 (1:1000 verdünnt in PBS/2mM MgCl<sub>2</sub>) zugesetzt. Nach drei weiteren Waschschrinen mit PBS/2 mM MgCl<sub>2</sub> folgte eine einstündige Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (1:100 verdünnt in PBS/2mM MgCl<sub>2</sub>) im Dunkeln. Zum Schluss wurde nochmals 3 x mit PBS/2mM MgCl<sub>2</sub> gespült. Die Plättchen wurden jeweils 5 sec in eine DAPI-Lösung (Sigma) in Wasser und in Ethanol<sub>abs</sub> getaucht, luftgetrocknet und mit der zelltragenden Seite auf einem Objektträger mit Vectashield (Vector Laboratories) eingedeckelt. Nach einigen Stunden, im Dunklen aufbewahrt, konnten die Fluoreszenzen mikroskopisch ausgewertet und fotografiert werden.

4% Formalin: 10,8 ml 37% Formaldehyd-Stocklösung (Sigma) in 100 ml PB

## **3.7 Präparation und Analyse von RNA**

### **3.7.1 Total-RNA-Extraktion mit Trizol**

Die gewünschte Zellzahl der U937 Zellen wurde aus der Suspensionskultur entnommen und bei RT für 7 min bei 1000 rpm abzentrifugiert; der Überstand wurde entfernt. Danach wurde pro 10<sup>7</sup> Zellen 1 ml Trizol (GIBCO BRL) dazugegeben und die Zellen darin resuspendiert, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Pro 1 ml Trizol wurden dann 0,2 ml Chloroform (Merck) dazugegeben und durch Schütteln gut gemischt, anschließend für 2-3 min bei RT inkubiert und schließlich bei 13000 rpm, 4°C für 15 min abzentrifugiert. Die obere Phase (=Wasserphase) wurde abgenommen und in ein neues Tube gegeben. Dazu wurde in Verhältnis 1:1 Isopropanol (Riedel-de-Häen) hinzugefügt und weiter 10 min bei RT inkubiert. Zum Pelletieren der RNA wurde bei 11000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert, danach der Überstand vorsichtig entfernt. Mit 75%-igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen und für 10 min an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet aus 10<sup>7</sup> Zellen wurde in 100 µl RNase-reien Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

### **3.7.2 DNase-Behandlung der Total-RNA**

Die DNase-Behandlung wurde nach dem Protokoll des *Atlas<sup>TM</sup> Pure Total RNA Labeling System Kits* durchgeführt.

### 3.7.3 Überprüfung der RNA-Qualität auf einem denaturierenden Agarose-Gel

Zur Überprüfung der Qualität der Total-RNA wurde ein 1%-iges Agarosegel in 1x MOPS-Puffer mit 7,5% Formaldehyd gegossen. Dazu wurde 1g Agarose in 82,5 ml H<sub>2</sub>O aufgekocht, 2 min bei RT gerührt, bevor 10 ml 10x MOPS-Puffer und 7,5 ml Formaldehyd unter Rühren dazugegeben wurden. Die Polymerisationszeit des Gels beträgt ca. 60 min. 1-2 µg der Total-RNA wurden in 15 µl RNA-Ladepuffer aufgenommen und 15 min bei 70°C inkubiert, dann 1 min auf Eis gekühlt. Die Auftrennung der RNA-Proben wurde bei 60 V solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande 4 cm von den Ladelöchern entfernt war. Zu sehen waren unter UV-Licht zwei Banden, die 28S und die 18S ribosomale RNA, bei ca. 4,5 und 1,9 kb, die in einem Verhältnis von 1,5-2,5:1 vorlagen.

MOPS-Puffer, 10x:	0,4 M MOPS (ph 7,0) 0,1 M NaOAc (pH 7,0) 10 mM EDTA (pH 8,0; Ambion)	
RNA-Ladepuffer:	50% Formaldehyd 50% Formamid 1x MOPS-Puffer in den noch Etidiumbromid (10mg/ml) (1,5 µl auf 100µl RNA Ladepuffer) und Bromphenolblau in 50%-igem Glycerol (1µl auf 10µl RNA-Ladepuffer) gegeben wurden	
RNA Größenstandard	High range RNA-Leiter	peqlab

### 3.7.4 mRNA-Extraktion

Die Extraktion der m-RNA wurde mit den DNA verdauten Total-RNA-Proben mit *OligoTex mRNA Mini Kit* von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden 250 µg Total-RNA eingesetzt und die m-RNA in 20 µl OBE-Puffer aus dem Kit eluiert. Die gesamte eluierte RNA wurde sofort in der Labeling Reaktion eingesetzt. Dafür musste das Volumen reduziert werden, was mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge erreicht wurde.

### **3.7.5 Radiaktives Markieren der cDNA mit [ $\gamma^{32}$ P] -dATP, ausgehend von der vorher gewonnenen mRNA**

Für das Markieren der cDNA ausgehend von der mRNA wurde das *Atlas<sup>TM</sup> Pure Total RNA Labeling System* Kit verwendet und nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen. Dabei wurden folgende Änderungen vorgenommen: Pro Probe wurde ein Doppelansatz gemacht um höhere Mengen an radioaktiv gelabeltem Endprodukt zu erhalten. Zusätzlich dazu wurde die mit 1  $\mu$ l pro Ansatz angegebene Primer-Mischung auf 2  $\mu$ l je Ansatz erhöht.

### **3.8 Hybridisierung und Auswertung der „human cancer 1.2 arrays“ von Clontech**

Die Membranen wurden nach dem Protokoll des *Atlas<sup>TM</sup> „human cancer 1.2 arrays“* hybridisiert. Danach wurden die Membranen noch feucht und luftblasenfrei in Folie eingeschlagen und über Nacht in eine Phosphorimager-Kassette gegeben. Am nächsten Tag wurde die Phosphorimagerfolie dann mit einem Phosphorimager eingescannt und im TIFF-Format abgespeichert. Wenn nötig, wurden die Membranen noch einmal länger exponiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des *Atlas Image 1.0* Programms von Clontech, Version 1.01a.

Nach der Exposition der Membranen wurden diese nach dem Protokoll im *Atlas<sup>TM</sup> „human cancer 1.2 array“* Kit gestrippt. Die Effizienz des Strip-Vorgangs wurde durch 3-tägige Exposition in der Phosphorimager Kassette überprüft, außerdem wurde vor dem nochmaligen Verwenden derselben Membranen mindestens 4 Wochen gewartet, um die verbleibende Restradioaktivität abklingen zu lassen. Danach wurden die Membranen noch einmal zur Hybridisierung verwendet, dabei wurde kreuzhybridisiert: wenn für eine Membran das erste Mal die gelabelte mRNA der nicht infizierten U937 Zellen verwendet wurde, so wurde dann die mRNA der infizierten U937 Zellen beim zweiten Hybridisieren verwendet und umgekehrt.

### **3.9 Auswertung der Unigeneset-1-Filter**

Die Unigeneset-1-Filter wurden nicht von mir hybridisiert, sondern in dem Labor von Christian Merker im DKFZ Heidelberg. Ihm wurde die Total-RNA von zwei voneinander unabhängigen Experimenten gegeben, zusammen mit einem Foto des analytischen Gels. In seinem Labor wurde die mRNA aufbereitet, welche gelabelt und zur Hybridisierung der Unigeneset-1-Filter verwendet wurde. Zur Auswertung bekamen wir einen Excel-File, der sowohl die schon standardisierte Intensität des gemessenen radioaktiven Signals, wie auch den Unterschied der beiden Signale „U937 nicht infiziert“ und „U937 infiziert“ aus einem Experiment angab. Da auf einer Membran je zwei DNA-Punkte je Gen aufgebracht waren und zwei unabhängige Experimente gemacht wurden, ergaben sich also je Gen vier Werte. Mit dem Excel-Programm wurden erst alle Gene herausgesucht, die in mindestens drei Fällen 5-fachen und mehr Unterschiede zwischen den infizierten und nicht-infizierten Zellen zeigten, so wie es von Herrn Merker empfohlen worden war. Als zweites wurden all die Gene ausgewertet, die in mindestens drei Fällen 2,5-fachen oder mehr Unterschiede, aber weniger als einen 5-fachen Unterschied zeigten. Dies wurde gemacht, um zu sehen, ob es noch andere Gene gibt, die in Verbindung mit den schon gefundenen Genen stehen. Die gefundenen Gene wurde ausgehend von der Datenbank „gene card“, welche Verbindungen zu vielen anderen Datenbanken wie „pubmed“ und „swissprot“ besitzt, auf ihre Funktion hin analysiert und dann in funktionelle Gengruppen eingeordnet.

### **3.10 Chemikalien**

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

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Reduktion der Wildtypkontamination in parvoviralen Vektorstocks durch die Konstruktion von MVMP- und hH1-basierenden Chimären und Pseudotypen

#### 4.1.1 RCVs als Problem bei der Produktion parvoviraler Vektoren

Wie im Schrifttum in Kap. 2.2.11 beschrieben, wurde im Falle der hier verwendeten hH1- und MVMP-basierenden Vektoren eine Region im Kapsid-Bereich von ca. 800 bp deletiert und eine multiple Klonierungsstelle (MKS) eingebracht, die das Einklonieren eines Transgenes ermöglicht (Kestler et al., 1999). In diesen NS<sup>+</sup>VP-Vektoren steht das Transgen unter der Kontrolle des P38-Promotors, der durch das ebenfalls in diesen Vektoren erhalten gebliebene NS1-Protein transaktiviert wird und zu einer hohen Transgenexpression führt. Kapsidproteine können von dem rekombinanten Genom nicht produziert werden und müssen zur Virusproduktion als Helferplasmid (pMVMP/CMVVP für den MVMP-Vektor und pBK-CMVVP für den hH1-Vektor) *in trans* zugegeben werden.

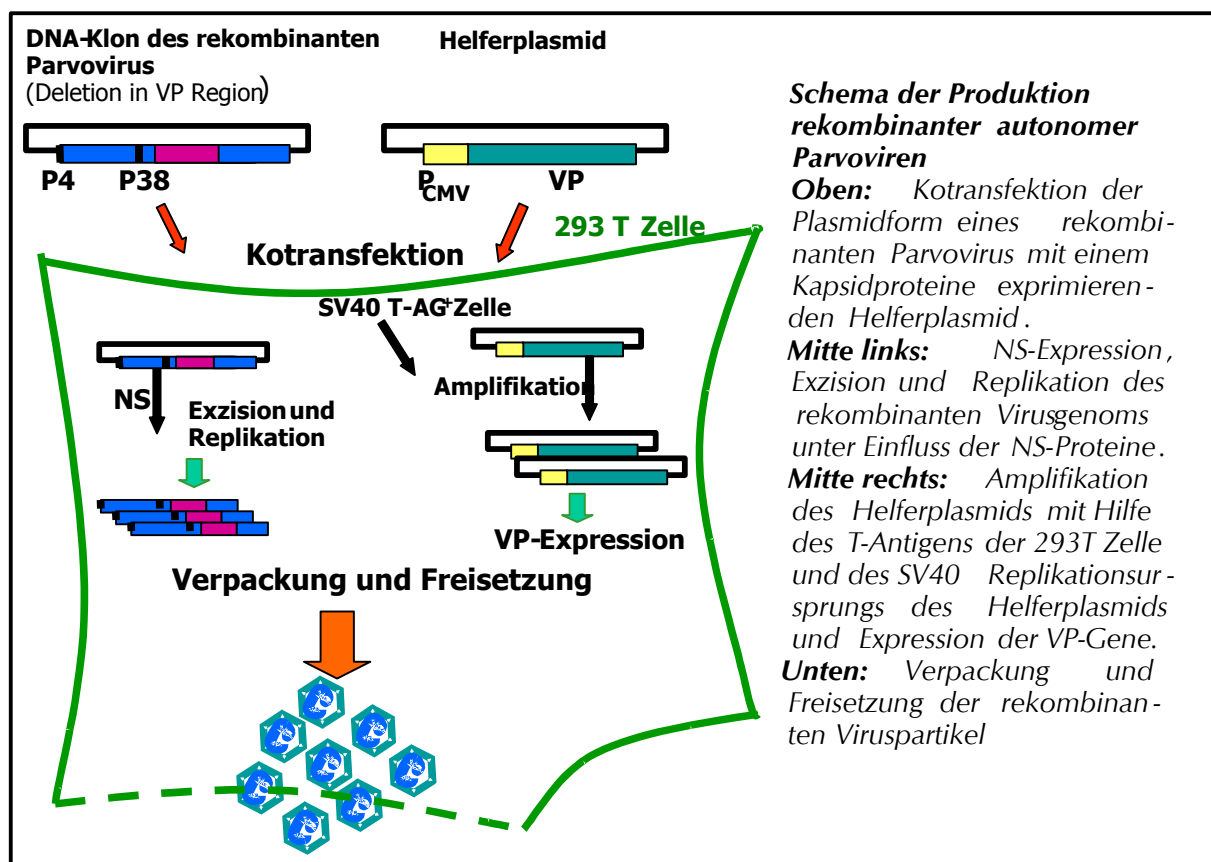
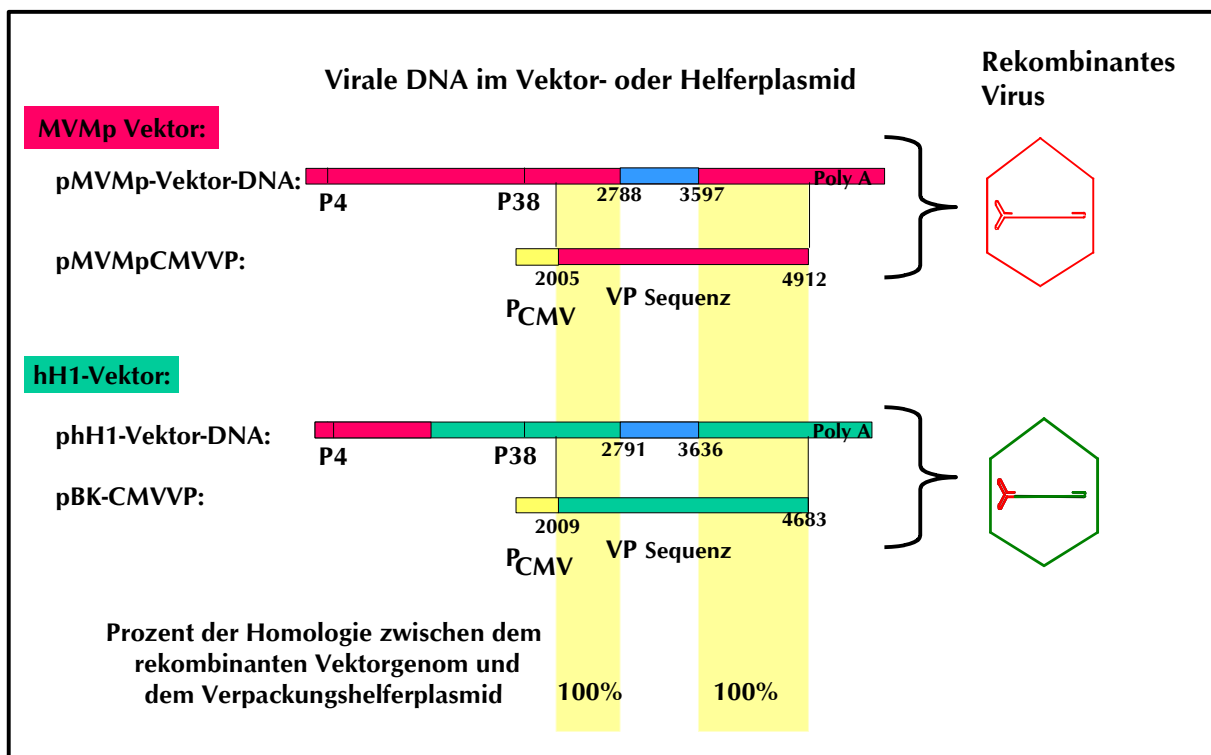


Abb. 4-1: Produktion rekombinanter Parvoviren

Dieses Helferplasmid enthält unter dem frühen Promotor des Cytomegalie Virus (CMV) die gesamte kodierende Sequenz von VP1 und VP2. Zur Produktion rekombinanter Viren, dargestellt in Abb. 4-1, werden 293T Zellen mit dem rekombinanten Virusgenom und dem Helferplasmid kotransfiziert. Im ersten Schritt wird NS1-Protein exprimiert, das dann im zweiten Schritt das rekombinante Genom aus dem Plasmid ausschneidet. Dieses wird anschließend mit weiterer Hilfe des NS1-Proteins nach dem in der Einleitung beschriebenen Rollend-Haarnadel-Replikations-Mechanismus (Kap. 2.8) amplifiziert. Zeitgleich werden die Kapsidproteine VP1 und VP2 exprimiert, welche die virale Einzelstrang (ss) DNA verpacken. Das so entstandene Virus wird durch Zellyse freigesetzt. Zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Virusgenom gibt es Bereiche von 100%-iger Homologie. In Abb. 4-2 sind die homologen Abschnitte zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Genom unserer MVMp und hH1-Basisvektoren als gelb unterlegte Bereiche dargestellt.



**Abb. 4-2: Homologieverhältnisse auf DNA-Ebene für die Basisvektoren**

In Rot sind DNA Sequenzen aus dem MVMp-Genom dargestellt, in Grün hH1-Genom-Sequenzen, in Blau das Transgen oder die Deletion; jeweils für das MVMp-Vektorsystem und das hH1-Vektorsystem, zuerst das rekombinante Genom, darunter das Helferplasmid. Mit Gelb sind die Teilstücke unterlegt, in denen 100%-ige Homologie zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Vektor-Genom besteht.

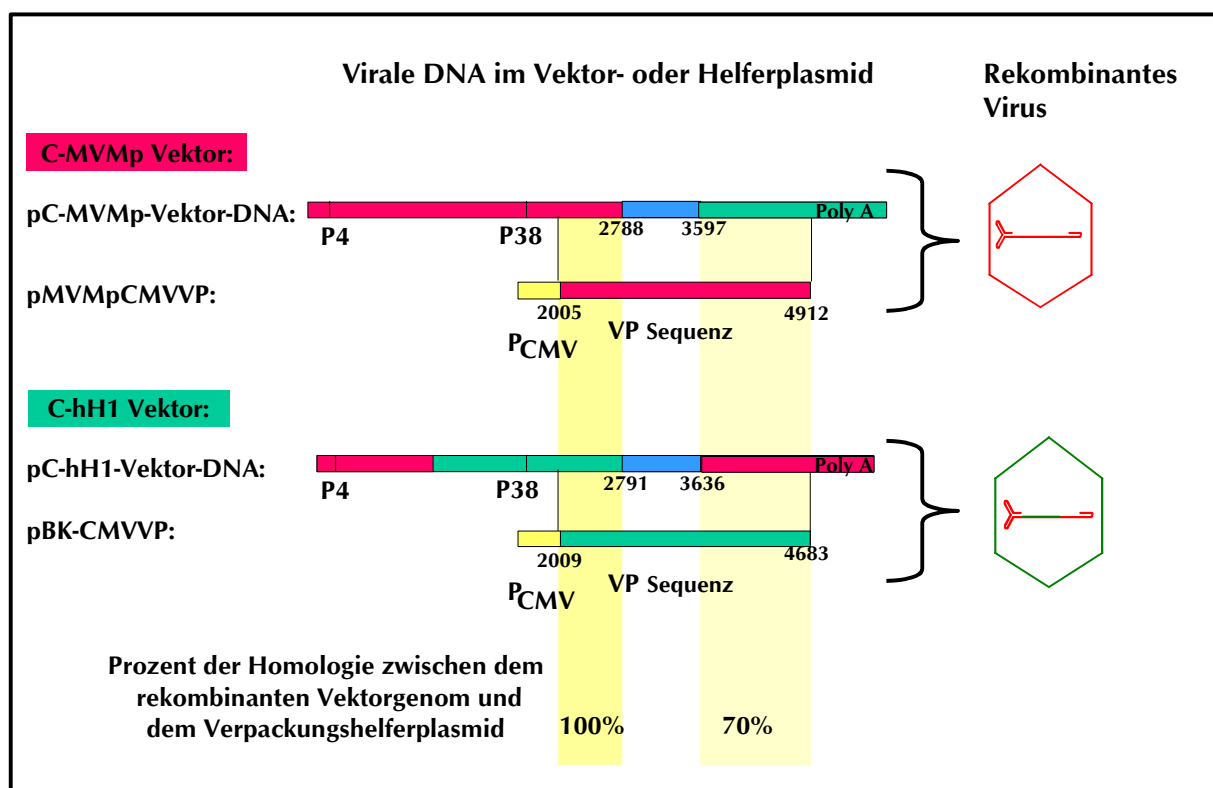
In den Abschnitten mit 100%-iger Homologie kann es bei der Vektorproduktion zu homologer Rekombination zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten



Genom kommen, und ein sogenannter RCV entsteht. Dabei wird die für das Kapsidprotein kodierende Sequenz aus dem Helferplasmid in das rekombinante Virusgenom rekombiniert. Die so entstandenen RCVs können wieder Kapsidproteine bilden und somit Nachkommenviren produzieren. Der RCV-Anteil der in Abb. 4-2 beschriebenen Vektoren beträgt zwischen 0,1% und 1% (Kestler et al., 1999; Haag et al., 2000a).

#### 4.1.1.1 Klonierung und Produktion der MVMp- und hH1-Chimären

Um den RCV-Anteil in von uns produzierten Virusstocks zu senken, planten wir Kombinationsvektoren zwischen den beiden nahe miteinander verwandten hH1- und MVMp-Vektoren herzustellen. Dadurch können die homologen Überlappungen zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Virusgenom reduziert werden. Diese Chimären, dargestellt in Abb. 4-3, sollen erstens einen reduzierten RCV-Anteil generieren und zweitens Titer in vergleichbarer Höhe wie die Basisvektoren erreichen. Unangetastet blieben alle Bereiche, die kodierend für NS1/2 sind.



**Abb. 4-3: Homologieverhältnisse auf DNA-Ebene für die Chimären**

In Rot sind DNA Sequenzen aus dem MVMp-Genom dargestellt, in Grün hH1-Genom-Sequenzen, in Blau das Transgen; jeweils für das MVMp-Vektorsystem und das hH1-Vektorsystem, zuerst das rekombinante Genom, darunter das Helferplasmid. Mit Gelb sind die Teilstücke unterlegt, in denen Homologie zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Vektor-Genom besteht

Zur Klonierung der Chimären wurden die beiden Basisvektoren pH1/ $\Delta$ 800 und MVMp/ $\Delta$ 800 jeweils mit Bgl1, dessen Schnittstelle im Vektor nach dem Ende des rekombinanten Genoms liegt und BamH1, dessen Schnittstelle in der MKS liegt, verdaut (Abb. 4-4).

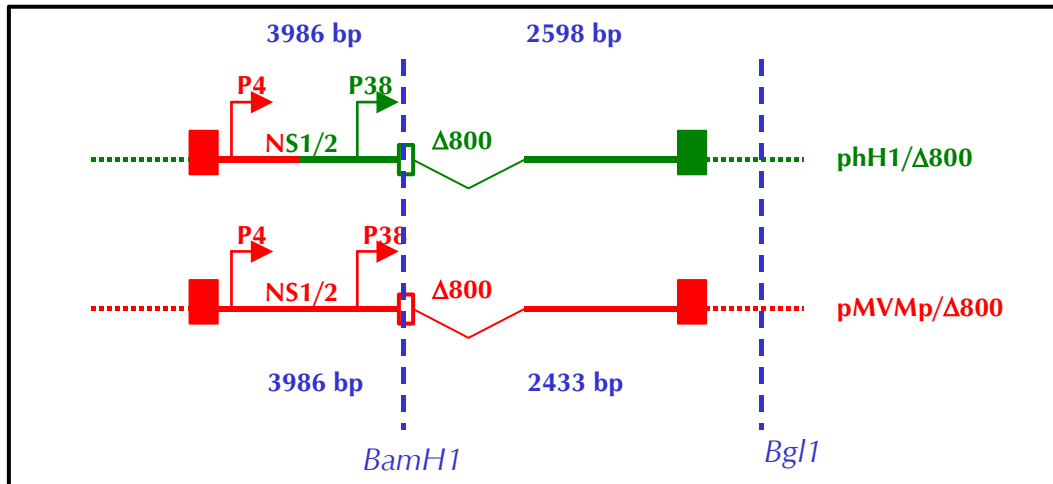


Abb.4-4: Expressionsplasmide der Basisvektoren: Schnittstellen zur Klonierung der Chimären

Somit entstanden pro Vektor zwei Fragmente. Das erste Fragment beinhaltet neben der Plasmidvektorsequenz den gesamten Anfang des rekombinanten Virusgenoms bis zur MKS, mit einer Länge von 3986 bp sowohl für den pH1/ $\Delta$ 800- als auch für den MVMp/ $\Delta$ 800-Vektor. Das zweite Fragment beinhaltet den gesamten Endteil des rekombinanten Virusgenoms ab der MKS und Teile der Plasmidsequenz. Die Länge dieses Teilstücks betrug im Falle von pH1/ $\Delta$ 800 2598 bp und im Falle von MVMp/ $\Delta$ 800 2433 bp, dargestellt in Abb. 4-4. Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Nach nochmaliger Kontrolle in einem EtBr-gefärbten Agarosegel wurde die Ligation durchgeführt. Dabei wurde das erste Fragment des pH1/ $\Delta$ 800, also das 3986 bp umfassende Teilstück, mit dem zweiten Fragment des MVMp/ $\Delta$ 800, also das 2433 bp lange Teilstück, ligiert. Daraus entstand die Chimäre pC-hH1/ $\Delta$ 800 (Abb. 4-5). Für die Chimäre pC-MVMp/ $\Delta$ 800 wurde das 3986 bp-Stück des MVMp/ $\Delta$ 800 Vektors mit dem 2598 bp-Stück des pH1/ $\Delta$ 800-Vektors ligiert. Das Endprodukt dieser Klonierung ist in Abb. 4-5 dargestellt. Die Ligationsprodukte wurden in elektrokompente *E.coli*-k12-SURE-Bakterien transformiert. Über verschiedene Restriktionsverdauungen wurde die Richtigkeit dieser Klonierung überprüft.

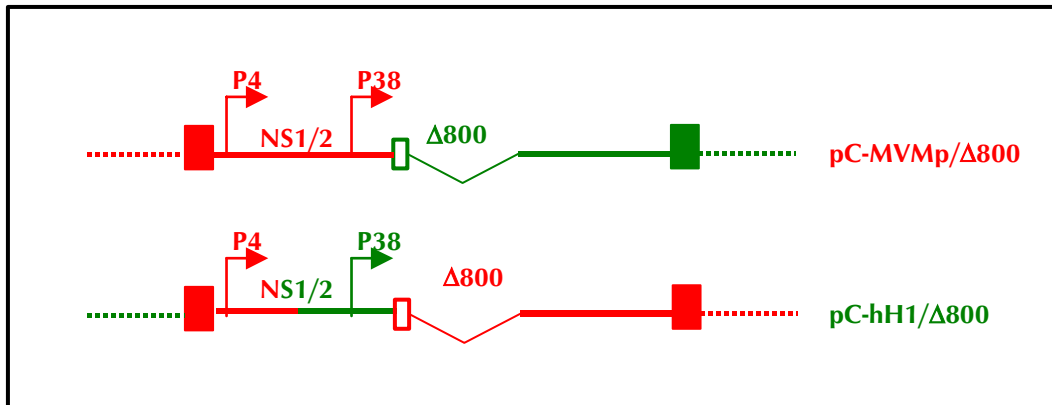


Abb 4-5: Expressionsplasmide der Chimären

In die MKS dieser beiden Chimären wurde nun als Transgen EGFP einkloniert. Dafür wurde aus dem pEGFP-1 (4.2 kb) Vektor mit Sac1 und Not1 ein 784 bp umfassendes EGFP-Fragment herausgeschnitten und in die Chimären pC-hH1/Δ800 und pC-MVMp/Δ800 nach deren Restriktion mit Sac1 und Not1 ligiert. Somit entstanden pC-hH1/EGFP und pC-MVMp/EGFP, zu sehen in Abb. 4-6. Auch diese Konstrukte wurden in elektrokompente *E.coli*-K12-sure-Bakterien transformiert und durch mehrere Restriktionsverdauungen auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

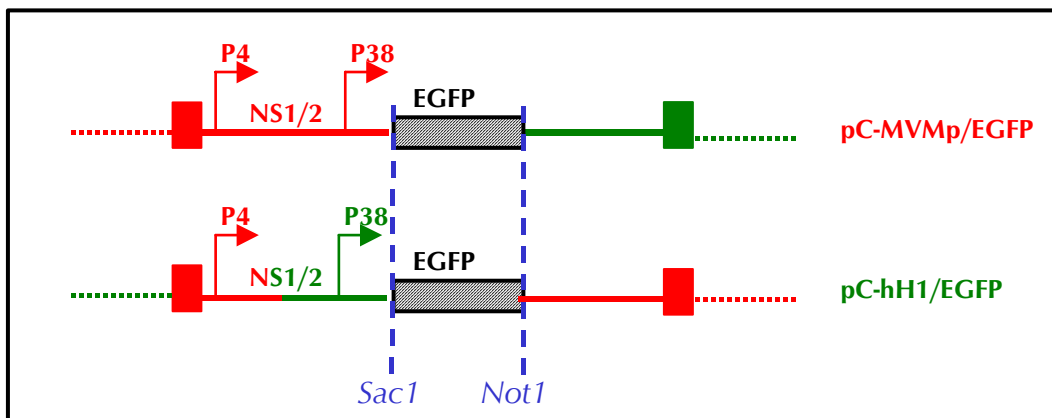
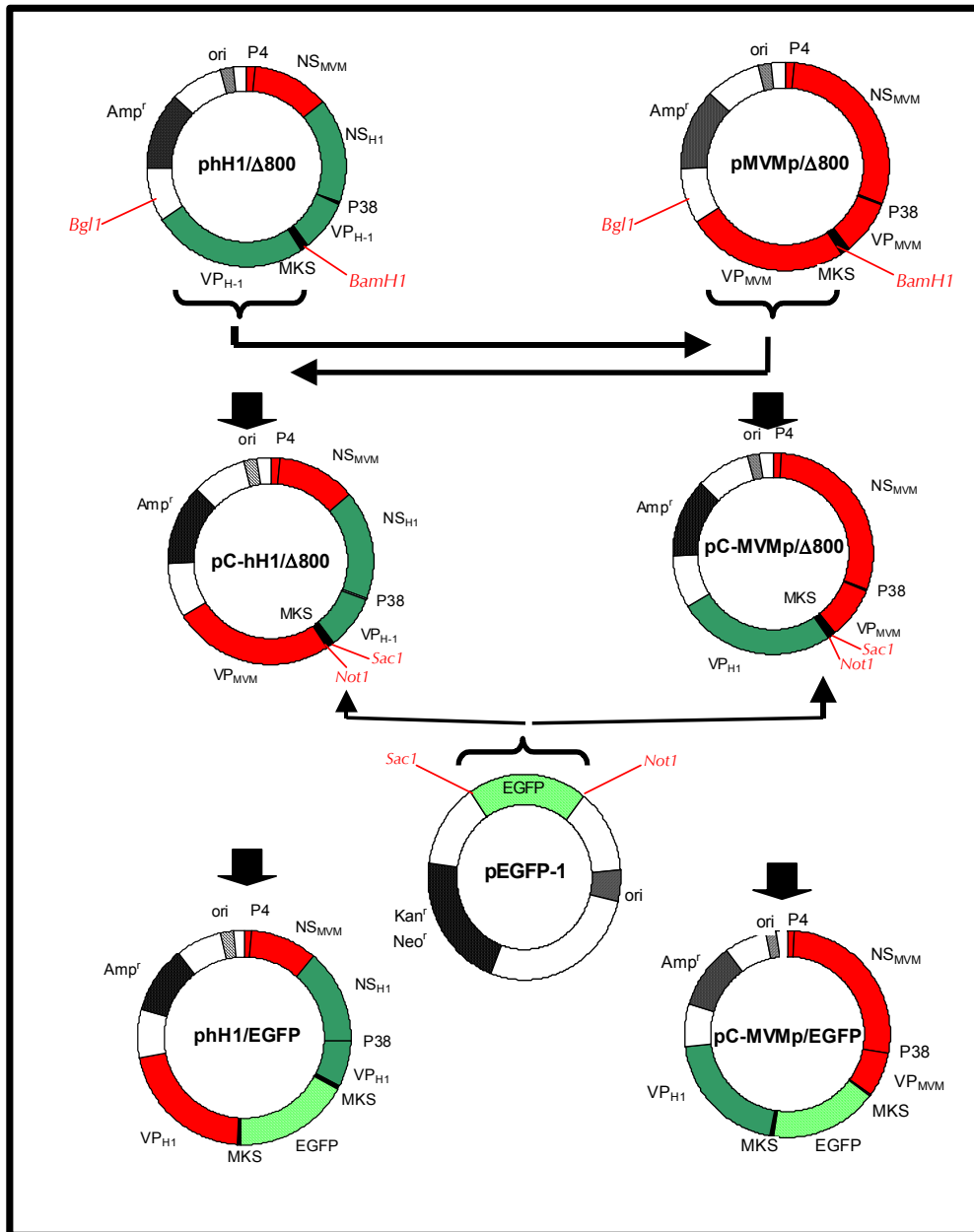


Abb.4-6: Expressionsplasmide der Chimären mit einkloniertem EGFP-Transgen

Zur Produktion der rekombinanten **C-MVMp/EGFP**-Viren wurde eine Kotransfektion in 293T Zellen mit dem rekombinanten Vektorgenom in Form des pC-MVMp/EGFP-Plasmids und dem Verpackungshelferplasmid pMVMpCMVVP, welches die MVMp-Kapsidproteine exprimiert, durchgeführt. Zur Produktion des rekombinanten **C-hH1/EGFP**-Vektors wurde das rekombinante Virusgenom als pC-hH1/EGFP-Plasmid mit dem pBK-CMVVP-Plasmid kotransfiziert, welches die H1-Kapsidproteine exprimiert.



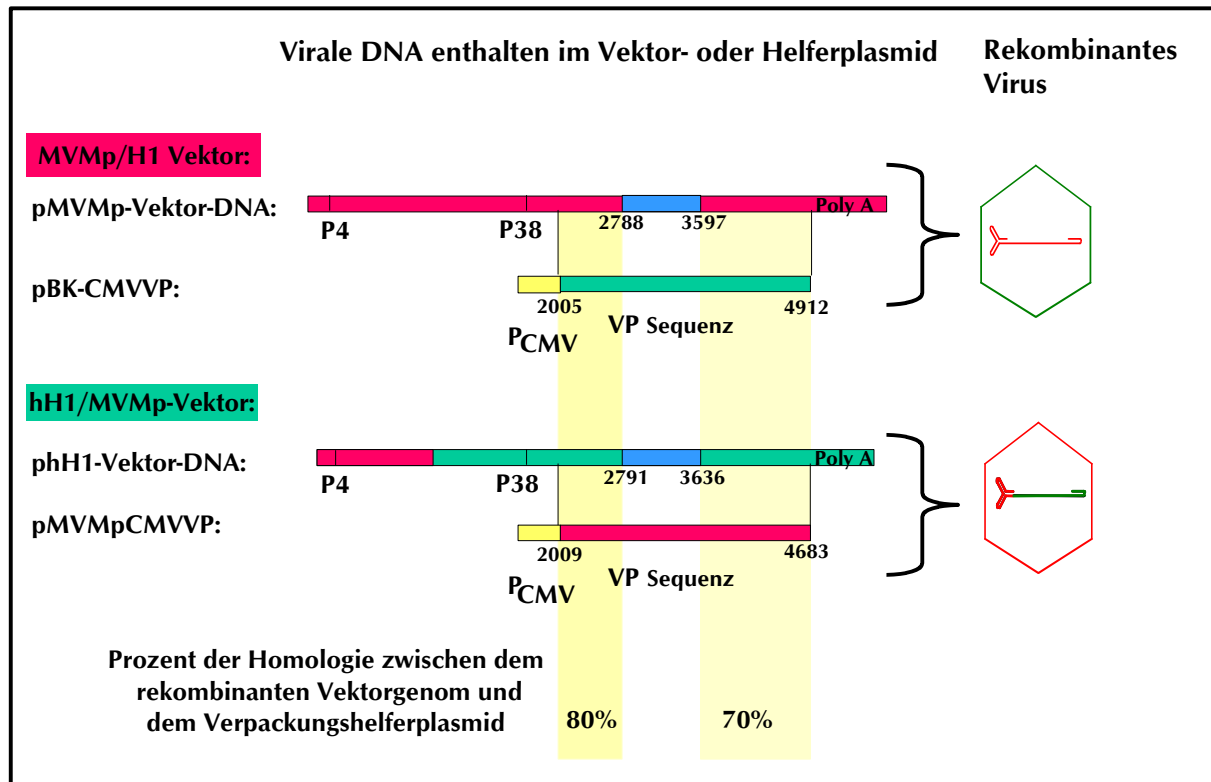
#### Abb.4-7: Schematische Darstellung der Klonierung der parvoviralen Chimären

Die in einem pUC19-Plasmid vorliegenden parvoviralen Vektoren *phH1/Δ800* und *pMVMp/Δ800* wurden jeweils durch Restriktionsenzymverdau mit *Bam*H1 und *Bgl*I in zwei Fragmente zerlegt, die entweder das rekombinante parvovirale Genom vom 5'-prime Ende bis zur *MKS* oder ab der *MKS* bis zum 3'-prime Ende enthalten. Das 3'-prime Fragment des *pMVMp/Δ800*-Vektors wurde mit dem 5'-prime Fragment des *phH1/Δ800* ligiert und somit entstand die Chimäre *pC-hH1/Δ800*. Durch die Ligation des 3'-prime Fragments des *phH1/Δ800*-Vektors und des 5'-prime-Fragments des *pMVMp/Δ800*-Plasmids entstand die Chimäre *pC-MVMp/Δ800*.

Darauf folgend wurde das *EGFP*-Fragment durch Restriktion des *pEGFP-1*-Vektors mit *Sac*I und *Not*I isoliert und in die *MKS* der beiden Chimären einkloniert, nachdem diese zuvor mit *Sac*I und *Not*I linearisiert worden waren.

#### 4.1.1.2 Produktion der MVMp- und hH1-Pseudotypen

Maxwell und Mitarbeiter konnten zeigen, dass das parvovirale Lull-Genom mit H1-, sowie auch mit MVMp- und MVMi-Kapsiden verpackt werden kann (Maxwell et al., 1993). Diese Ergebnisse ließen uns als zweite Strategie zur Reduktion der Homologien zwischen dem Verpackungsplasmid und dem rekombinanten Virusgenom die Pseudotypisierung des hH1-Genoms mit dem MVMp-Kapsid und umgekehrt verfolgen.



**Abb. 4-8: Homologieverhältnisse auf DNA-Ebene für die Pseudotypen**

In Rot sind DNA-Sequenzen aus dem MVMp-Genom dargestellt, in Grün hH1-Genom-Sequenzen, in Blau das Transgen; jeweils für das MVMp-Vektorsystem und das hH1-Vektorsystem, zuerst das rekombinante Genom, darunter das Helferplasmid. Mit Gelb sind die Teilstücke unterlegt, in denen Homologie zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Vektor-Genom besteht

Dazu wurde das rekombinante Virusgenom pH1/GFP mit dem MVMp-Verpackungshelfer pMVMpCMVVP kotransfiziert. Dadurch entstand ein Vektor, der das rekombinante hH1-Genom enthält und mit MVMp-Kapsidproteinen verpackt ist, der **hH1-GFP/MVMp**-Pseudotyp. Durch Kotransfektion des pMVMp/GFP-Plasmids mit dem pBKCMVVP-Plasmid (exprimiert H1-Kapsidproteine), wurde das rekombinante MVMp-Genom mit H1-Kapsidproteinen verpackt; der **MVMp-GFP/H1**-Pseudotyp war entstanden. Abb. 4-8 verdeutlicht die Homologieverhältnisse der Pseudotypen.

#### 4.1.2 Vergleich der erreichbaren Titer bei Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen

Die Titer autonomer Wildtyp-Parvoviren werden durch Plaque-Assay bestimmt. Für MVMP-Viren werden dafür Zellen ihres natürlichen Wirts benutzt, die murinen A9 Zellen. In diesen Zellen ist NS2 für eine produktive Infektion notwendig (Naeger et al., 1990; Brownstein et al., 1992; Cater % Pintel, 1992). H1-Viren werden auf humanen NB324K Zellen titriert, in denen NS2 nicht essentiell ist. Es gibt keine Zelllinie des natürlichen Wirts, die sich zur H1-Titration eignet. Auf NB324K Zellen können, genau wie H1-Viren, auch MVMP-Viren titriert werden, ohne NS2 zu benötigen. Die Methode des Plaque-Assays zur Virustitration ist nur für Viren möglich, die nach Infektion Nachkommenviren generieren können und diese durch Zelllyse freisetzen, wie das die Wildtypviren und auch die RCV-Kontaminanten können. Da parvovirale Vektoren auf Grund einer Deletion im Kapsidbereich nicht in der Lage sind, Nachkommenviren zu bilden und dadurch keine erkennbaren Plaques bilden können, bestimmt man ihre Titer über die Detektion der viralen DNA-Replikation in der Zelle mit einem Hybridisierungs-Assay. Ziel war es zu sehen, ob sowohl die Chimären als auch die Pseudotypen mit vergleichbar hohen Titern produziert werden können wie die Basisvektoren, von denen sie abstammen. Dies ist von essentieller Bedeutung für die Verwendung der Vektoren im Tierversuch. Da es sich sowohl bei den Chimären als auch bei den Pseudotypen um Kombinationsprodukte aus MVMP- und H1-Viren handelt wurden alle Konstrukte sowohl auf der A9 als auch der NB324K Zelllinie titriert. Der Titervergleich der verschiedenen Konstrukte wurde dann innerhalb einer Zelllinie durchgeführt. Zur Hybridisierung wurden für MVMP/GFP, C-MVMP/EGFP und MVMP-GFP/H1 eine <sup>32</sup>P markierte DNA-Sequenz aus MVMP benutzt, die spezifisch für die NS-Region ist (Kap. 3.2.11), für hH1/GFP, C-hH1/EGFP und hH1-GFP/MVMP die entsprechende Sequenz aus hH1 (Kap. 3.2.11).

##### Chimären

Die Titrationsergebnisse der Chimären auf NB324K Zellen, zu sehen in Tab 4-1, lassen folgende Tendenz erkennen:

1. Mit MVMP/GFP-Basisvektor (Spalte 1) werden deutlich höhere Titer erreicht als mit dem hH1/GFP-Basisvektor (Spalte 3).

2. Die Titer der Chimären ordnen sich dazwischen an, wobei C-hH1/EGFP (Spalte 4) mindestens doppelt so hohe Titer erreicht wie C-MVMp/EGFP (Spalte 2). Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da C-MVMp/EGFP (Spalte 2) mehr Bereiche des zu höheren Titern führenden MVMp/GFP Vektors (Spalte 1) enthält als der C-hH1/EGFP Vektor (Spalte 3). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte darin liegen, dass der in die C-hH1/EGFP-Chimäre inklonierte MVMp-Bereich (5´ Palindrom des parvoviralen Genoms) das Entstehen höherer Titer ermöglicht, entweder durch ein effizienteres Ausschneiden des parvoviralen Genoms aus dem Expressionsplasmid nach der Transfektion, oder eine bessere Replikation des viralen Genoms oder aber eine effizientere Verpackung des parvoviralen Genoms. Deshalb bietet es sich an, dieses Palindrom auch in der C-MVMp/EGFP-Chimäre zu erhalten.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit den Chimären Titer erreicht werden können, die mit denen der Basisvektoren vergleichbar sind.

**Tab. 4-1: Titration der Basisvektoren und Chimären auf NB324K Zellen**

Titerangaben in RU/2x10<sup>6</sup> 293T-Zellen

	1 MVMp/GFP Basisvektor	2 C-MVMp/EGFP Chimäre	3 hH1/GFP Basisvektor	4 C-hH1/EGFP Chimäre
Versuch A:	4,3x10 <sup>7</sup>	4,4x10 <sup>6</sup>	7,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>7</sup>
Versuch B:	3,6x10 <sup>7</sup>	4,7x10 <sup>6</sup>	4,1x10 <sup>4</sup>	7,3x10 <sup>7</sup>
Versuch C:	5,5x10 <sup>7</sup>	7,5x10 <sup>6</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>

Nach der Titration auf den humanen NB324K Zellen wurde die Titration auf murinen A9 Zellen wiederholt, die normalerweise in unserem Labor zur Titration der MVMp-Vektoren benutzt werden, und von denen bekannt war, dass H1-Wildtypviren in diesen Zellen keine Nachkommenviren produzieren können. Außerdem liefert ein hH1-Vektor keine detektierbare DNA-Replikation in A9 Zellen. Diese Betrachtung führte zu der Frage, wie sich die Chimären als Kombinationsprodukte aus H1- und MVMp-Viren auf A9 Zellen verhalten. Dafür wurden die Chimären und Basisvektoren auf A9 Zellen titriert und die erreichten Titer miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-2 zu sehen.

**Tab. 4-2: Titration der Basisvektoren und Chimären auf A9 Zellen**

	Titerangaben in RU/ $2 \times 10^6$ 293T-Zellen			
	1	2	3	4
	MVMp/GFP Basisvektor	C-MVMp/EGFP Chimäre	hH1/GFP Basisvektor	C-hH1/EGFP Chimäre
Versuch A:	$1,2 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	n.d.	n.d.
Versuch B:	$6,7 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	n.d.	n.d.
Versuch C:	$2,7 \times 10^6$	$7,5 \times 10^4$	n.d.	n.d.

n.d.: nicht detektierbar

Der in Tab. 4-2 dargestellte Versuch zeigt folgende Ergebnisse:

1. Die beiden MVMp-Konstrukte pMVMp/GFP (Spalte 1) und pC-MVMP/EGFP (Spalte 2) führen nach Infektion muriner A9 Zellen im Gegensatz zu den beiden H1-Konstrukten, hH1/GFP (Spalte 3) und C-hH1/EGP (Spalte 4) zu einer gut detektierbaren DNA-Replikation. Der unterschiedliche Zelltropismus von MVMp, H1 und ihren Konstrukten bleibt auch in den Chimären erhalten.
2. Der Titer-Unterschied von MVMp/GFP zu C-MVMp/EGFP ist auf A9 Zellen genauso hoch wie auf NB324K Zellen (Tab. 4-1).
3. Vergleicht man die Titer aus der A9-Titration mit denen aus der NB324K-Titration (Tab. 4-1) wird deutlich, dass die Titer, die mit A9 Zellen für die MVMp-Konstrukte ermittelt worden sind, wesentlich unter denen der auf NB324K Zellen ermittelten liegen. Somit scheinen A9 Zellen mit derselben Menge an Viren in weniger Zellen eine messbare Virus-Replikation zu erlauben als das bei NB324K Zellen der Fall ist. Oder umgekehrt, A9 Zellen benötigen eine größere Menge an MVMp-basierenden Vektoren, bevor die gleiche Anzahl an Zellen virale Replikation im Hybridsierungs-Assay zeigt wie NB324K Zellen. Der Grund dafür kann auf verschiedenen Stufen der Virusinfektion liegen. So können frühe Ereignisse in der Virusinfektion, wie der Virus-Eintritt oder Transport der viralen DNA zum Nukleus weniger effizient sein. Oder aber die Replikationsmaschinerie arbeitet in A9 Zellen weniger effizient als in NB324K Zellen.



## Pseudotypen

Auch bei der Herstellung der Pseudotypen wurden alle vier Konstrukte, die beiden Ursprungsvektoren hH1/GFP und MVMp/GFP, sowie die beiden Pseudotypen MVMp-GFP/H1 (MVM-GFP-Genom und H1-Kapsid) und hH1-GFP/MVMp (hH1-GFP-Genom und MVMp-Kapsid) „parallel“ produziert. Wie bei den Chimären wurden auch hier die Titrationen auf A9 und NB324K Zellen durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Titer bestimmt .

**Tab. 4-3: Titration der Basisvektoren und Pseudotypen auf NB324K Zellen**

Titerangaben in RU/  $2 \times 10^6$  293T-Zellen

	1	2	3	4
	<i>MVMp/GFP</i> Basisvektor	MVMp-GFP/H1 Pseudotyp	hH1/GFP Basisvektor	hH1-GFP/MVMp Pseudotyp
Versuch A:	$8,6 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
Versuch B:	$7,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$	$5,8 \times 10^6$
Versuch C:	$5,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$

Der Tab. 4-3 kann entnommen werden, dass die Pseudotypen mit mindestens genauso hohen Titern wie die Basisvektoren produziert werden können. Der Titer des Basisvektors MVMp/GFP (1), ein MVMp-basierendes Genom mit MVMp-Kapsiden verpackt, hat einen vergleichbaren Titer wie MVMp-GFP/H1 (2), ein MVMp-basierendes Genom mit H1-Kapsid verpackt. Der Pseudotyp hH1-GFP/MVMp (4), ein H1-basierendes Genom mit MVMp-Kapsiden verpackt, zeigt genauso hohe oder sogar höhere Titer als der H1-Basisvektor hH1/GFP-Vektor (3).

Dieselben viralen Vektoren wurden auch auf A9 Zellen titriert, zu sehen in Tab. 4-4. Die beiden Konstrukte, die ein MVMp-basierendes Genom besitzen, also MVMp/GFP und MVMp-GFP/H1, zeigen unabhängig von ihrem Kapsid detektierbare Titer nach Infektion von A9 Zellen. Dazu sind die auf einem hH1-Genom basierenden Vektoren nicht in der Lage. Somit ist der Zelltropismus für A9 Zellen für MVMp bzw. hH1 nicht vom Kapsid abhängig (siehe dazu auch Kap. 4.2.2 und 4.2.3).

**Tab. 4-4: Titration der Basisvektoren und Pseudotypen auf A9 Zellen**  
Titerangaben in RU/Zellkulturschale

	1	2	3	4
	MVMp/GFP Basisvektor	MVMp-GFP/H1 Pseudotyp	hH1/GFP Basisvektor	hH1-GFP/MVMp Pseudotyp
Versuch A:	2,9x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>	n.d.	n.d.
Versuch B:	3,2x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>6</sup>	n.d.	n.d.
Versuch C:	1,4x10 <sup>6</sup>	3,2x10 <sup>6</sup>	n.d.	n.d.

n.d.: nicht detektierbar

In zwei weiteren hier nicht gezeigten Versuchen wurden sowohl die beiden Basisvektoren, die beiden Chimären als auch die beiden Pseudotypen „in parallel“ produziert. Die Resultate daraus stehen im Einklang zu den oben beschriebenen Ergebnisse.

Außerdem wurde für jedes der Konstrukte eine sogenannte „large scale“-Produktion (Kap 3.5.1) durchgeführt, eine Produktion, wie sie normalerweise in unserem Labor zur Gewinnung rekombinanter Viren für einen Tierversuch praktiziert wird. Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl mit den Chimären als auch mit den Pseudotypen Titer erreicht werden können, die für ein Tierexperiment ausreichend sind.

Als wichtigstes Resultat für dieses Kapitel kann zusammengefasst werden, dass sowohl Chimären als auch Pseudotypen Titer in einer Höhe zeigen, die in der Höhe der Titer der Basisvektoren liegen und in einer Menge hergestellt werden können, die die Durchführung von Tierversuchen erlauben.

### 4.1.3 Vergleich der RCV-Kontamination der Basisvektoren, der Chimären und der Pseudotypen

#### 4.1.3.1 Detektion der RCV-Kontamination mit Plaque-Assay

Im Plaque-Assay können nur Viren, die in der Lage sind, Nachkommenviren zu generieren, eine sichtbare Plaque bilden, also Wildtypvirus und RCVs. In einem rekombinanten Virusstock kann man mit Hilfe des Plaque-Assays die Menge an RCVs bestimmen. Mit einem Hybridisierungs-Assay ermittelt man die Menge an Partikeln, die DNA amplifizieren können, den Titer einer Virussuspension rekombinanter Vektoren.

Setzt man die Menge der RCVs ins Verhältnis zu dem ermittelten Titer, erhält man die RCV-Kontamination eines Virusstocks. Für die Chimären und die Pseudotypen, die genauso effizient produziert werden können wie die Basisvektoren, soll abgeklärt werden, wie hoch ihr RCV-Anteil im Vergleich zu dem RCV-Anteil der Basisvektoren ist.

Errechnet man die RCV-Kontamination für die Experimente, in denen die Chimären hergestellt worden sind, ergibt sich das Bild in der Tab. 4-5. Für alle Basisvektoren (Spalte 1 und 3) konnte mit dem Plaque-Assay eine RCV-Kontamination gemessen werden, die zwischen 0,1 und 0,6% lag. Für die Chimären (Spalte 2 und 4) waren bei der niedrigst möglichen Virusverdünnung keine Plaques erkennbar. Nur in Versuch C wurden für die Chimäre C-MVMp/EGFP Plaques sichtbar, und es konnte eine RCV-Kontamination errechnet werden.

**Tab. 4-5: Chimären: Plaque-Assay auf NB324K Zellen**

RCV-Kontamination in % Angabe

	1 MVMp/GFP Basisvektor	2 C-MVMp/EGFP Chimäre	3 hH1/GFP Basisvektor	4 C-hH1/EGFP Chimäre
Versuch A:	0,01	n.d.	0,58	n.d.
Versuch B:	0,01	n.d.	0,03	n.d.
Versuch C:	0,01	0,00011	0,03	n.d.

n.d.: nicht detektierbar

Für die Chimären bedeutet „nicht detektierbar“, dass in der 200 µl Virussuspension, die auf die Zellen aufgetragen wurde, keine plaqueformierende Einheit vorhanden war, also kein plaquebildender RCV. Es müssen weniger als ein plaquebildender RCV pro Partikelzahl dieser 200 µl reinen Virussuspension vorhanden sein. Anhand dieser Überlegung lassen sich Werte errechnen, unter denen die RCV-Kontamination liegen muss. Für C-MVMp/EGFP liegt die RCV-Kontamination in Versuch A unter 0,000136% und in Versuch B unter 0,0001%; in Versuch C konnte eine Kontamination von 0,00011% nachgewiesen werden. Also liegen in der C-MVMp/EGFP-Chimäre um mindestens ca.100 mal weniger RCVs vor als in dem zugehörigen Basisvektor. Für die C-hH1/EGFP-Chimäre lagen die RCV-Werte unter 0,000033% (Versuch A); 0,000006% (Versuch B) und 0,000035% (Versuch C). Die RCV-Kontamination der Chimäre liegt auch hier deutlich unter der RCV-Kontamination des Basisvektors. Von 875 mal niedriger

im Versuch C über 5000 mal niedriger im Versuch B bis hin zu 17575 mal niedriger in Versuch A, bei dem allerdings die RCV-Kontamination des Basisvektors ungewöhnlich hoch war. Auch bei weiteren Wiederholungen dieser Versuche konnte diese Tendenz bestätigt werden.

Dieselben Versuche wurden auf A9 Zellen durchgeführt, dabei wurde für die MVMp/GFP-Vektoren eine RCV-Kontamination derselben Höhe wie die auf den NB324K Zellen ermittelten festgestellt. Für alle anderen Konstrukte konnten keine Plaques detektiert werden.

Bei der Berechnung der RCV-Kontamination für die Experimente, in denen parallel die Basisvektoren und Pseudotypen hergestellt wurden, ergab sich eine RCV-Kontamination der Basisvektoren zwischen 0,012 und 0,8%. In keinem der Fälle waren aber Plaques für die Pseudotypen detektierbar, siehe dazu Tab. 4-6.

**Tab.4-6: Pseudotypen: Plaque-Assay auf NB324K Zellen**  
RCV-Kontamination in % Angabe

	1	2	3	4
	MVMp/GFP Basisvektor	MVMp-GFP/H1 Pseudotyp	hH1/GFP Basisvektor	hH1-GFP/MVMp Pseudotyp
Versuch A:	0,03	n.d.	0,012	n.d.
Versuch B:	0,08	n.d.	0,35	n.d.
Versuch C:	0,04	n.d.	0,8	n.d.

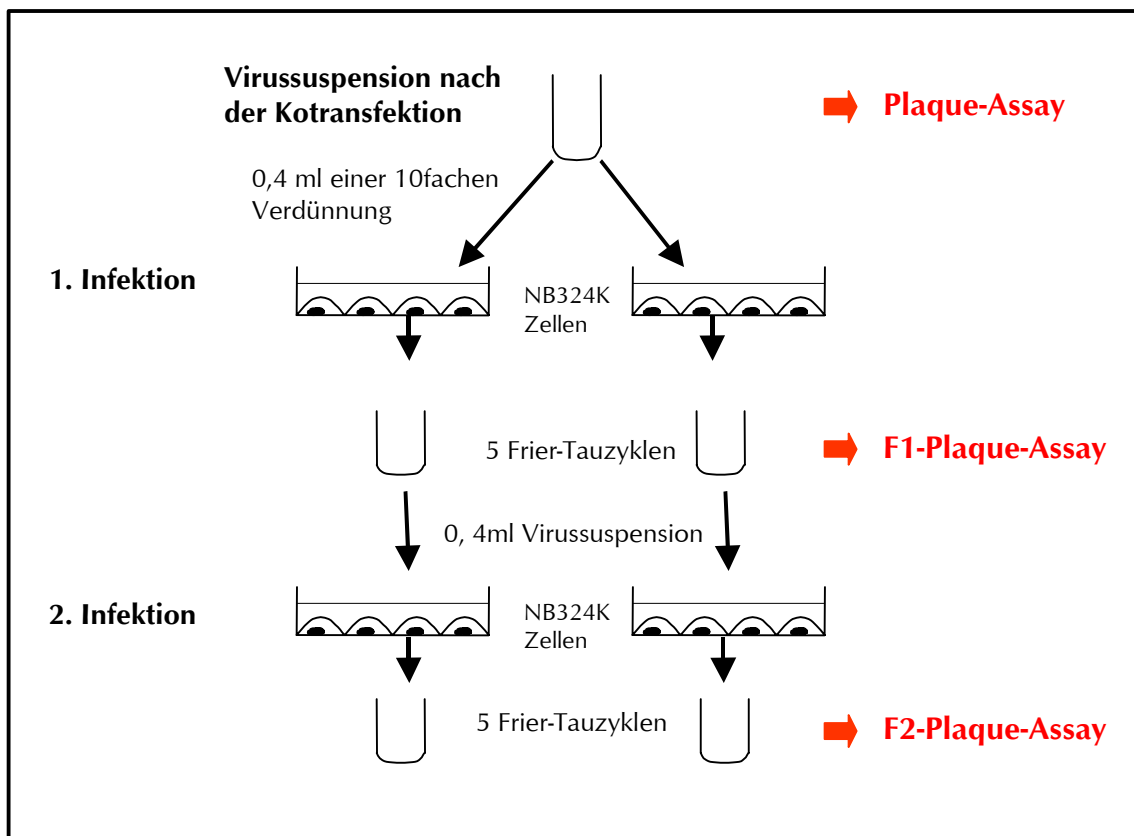
n.d.: nicht detektierbar

Genau wie für die Chimären lässt sich hier ein Wert errechnen, unter dem die RCV-Kontamination liegen muss. Dabei errechnete sich eine RCV-Kontamination für MVMp-GFP/H1 von unter 0,00006% bei Versuch A, unter 0,000042% bei Versuch B, und unter 0,000015% bei Versuch C. Für hH1-GFP/MVMp errechnete sich eine RCV-Kontamination unter 0,00023% bei Versuch A, unter 0,000086% bei Versuch B und unter 0,00016% bei Versuch C. Dies entspricht einer durchschnittlich 1645 mal geringeren RCV-Kontamination bei den Pseudotypen als bei den Basisvektoren. Allerdings muss noch einmal betont werden, dass es sich dabei um einen rein rechnerischen Wert handelt und die Schwankungen sehr hoch sind, da schon die RCV-Kontamination der Basisvektoren nicht unerheblichen Schwankungen unterliegt und auch die Titer eine gewisse Bandbreite zeigen.

Derselbe Versuch wurde auf A9 Zellen durchgeführt. Dabei wurde für den MVMp/GFP-Vektor dieselbe RCV-Kontamination wie auf NB324K Zellen ermittelt. Für alle anderen Konstrukte waren keine Plaques detektierbar.

Diese Versuche wurden mehrmals wiederholt, auch in einer „large scale“-Produktion (Kap. 3.5.1). Sie führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Herstellung der Pseudotypen und Chimären voll und ganz die in sie gesetzten Erwartungen einer deutlich reduzierten RCV-Kontamination erfüllt hat. Zu klären blieb noch, ob diese Virusstocks völlig RCV-frei sind oder unter der Detektionsgrenze des Plaque-Assays liegen. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde die in Abb. 4-9 schematisch dargestellte RCV-Amplifikation (Kap. 3.5.6) durchgeführt.



**Abb. 4-9: Schematische Darstellung der RCV-Amplifikation**

Die aus der Kotretransfektion gewonnene Virussuspension wird zu einem Teil direkt in einem Plaque-Assay eingesetzt. Zum anderen wird mit 400 µl einer 10-fachen Verdünnung eine Infektion von NB324K Zellen durchgeführt und den RCV-Kontaminanten die Möglichkeit gegeben, Nachkommenviren zu bilden, die nach Freisetzung durch Frier-Tauzyklen in einem F1-Plaque-Assay nachgewiesen werden können. Oder die Viren werden in eine zweite Virusamplifikationsrunde gegeben und dann die entstandenen RCVs in einem F2-Plaque-Assay nachgewiesen.

Sinn dieser RCV-Amplifikation ist es, den in der Transfektion entstandenen RCVs durch eine Zellinfektion mit 400 µl einer 10-fachen Virusverdünnung die Möglichkeit zu geben,

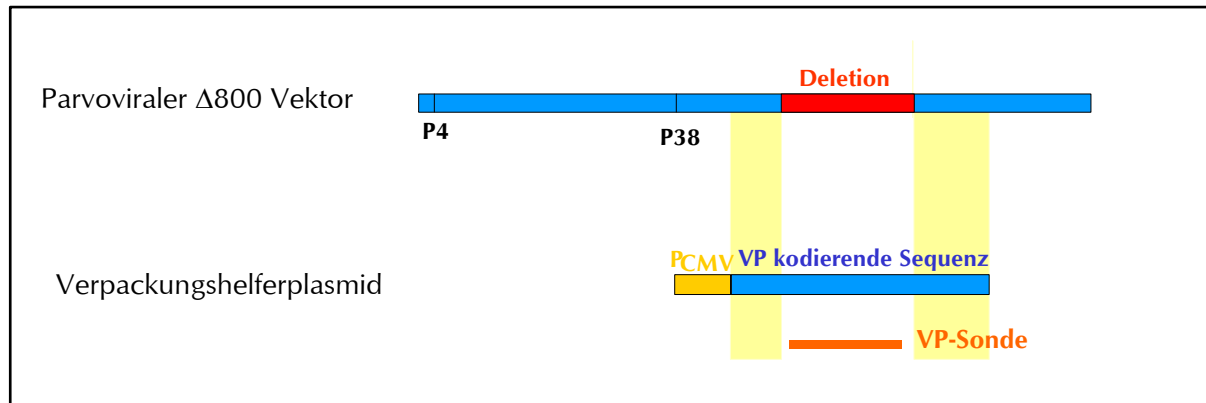
sich in den infizierten NB324K Zellen zu vermehren und so neue RCVs zu bilden. 48h später wurden diese Zellen geerntet und das Virus durch 5 Frier-Tau-Zyklen freigesetzt. Mit dieser Virussuspension wurde dann entweder ein Plaque-Assay (F1-Generations-Plaque-Assay) oder eine zweite Amplifikationsrunde mit darauffolgendem Plaque-Assay (F2-Generations-Plaque-Assay) durchgeführt. Die Ergebnisse des F1- und F2-Plaque-Assay sind nicht mehr quantitativ auswertbar. Es kann somit keine Prozentangabe der Wildtypkontamination gemacht werden. Nur eine qualitative Aussage ist möglich, ob RCVs in den produzierten Virusstocks vorhanden sind oder nicht.

Im Falle der Chimären waren meist schon nach der ersten und immer nach der zweiten Amplifikationsrunde RCVs als Plaques detektierbar. Pseudotypen zeigten meist erst nach der zweiten Amplifikationsrunde detektierbare Plaques. In wenigen Fällen waren auch nach der zweiten Runde der RCV-Amplifikation keine Plaques detektierbar. Zusammenfassend können wir sagen, dass tatsächlich das erste Ziel dieser Arbeit erreicht wurde, bei gleichbleibenden Titern eine deutliche Reduktion der RCV-Kontamination zu erhalten. Dabei zeigte sich eine Reduktion um ca. den Faktor 100, im niedrigsten Fall über 1600 und 5000 bis zu 17000, immer abhängig von der RCV-Kontamination der Basisvektoren und von den erreichten Titern.

#### **4.1.3.2 Detektion der RCV-Kontamination mit VP-Hybridisierungs-Assay**

Wir wollten überprüfen, ob in unseren Vektorstocks rekombinierte RCVs vorliegen, die den Teil des deletierten VP-Bereichs rekombiniert haben, aber keine Plaques bilden können, wie Dupont und Mitarbeiter es für ihre Vektoren beschrieben haben (Dupont et al., 2001). Der Grund dafür könnte in einer unvollständigen Rekombination der fehlenden VP-Bereiche liegen, so dass überhaupt keine oder keine funktionstüchtigen Kapsidproteine exprimiert werden können. Mit einer VP-Sonde aus dem Deletionsbereich des parvoviralen Vektors können in einem VP-Hybridisierungs-Assay alle RCVs erkannt werden, die ihre DNA replizieren. Dazu wurde eine VP-Sonde konstruiert, die etwas über 700bp lang ist und beinahe den gesamten Deletionsbereich  $\Delta 800$  umfasst (Abb. 4-10). Die aus dem MVMp-Genom hergestellte VP-Sonde, wurde für die Hybridisierungs-Assays der folgenden Konstrukte verwendet: MVMp/GFP, C-MVMp/EGFP und MVMp-GFP/H1. Während eine VP-Sonde, erhalten aus dem hH1-Genom, für die Konstrukte hH1/GFP, C-hH1/EGFP und hH1-GFP/MVMp angewandt

wurde. Aus ein und derselben Verdünnungsreihe der rekombinanten Viren wurden Proben zur NS-Titration (entspricht den Titern der rekombinanten Viren, Kap. 3.2.11, 3.5.4), zum Plaque-Assay und zum VP-Hybridisierungs-Assay genommen.



**Abb.4-10: Schematische Darstellung der Bereiche, aus denen die VP-Sonden erstellt wurden**

Mit dem VP-Hybridisierungs-Assay wurde eine 2-4 mal höhere RCV-Kontamination ermittelt als mit dem Plaque-Assay. Um herauszufinden, inwieweit dabei die unterschiedliche Sensitivität der beiden Methoden eine Rolle spielt, wurde die Sensitivität beider Methoden miteinander verglichen. Dazu wurden ein MVMp- und ein H1- Wildtypvirusstock parallel im Plaque-Assay und im VP-Hybridisierungs-Assay auf ihre Titer hin untersucht. Bei einem Wildtypvirusstock sollte jedes Virus, das seine DNA amplifizieren kann, also im VP-Hybridisierungs-Assay sichtbar ist, auch ein infektiöses Virus produzieren, also auch im Plaque-Assay als Plaque sichtbar sein. Zeigt sich nun ein Unterschied in den so ermittelten Titern des Wildtypvirus, so liegt das an der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Methoden.

**Tab. 4-7: Sensitivitätsvergleich: Plaque-Assay und VP-Hybridisierungs-Assay**

	H1-wt	MVMp-wt
<b>Plaque-Assay auf NB324K Zellen</b>	1,3 x 10 <sup>8</sup> RU/ml	2,7 x 10 <sup>8</sup> RU/ml
VP-Hybridisierungs-Assay auf NB324K Zellen	4,9 x 10 <sup>8</sup> RU/ml	7,5 x 10 <sup>8</sup> RU/ml

Aus Tab. 4-7 ist deutlich zu entnehmen, dass auch hier der VP-Hybridisierungs-Assay bis zu 3 mal höhere Werte als der Plaque-Assay liefert. Somit ist davon auszugehen, dass auch der im Falle der rekombinanten Viren ermittelte Unterschied methodischer Art ist.

Das zeigt, im Gegensatz zu Duponts Ergebnissen (Dupont et al. 2001), dass in unseren rekombinanten Virusstocks jede Rekombination zu einem im Plaque-Assay detektierbaren Virus führt.

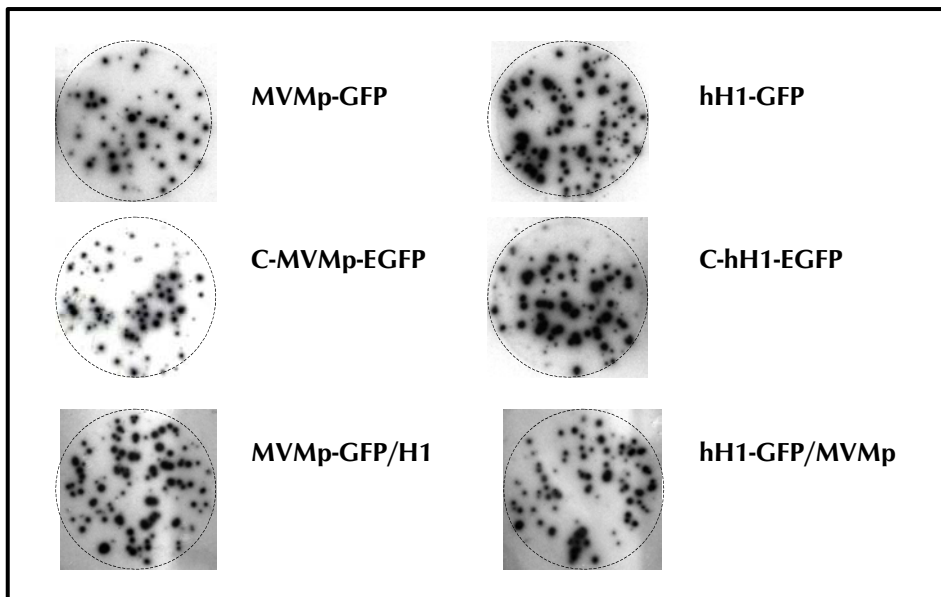
## **4.2 Zelltropismus der MVMp- und hH1-Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen**

Das murine MVMp-Virus und Ratten H1-Virus besitzen einen unterschiedlichen Zelltropismus. So kann MVMp in A9 Zellen Nachkommenviren bilden, während H1 dazu nicht in der Lage ist. Mit den von uns konstruierten rekombinanten Pseudotypen hatten wir ein gutes Werkzeug in Händen, um zu untersuchen, ob für den Tropismus das Kapsid oder das Genom des Virus` der determinierende Faktor ist. In Kap. 4.1.2 Tab. 4-4 wurde schon gezeigt, dass in A9 Zellen nur der Pseudotyp mit dem MVMp-Genom und dem H1-Kapsid repliziert, nicht aber der Pseudotyp mit dem hH1-Genom und dem MVMp-Kapsid. Im Folgenden wird diese Beobachtung näher analysiert und auch in anderen Zellen überprüft.

### **4.2.1 Die Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen in NB324K Zellen: Genom-Replikation und Expression**

H1- und MVMp-Virus können zu einer produktiven Infektion in den humanen NB324K Zellen führen. Sie können in diese Zellen eindringen, dort ihre DNA replizieren, ihre Proteine exprimieren und Nachkommenviren produzieren. Deshalb war zu erwarten, dass die rekombinanten Vektoren basierend auf hH1- und MVMp-Virus ebenfalls in die NB324K Zellen eindringen, dort nach der Konversion ihre Proteine exprimieren und schließlich ihre DNA replizieren können. Durch das Detektieren der DNA-Replikation und der NS-Protein-Expression auf NB324K Zellen konnte die Funktionstüchtigkeit der Chimären getestet werden, was insofern wichtig war, da ihr Genom durch die Klonierung verändert worden war. Mit einem NS-Hybridisierungs-Assay wurde getestet, ob alle Konstrukte DNA-Replikation zeigen. Dazu wurden NB324K Zellen mit einer sehr geringen MOI (0,001) infiziert, nach zwei Tagen auf einen Nylonfilter übertragen, hitzefixiert und danach mit einer NS1-spezifischen DNA-Probe hybridisiert, wodurch die in der Zelle amplifizierte Virus-DNA detektiert wurde. In Abb. 4-11 ist deutlich zu erkennen, dass das virale Genom sowohl der beiden Basisvektoren als auch der beiden Chimären und Pseudotypen in NB324K Zellen nach Infektion replizieren kann.

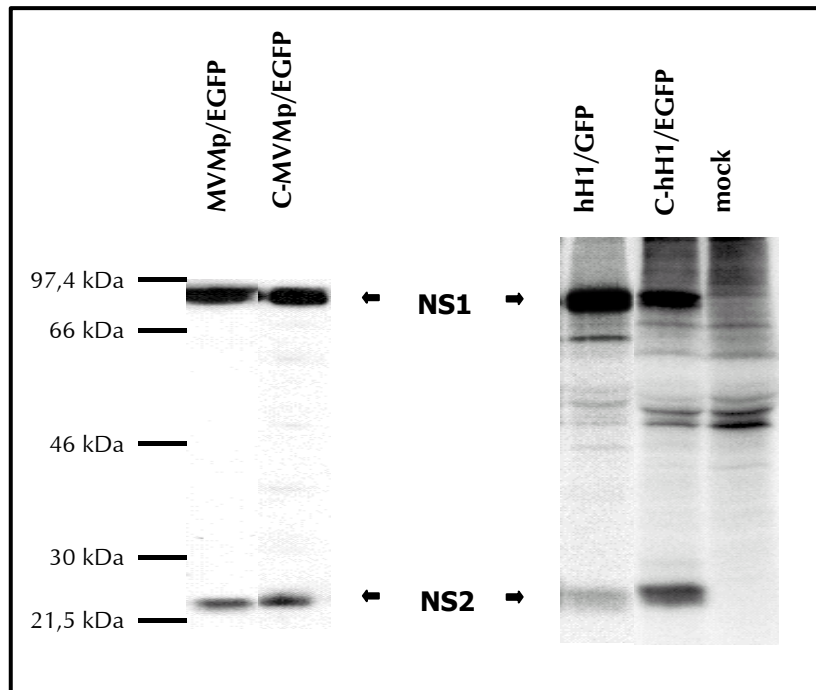




**Abb. 4-11: Nachweis viraler DNA-Replikation in NB324K Zellen im NS-Hybridisierungs-Assay**

NB324K Zellen wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert, nach zwei Tagen auf eine Nylonmembran übertragen und dort die DNA hitzefixiert. Danach wurde mit einer NS-spezifischen Sonde hybridisiert. Dadurch wird die Virus-DNA-Amplifikation spezifisch nachgewiesen. Jedes der Konstrukte führt zu einer deutlich sichtbaren DNA-Amplifikation in NB324K Zellen, zu sehen als schwarzer Punkt.

Getestet wurde auch die Expression der beiden nichtstrukturalen Proteine NS1 und NS2 nach Infektion von NB324K Zellen. Wie in Abb. 4-12 zu sehen ist, konnte für die beiden MVMp-Konstrukte MVMp/EGFP und C-MVMp/EGP durch einen Western-Blot mit dem SP7-Antikörper NS1 und dem SP6-Antikörper NS2 nachgewiesen werden. Für die beiden hH1-Konstrukte hH1/EGFP und C-hH1/EGFP wurde die Expression der NS-Proteine in einer Immunpräzipitation mit Hilfe des SP11-Antikörpers nachgewiesen. Wie in Abb. 4-12 zu erkennen ist, exprimieren sowohl die viralen Genome der Basisvektoren wie auch die der neuklonierten Chimären eindeutig NS1 und NS2.

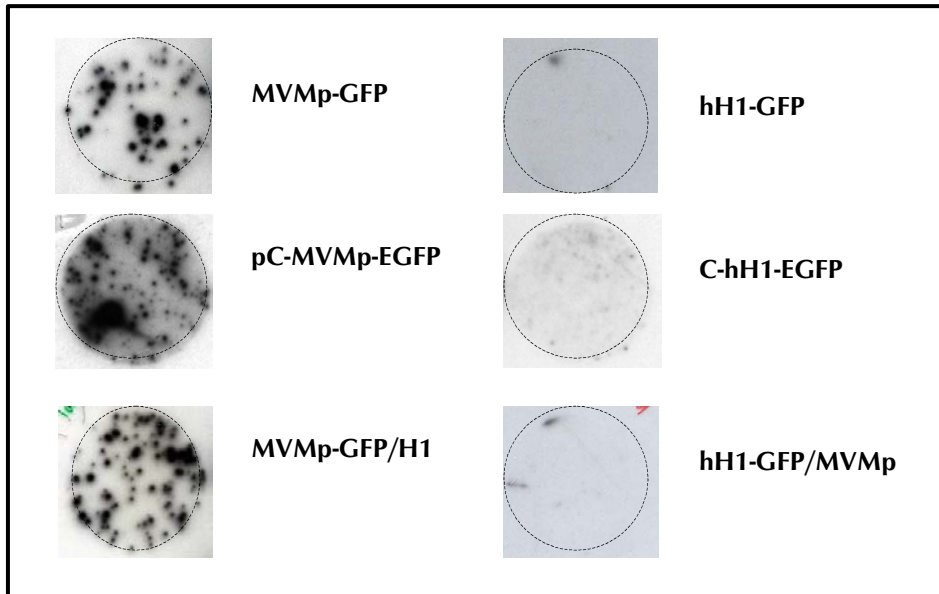


**Abb. 4-12: Nachweis der NS1- und NS2-Expression in NB324K Zellen nach Infektion mit den Basisvektoren und ihren zugehörigen Chimären**

NB324K Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert. Für die MVMp-Konstrukte MVMp/EGFP und C-MVMp/EGFP wurden die Zellen nach 48 h in 200  $\mu$ l Western-Blot-Ladepuffer aufgenommen, 20  $\mu$ l davon über ein 10%iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Anschließend wurde mit dem NS1-Antikörper SP7, dem NS2-Antikörper SP6 und dem HPR-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert und eine ECL-Reaktion angeschlossen. Für die hH1-Konstrukte hH1/EGFP und C-hH1/EGFP wurde 18h nach Infektion 2h mit  $^{35}$ S gelabelt, danach die  $^{35}$ S-markierten Zellextrakte mit RIPA-Puffer ohne SDS mit 5  $\mu$ l SP11-Antikörper für 1 h, danach für 1 weitere Stunde mit Protein A-Sepharose inkubiert. Die Auftrennung der Präzipitate erfolgte über ein 10%-iges SDS-PAA-Gel. Nach Trocknen des Gels wurde es mit einem Röntgenfilm bei  $-70^{\circ}\text{C}$  exponiert. Deutlich ist zu erkennen, dass alle vier Genome, die der Basisvektoren, und die der neuklonierten Chimären beide nichtstrukturalen Proteine exprimieren können.

#### 4.2.2 Die Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen in A9 Zellen: Genom-Replikation und Expression

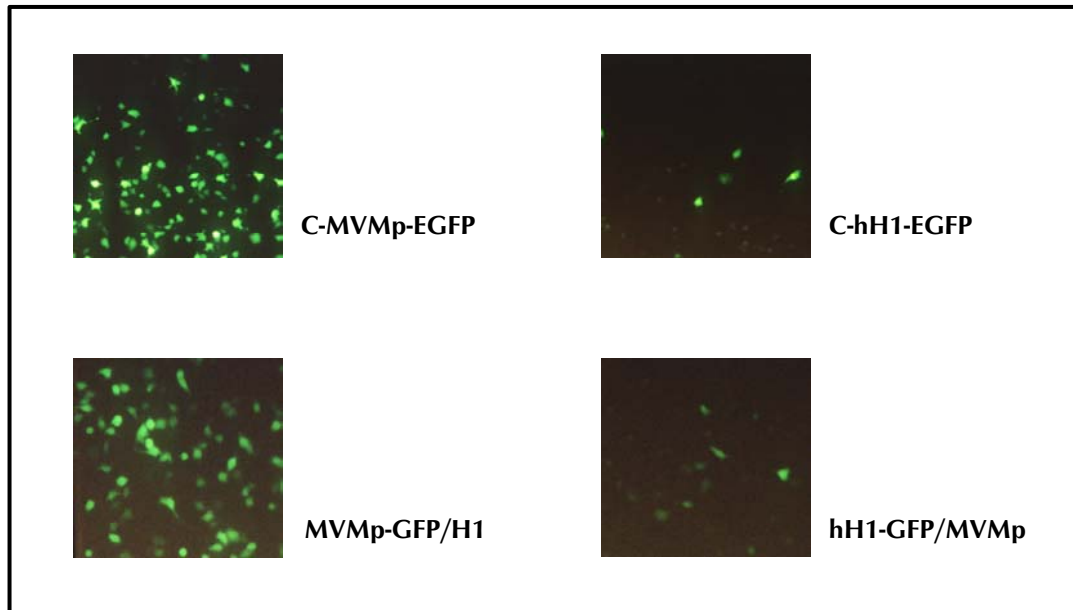
Wir wollten der Frage nachgehen, ob das Genom, das Kapsid oder beides für den Tropismus von MVMp und hH1 in A9 Zellen verantwortlich ist. Aus den in Kap. 4.1.2 gezeigten Titrationsversuchen, dargestellt in Tab. 4-2 und Tab. 4-4, ist ersichtlich, dass weder hH1/GFP, noch C-hH1/GFP oder H1-GFP/MVMp-Vektoren nach Infektion von A9 Zellen DNA-Replikation zeigen. In Abb. 4-13 wird dieses Ergebnis noch einmal optisch verdeutlicht. Links sind alle Konstrukte zu sehen, die ein MVMp-basierendes Genom besitzen und hier mit einer MOI von 0,03 (Titer auf NB324K Zellen ermittelt) infiziert wurden.



**Abb. 4-13: Nachweis der DNA-Replikation in A9 Zellen nach Infektion im NS-Hybridisierungs-Assay**

A9 Zellen wurden infiziert, nach zwei Tagen auf eine Nylonmembran übertragen und dort die DNA hitzefixiert. Danach wurde mit einer NS-spezifischen Sonde hybridisiert und dadurch die Virus DNA-Amplifikation spezifisch nachgewiesen. Nur Viren mit einem MVMp-basierenden Genom (links) führen zu einer deutlich sichtbaren DNA-Amplifikation in A9 Zellen. Bei Viren mit einem hH1-basierenden Genom lässt sich auch bei deutlich erhöhter MOI keine DNA-Amplifikation detektieren.

Die Konstrukte rechts, denen gemeinsam ist, dass sie alle ein hH1-basierendes Genom besitzen, zeigen keine DNA-Amplifikation. Dabei war die bei ihnen eingesetzte MOI deutlich höher. Es wurden 100 µl pure Virussuspension mit 300 µl Medium vermischt und zur Infektion auf die Zellen aufgetragen. Damit ergeben sich MOIs, die je nach ermitteltem Titer von 1 bis 10 reichten. MOIs, bei denen im Falle der MVMp-basierenden Vektoren die hybridisierten Filter tiefschwarz und unauswertbar waren, führten für die hH1-basierenden Konstrukte dagegen zu Filtern, die mit denen der Negativkontrolle vergleichbar waren. Dasselbe Bild spiegelte sich auf der GFP-Expressionsebene wider, dargestellt in Abb. 4-14. Dabei wurden die A9 Zellen mit einer MOI von 10 infiziert und über 72 h beobachtet. Man konnte sehen, dass die beiden Konstrukte mit einem MVMp-basierenden Genom, die Chimäre C-MVMp/EGFP (MVMp-Kapsid) und der Pseudotyp MVMp-GFP/H1 (H1-Kapsid), eine hohe Anzahl GFP-fluoreszierender Zellen zeigten, unabhängig von ihrem Kapsid, während die Konstrukte mit einem hH1-basierenden Genom, die Chimäre C-hH1/EGFP (H1-Kapsid) und der Pseudotyp hH1-GFP/MVMp (MVMp-Kapsid), unabhängig von ihrem Kapsid wenige GFP-positive Zellen zeigten.

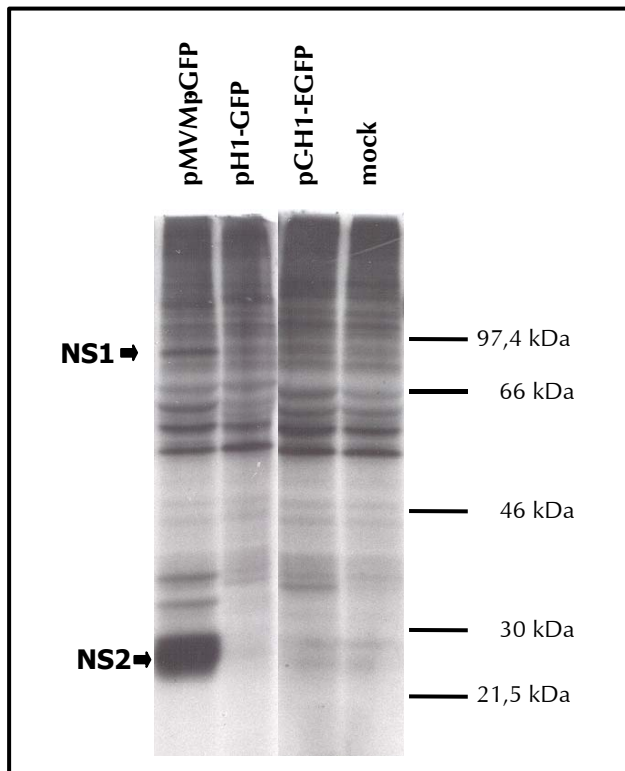


**Abb. 4-14: Transduktion von GFP 72h nach Infektion von A9 Zellen mit Chimären und Pseudotypen**

A9 Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und über 72h beobachtet. Dabei lässt sich erkennen, dass genau die Konstrukte, die auch schon im Hybridisierungs-Assay DNA-Amplifikation zeigten auch hier GFP-Expression zeigen, nämlich sowohl die Chimäre als auch der Pseudotyp, die ein MVMp-basierendes Genom haben, unabhängig von ihrem Kapsid. Während die Chimäre als auch der Pseudotyp mit einem hH1-basierenden-Genom kaum GFP-positive Zellen zeigen, auch unabhängig von ihrem Kapsid.

Unabhängig davon, ob das MVMp-Vektorgenom mit einem H1-Kapsid oder mit einem MVMp-Kapsid verpackt ist, kann es in einer A9 Zelle sowohl virale DNA-Amplifikation als auch Transgenexpression zeigen. Umgekehrt zeigt ein hH1-Vektorgenom keine DNA-Amplifikation und auch keine Transgenexpression nach Infektion in A9 Zellen, egal ob es mit einem H1-Kapsid oder einem MVMp-Kapsid verpackt ist. Beide Kapside ermöglichen also gleich gut das Eindringen des Virus in die A9 Zelle. Der restringierende Schritt muss nach dem Eintritt des Virus` in die Zelle stattfinden, auf Ebene der Dekapsidierung, der Konversion oder der Replikation. Aus diesem Grunde waren wir daran interessiert zu sehen, ob die NS-Proteine exprimiert werden. Ist dies der Fall, wäre der Konversionsvorgang ungestört abgelaufen, aber die hH1-NS-Proteine könnten in A9 Zellen ihre Aufgaben nicht erfüllen. Sind dagegen keine NS-Proteine detektierbar, ist das ein Hinweis auf eine nicht erfolgte Konversion. A9 Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert und anschließend eine Immunpräzipitation (IP) mit dem NS1- und NS2-erkennenden SP11-Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 4-15 dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass der als Positivkontrolle benutzte MVMp-GFP-infizierte A9 Zellextrakt (ganz linke Spur) eine NS1- und NS2-Bande aufweist, während für die beiden H1-basierenden Genome pH1-GFP und pC-hH1-EGFP beide nichtstrukturalen Proteine

nicht sichtbar waren. Also scheint schon die Bildung der nichtstrukturalen Proteine und somit die Konversion gehemmt zu sein.



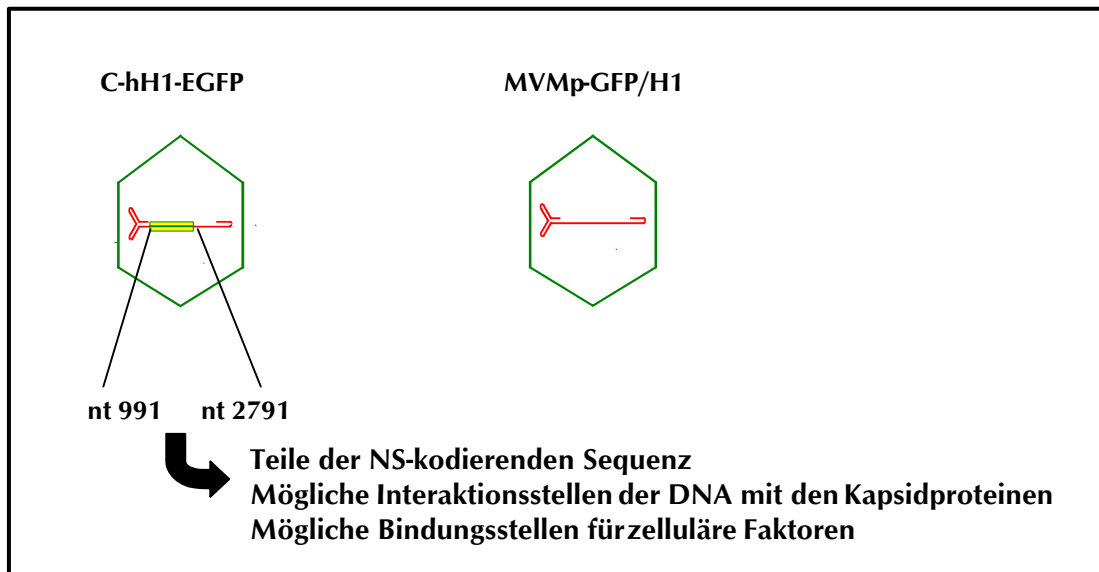
A9 Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert, 18h nach Infektion 2h  $^{35}\text{S}$  gelabelt, danach die  $^{35}\text{S}$ -markierten Zellextrakte mit RIPA-Puffer ohne SDS mit  $5\mu\text{l}$  SP11-Antikörper für 1h inkubiert, danach für eine weitere Stunde mit Protein A-Sepharose. Die Auftrennung der Präzipitate erfolgte über ein 10%iges SDS-PAA-Gel. Nach Trocknen des Gels wurde es mit einem Röntgenfilm bei  $-70^\circ\text{C}$  exponiert. Deutlich ist zu erkennen, dass im Falle der beiden Vektoren mit dem hH1-basierenden Genom hH1-GFP und ChH1-GFP weder NS1 noch NS2 detektiert werden kann, während es in der Positivkontrolle MVMp-GFP deutlich zu sehen ist.

Abb. 4-15: Immunpräzipitation der NS1- und NS2-Proteine nach Infektion von A9 Zellen

#### 4.2.3 Untersuchung des Genombereichs und seine Bedeutung für den A9-Zelltropismus in hH1- und MVMp-Vektoren

Wie aus dem Hybridisierungs-Assay und dem GFP-Expressionsversuch auf A9 Zellen zu erkennen ist, kann das MVMp-GFP-Genom verpackt mit MVMp- oder H1-Kapsid nach Infektion von A9 Zellen NS-Proteine exprimieren und die virale DNA replizieren, während das hH1-GFP-Genom dies weder mit H1- noch mit MVMp-Kapsidierung leisten kann. Um herauszufinden welcher Bereich des Genoms dafür von Bedeutung ist verglichen wir den Pseudotyp MVMp-GFP/H1 und die Chimäre C-hH1/EGFP, sie besitzen beide ein H1-Kapsid. Auch Teile ihres Genoms sind die gleichen, abgesehen vom Sequenzabschnitt 991 bis 2791, der im Falle der Chimäre C-hH1/EGFP aus dem H1-Genom stammt, im Falle des Pseudotypen MVMp-GFP/H1 aus dem MVMp-Genom. Während der MVMp-GFP/H1 Pseudotyp in A9 Zellen sowohl im Hybridisierungs-Assay, wie auch im GFP-Expressionsversuch dieselbe Effizienz wie ein MVMp-GFP-Virus zeigt, zeigt die Chimäre einen stark reduzierten (GFP-Expressionsversuch) oder keinen Effekt

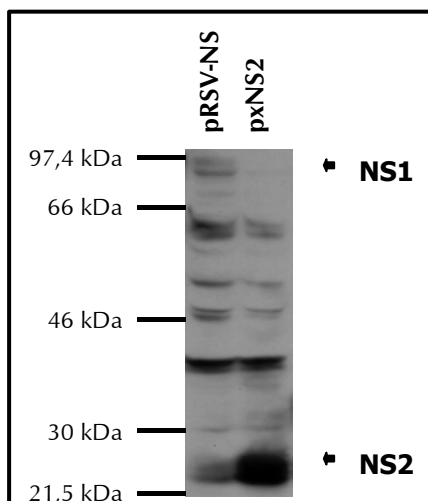
(Hybridisierungs-Assay). In Abb. 4-16 ist der Unterschied zwischen den beiden Vektoren MVMp-GFP/H1 und C-hH1-EGFP genauer dargestellt.



**Abb. 4-16: Vergleich der C-hH1-GFP-Chimäre und des MVMp-GFP/H1-Pseudotyp**

Während das MVMp-GFP/H1-Virus eine effiziente Infektion der A9 Zellen zeigt, ist mit dem C-hH1-EGFP-Virus ein stark reduzierter Effekt in A9 Zellen zu sehen. Beide Vektoren besitzen das gleiche Kapsid, sie unterscheiden sich in einem 1800 Basenpaaren langen DNA-Bereich, der den Grund für ihr unterschiedliches Verhalten in A9 Zellen enthalten muss.

Offensichtlich liegt der Grund für die effiziente Replikation und Expression des MVMp-GFP/H1-Virus, bzw. die Ursache für die Unfähigkeit des C-hH1-EGFP in dem Bereich dieser 1800 Basenpaare. In diesem Bereich finden sich Teile der für NS1- und NS2-kodierenden Sequenzen und können, mögliche Interaktionsstellen der Virus-DNA mit den Kapsidproteinen oder mögliche Bindungsstellen für zelluläre Faktoren sein, die die virale Replikation inhibieren oder aktivieren.



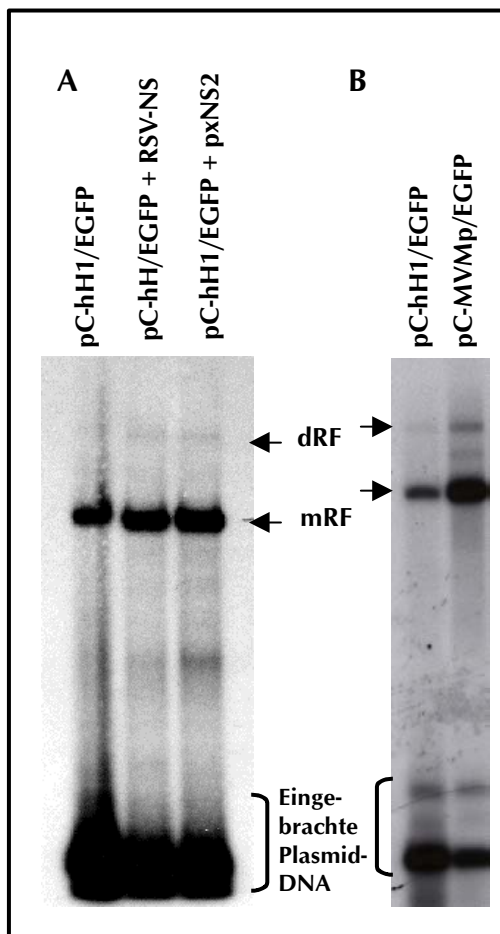
$10^6$  A9 Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  der angegebenen Plasmide wie oben beschrieben (siehe auch Kap. 5.3.2) transfiziert, nach 48h in  $200 \mu\text{l}$  Western-Blot-Ladepuffer aufgenommen,  $10 \mu\text{g}$  davon über ein 10%-iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebロットet. Anschließend hybridisierte man mit dem NS1-Antikörper SP7, dem NS2-Antikörper SP6 und dem HRP-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper mit anschließender ECL-Reaktion.

In dem Western-Blot ist zu sehen, dass der pRSV-NS Vektor sowohl NS1, wie auch NS2 exprimiert. Wohingegen der pxNS2-Vektor zwar eine hohe Menge an NS2, aber kein NS1 exprimiert.

**Abb. 4-17: Kontrolle der NS-Expression des pRSV-NS- und pxNS2-Vektors in transfizierten A9 Zellen**



Um den Einfluss der nichtstrukturalen Proteine zu bestimmen, wurde ein Kotransfektionsexperiment in A9 Zellen durchgeführt, mit dem das virale Genom des C-hH1/EGFP-Virus zusammen mit einem Expressionsvektor, der entweder im Falle des pRSV-NS Vektors (Spegelaere et al., 1994; Kap. 3.2.1) NS1 und NS2 des MVMp-Virus oder im Falle des pxNS2-Vektors (Salome & Bodendorf, Kap. 3.2.1) nur NS2 des MVMp-Virus exprimiert. Zuerst wurden beide Vektoren auf die Expression der jeweiligen Proteine in A9 Zellen untersucht, zu sehen in Abb. 4-17.



$10^6$  A9 Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  der angegebenen Plasmide mit der  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ -Methode und anschließend Glycerolschock transfiziert. 48h später wurden die Zellen in Hirtextraktionspuffer aufgenommen und eine Hirtextraktion mit anschließendem DpnI-Verdau durchgeführt. Nach Auftrennen über ein 1% iges Agarosegel wurde es auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer  $\text{P}^{32}$ -markierten NS1(H1)-Sonde hybridisiert.

dRF: dimere replikative Form  
mRF: monomere replikative Form

In Blot **A** und **B** ist zu sehen, dass auch die Chimäre allein transfiziert replizieren kann.

In Blot **A** ist außerdem zu erkennen, dass die Zugabe von MVMp NS1/2 oder NS2 allein eine graduelle Verstärkung der Replikation zur Folge hat. Dabei hat es keinen Einfluss, dass nur NS2(MVMp) oder NS1/2 (MVMp) in trans zugegeben wurde.

In Blot **B** ist deutlich zu sehen, dass die Chimäre C-hH1/EGFP nach Transfektion gut repliziert, aber nicht in demselben Ausmaß wie der C-MVMp/EGFP-Vektor.

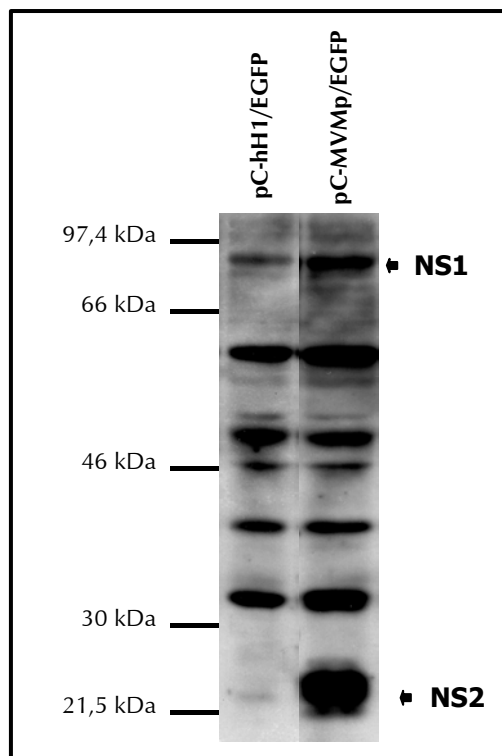
**Abb.4-18: Replikation des viralen Genoms nach Transfektion in A9 Zellen**

Nun wurde die C-hH1/EGFP-Chimäre mit dem pRSV-NS oder dem pxNS2 in A9 Zellen kotransfiziert. Dafür wurde die Methode der  $\text{CaPO}_4$ -Transfektion mit anschließendem Glycerolschock benutzt. 48h später folgte eine Hirtextraktion zur Extraktion der viralen DNA und ein DpnI-Verdau der bakteriell hergestellte Plasmid-DNA. Die Proben wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Dieser Blot, dessen Ergebnis in Abb. 4-18 A dargestellt ist, wurde mit einer NS1(H1)-spezifischen Sonde hybridisiert und exponiert. Deutlich ist zu sehen, dass die C-

hH1/GFP Chimäre, welche nach Infektion keine Replikation zeigte, nach Transfektion replizierte. Eine Zugabe von NS1/2 von MVMP *in trans* hatte einen geringfügig verbessernden Einfluss auf die Replikation, die genauso mit der alleinigen Zugabe von NS2 (MVMP) erreicht wurde.

Um die Effizienz der Replikation der C-hH1/EGFP-Chimäre zu überprüfen, wurde in einem folgenden Versuch, dargestellt in Blot B, die Menge an entstandenen replikativen Formen zwischen der C-hH1/EGFP und der C-MVMP/EGFP verglichen. Dabei zeigt sich deutlich, dass die C-hH1/EGFP wesentlich weniger replikative Formen liefert als die C-MVMP/EGFP, also auch nach Transfektion ineffizienter repliziert.

Da mit diesem Experiment gezeigt werden konnte, dass die nach Infektion von A9 Zellen nicht replizierende C-hH1/EGFP-Chimäre nach Transfektion durchaus replizieren kann, war anzunehmen, dass sie nach Transfektion auch die nichtstrukturalen Proteine in A9 Zellen exprimiert (Abb. 4-19).



$10^6$  A9 Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  der angegebenen Plasmide mit der  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$ -Methode und anschließendem Glycerolschock transfiziert. 48h später wurden sie in  $200 \mu\text{l}$  Westernblot-Lade-Puffer aufgenommen,  $10 \mu\text{l}$  davon über ein 10%-iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Anschließend inkubierte man mit dem NS1-Antikörper SP7 und dem NS2-Antikörper SP6, danach mit dem HPR-konjugierten Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper mit folgender ECL-Reaktion.

NS1 ist in beiden Proben deutlich detektierbar, auch für die Chimäre C-hH1/EGFP, für die es nach Infektion nicht detektiert werden konnte. NS2 ist im Falle der Chimäre nur zu einem geringen Ausmaß detektierbar, was aber auch an einer geringen Affinität der SP6-Antikörper für NS2(hH1) liegen kann.

**Abb. 4-19: NS1/NS2-Expression der C-hH-EGFP und des MVMP-GFP-Genoms nach Transfektion in A9 Zellen**

Um die Expression der NS-Proteine nach Transfektion in A9 Zellen nachzuweisen, wurde C-hH1/EGFP allein in A9 Zellen transfiziert. Dabei war festzustellen, wie in Abb. 4-19 zu sehen ist, dass nach Transfektion auch die C-hH1/EGFP-Chimäre NS1 produzieren kann.



NS2 wurde zu einem wesentlich geringeren Anteil sichtbar, was wahrscheinlich auf einer zu geringen Affinität des SP6-Antikörpers für NS2 von H1 zurückzuführen ist. Leider existiert kein geeigneter Antikörper für NS2 von hH1 für den Western-Blot. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass NS2 zu einem wesentlich geringeren Anteil vorliegt, entweder weil es weniger gebildet wird oder instabiler in A9 Zellen ist als NS2 von MVMp. Dies kann noch mit einer IP mit dem SP11-Antikörper überprüft werden.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Nach Infektion konnte für die C-hH1-EGFP-Chimäre weder NS1/2-Expression, noch Replikation nachgewiesen werden, nach Transfektion trat Replikation und zumindest NS1-Expression auf. In den Transfektionsexperimenten spielen die Kapsidproteine und ihre Interaktionen mit dem viralen Genom keine Rolle, was durchaus dafür spricht, dass der Dekapsidierungsvorgang bei der Infektion gestört sein kann und somit keine NS1/2-Expression möglich ist. Bei der Infektion von A9 Zellen mit einem MVMp-Genom enthaltenden Konstrukt läuft die Dekapsidierung sowohl mit einem H1-Kapsid als auch das MVMp-Kapsid ungestört ab. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Kapside selbst geöffnet werden. Wenn es sich im Falle der C-hH1/EGFP-Chimäre um ein Dekapsidierungsproblem handelt, liegt das eher an einer Interaktion einzelner VP-Proteine mit dem H1-Genom im Bereich der oben beschriebenen 1800 bp, die dann die Konversion verhindern.

In den Transfektionsversuchen liegt das virale Genom in Form eines Plasmids vor, aus dem das parvovirale Genom ausgeschnitten wird. Nach dem Ausschneiden liegt das parvovirale Genom schon als konvertierte doppelsträngige mRF vor, und das Ablesen der nichtstrukturalen Proteine kann sofort beginnen. Alle nachfolgenden Schritte bis hin zur Replikation der viralen DNA können, wie oben gezeigt, auch für das H1-Virus in A9 Zellen ungehindert ablaufen. Der Grund für die fehlende Replikation des H1-Virus nach Infektion muss in einer verhinderten Konversion liegen. Dafür sind drei Gründe denkbar. Erstens, kann die oben beschriebene Interaktion einzelner viraler Kapsidproteine die Konversion behindern. Zweitens, können bestimmte zelluläre Faktoren fehlen, die für die Konversion des hH1-Genomes benötigt werden und an dem 1800 bp Stück binden. Sie sind entweder in den A9 Zellen nicht oder aber in einer solchen Form vorhanden, dass sie nicht an das hH1-Genom binden können. Alle zellulären Faktoren, die für die an die Konversion anschließenden Schritte benötigt werden, sind dann wieder vorhanden und können auch an das hH1-Genom binden. Drittens, ist denkbar, dass an das H1-Genom

inhibitorische Faktoren binden, die dann die Konversion verhindern, also eine Art Abwehrmechanismus der Zelle darstellen.

Der Einfluss von NS1 und NS2 ist eher als geringfügig einzuschätzen, wobei die Zugabe von NS2 allein schon ausreicht, um einen positiven Effekt auf die Replikation zu erreichen, der aber durch die zusätzliche Zugabe von NS1 nicht mehr verstärkt werden kann.

#### **4.2.4 GFP-Expression der Pseudotypen in anderen Zelllinien: Ist der Tropismus kapsid oder genomdeterminiert ?**

Das Beispiel der A9 Zellen hat gezeigt, dass dort der Tropismus der Pseudotypen nach Infektion mit einem bestimmten Teil des viralen MVMP-Genoms zusammenhängt. Wir wollten wissen, ob diese Beobachtung spezifisch für A9 Zellen ist oder ob sie sich auch in anderen Zelllinien widerspiegelt. Deshalb wurden verschiedene Zelllinien ausgewählt, die mit den GFP-exprimierenden Basisvektoren, Chimären und Pseudotypen infiziert wurden und auf ihre GFP-Expression hin untersucht wurden. Sowohl der Einfluss der Herkunftsspezies (human, murin) als auch des Herkunftsgewebes sollte untersucht werden. Der prototype Stamm MVMP des Parvovirus Minute Virus of Mice (MVM) infiziert produktiv Fibroblasten (Cotmore & Tattersall, 1987; Spalholz & Tattersall, 1983; Tattersall & Bratton, 1983). Für das H1-Virus hingegen wurde gezeigt, dass es unter anderem transformierte menschliche Blutzellen sehr erfolgreich infizieren kann (Faisst et al., 1989). Deshalb wurden die menschlichen Zelllinien U937, MOLT-4 und HeLa benutzt, von denen bekannt war, dass sie mit H1-Virus infizierbar sind, sowie auch U373, um zu untersuchen, wie sich in diesen Zellen die Pseudotypen verhalten. Auch murine Zellen unterschiedlichen Gewebsursprungs wurden verwendet, von denen man wusste, dass sie mit MVMP infizierbar sind, wie die Ehrlich Aszites Zellen, K1735, sowie auch die Zelllinie C3H/10T1/2. Außerdem wurden die den A9 Zellen nahe verwandten L929 Zellen benutzt, um die in A9 Zellen beobachteten Effekte in diesen Zellen zu bestätigen.

Es wurden außerdem die Zelllinien EL4 und C127 getestet. Da aber ihre Infizierbarkeit mit allen getesteten Viren sehr gering war, sind die Ergebnisse nicht aussagekräftig und werden hier nicht weiter ausgeführt.

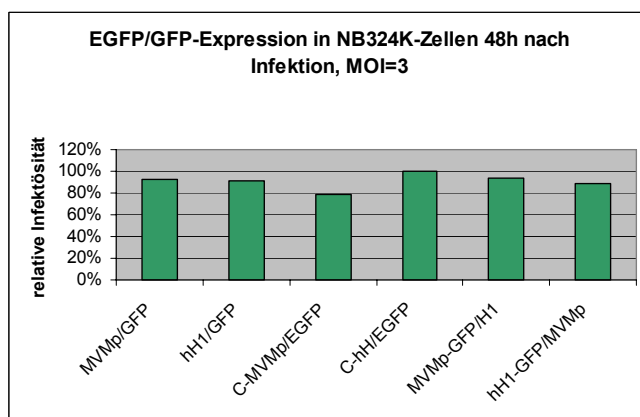
## Übersicht über die verwendeten Zellen:

Humane:	U937:	histozytisches Lymphom
	HeLa:	cervicales Adenokarzinom
	U373:	Gliom
	MOLT-4:	T-Zell Leukämie
Murine:	C3H/10T1/2:	embryonale Zellen
	Ehrlich Aszites Zellen:	Karzinom
	L929:	fibroblastische Zelllinie (wie auch A9 Zellen Derivat der L-Zellen)
	K1735:	Melanom

Die Zellen wurden mit den EGFP- bzw. GFP-Konstrukten der MVMp- und H1-Basisvektoren (MVMp/GFP, hH1/GFP), der Chimären (C-MVMp/EGFP, C-hH1/EGFP) und der Pseudotypen (MVMp-GFP/H1, hH1-GFP/MVMp) zu unterschiedlichen MOIs infiziert. Dafür wurden Viren aus einer mit Iodixanol aufgereinigten „large-scale“-Produktion verwendet. Neben einer Titerbestimmung auf NB324K Zellen wurde auch ihre GFP-Expression auf NB324K Zellen getestet (s. Abb. 4-20), um zu sehen, ob die Zahl der EGFP- bzw. GFP-positiven NB324K Zellen bei derselben MOI zwischen den verschiedenen Konstrukten vergleichbar war. Dabei wurde gezeigt, dass erwartungsgemäß in den hier verwendeten Vektoren die EGFP-Expression mit der DNA-Replikation korrelierte.

Die so infizierten Zellen wurden über 72h beobachtet, gezählt und fotografiert. Die Zellen unterschieden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Zellzahl an EGFP/GFP-positiven Zellen, sondern auch hinsichtlich des Zeitverlaufs der EGFP/GFP-Expression. So zeigten manche Zellen schon nach 24h eine deutliche EGFP/GFP-Expression, die dann aber nach 72h nicht mehr so klar zu erkennen war, wahrscheinlich weil die erfolgreich transduzierten Zellen abstarben. Andere hingegen zeigten erst nach 48h eine gute EGFP/GFP-Expression, die aber auch noch nach 72h erhalten blieb. Andere Zellen hatten die gesamten 3 Tage über eine gut sichtbare EGFP/GFP-Expression. Das Ziel war, die relative Infektionseffizienz der verschiedenen Konstrukte innerhalb einer Zelllinie zu vergleichen. Deshalb wurde die „relative Infektiosität“ zur Darstellung der Ergebnisse

gewählt. Dabei meint „Infektiosität“ eines Vektor-Konstrukts in unserem Fall seine Fähigkeit, nach Infektion der Zelle sein Transgen, also das GFP-Protein, zu exprimieren und so zu grün-fluoreszierenden Zellen zu führen. Die Anzahl der unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählten GFP-positiven Zellen wurde dabei für den Vektor mit der höchsten Anzahl GFP-positiver Zellen gleich 100% gesetzt. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen mit den restlichen Vektoren wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Dies ist mit *relativer* Infektiosität gemeint. Dadurch ist eine gute Vergleichbarkeit der Konstrukte untereinander innerhalb einer Zelllinie möglich.



**Abb. 4-20: Relative Infektiosität in NB324K Zellen**

4000 NB324K Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 3 infiziert, 48h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Die verschiedenen Vektoren zeigen eine ähnliche Menge an GFP-positiven Zellen in NB324K Zellen, den Zellen auf denen sie auch titriert wurden. Die Varianz der GFP-

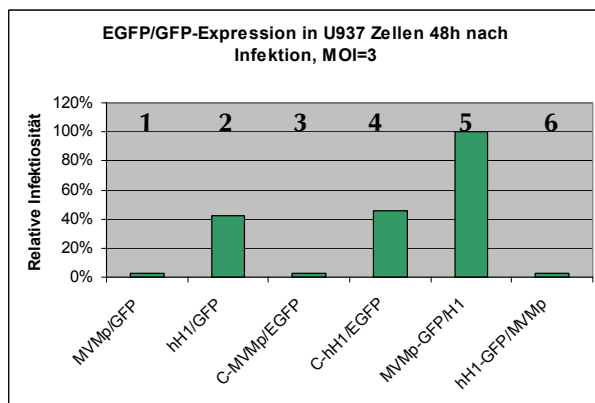
In der obigen Abbildung (Abb. 4-20) ist zu sehen, dass die EGFP/GFP-Expression der Vektoren auf NB324K Zellen höchstens eine Varianz um 20% zeigt. Also führt das Einsetzen desselben Titers der verschiedenen Konstrukte, die auf genau diesen NB324K Zellen titriert wurden, zu einer vergleichbaren EGFP/GFP-Expression. Die Konstrukte sind sozusagen auf NB324K Zellen standardisiert worden. Die so standardisierten Vektoren wurden in anderen Zelllinien benutzt. Dabei wurden alle Zellen zum Zeitpunkt 24h, 48h und 72h auf ihre GFP-Expression hin betrachtet und ausgezählt. Alle humanen Zelllinien wurden mit einer MOI von 3 und 10, die murinen Zelllinien mit einer MOI von 10, 30 und 100 infiziert. Alle Experimente wurden mindestens 3 mal wiederholt. Im Folgenden wird jeweils ein repräsentativer Graph abgebildet.

## In den untersuchten humanen Zelllinien ist der Tropismus kapsiddeterminiert

**U937** sind humane monozytische Zellen und gut mit hH1-Viren infizierbar (Rayet et al., 1998). Dementsprechend zeigen, wie in Abb. 4-21 zu sehen ist, der hH1-GFP- und der C-hH1-EGFP-Vektor (Säule 2 und 4) eine ähnlich hohe Anzahl an EGFP/GFP-positiven Zellen. Die beiden MVMp-Konstrukte, das MVMp/GFP und das C-MVMp/EGFP-Virus (Säule 1 und 3), führen hingegen zu ca. 16 mal weniger EGFP/GFP-fluoreszierenden Zellen. hH1-basierende Vektoren zeigen einen deutlichen Tropismus für diese Zellen, MVMp-Viren dagegen nicht. Die Höhe der MOI von 3 oder 10 hatte auf dieses Verhalten keinen Einfluss.

Der Pseudotyp MVMp-GFP/H1 (Säule 5), bestehend aus einem MVMp-basierenden Genom und einem H1-Kapsid, zeigt eine wesentlich höhere Anzahl an GFP-positiven Zellen als der hH1-GFP/MVMp-Pseudotyp (Säule 6). Der Tropismus ist in diesen Zellen demnach deutlich über das **H1-Kapsid determiniert**.

Außerdem zeigt der MVMp-GFP/H1-Pseudotyp (Säule 5) eine 2,5-mal höhere Anzahl GFP-positiver Zellen als der hH1-Basisvektor oder die hH1-Chimäre (Säule 2 und 4). Er ist folglich sogar effektiver als die beiden hH1-Konstrukte.



50.000 U937 Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert, 48h später die EGFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Die beiden auf dem hH1-Genom basierenden Vektoren hH1/GFP und C-hH1/EGFP zeigen eine vergleichbar hohe Anzahl an GFP-positiven Zellen. Die beiden MVMp-Vektoren MVMp/GFP und C-MVMp/EGFP dagegen eine geringe Anzahl fluoreszierender Zellen, genau wie der MVMp-kapsidierte Pseudotyp. Der das H1-Kapsid tragende Pseudotyp führt dagegen zu der höchsten Anzahl GFP-positiver Zellen.

**Abb. 4-21: Relative Infektiosität in U937 Zellen**

**HeLa** Zellen (Abb. 4-22) verhalten sich relativ ähnlich wie U937 Zellen. Auch hier ist der Tropismus über das **H1-Kapsid determiniert**. Allerdings mit dem Unterschied, dass der Pseudotyp MVMp-GFP/H1 (Säule 5) keine höhere Effizienz als die beiden H1-basierenden Vektoren hat (Säule 2 und 4). Auch HeLa Zellen exprimierten schon nach

24h gut sichtbar GFP, was sich auch nach 48h relativ unverändert zeigte und selbst nach 72h noch deutlich war.

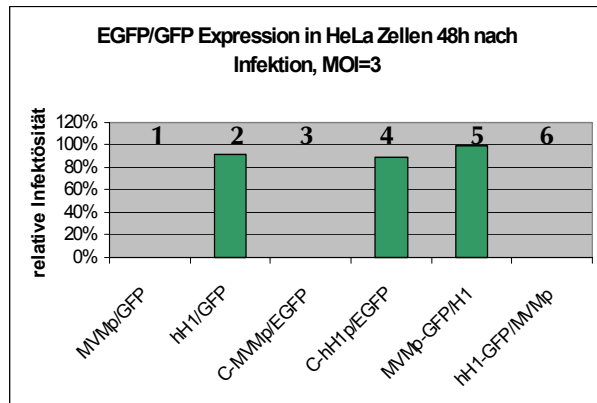


Abb. 4-22: Relative Infektiosität in HeLa Zellen

4000 HeLa Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert, 48h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Die beiden auf dem hH1-Genom basierenden Vektoren hH1/GFP und C-hH1/GFP, sowie der das H1-Kapsid tragende Pseudotyp zeigen eine vergleichbar hohe Anzahl an GFP-positiven Zellen. Die beiden MVMp-Vektoren MVMp/GFP und C-MVMp/EGFP zeigen dagegen eine geringe Anzahl fluoreszierender Zellen, genau wie der MVMp-kapsidierte Pseudotyp.

Auch in den **U373** Zellen (Abb. 4-23) zeigen der MVMp-basierende Basisvektor und die zugehörige Chimäre (Säule 1 und 3) eine niedrigere Zahl GFP-positiver Zellen als der hH1-basierende Basisvektor und die entsprechende Chimäre (Säule 2 und 4). Auch hier ist wieder das **H1-Kapsid der determinierende Faktor**; deutlich zu sehen daran, dass der Pseudotyp MVMp-GFP/H1 (Säule 5) eine vergleichbare Anzahl GFP-fluoreszierender Zellen hat wie die beiden rekombinanten Viren hH1/GFP und C-hH1/EGFP (Säule 2 und 4). Außerdem führte der Pseudotyp hH1-GFP/MVMp (Säule 6) zu einer höheren Anzahl fluoreszierender Zellen als MVMp-GFP und C-MVMp-EGFP (Säule 1 und 2). Obwohl der Unterschied immer sehr gering war, war er systematisch zu beobachten.

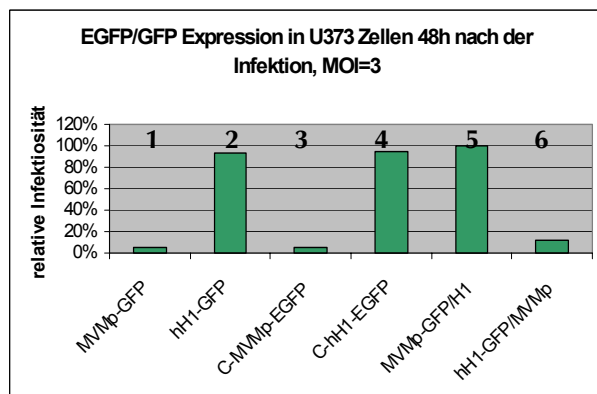
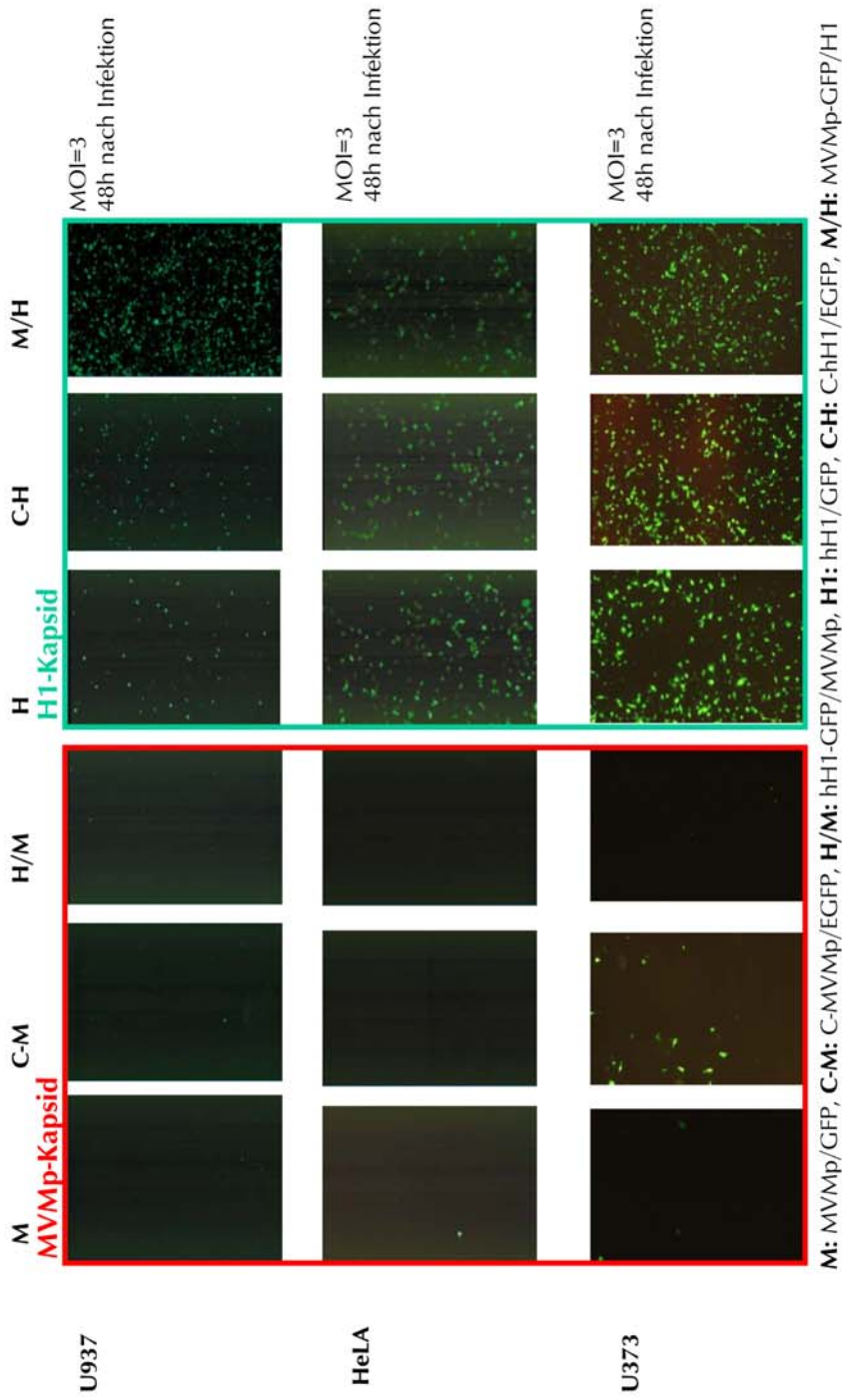


Abb. 4-23: Relative Infektiosität in U373 Zellen

4000 U373 Zellen wurden mit einer MOI von 3 infiziert, 48h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Die beiden auf dem H1-Genom basierenden Vektoren hH1/GFP und C-hH1/GFP, sowie der das H1-Kapsid tragende Pseudotyp zeigen eine vergleichbar hohe Anzahl an GFP-positiven Zellen. Dagegen führen die beiden MVMp-Vektoren MVMp/GFP und C-MVMp/GFP genau wie der MVMp-kapsidierte Pseudotyp zu einer geringen Anzahl GFP-positiver Zellen. Das H1-Kapsid ist in den U373 Zellen determinierend für den Tropismus.

Abb. 3-24: EGFP/GFP-Expression nach Infektion in humanen Zellen



**M:** MVMp/GFP, **C-M:** C-MVMp/EGFP, **H/M:** hH1-GFP/MVMp, **H:** hH1-Kapsid, **C-H:** C-hH1/GFP, **M/H:** MVMp-GFP/H1

Nur mit H1-Kapsiden verpackte GFP-Vektoren führen in den humanen Zellen zu einer GFP-Expression, dargestellt in dem grün umrandeten Rechteck, das lässt deutlich die Determinierung des Tropismus durch das H1-Kapsid erkennen. Erstaunlicherweise führt in den U937 Zellen der MVM-GFP/H1-Pseudotyp zu einer höheren Anzahl GFP-exprimierender Zellen als der hH1/GFP-Basisvektor oder die C-hH1/EGFP-Chimäre.

Zusammenfassend lässt sich als Gemeinsamkeit dieser drei getesteten humanen Zelllinien festhalten, dass erstens in allen Fällen die hH1/GFP- und C-hH1E/GFP-Vektoren eine weitaus bessere Effizienz der GFP-Expression zeigen als die MVMp/GFP- und C-MVMp/GFP-Vektoren, dabei zeigte die C-hH1/GFP Chimäre eine vergleichbare Anzahl fluoreszierender Zellen wie ihr Ausgangsvektor hH1-GFP. Zweitens war in allen Fällen, anders als in den A9 Zellen, das H1-Kapsid der den Zelltropismus festlegende Faktor. Drittens zeigte die Erhöhung der MOI von 3 auf 10 in keiner der drei Zelllinien einen Einfluss auf den Tropismus. Mit einer Erhöhung der MOI von 3 auf 10 konnte die Anzahl der fluoreszierenden Zellen für den MVMp-kapsidierten Pseudotyp nicht erhöht werden. Auch für alle anderen Konstrukte hatte die Erhöhung der MOI nur einen sehr geringen Effekt auf die Anzahl EGFP/GFP-positiver Zellen. Viertens zeigte sich, dass auch der Zeitfaktor dem hH1-GFP/MVMp-Virus nicht das Überkommen der Tropismusbarriere ermöglicht. Es konnte für die Konstrukte MVMp/GFP, C-MVMp/EGFP und hH1-GFP/MVMp nur ein geringer Anstieg der GFP-positiven Zellen um höchstes 1% von einem Tag auf den nächsten festgestellt werden.

In Abb. 4-24 sind drei Aspekte zu erkennen: Erstens, nur die H1-basierenden Basisvektoren und Chimären können in den humanen Zellen zu einer GFP-Expression führen. Zweitens, der Zelltropismus der Pseudotypen ist für diese drei humanen Zelllinien über das H1-Kapsid determiniert. Drittens, erstaunlicherweise ist die relative Infektiosität des MVMp-GFP/H1-Pseudotypen in den U937 Zellen von allen getesteten Konstrukten am höchsten. Entweder ist der Transport in den Nukleus mit ablaufender Dekapsidierung oder aber die Replikation des MVMp-Genoms mit nachfolgender Transgenexpression noch effizienter als im Falle der hH1-Konstrukte.

Noch eine andere humane Zelllinie wurde getestet, die T-Zelllinie **MOLT-4**. Sie war die einzige getestete humane Zelllinie, die mit MVMp/GFP- und C-MVMp/EGFP-Vektoren (Säule 1 und 3 in Abb. 4-25 und 4-26) eine höhere Anzahl GFP-exprimierender Zellen zeigte als mit den hH1/GFP- oder den C-hH1/GFP-Vektoren (Säule 2 und 4 in Abb. 4-25 und 4-26). Wie in den übrigen getesteten humanen Zelllinien war auch in den MOLT-4 Zellen das Kapsid verantwortlich für den Tropismus der Pseudotypen, allerdings diesmal das **MVMp-Kapsid** (Säule 6 in Abb. 4-25); auch zu sehen in Abb. 4-27. Alle GFP-Vektoren mit einem MVMp-Kapsid, in Abb. 4-27 mit einem roten Rechteck umrahmt, zeigen eine ähnlich hohe Anzahl GFP-exprimierender Zellen, sowohl bei MOI von 3 wie auch bei MOI von 10. Wird aber ein MVMp/GFP-Genom mit einem H1-Kapsid verpackt



(Säule 5, Abb. 4-25), zeigen sich bei einer MOI von 3 eine ähnlich niedrige Anzahl GFP-exprimierender Zellen wie für die hH1/GFP- und C-hH1/GFP-Vektoren (Säule 2 und 4, Abb. 4-25); auch gut zu sehen in Abb. 4-27: die drei oberen Fotos im grünen Rechteck. Aber bei einer Erhöhung der MOI von 3 auf 10 bleibt, wie in Abb. 4-27 zu sehen, die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen für hH1/GFP und C-hH1/EGFP unverändert. Im Falle des Pseudotypen MVMp-GFP/H1 hingegen steigt die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen stark an (Säule 5 in Abb. 4-26, Abb. 4-27), sogar auf eine höhere Zahl als im Falle des MVMp/GFP- und C-MVMp/GFP-Vektors (Säule 1 und 3 in Abb. 4-26; Abb. 4-27). Das bedeutet, dass neben dem Einfluss des MVMp-Kapsides auf den Tropismus der Pseudotypen auch das MVMp-Genom einen deutlichen Einfluss darauf zeigt, da das MVMp-Genom in den MOLT-4 Zellen zu einer wesentlich besseren GFP-Expression führt als das hH1-Genom.

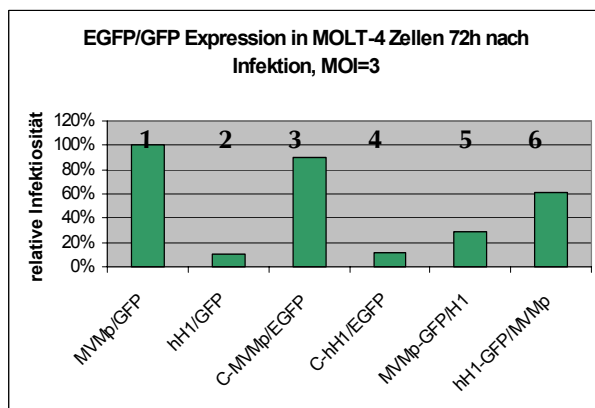


Abb. 4-25: Relative Infektiosität in MOLT-4 Zellen mit einer

150.000 MOLT-4 Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 10 infiziert, 72h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Anders als in den vorhergehend beschriebenen humanen Zelllinien führen in den MOLT-4 Zellen die beiden MVMp-basierenden Vektoren MVMp/GFP und C-MVMp/EGFP zu einer höheren Anzahl GFP-exprimierender Zellen als hH1-GFP und C-hH1/EGFP. Der MVMp-kapsidierte Pseudotyp hH1-GFP/MVMp funktioniert deutlich besser als der H1-VP-kapsidierte Pseudotyp. Dies spricht für eine Kapsid-Determinierung des Zelltropismus.

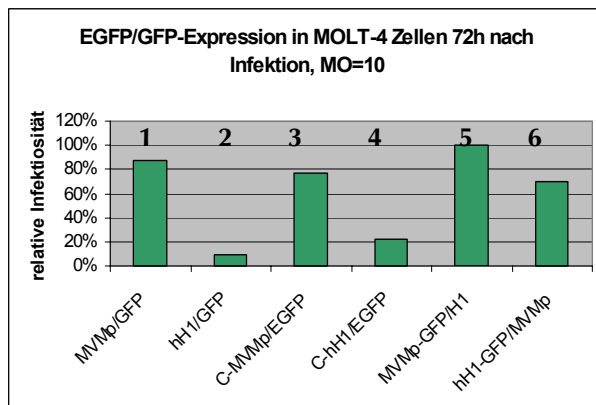
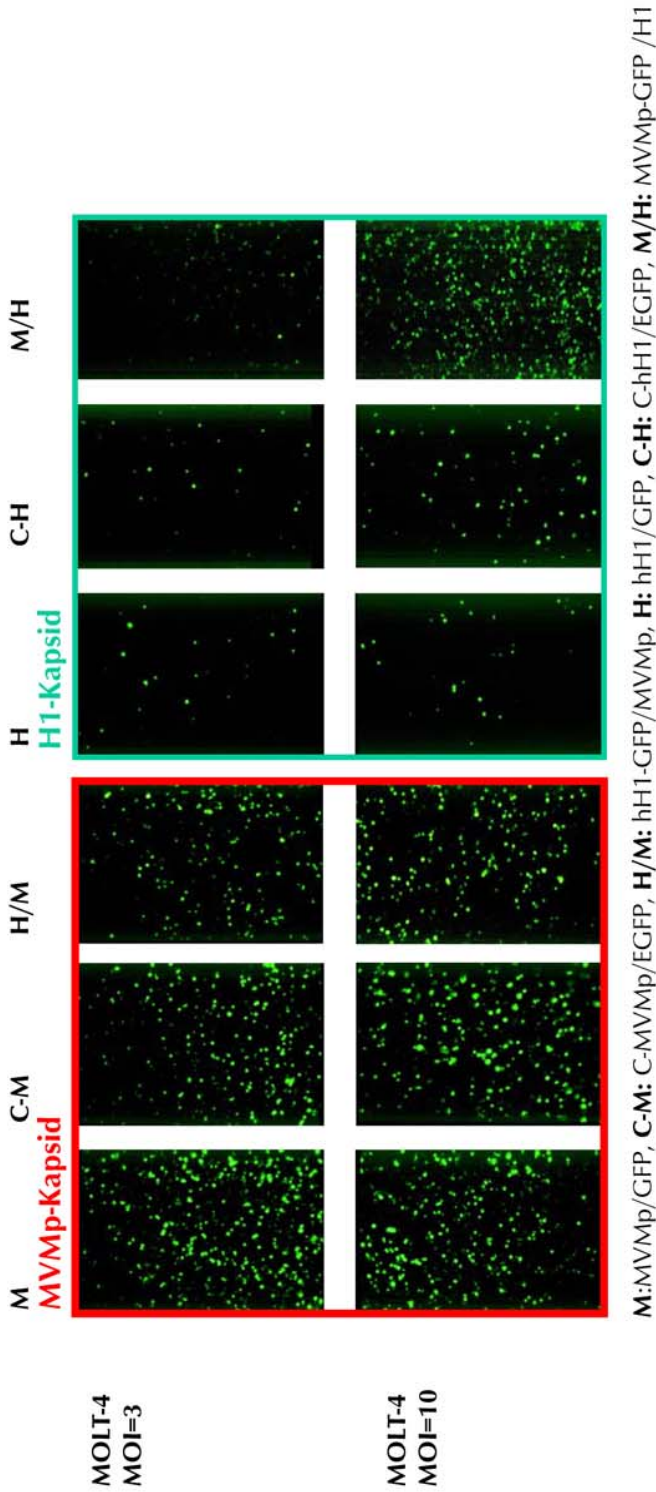


Abb. 4-26: Relative Infektiosität in MOLT-4 Zellen mit einer MOI von 10

150.000 MOLT-4 Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 10 infiziert, 72h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt

Auch hier zeigen die beiden MVMp-basierenden Vektoren MVMp/GFP und C-MVMp/EGFP eine höhere Anzahl GFP-exprimierender Zellen als hH1/GFP und C-hH1/EGFP. Der MVMp-GFP/hH1-Vektor führt allerdings bei einer MOI von 10 zu einer wesentlich höheren Anzahl GFP-exprimierender Zellen als mit einer MOI von 3.

Abb. 3-27: Einfluß der MOI auf die EGFP/GFP-Expression in MOLT-4 Zellen, 72h nach Infektion



In der humanen Zelllinie MOLT-4 ist das MVMp-Kapsid der determinierende Faktor für den Zelltropismus, so funktioniert der Pseudotyp hH1-GFP/MVMp sowohl bei MOI 3 wie auch bei MOI 10 gleich gut. Auf die Menge der GFP-positiven Zellen hat es im Falle der Konstrukte MVMp-GFP, C-MVMp-EGFP, hH1-GFP/MVMp und hH1-GFP keinen Einfluss, ob eine MOI von 3 oder 10 benutzt wird. Im Falle von C-hH1-EGFP findet bei der Erhöhung der MOI von 3 auf 10 eine leichte Erhöhung der Zahl der GFP-positiven Zellen statt. Interessanterweise scheint eine Erhöhung der MOI von 3 auf 10 die Zahl der GFP-positiven Zellen im Falle des bei MOI 3 kaum funktionierenden Konstruktes MVMp-GFP/H1 stark zu erhöhen. Dies war der einzige Fall bei den getesteten Zellen, der einen solchen Effekt bei der Erhöhung der MOI zeigte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle vier getesteten humanen Zelllinien einen kapsid-determinierten Zelltropismus zeigen. Ist der Tropismus durch das H1-Kapsid festgelegt, wie in den U937, HeLa und U373 Zellen scheint sowohl das MVMP- als auch das H1-Genom mit gleicher Effizienz zur GFP-Expression zu führen, solange sie mit einem H1-Kapsid verpackt sind. Im Falle der MOLT-4 Zellen ist der Tropismus nicht nur durch das MVMP-Kapsid, sondern auch durch das MVMP-Genom determiniert, was sich aber erst bei einer höheren MOI bemerkbar macht.

### **Murine Zellen: sowohl das Kapsid als auch das Genom kann den Tropismus determinieren**

Alle folgenden Versuche wurden mit MOI von 10, 30 und 100 durchgeführt und die Zeitpunkte 24h, 48h und 72h beobachtet. Exemplarisch wird eine MOI zu einem Zeitpunkt dargestellt. Es ist zu bemerken, dass verglichen mit den humanen Zellen, in den getesteten murinen Zellen durchwegs eine höhere MOI notwendig war, um den maximalen Transduktionseffekt zu erreichen. Dies entspricht auch der Tatsache, dass das Titrieren desselben MVMP- basierenden Vektors auf murinen A9 Zellen einen durchschnittlich 30 mal niedrigeren Titer als auf den humanen NB324K Zellen ergab (siehe auch Kap. 4.1.2 Tab. 4-1 und 4-2, sowie Tab. 4-3 und 4-4). Wie schon oben beschrieben, wurden alle hier verwendeten Konstrukte auf NB324K Zellen titriert. Deshalb ergibt sich auch die sehr hoch erscheinende MOI von 100 für A9 Zellen und den ihnen nah verwandten L929 Zellen. Dies entspricht einer MOI von etwas über 3, würde man wie sonst im Falle der MVMP-Konstrukte, eine Titration auf A9 Zellen durchführen.

Deutlich ist der **genomabhängige Zelltropismus** auf **A9** Zellen in Abb. 4-28 zu sehen. Alle Vektoren mit einem MVMP-basierenden Genom (Säule 1, 3 und 5) zeigen eine

maximale Anzahl an GFP-positiven Zellen, während hH1-Genom basierende Konstrukte (Säule 2, 4 und 6) kaum zu GFP-positiven Zellen führen.

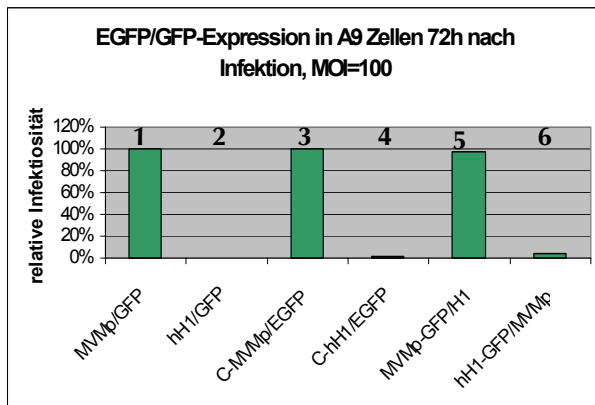


Abb. 4-28: Relative Infektiosität in A9 Zellen

3000 A9 Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 100 infiziert, 72h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Deutlich zeigt sich, wie auch schon vorher beschrieben, dass alle Vektoren, die ein MVMP-basierendes Genom besitzen, GFP-Expression in A9 Zellen zeigen, während den hH1-Genom-basierenden Konstrukten keine GFP-Expression möglich ist.

Auch die L929 Zellen, die den A9 Zellen nahe verwandt sind, haben einen **genomdeterminierten** Tropismus, zu sehen in Abb. 4-29. Alle Konstrukte mit einem MVMP-basierenden Genom zeigen eine vergleichbar hohe Anzahl GFP-positiver Zellen.

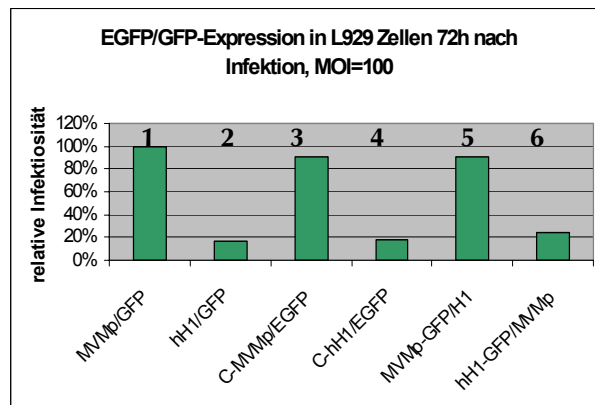
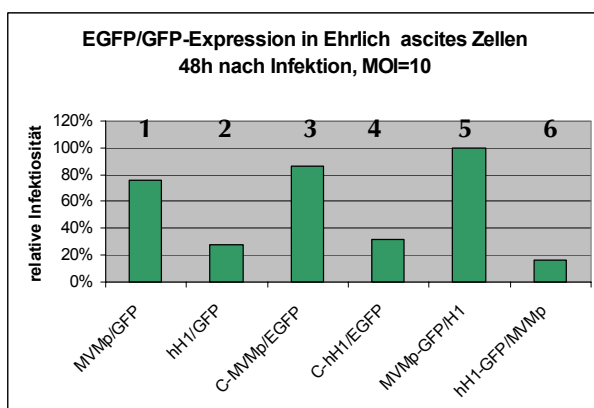


Abb. 4-29: Relative Infektiosität in L929 Zellen

3000 L929 Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 100 infiziert, 72h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Die L929 Zellen verhalten sich genauso wie die nahe mit ihnen verwandten A9 Zellen. Alle Vektoren mit einem MVMP-basierenden Genom zeigen GFP-Expression, Vektoren mit einem hH1-basierenden Genom dagegen zu einem viel geringeren Ausmaß.



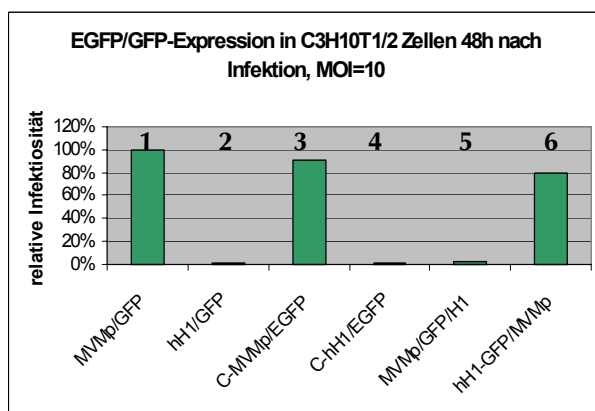
4000 Ehrlich-Ascites-Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 10 infiziert, 48h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Ehrlich-Ascites-Zellen sind zwar auch mit hH1-Genom-basierenden Vektoren infizierbar, deutlich besser aber mit MVMP-Genom-basierenden Vektoren. Auch hier liegt wie bei A9 und L929 Zellen ein genom-determinierter Tropismus vor.

**Abb. 4-30: Relative Infektiosität in Ehrlich-Aszites- (EA)-Zellen**

Genau wie A9 und L929 Zellen zeigen auch **Ehrlich-Aszites-Zellen** einen **genom-determinierten** Tropismus. Wie in Abb. 4-30 zu sehen ist, führen alle Konstrukte, die ein MVMp-basierendes Genom besitzen (Säule 1, 3 und 5), zu einer vergleichbar höheren Anzahl GFP-positiver Zellen als Vektoren mit einem hH1-basierenden Genom (Säule 2, 4 und 6).

Wie in den vorher beschriebenen humanen Zellen ist auch in den murinen **C3H10T1/2** Zellen das **Kapsid** determinierend, allerdings diesmal das MVMp-Kapsid, wie deutlich in Abb. 4-31 zu sehen ist. C3H10T1/2 Zellen waren die einzigen murinen Zellen, die schon nach 24h eine hohe GFP-Expression gezeigt haben.

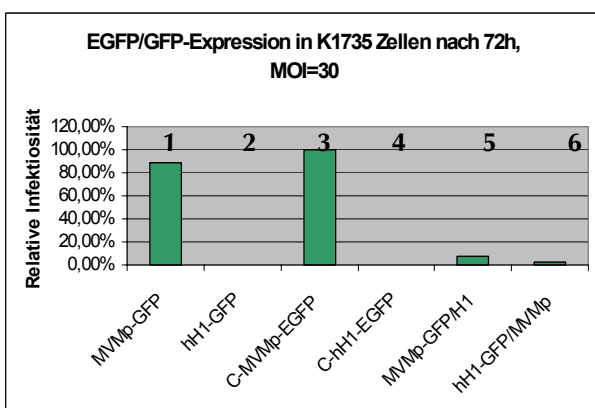


2500 C3H10T1/2 Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 100 infiziert, 72h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Anders als bei den A9, L929 und EA Zellen ist hier eindeutig das MVMp-Kapsid determinierend und nicht das Genom.

**Abb. 4-31: Relative Infektiosität in C3H10T1/2 Zellen**

Als letzte Zelllinie ist die Melanoma-Zelllinie **K1735** (Abb. 4-32) getestet worden. In K1735 Zellen führten nur die MVMp-basierenden Vektoren MVMp/GFP und C-MVMp/EGFP zu einer GFP-Expression, wohingegen keiner der Pseudotypen eine signifikante Anzahl GFP-exprimierender Zellen zeigte. Damit wird deutlich, dass in diesen Zellen sowohl das MVMp-Genom als auch das Kapsid eine Rolle spielt.



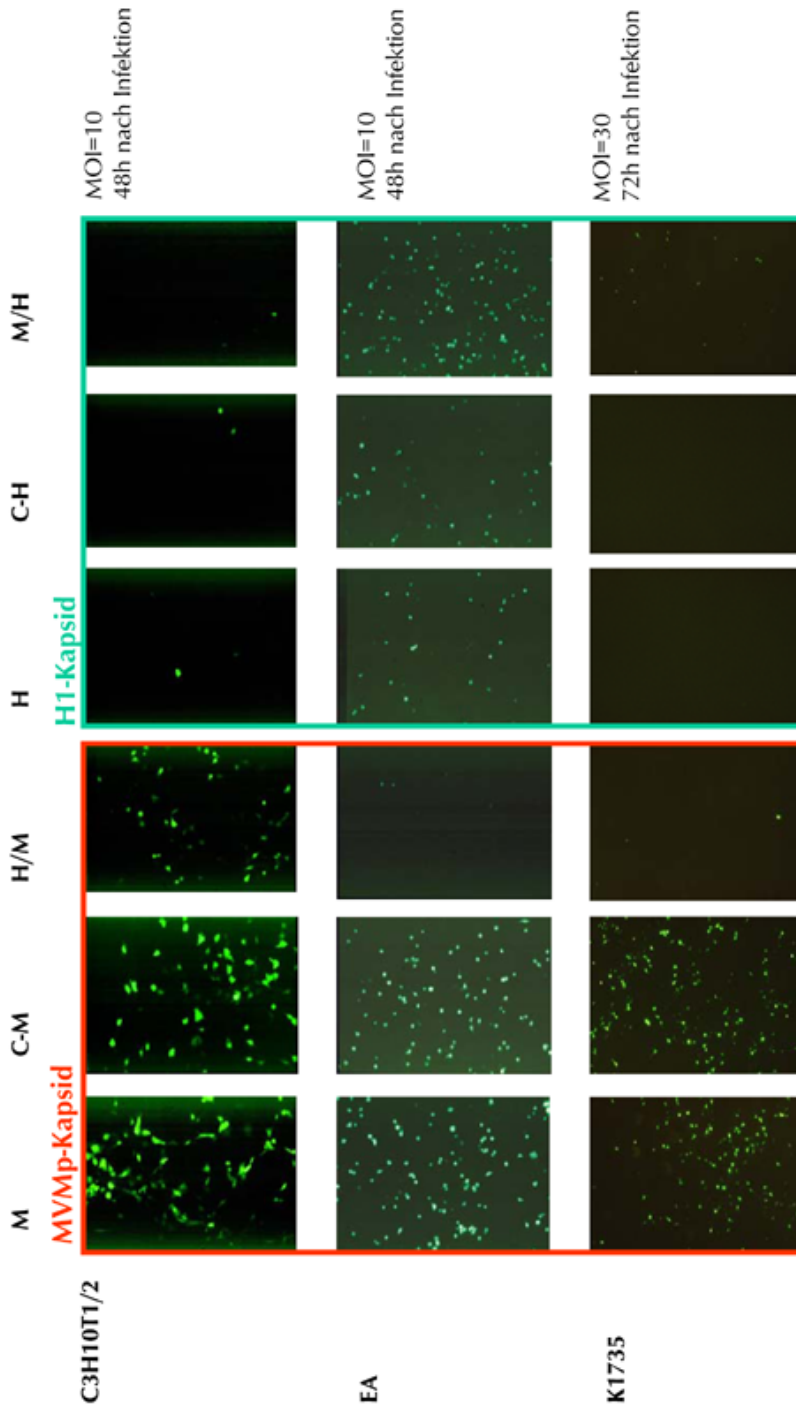
12.000 K1735 Zellen wurden pro Loch einer 96 Lochplatte ausgesät und mit einer MOI von 30 infiziert, 72h später die GFP-positiven Zellen ausgezählt und für die verschiedenen Konstrukte ins Verhältnis gesetzt.

Nur die MVMp-basierenden MVMp-GFP und C-MVMp-EGFP-Vektoren können zu einer GFP-Expression führen, keiner der Pseudotypen ist dazu in der Lage.

**Abb. 4-32: Relative Infektiosität in K1735 Zellen**



Abb.3-33: EGFP/GFP-Expression nach Infektion in murinen Zellen



**M:** MVMp/GFP, **C-M:** C-MVMp/EGFP, **H/M:** hH1-GFP/MVMp, **H:** hH1-GFP, **C-H:** C-hH1/GFP, **M/H:** MVMp-GFP/H1

Die hier abgebildeten murinen Zellen sind alle besser mit den MVMp-Genom-basierenden Vektoren infizierbar (MVMp/GFP, C-MVMp/GFP) als mit den hH1-Genom-basierenden Vektoren (hH1/GFP, C-hH1/GFP). In den C3H10T1/2 Zellen ist das MVMp-Kapsid für den Zell-Tropismus des Pseudotypen (hH1-GFP/MVMp) verantwortlich. Das ist die einzige getestete murine Zelllinie, in der das Kapsid für den Zell-Tropismus der Pseudotypen determinierend war. Im Fall der EA (Ehrlich-Aszites-Zellen) war der Tropismus, genau wie auch in den A9 und L929 Zellen über das MVMp-Genom determiniert. Dort führt der MVMp-GFP/H1-Pseudotyp zu GFP-positiven Zellen, während der hH1-GFP/MVMp-Pseudotyp das nicht kann. In den K1735 Zellen führt keiner der beiden Pseudotypen zu einer GFP-Expression.

Zusammenfassend kann für die hier getesteten murinen Zellen festgestellt werden, dass eine deutliche Prävalenz für MVMP-basierende Vektoren (MVMP/GFP, C-MVMP/EGFP) im Gegensatz zu den H1-basierenden rekombinanten Viren (hH1/GFP, C-hH1/EGFP) besteht. Den Tropismus betreffend zeigen die murinen Zelllinien ein inhomogenes Verhalten. Der Großteil der getesteten murinen Zellen, wie die Ehrlich-Aszites -Zellen, die A9 Zellen und die L929 Zellen zeigen eine genomabhängige Determinierung des Tropismus. Im Falle der C3H10T1/2 Zellen findet eine Determinierung des Tropismus über das MVMP-Kapsid statt. Bei den K1735 Zellen führt keiner der Pseudotypen zu einer effizienten Infektiosität.

		Basis der besser transduzierenden Vektoren:	Ursachen für den Tropismus der Pseudotypen:
Humane Zellen:	• U937 • HeLa • U373	<b>hH1</b>	<b>H1-Kapsid</b>
	• Molt4	<b>MVMP</b>	<b>MVMP-Kapsid</b> MVMP-Genom bei höherer MOI
murine Zellen:	• C3H	<b>MVMP</b>	<b>MVMP-Kapsid</b>
	• EA • L929 • A9	<b>MVMP</b>	<b>MVMP-Genom</b>
	• K1735	<b>MVMP</b>	-

**Abb.4-34: Zusammenfassung der Determination des Tropismus in verschiedenen Zelllinien**

In dieser Tabelle wird dargestellt, welche Konstrukte in den einzelnen Zellen die höhere Zahl GFP-exprimierender Zellen zeigten. hH1-basierende Basisvektoren sind: hH1/GFP und C-hH1/EGFP; auf MVMP-basierende: MVMP/GFP und C-MVMP/GFP. Die rechte Spalte stellt dar, ob für die Pseudotypen das Genom oder das Kapsid einen größeren Einfluss auf den Tropismus hatte.

### **4.3 Interaktion des H1-Virus mit den humanen monozytischen U937 Zellen auf genregulatorischer Ebene**

In diesem Teil der Arbeit soll der Mechanismus der parvoviralen Infektion, insbesondere der Zytotoxizität, näher untersucht werden. Diese Eigenschaft wird in unseren NS<sup>+</sup>VP-Vektoren ausgenutzt, ihre Wirkungsweise aber ist bis heute noch nicht verstanden. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die parvovirale H1-Infektion in U937 Zellen zu einer Aktivierung der Kaspase 3 führt und in der humanen U937 Zelllinie Apoptose ähnlich einer TNF $\alpha$ -Behandlung induziert (Rayet et al., 1998). Derselbe Effekt konnte auch durch Infektion mit dem kapsidproteinsequenz-deletierten-hH1-GFP-Vektor erreicht werden, wie er auch für die Gentherapie benutzt wird. Eine Infektion mit UV-bestrahlten Viren, was einer Behandlung mit leeren Kapsiden entspricht, induziert dagegen kein apoptotisches Sterben. Dies lässt vermuten, dass der zytotoxische Effekt durch die nichtstrukturalen Proteine hervorgerufen wird. Dabei ist schon bekannt, dass NS1 zytotoxische Fähigkeiten hat. Der genaue Wirkmechanismus ist aber noch ungeklärt. NS1 ist als multifunktionelles Protein bekannt, das in viele regulatorische Prozesse im viralen Lebenszyklus involviert ist. Es wurde unter anderem gezeigt, dass es als Transkriptionsfaktor agieren kann, der neben den parvoviralen P4- und P38-Promotoren verschiedene heterologe virale und zelluläre Promotoren regulieren kann (Legrende & Rommelaere, 1994; Vanacker et al., 1996). Auf genregulatorischer Ebene wurde in U937 Zellen gezeigt, dass das überexprimierte c-myc-Gen nach H1-Infektion schnell herabreguliert wird. Dies kann eine Rolle im programmierten Zelltod spielen (Rayet et al., 1998).

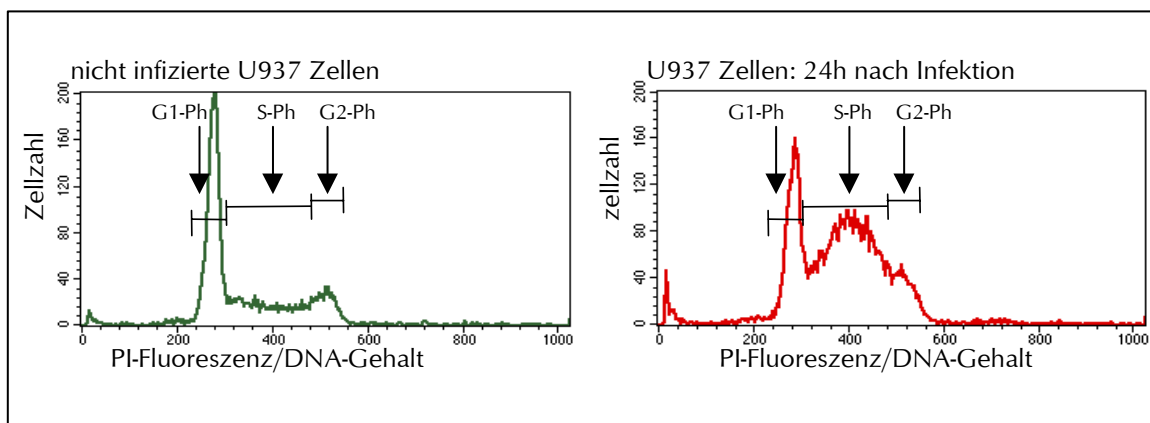
Wir wollten Gene identifizieren, deren Expression durch eine H1-Infektion in U937 Zellen verändert ist. Für diesen Zweck haben wir „atlas human cancer 1.2“-cDNA Expressions-Arrays (Clontech) und den „profiling service“ des RZPDs mit den Unigeneset-1-Filtern benutzt.

#### **4.3.1 Analyse der U937 Zellen während einer Infektion mit H1-Virus und nach Synchronisierung: Suche des geeigneten Zeitpunktes zum Vergleich infizierter und nicht-infizierter U937 Zellen**

Autonome Parvoviren benötigen zur Replikation Zellen in S-Phase, in der sie die Zellen arretieren. Das bedeutet, dass in einer infizierten Zellpopulation Parvoviren nur in den Zellen der S-Phase replizieren und ihre nichtstrukturalen Proteine exprimieren, die dann



einen Effekt auf die zelluläre Genregulation zeigen können. Die untere Abbildung 4-35 verdeutlicht diese Situation. Sie vergleicht die Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklus-Stadien in nicht infizierten U937 Zellen, also die normale Zellzyklusverteilung, mit U937 Zellen, die mit H1-Virus mit einer MOI von 10 infiziert, 24 h später geerntet und deren Zellzyklusverteilung durch FACS-Analyse bestimmt wurde. In uninifizierten Zellen ist nur ein vergleichsweise geringer Anteil der Zellen (ca. 23%) in S-Phase, der größte Teil der Zellen (ca. 62%) befindet sich in der G1-Phase, der Rest (ca. 12%) ist in G2-Phase. Nach 24-stündiger Infektion mit einer MOI von 10 ist, wie erwartet, ein weitaus höherer Anteil der Zellen, ca. 58%, in S-Phase. Nur noch ca. 22% der Zellen sind in G1 -Phase.

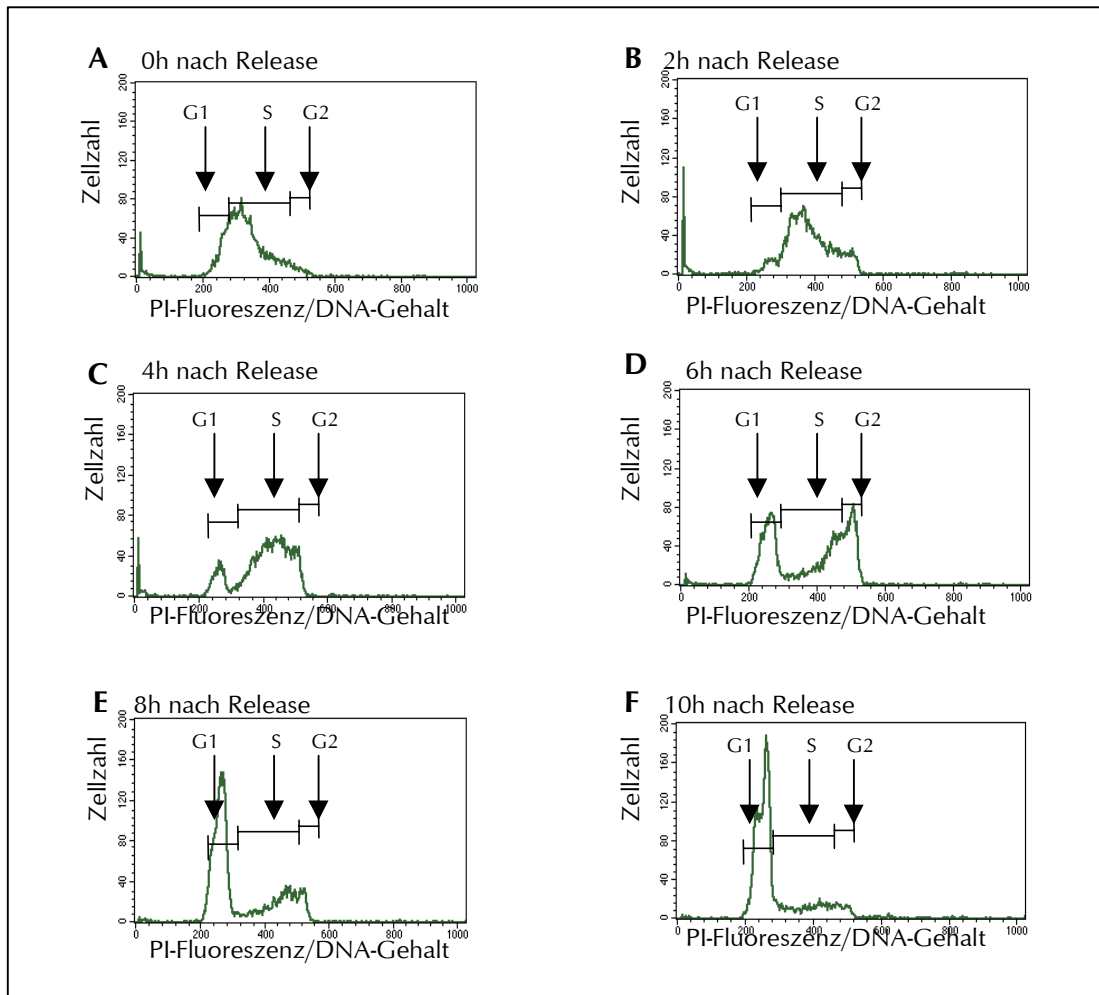


**Abb. 4-35: Zellzyklusverteilung nicht-infizierter und infizierter U937 Zellen 24h nach Infektion**

U937 Zellen wurden mit H1-Virus mit einer MOI von 10 infiziert, nach 24h wurden  $10^6$  Zellen aus der infizierten, sowie aus einer nicht-infizierten U937 Suspensionskultur entnommen, abzentrifugiert, mit Propidiumjodid angefärbt und mit der FACS hinsichtlich ihres DNA-Gehaltes analysiert.

Mit diesen Ergebnissen werden frühere Beobachtungen bestätigt, die zeigten, dass eine parvovirale Infektion zu einer Akkumulation in der S/G2-Phase führt (Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997; Oleksiewicz & Alexandersen, 1997). Daraus ergeben sich zwei Probleme, die es zu lösen gilt, bevor ein aussagekräftiger Genexpressionsvergleich durchgeführt werden kann. Erstens ist deutlich zu erkennen, dass die infizierten Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen eine völlig unterschiedliche Zellzyklusverteilung zeigen, was einen Vergleich miteinander schwierig machen kann, bzw. bei Genen, die in irgendeiner Weise in die Regulation des Zellzyklus involviert oder von ihm abhängig sind, unmöglich macht. Zweitens ist immer noch ein nicht zu unterschätzender Teil der Zellen, der G1-Teil, ohne einen sichtbaren Effekt der parvoviralen Infektion, da in diesen Zellen weder parvovirale Proteine exprimiert worden sind noch virale DNA-Replikation stattgefunden hat. Auch das erschwert erheblich einen

Vergleich und macht mögliche Unterschiede in der Genexpression undeutlicher. Ein längeres Warten, um einen höheren Anteil NS1-positiver Zellen zu bekommen, ist in diesem System nicht möglich, da man dann einen Großteil der Zellen durch Apoptose verliert.



**Abb. 4-36: FACS-Analyse methotrexat-synchronisierter nicht-infizierter U937 Zellen**

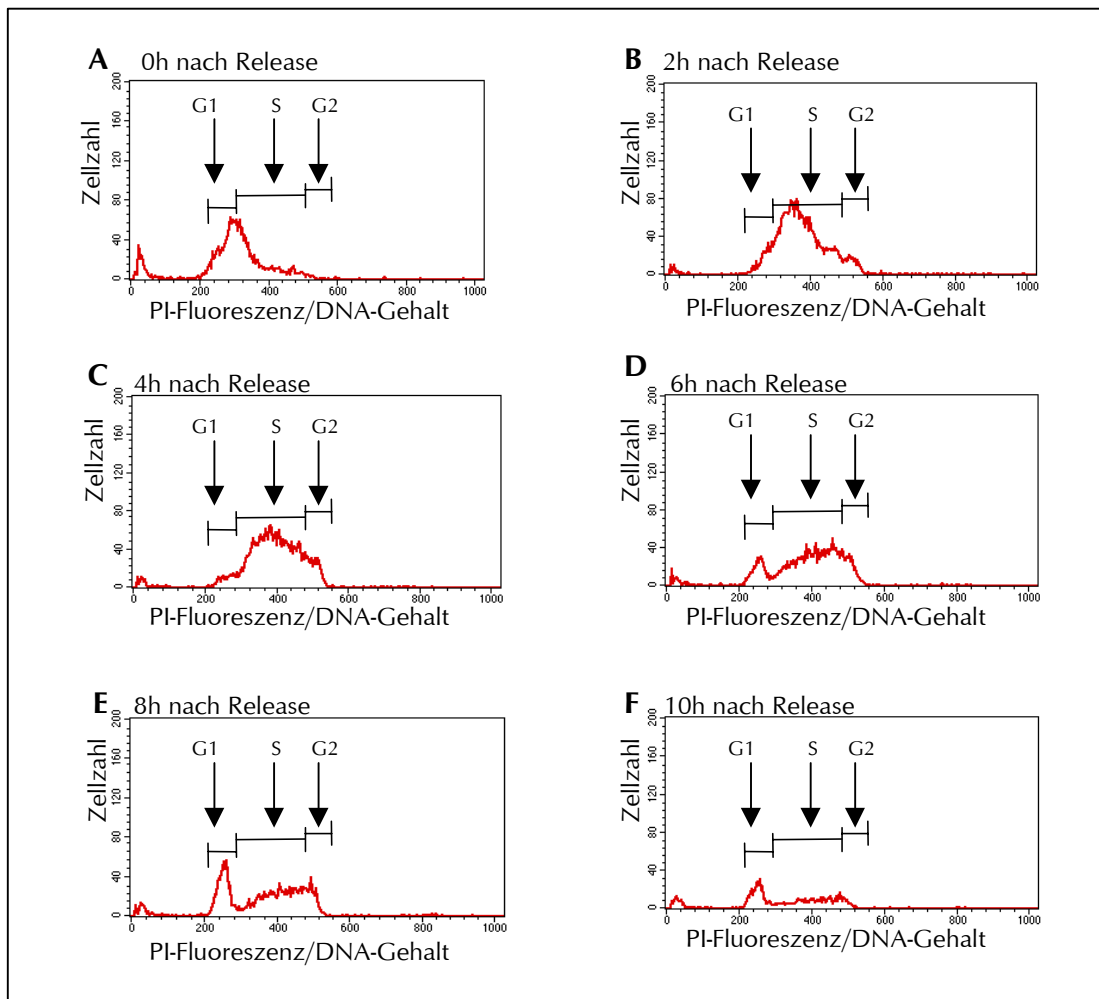
U937 Zellen wurden mit  $0,04 \mu\text{M}$  Methotrexat für 17h synchronisiert, danach wurde das Methotrexat entfernt (release), die Zellen gewaschen und methotrexat-freies Medium zugegeben. Mit der FACS wurde der Zellzyklusverlauf analysiert. Zum Zeitpunkt des Release (A) befinden sich ca. 25% der Zellen in G1-Phase und 63% der Zellen in S-Phase, nach 2h (B) ist ein großer Teil der Zellen in S-Phase (82%), nur noch 6% sind in G1-Phase. Nach 4h (C) sind einige Zellen über die G2-Phase wieder zurück in die G1-Phase gelangt (12%), in der S-Phase sind immer noch 70%. Nach 6h (D) sind 34% in G1-Phase, 43% in S-Phase und 23% in G2-Phase. Nach 8h (E) ist die normale Zellzyklusverteilung dieser Zellen beinahe wieder erreicht, 60% G1-Phase, 23% S-Phase, 17% G2-Phase. 10h nach dem Release haben die Zellen wieder ihre normale Zellzyklusverteilung erreicht.

Als Lösung für diese Probleme bot sich die Synchronisierung der Zellen für 17h mit Methotrexat in Konzentration von  $0,04 \mu\text{M}$  an, einem Dehydrofolatreduktase-Inhibitor, der die DNA-Synthese der Zellen hemmt und die Zellen in G1-Phase, frühe S-Phase, arretiert (Abb. 4-36). Methotrexat kann in dieser niedrigen Konzentration zur Synchronisierung der U937 Zellen verwendet werden, ohne toxische Effekte zu zeigen

(Sen et al., 1990). Es wurde außerdem gezeigt, dass bei dieser niedrigen Konzentration des Methotrexats die RNA- und Proteinbiosynthese nicht gehemmt ist, was sich zum einem in einer erhöhten Ratio RNA/DNA, bzw. Protein/DNA ausdrückt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass durch das zusätzliche Benutzen von Hypoxanthinen, was die RNA-Synthese gewährleistet, der Synchronisierungseffekt unbeeinträchtigt blieb; während die Zugabe von Thymidinylat zum Synchronisierungsmedium den Synchronisierungseffekt aufhob; ein Beweis dafür, dass nur die DNA-Biosynthese durch die Hemmung der Thymidinylat-Synthese gehemmt ist (Sen et al., 1990). Um sicher zu gehen, dass die RNA-Synthese ungestört ablaufen konnte, wurde dem Synchronisierungsmedium Hypoxanthin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Aus der FACS-Analyse, dargestellt in Abb. 4-36, ist zu sehen, dass zum Zeitpunkt des Release (A), bei dem man das Methotrexat und Hypoxanthin von den Zellen wäscht und Medium ohne Methotrexat und Hypoxanthin dazugibt, die Zellen in G1- früher S-Phase akkumuliert sind. Sie laufen dann synchron in die S-Phase. Nach ca. 2h (B) ist der größte Teil der Zellen (82%) in S-Phase, nach 4h (C) beginnen die Zellen über die G2-Phase wieder die G1-Phase zu erreichen, aber immer noch ist der weitaus größte Teil in S-Phase. 10h (F) nach Release ist die normale Zellzyklusverteilung von U937 Zellen wieder erreicht.

Für die Infektion der U937 Zellen wurde die Methotrexatbehandlung nach 10h für 1h unterbrochen, die Zellen abzentrifugiert und in einem geringen Volumen von DMEM-Medium aufgenommen, welches dieselbe Konzentration an Methotrexat enthielt wie das Synchronisierungsmedium. Diesem DMEM-Medium wurde die Virussuspension in VTE-Puffer, im Falle der nichtinfizierten Kontrollgruppe reiner VTE-Puffer zugegeben. Nach der Infektion gab man wieder das vorher abgenommene Synchronisierungsmedium dazu und die Synchronisierung wurde für weitere 6h fortgesetzt. In diesen 6h hat das Virus Zeit zu dekapidieren und in den Kern zu gelangen. Dort angelangt, kann auf Grund des Methotrexats keine virale DNA-Replikation und damit auch keine nachfolgende virale Proteinexpression stattfinden. Erst mit dem Release und dem gemeinsamen Eintritt der Zellen in S-Phase wird dies möglich. Durch dieses Vorgehen startet die virale Replikation und Proteinexpression in einem großen Anteil der Zellen zeitgleich. In der FACS-Analyse, zu sehen in Abb. 4-37, ist zu erkennen, dass in den ersten 4h (A, B, C) die Zellen in ihrer Zellzyklusverteilung keine großen Unterschiede zu den nicht infizierten Zellen (Abb. 4-36) aufweisen. In den folgenden Zeitpunkten (D, E, F) ist aber deutlich zu sehen, dass

kaum Zellen die S-Phase verlassen. Die Zellen, die man nach 10 h immer noch in der G1-Phase sehen kann, sind wahrscheinlich der Anteil der Zellen, die in G0-Phase waren und diese auch nicht verlassen haben. Sie stellen sich in der FACS-Analyse genauso wie G1-Phase-Zellen dar. Da sie im Gegensatz zu den Zellen, die eine S-Phase mit der viralen Replikation durchlaufen haben, nicht absterben, wird ihr Anteil relativ größer. Deutlich zu erkennen ist, dass nach 10h beinahe keine Zellen mehr vorhanden sind.

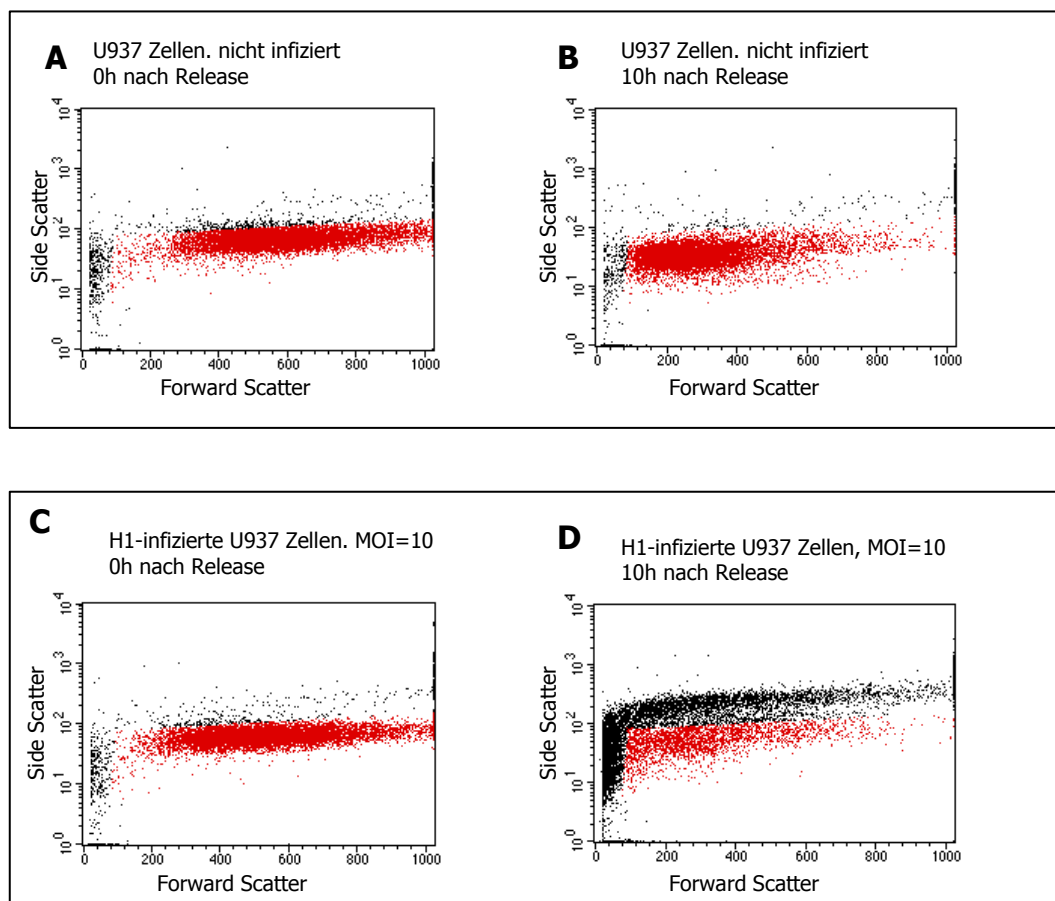


**Abb. 4-37: FACS-Analyse methotrexat-synchronisierter, H1-infizierter (MOI=10) U937 Zellen**

U937 Zellen wurden wie oben beschrieben, für 10h mit Methotrexat synchronisiert, 1h mit methotrexathaltigem DMEM-Medium infiziert, danach für weitere 6h synchronisiert. Die ersten beiden Zeitpunkte 0h (A) (G1-Phase: 27%, S-Phase: 62%) und 2h (B) (G1-Phase: 7%, S-Phase: 84%) sind sehr ähnlich denen der uninfizierten Zellen. Nach 4h (C) ist zu erkennen, dass weniger Zellen in der G1-Phase (6%) sind als bei den uninfizierten Zellen zum gleichen Zeitpunkt. Der S-Phase-Anteil ist unverändert hoch (82%). Im folgenden Verlauf (D, E, F) sieht man deutlich, dass kaum noch Zellen die S/G2-Phase verlassen können, die Zellen bleiben arretiert und sterben ab.

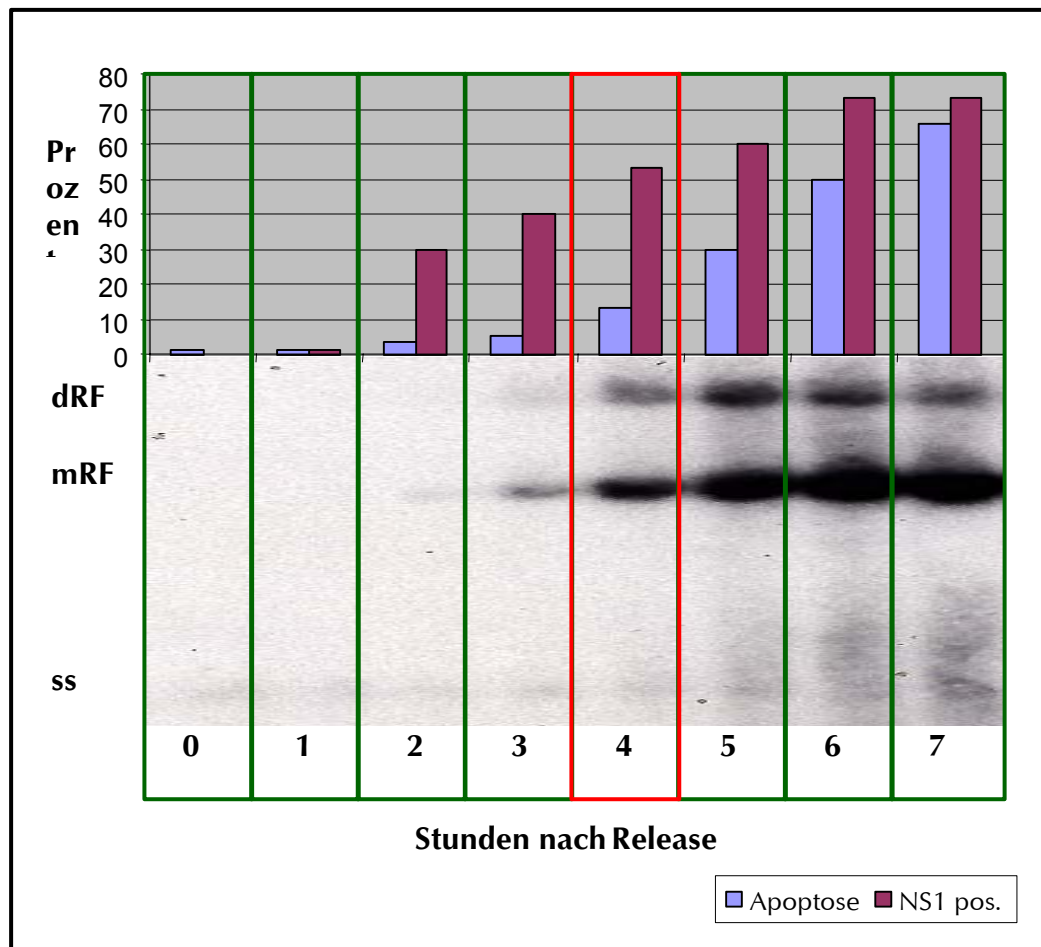
Das Absterben der Zellen nach Infektion lässt sich noch besser mit einem FACS-Dotplot veranschaulichen (Abb. 4-38). Diese Graphik wurde in Verbindung mit den

Histogrammen im „Cell-Quest-Computerprogramm“ durch-FACS-Analyse erstellt. Dabei wird die Größe der Zellen im Forward-Scatter (x-Achse) gegen ihre Granularität im Side-Scatter (Y-Achse) aufgetragen. Sterben die Zellen apoptotisch, erhöht sich ihre Granularität und der FACS-Dotplot verschiebt sich nach oben auf der Y-Achse. Zelltrümmer, die nach dem Absterben entstehen, haben eine geringe Größe und sind deshalb sehr nah am Nullpunkt der X-Achse gelegen. In der unteren Abbildung sind in Rot die gesunden Zellen dargestellt und in Schwarz die abgestorbenen. Deutlich ist zu sehen, dass sich der Anteil der gesunden Zellen im Falle der nicht-infizierten U937 Zellen zum Zeitpunkt 0h (A) nach Release von dem zum Zeitpunkt 10h (B) nach Release nicht unterscheidet. Wohingegen im Falle der (mit einer MOI von 10) H1-infizierten U937 Zellen ein deutlicher Anstieg der abgestorbenen Zellen 10h nach der Infektion (D) im Vergleich zum Zeitpunkt direkt nach Release (C) zu erkennen ist.



**Abb.4-38:** In Rot sind die lebenden Zellen und in Schwarz die toten Zellen (in den oberen Quadranten), bzw. die Zelltrümmer (nahe dem Nullpunkt der X-Achse) dargestellt. Die nicht-infizierten U937 Zellen zeigen 0h nach Release (A) den gleichen Anteil an toten Zellen wie 10h danach (B). Dagegen ist bei den infizierten Zellen (H1, MOI=10) nach 10h (D) eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen bzw. der Zelltrümmer im Vergleich zu 0h nach Release (C) zu sehen.

Im Weiteren wurde der virale Lebenszyklus in den synchronisierten U937 Zellen näher beobachtet. Dabei wurde untersucht, ab wann und mit welchem Ausmaß sowohl die virale Replikation als auch die NS1-Expression und das apoptotische Sterben der Zellen beginnt. Dies war v.a. unter dem Gesichtspunkt des besten Zeitpunkts für die Zellernte zur Durchführung der cDNA-Arrays von Bedeutung. Es sollte ein möglichst großer Anteil der Zellen NS1-Expression zeigen, getestet mit einer Immunofluoreszenz, aber ein noch möglichst geringer Anteil der Zellen in Apoptose (getestet durch DAPI-Färbung) sein. In der Abbildung 4-39 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

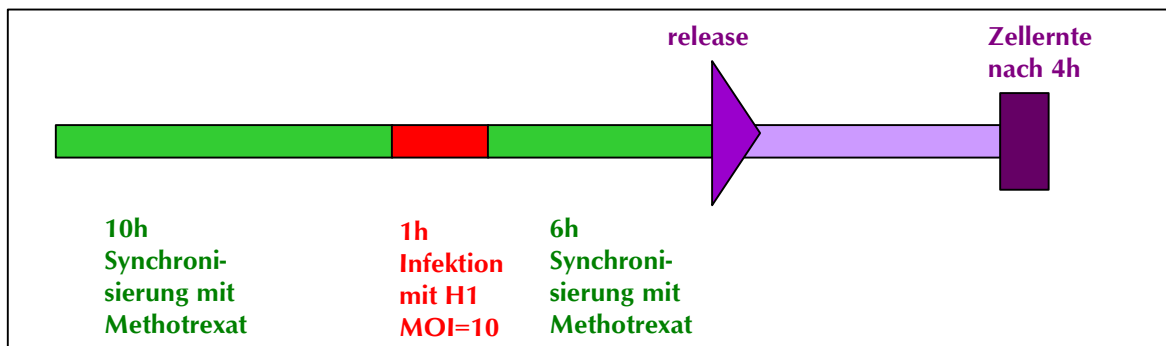


**Abb. 4-39: Prozentsatz NS1-exprimierender und apoptotischer Zellen nach H1-Infektion (MOI=10) in methotrexatsynchronisierten U937 Zellen:**

U937 Zellen wurden für 10h, wie oben beschrieben, mit Methotrexat synchronisiert, dann 1h mit einer MOI von 10 mit H1-Virus in einem methotrexathaltigem DMME-Medium infiziert, danach wurde die Synchronisierung für 6h weiter fortgesetzt. Der Zeitpunkt 0h entspricht dem Zeitpunkt des Release. Jede Stunde wurden Proben für die Immunfluoreszenzen (NS1) mit gleichzeitigem DAPI-Färbung (zur Apoptosebestimmung) und Proben zur Bestimmung der viralen Replikation im Southern-Blot entnommen. Deutlich ist zu sehen, dass die virale Replikation 2h nach Release detektierbar wird, in der dritten, vierten und fünften Stunde ansteigt, bis sie dann ein Plateau erreicht hat. Zur selben Zeit, 2h nach Release, akkumuliert NS1; die Expression steigt kontinuierlich an, bis zu einem Plateau nach 6h. Zwei Stunden versetzt dazu, zum Zeitpunkt 4h, beginnt eine deutliche Zunahme der Apoptose, die immer mehr Zellen betrifft. Zum Zeitpunkt 4h ist bereits eine große Anzahl NS1-positiver Zellen detektierbar, aber erst ein relativ geringer Prozentsatz apoptotisch. Dies ist der geeignete Zeitpunkt zur Zellernte.

Schon 2h nach Release beginnt die detektierbare NS1-Expression. Auch eine geringe Replikation ist schon sichtbar. Kontinuierlich steigt sie an, bis zu einem Plateau nach 7h. Ihr folgend beginnt kurz darauf die Apoptose, die in ähnlicher Weise kontinuierlich zunimmt. Deutlich ist in dieser Abbildung das Zusammenspiel der drei Komponenten NS1-Expression, virale Replikation und schließlich die Apoptose zu erkennen. Der beste Zeitpunkt der Zellernte scheint bei 4h zu liegen, da schon ein großer Teil (der durch die Immunfluoreszenz sicherlich unterschätzt wird) der Zellen NS1-positiv, der Anteil der apoptotischen Zellen aber noch nicht sehr hoch ist.

Der optimale Zeitpunkt der Zellernte mit einem hohen Prozentsatz NS1-exprimierender Zellen und einem geringen Prozentsatz apoptotischer Zellen ist also 4h nach Release. Daraus ergibt sich folgendes Versuchsschema des Infektionsversuchs (Abb. 4-40). Die Kontrollgruppe der nicht-infizierten Zellen wurde genauso behandelt, nur wurde statt der Virussuspension reiner VTE-Puffer dazu gegeben.



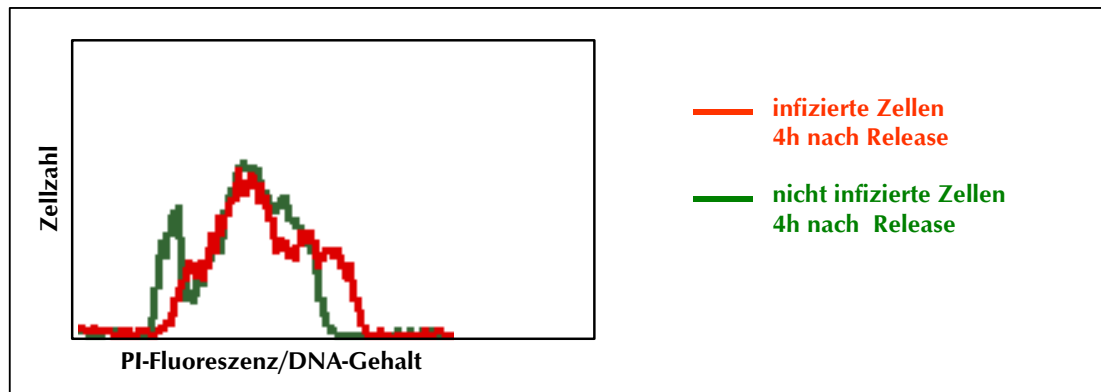
**Abb. 4-40: Schema der Zellsynchronisierung, der Infektion und der anschließenden Zellernte**

U937 Zellen werden für 10h synchronisiert, für 1h mit methotrexathaltigem DMEM-Medium infiziert, wobei der nicht-infizierten Kontrollgruppe VTE-Puffer ohne Virus zugesetzt wurde. Anschließend folgte ein Fortsetzen der Synchronisierung für weitere 6h. Durch Waschen und Mediumwechsel wurde das Methotrexat entfernt. Nach 4h wurden die Zellen abzentrifugiert und mit der RNA-Extraktion begonnen (Zellernte).

### 3.3.2 Vergleich H1-infizierter U937 Zellen mit nicht-infizierten U937 Zellen auf genregulatorischer Ebene mit Hilfe von cDNA-Arrays

Vergleicht man nun die Zellzyklus-Histogramme infizierter und nicht-infizierter Zellen zum Zeitpunkt 4h nach Release, ist deutlich zu sehen, dass die Zellzyklusverteilung

infizierter und nicht-infizierter Zellen mit Synchronisierung sehr viel ähnlicher ist als ohne Synchronisierung.



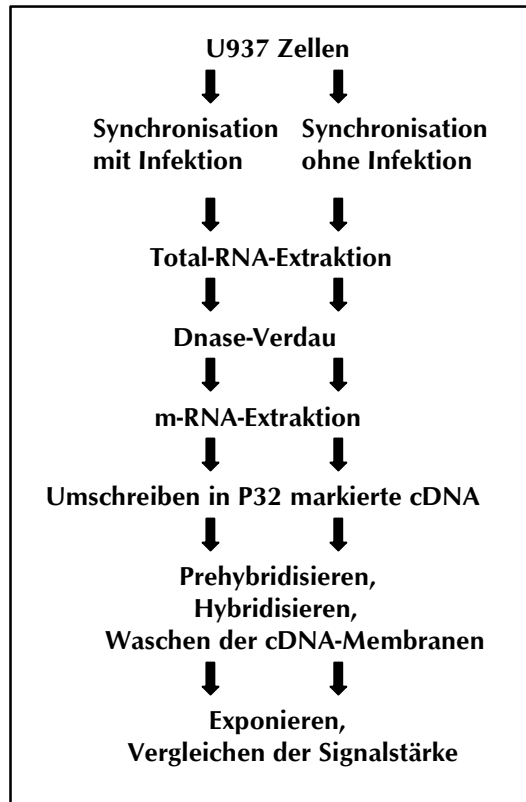
**Abb. 4-41: Vergleich der FACS-Histogramme infizierter und nicht-infizierter U937 Zellen (H1, MOI=10) in synchronisiertem Zustand, 4h nach Release**

Vier Stunden nach Zell-Release wurden die Zellen abzentrifugiert. Eine Total-RNA-Extraktion wurde mit Trizol durchgeführt und anschließend auf einem denaturierenden Formamidgel die Qualität der RNA überprüft. Im Falle der RZPD-Membranen, Unigeneset-1, wurden diese RNA direkt weitergegeben an das Labor von Christian Merker im DKFZ Heidelberg. Dort wurde die mRNA-Extraktion mit anschließender cDNA-Synthese und Membranhybridisierung durchgeführt. Für die Clontech-Membranen, cancer 1.2, folgte eine mRNA-Extraktion mit „magnetic beats“. Diese wurde dann mit einem spezifischen Primermix in  $^{32}\text{P}$ -markierte c-DNA umgeschrieben. Damit hybridisierte man die cancer 1.2-Membranen über Nacht, wusch sie mehrmals und exponierte sie in einer Phosphorimagerkassette. Je nach Menge der in der Probe vorhandenen mRNA war das auf diese Weise erhaltene Signal auf der Membran stärker (hohe Menge dieser mRNA) oder schwächer (geringe Menge dieser mRNA) ausgeprägt. Man vergleicht die Signalstärke eines bestimmten cDNA-Punktes auf der Membran, hybridisiert mit der aus den infizierten Zellen gewonnenen Probe, mit dem korrespondierenden DNA-Punkt auf der Membran, hybridisiert mit der aus den nicht-infizierten Zellen gewonnenen Probe. Damit kann eine Aussage darüber gemacht werden, ob ein Unterschied in der Menge dieser bestimmten mRNA vorliegt, ob also eine Hoch- bzw. Herabregulierung dieses Gens stattgefunden hat.

Zur Kontrolle der Hybridisierung sind auf den Membranen DNA einiger „house-keeping“-Gene aufgetragen, bei denen man davon ausgehen kann, dass sie in beiden Proben gleichermaßen exprimiert werden. Außerdem werden die Signale beider Membranen mit dem jeweiligen für die Membranen typischen Hintergrund standardisiert, bevor die Signale verglichen werden.



Abb. 4-42: Schema des Versuchsablaufs



Im Folgenden zeigt eine Tabelle, welche Unterschiede in der Genexpression infizierter und nicht-infizierter Zellen gefunden worden sind. Dabei sind in Rot die Gene dargestellt, die mit den Clontech „human cancer 1.2 arrays“ gefunden worden sind. Sie sind bis zu zweimal unterschiedlich in ihrem Expressionslevel. In Grün sind die Gene dargestellt, die mit den Unigeneset-1-Filtern detektiert worden sind und einen Unterschied in der Expression von 5-fach und mehr zeigten, in Schwarz auch Gene aus dem Unigeneset-1, allerdings 2,5- bis 5-fach unterschiedlich exprimiert. Die Gene wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt. Solch eine Gruppierung ist subjektiv und vorläufig, besonders weil einige Gene durchaus in verschiedene Gruppen eingeordnet werden könnten. Erst wenn in der folgenden Analyse die Funktion des von diesem Gen exprimierten Proteines in diesem Zell-Virus-System abgeklärt ist, kann mit Sicherheit entschieden werden, in welche Gruppe das gefundene Gen einzuordnen ist.

## In den H1-infizierten Zellen hochregulierte Gene und Funktion der von ihnen kodierten Proteine:

### Apoptose

- *kaspase 2*
- *kaspase 3*
- *kaspase 4*
- *kaspase 8*
- *cox 6c* Teil der Cytochrom C Oxidase
- *tia1* RNA-bindendes Protein, das in Apoptose involviert sein kann
- *gnb2L1* agiert als intrazellulärer Rezeptor, der aktivierte PKC am Zytoskelett verankert
- *jwhag* aktiviert Kinase C, ist ein multifunktionaler Regulator des Zell-Signal-Weges
- *prkcbp1* Proteinkinase C-bindendes Protein 1
- *Cytochrom C Oxidase Untereinheit Vic*
- *parp* Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase, Substrat der Kaspase 3
- *bcl2L2* BCL2-like 2
- *usp11* Ubiquitin-spezifische Protease 11
- *psmd2* regulierende Untereinheit des 26s-Proteosoms, involviert in die ATP-abhängige Degradierung ubiquitinerter Proteine, bindet an die intrazelluläre Domäne des TNF1-Rezeptors,
- *tnfaip3* Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ -induziertes Protein
- *traf5* TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 5
- *pig 7* LPS-induzierter TNF $\alpha$ -Faktor
- *dedd* death effector domain-containing, auch CASP8IP genannt, ist wahrscheinlich das Endglied einer Ereigniskette, bei der das CD95 induzierte Apoptose Signal in den Nukleus transferiert wird und die zelluläre Biosynthese ausschaltet
- *mad4* antagonisiert Myc-Transkriptions-Aktivität durch Konkurrenz für Max (durch Ähnlichkeit)

### DNA, RNA, Proteinsynthese

- *rpm2* involviert in DNA-Synthese
- *gart* involviert in *de novo* Purin Synthese
- *eif2b5* Untereinheit des Translationsfaktors 2B
- *gtf2a2* allgemeiner Transkriptionsfaktor, TF2A
- *mef2A* MADs Box verstärkender Transkriptionsfaktor 2 , Polyprotein A
- *hnrpa1* transportiert poly A mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma, könnte die Selektion der „splice side“ beeinflussen
- *eifl 4 EL3* eukaryontischer Translations Initiationsfaktor 4E-like3
- *recq 15* DNA-Helikase, Typ 5
- *rps51* Ribosomales Protein S5-Pseudogen
- *rpl/a* Ribosomales Protein Lfa
- *ddx15* pre mRNA-prozessierender Faktor, involviert in das Disassembeln

- *cdk8* der Splicosome nach dem Entlassen der reifen mRNA  
cyclin-abhängige Kinase8, kontrolliert den Zellzyklus und vielleicht die Transkription,  
bindet und wird aktiviert von Cyclin C  
phosphoriliert die c und d Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II

### Zelladhäsion/Zellwachstum/Zelldifferenzierung

- *fgf8* stimuliert Zellwachstum in autokriner Weise
- *tyro 3* involviert in Zelladhäsion
- *egfl2* „epidermal growth factor like“
- *gib3 / gib 4* involviert in Zellverknüpfung
- *pcdh10* gehört zu der Familie der humanen neuronalen cadherin-like Zelladhäsionsgene
- *pnn* von Desmosomen aktiviertes Protein
- *krt17* Keratinuntereinheit Typ I und II, stressinduziert
- *krt18* Heterotetramer von Typ I und II Keratin
- *nap1L1* Nukleosom Assembling Protein1, vielleicht involviert in Chromatin Formation und Regulation der Zellproliferation
- *tbce* Tubulin-spezifisches Chaperon
- *mcam* Melanoma Adhäsions Molekül
- *adam15* Desintegrin und Metalloproteinase Domäne 15, Mögliche Funktion: Zelladhäsions-Molekül
- *creg* Zellulärer Repressor des E1A-stimulierenden Gens, könnte auf transkriptioneller Ebene das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung beeinflussen

### Cholesterol/Steroide

- *mvk* Mevolatkinase, involviert in Synthese des Isoprenoid und des Cholesterol
- *ptgis* Prostaglandin I2-Synthase
- *sts* Steroidsulfatase, involviert in Östrogenproduktion während der Schwangerschaft
- *hsd* Hydroxysteroid (17 $\beta$ ) Dehydrogenase 1, involviert in Biosynthese von Östrogen
- *abca1* cAMP-abhängiger und Sulfonylurea-sensitiver Anionen Transporter, involviert in den intrazellulären Cholesteroltransport
- *cyp 19* Cytochrom P450, involviert in Östrogensynthese und Tryptophanmetabolismus
- *arsa* Arylsulfatase A, involviert in Sphingomyelidmetabolismus

**Übrige**

- *scya7* MCP-3, Zytokine
- *apoe* Lipidrezeptor
- *igsf3* immunglobuline Superfamilie, Membran Antigen
- *tpl1* Triosephosphat Isomerase, wichtig in verschiedenen Pathways

**In H1-infizierten U937 Zellen herunterregulierte Gene und Funktion der von ihnen kodierten Proteine:**

Hier wurden nur auf den Unigeneset-1-Filtern Gene gefunden.

- *pap* Polymerase, kreiert 3´-Poly-A-Schwanz der mRNA
- *atf1* aktivierender Transkriptionsfaktor 1, bindet an cAMP-empfindliche CRE-Element, cAMP-reguliert,
- *adcy1* Adenylatzyklase 1
- *mxi1* MAX-interagierendes Protein antagonistisiert myc-Transkription durch Konkurrenz um die Bindung von MAX

Folgende Gene sollen mit einem Northern-Blot bestätigt werden, sie wurden aus den verschiedenen Gruppen ausgewählt:

<b>c-myc Regulation:</b>	<i>mxi1</i> <i>mad4</i> <i>c-myc</i>	<b>Apoptose:</b>	<i>kaspase 2</i> <i>kaspase 3</i> <i>kaspase 4</i> <i>kaspase 8</i>
<b>CAMP</b>	<i>atf1</i> <i>adcy1</i>		<i>jwhag</i> <i>gnb2L1</i> <i>dedd</i> <i>cox6c</i>
<b>Zelldifferenzierung:</b>	<i>gib3</i> <i>krt18</i> <i>pnn</i>	<b>Cholesterolfstoffwechsel:</b>	<i>hsd</i> <i>sts</i> <i>arsa</i> <i>mvk</i> <i>abaca1</i>

## 5 Diskussion

### 5.1 Chimären und Pseudotypen

Durch die Konstruktion von Chimären und Pseudotypen aus den MVMp- und hH1-Basisvektoren ist der Anteil der RCVs in den Virusstocks unter den detektierbaren Level im Plaque-Assay gesenkt worden. In den hier durchgeführten Experimenten entspricht das einer Senkung des RCV-Anteils von 0,012% bis 0,6% (Basisvektoren) auf Werte von unter 0,0001% bis 0,000006% (Chimären/Pseudotypen). Dabei konnte ein unerwünschter Titerdrop vermieden werden. Trotzdem waren für die Chimären nach 1 bis 2maliger RCV-Amplifikation immer und für die Pseudotypen nach 2maliger RCV-Amplifikation in fast allen Fällen RCVs detektierbar. Wir haben außerdem gezeigt, dass bei unseren Vektoren jeder entstandene RCV auch zu einer Plaque führt, anders als Dupont und seine Mitarbeiter für ihre Vektoren beschrieben haben (Dupont et al., 2001).

Außerdem konnte mit Hilfe der Pseudotypen und der C-hH1-Chimäre gezeigt werden, dass die Restriktion der viralen H1-Replikation in den murinen A9 Zellen nicht durch das H1-Kapsid, sondern einzig durch einen 1800 bp langen H1-Genombereich verursacht wird, der im NS-kodierenden Bereich liegt. Dies ist unseres Wissens der erste Fall für den gezeigt wurde, dass der Wirtszelltropismus nur durch das virale Genom determiniert ist. Dabei liegt die Ursache der Restriktion nach dem Eintritt des Virus, aber noch vor Beendigung der Konversion. Ursachen der gestörten Konversion können Interaktionen einzelner VP-Proteine mit dem oben genannten H1-Genomabschnitt sein, die dann eine Konversion behindern, oder aber der fehlende Ansatzpunkt für zelluläre Faktoren in eben diesem H1-Genomabschnitt, die für die Konversion von Nöten wären. Schließlich ist es auch vorstellbar, dass dort zelluläre Faktoren ansetzen können, die inhibitorisch auf den Konversionvorgang wirken.

Auch in den beiden murinen Zelllinien L929 und EA ist nur das MVMp-Genom, nicht aber das MVMp-Kapsid für den Tropismus determinierend. In zwei anderen getesteten murinen Zelllinien (C3H10T1/2 und K1735) ist hingegen auch das MVMp-Kapsid für den Tropismus wichtig. Drei der humanen getesteten Zelllinien (U937, HeLa, U373) zeigten den Tropismus über das H1-Kapsid determiniert ohne eine erkennbare Rolle des Genoms. In einer vierten humanen Zelllinie (MOLT-4) determinierte das MVMp-Kapsid den Tropismus, allerdings spielt dabei auch das MVMp-Genom eine Rolle. Der

Tropismus wird also für diese beiden Viren in verschiedenen Zelllinien durch unterschiedliche Faktoren bestimmt.

### **5.1.1 Gefahren der RCVs und Strategien zu ihrer Minimierung**

Die RCV-Kontamination der rekombinanten Vektoren, die zur Immuntherapie von Krebs angewendet werden, soll möglichst gering gehalten werden, um die Gefahren für den Patienten zu minimieren.

Für H1-Wildtyp wurde zwar gezeigt, dass die *in vivo* Applikation im Menschen zu keinen klinischen Symptomen führt (Toolan et al., 1965), es ist aber noch wenig über die Reaktion immunsupprimierter Personen bekannt, sowie auch über die Wirkung in Kombination mit anderen Medikamenten, wie z.B. Chemotherapeutika. Für H1 ist gezeigt worden, dass es transformierte menschliche Blutzellen gut infiziert (Faisst et al., 1989). MVMp ist stark pathogen für neonatale Infektion von *Mastomys* (Haag et al., 2000b) und zeigt auch in adulten Tieren 10 Tage nach Infektion v.a. in Herz, Lunge und Milz Virusvermehrung mit gering- bis hochgradiger Erythropenie und mittelgradiger Leukozytose (Haag, 2000c). Neueste noch nicht publizierte Daten aus unserem Labor weisen darauf hin, dass bei der Verwendung unserer MVMp-basierenden Vektoren in Mäusen eine virale RNA-Expression in Lymphozyten durch RT-PCR nachzuweisen ist (Natalia Giese). Eine Infektion der Blutvorläuferzellen und Lymphozyten mit RCVs, die dort amplifizieren, könnte ungewollte Folgen für den Patienten nach sich ziehen. RCVs könnten womöglich genau wie Wildtyp zu einer langanhaltenden latenten Infektion führen, die bei Immunsuppression zu noch unbekanntem Folgeerscheinungen führen, oder aber ungewollte Konsequenzen für das Ungeborene in einer eventuellen späteren Schwangerschaft einer Patientin haben könnte.

Eine besondere biologische Gefahr der RCVs liegt in der Möglichkeit, transduzierte Zytokine und Drogen exprimierende Gene über den eigentlichen Wirkungsort, vielleicht sogar über den Patienten hinaus, auf andere Personen zu verbreiten. Ein Risiko, dessen Folgen schwer abzuschätzen sind und das unbedingt zu vermeiden ist.

Denkt man an eine mögliche Vektorproduktion in Verpackungszelllinien, die eine in ihr Zellgenom integrierte VP-Sequenz besitzen und damit die benötigten Kapsidproteine bereitstellen, stellt eine RCV-Kontamination auch in geringster Menge ein ernstes Problem dar, da diese Viren einen deutlichen Wachstumsvorteil in Verpackungszelllinien gegenüber rekombinanten Viren zeigen (Bakkouri et al., 2000). Die Folge davon ist

einerseits eine hohe RCV-Kontamination der so produzierten Virusstocks, da sich die RCVs nach wenigen Infektionsrunden der Verpackungszelllinie unproportional stark vermehren; andererseits zerstören die so amplifizierten RCVs schnell die Verpackungszellen (Brandenburger & Russell, 1996; Bakkouri et al., 2000).

Um den RCV-Anteil zu senken, wurde in dieser Arbeit das Vermindern der homologen Bereiche zwischen Helfer- und Vektorplasmid gewählt. Dabei wurde der RCV-Anteil der Kontamination zwischen 0,08% und 1% (Kestler et al., 1999) auf eine im Plaque-Assay nicht mehr detektierbare Menge reduziert, auf Werte niedriger als 0,00012% oder sogar niedriger als 0,000006%. Im Falle der Chimären waren nach 1-maliger, bei den Pseudotypen nach 2-maliger RCV-Amplifikation in den meisten Fällen wieder RCVs mit im Plaque-Assay detektierbarer Höhe entstanden.

Die meisten der bisher getesteten humanen und murinen Tumorzelllinien produzieren nur wenig oder kein Virus (Lopez-Guerrero et al., 1997; Cornelis et al., 1988; nicht publizierte Daten unseres Labors). Da tierexperimentelle Versuche mit den rekombinanten Viren durch eine gewisse RCV-Verunreinigung nicht beeinflusst worden sind (Haag, 2000a) und eine RCV-Verunreinigung unter 1% nachweislich keine pathogenen Veränderungen der Tiere verursacht (Wetzel et al., 2001; nicht publizierte Daten unseres Labors), können diese Vektoren unbedenklich zumindest im Tierversuch verwendet werden. Für die Anwendung im Menschen sollen transgenetrische Vektorstocks aus Sicherheitsgründen vollständig RCV-frei sein.

Außerdem ist das Benutzen dieser neuen Vektoren in einer Verpackungszelllinie, wie sie in unserem Labor zur Zeit für hH1-Vektoren entwickelt wird und schon Vorbilder in den von Brandenburger und Bakkouri beschriebenen MVMp-Verpackungszelllinien hat, sicherlich sehr vielversprechend. Es wurde gezeigt, dass rekombinante MVMp-Virusstocks, produziert durch Transfektion ihres Vektorgenoms in eine Verpackungszelllinie mit in das Zellgenom integrierter MVMp-Verpackungshelfersequenz zur Expression der Kapsidproteine, eine stark verminderte RCV-Kontamination aufzeigen (Brandenburger und Russell, 1996; Bakkouri et al., 2000). Deutlich zu sehen ist hier die Reduktion der RCV-Kontamination von ca. 90% nach der Kotransfektion von NB324K Zellen auf eine undetektierbare Höhe nach Transfektion der Verpackungszellen (Brandenburger und Russell, 1996). Mit Konstrukten, die weniger Homologien untereinander aufwiesen als im Falle von Brandenburger, konnte Bakkouri die RCV-Kontamination von ca. 10% nach Kotransfektion auf undetektierbaren Level nach

Transfektion der Verpackungszellen senken. Allerdings waren nach der ersten, spätestens aber nach der dritten Infektionsrunde der Verpackungszellen RCVs detektierbar, deren Anzahl dann rasant anstieg. In beiden Fällen weisen das Helferplasmid und das Vektorplasmid einen deutlich höheren Homologiegrad auf als das für die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte der Fall ist oder bei Verwendung der Chimären-Genome in diesen Zellen der Fall wäre. Somit besteht Grund zu der Annahme, dass bei der Transfektion dieser Zelllinie mit dem C-MVMp/EGFP-Genom zur Herstellung der Chimäre oder dem hH1/GFP-Genom zur Herstellung eines Pseudotypen ein völlig RCV-freier Virusstock entstehen kann. Dieser kann dann für weitere Runden von Infektionen der Verpackungszelllinien benutzt werden, ohne RCVs hochzuamplifizieren.

Beide von Brandenburger und Bakkouri beschriebenen MVMp-Verpackungszelllinien produzierten relativ niedrige Titer von höchstens bis zu  $10^4$  infektiösen Einheiten pro ml. Allerdings waren auch die in einer normalen Kotransfektion erreichten Titer deutlich unter  $10^5$  infektiösen Einheiten pro ml, also deutlich niedriger als die von uns erreichten Titer. Das kann zum einen daran liegen, dass die von ihnen verwendeten NB-E Zellen schlechter transfizierbar oder schlechtere Virus-Produzenten sind als die von uns verwendeten 293T Zellen. Zum anderen besitzen unsere Konstrukte eine NS1-Einzelbruchstelle am 3'-Palindrom, welche durch Cotmore und Tattersall charakterisiert worden war (Cotmore & Tattersall, 1994) und eine Erhöhung der Titer der ersten Generation autonomer parvoviraler Vektoren im Bereich von  $10^3$  bis  $10^4$  (Dupont et al., 1994; Brandenburger & Russell, 1996; Brandenburger et al., 1999) auf Titer von  $5 \times 10^7$  ermöglichte (Kestler et al., 1999).

Clement und Mitarbeiter isolierten unvollständige, noch effizient replizierende MVMp-Genome, die spontan während Infektionen mit Wildtyp bei hoher MOI entstehen. Diese besitzen immer noch die palindromischen Sequenzen und Reste des parvoviralen Genoms, aber keine vollständigen NS- oder VP-Sequenzen mehr. In diese Genome wurde dann die NS-kodierende Sequenz mit dem P4- und Il-2 als Transgen unter P38-Promotor eingebracht. Zur Vektorproduktion wurde eine Kotransfektion mit Helferplasmiden durchgeführt, welche die gesamte VP-kodierende Sequenz entweder unter dem P38- (pP38/VP) oder dem SV40-Promotor (pPSV40/VP) enthalten. Dadurch konnte die Homologie zwischen dem Helferplasmid und dem rekombinanten Vektorgenom rechter Hand des Transgens stark reduziert werden, in einem Vektorplasmid (pULB 3375) sogar eliminiert werden. Dieser Vektor lieferte die vielversprechendsten Ergebnisse deren Arbeit. Der pULB 3375-Vektoren konnten ohne



detektierbare RCV-Kontamination produziert werden, was bei erreichten Titern im Bereich von  $10^3$  infektiöse Einheiten pro ml, titriert auf NB324K Zellen, einer RCV Kontamination unter 0,03% entspricht. Bei der Herstellung der Vektoren mit dem pP38/VP-Helferplasmid konnten allerdings nach ein bis zwei Amplifikationsrunden auf NB324K Zellen RCVs regeneriert werden. Wurde dahingegen das pPSV40/VP-Helferplasmid benutzt, konnten auch nach drei Amplifikationsrunden keine RCVs nachgewiesen werden. Die Ursache dafür kann durchaus an den niederen Titern liegen. So wurde bei der Erstellung dieser hier vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die niedrigeren Titer der MVMp-Konstrukte auf A9 Zellen verglichen mit denen auf NB324K Zellen, auch in einer langsameren RCV-Amplifikation widerspiegelt wurden. Es gab durchaus Fälle, in denen für C-MVMp/EGFP deutliche Plaques nach der zweiten Amplifikationsrunde auf NB324K sichtbar waren, wohingegen auf den A9 Zellen noch keine Plaques (RCVs) zu erkennen waren (diese Daten sind hier nicht gezeigt). Dies ist sicherlich ein Effekt, der damit zusammenhängt, dass die ermittelten Titer auf A9 wesentlich niedriger sind als die auf NB324K Zellen ermittelten.

Vor kurzem veröffentlichten Dupont und Mitarbeiter eine Arbeit über ihre MVMp-Vektoren, die Titer in vergleichbarer Höhe ( $5 \times 10^7$ ) zu unseren Titern erreichten und einen stark reduzierten RCV-Anteil zeigten (Dupont et al., 2001). Sie eliminierten die homologe Region links des Transgens beinahe komplett und reduzierten die Homologie in der rechten Region auf 74 nt mit nur 61% Homologie. Dafür benutzte Dupont im Helferplasmid statt des P38-Promotors einen CMV-Promotor und ein SV40-Polyadenylierungssignal, genau wie auch in unseren Vektoren. Desweiteren degenerierte er den genetischen Code im Helferplasmid der überlappenden 3'-Sequenzen vom Kapsidgen im Helfer- und Vektorplasmid, wodurch die Homologie dieser Sequenz auf 61% reduziert werden konnte. Außerdem klonierten sie das Transgen direkt hinter das Stop-Kodon von NS1. Dadurch verlor der Vektor das zentrale Intron und das dritte Exon der NS2-major-Form. Das zweite Exon wurde direkt an das 5'-Ende des Transgens fusioniert. Mit einer P32 gelabelten VP-Sonde determinierte er im Hybridisierungs-Assay auf NB324K Zellen eine RCV-Kontamination von 0,39%. Allerdings konnte er auch nach 4maliger RCV-Amplifikation auf NB324K Zellen keinen zytopathischen Effekt im Plaque-Assay detektieren. Das bedeutet, dass die entstandenen RCVs nicht funktionstüchtig im Plaque-Assay waren, was Dupont und Mitarbeiter zu der Vermutung veranlasste, es handele sich hierbei um nichthomologe Rekombinationsereignisse (Dupont et al., 2001). Im Gegensatz dazu, konnte bei der von mir getesteten Produktion jeder generierte RCV

auch im Plaque-Assay nachgewiesen werden. Für die in Duponts Gruppe hergestellten Vektoren muss in Betracht gezogen werden, dass NS2 nicht mehr in seiner natürlichen Form vorliegt. Es wurde beschrieben, dass NS2 womöglich synergistisch mit NS1 für den zytotoxischen Effekt verantwortlich ist (Brandenburger et al., 1990). Da unsere Vektoren den zytotoxischen Effekt der nichtstrukturalen Proteine nutzen, wäre ein solche Reduktion der Zytotoxizität unerwünscht. Auch Naeger und Mitarbeiter beschreiben eine MVMp-NS2-Mutante: NS-2381 mit einer Translationstermination im zweiten Exon der NS2-major-Form ohne Beeinflussung der anderen NS2-Isoformen und NS1 (Naeger et al., 1990); sehr ähnlich dem NS2 in Duponts Vektoren. Naegers NS2-Mutante konnte zwar immer noch Plaques in den humanen NB324K Zellen bilden; die Titer allerdings sanken dabei von  $1,5 \times 10^8$  auf  $2,4 \times 10^7$ . Außerdem wird beschrieben, dass NS2 von MVMp für eine effiziente DNA-Amplifikation und Virusvermehrung ganz besonders in Zellen des natürlichen Wirts, also in murinen Zellen nötig ist. Dort zeigt die Titration der NS-2318-Virusmutante ein Senken der Titer auf A9 Zellen von  $5,0 \times 10^7$  auf  $2,4 \times 10^4$ . Es stellt sich die Frage, ob ein solch drastischer Titerverlust bei der Titration der Konstrukte von Dupont auf A9 Zellen auch auftreten würde. Sollte die Veränderung des NS2 in Duponts Vektoren tatsächlich einen ähnlichen Effekt haben wie die von Naeger beschriebene NS-2318-Mutante, bleibt das sicher nicht ohne Folgen für die Anwendung des Dupont-Vektors in den murinen Tumormodellen. Sowohl die zytotoxische Effektivität wie auch die Transgenexpression könnten zumindest in murinen Tumorzellen stark gesenkt sein. Auch die C-MVMp/EGFP-Chimäre hat im Vergleich zu MVMp/GFP einen Titerverlust gezeigt, allerdings auf A9 und NB324K Zellen gleichermaßen. Das bedeutet, dass die Chimäre C-MVMp/EGFP im Mäusemodell genauso funktionell ist wie der ursprüngliche MVMp/GFP-Vektor. Außerdem besteht Grund zu der Annahme, dass durch die Änderung des 5'-H1-Palindroms in ein 5'-MVMp-Palindrom dieser Titerverlust rückgängig gemacht werden kann.

Gene Palmer & Peter Tattersall beschrieben in dem parvoviralen Handbuch die Konstruktion eines parvoviralen MVMp-Vektor-Systems, bei dem die homologen Sequenzen aus dem MVMp-Helferplasmid im MVMp-Vektor durch LullI ersetzt wurden (Palmer und Tattersall, 2000). So entstand ein MVMp-Helferplasmid mit einem P38-Promotor des autonomen Parvovirus LullI, der VP-kodierenden Sequenz von MVMp und einem Polyadenylationssignal des Kaninchen- $\beta$ -Globulin-Gens. Die gesamte erhaltene VP-kodierende Sequenz stammt hierbei aus LullI mit einem an den N-Terminus von VP2-fusionierten Transgen und einem Stop-Kodon zu Beginn der VP1-kodierenden Sequenz.

Mit diesen Vektoren erreichte er Titer um die  $10^7$  infektiöse Einheiten pro ml, die jedoch einen signifikanten Anteil an RCVs enthielten. In einer zweiten Vektorgeneration wurden die internen Replikationssequenzen (IRS) am 5'-Ende des Genoms entfernt. Dabei stellten sie unerwarteterweise fest, dass die Vektoren zwar geringfügig schlechter verpackt wurden, aber die Replikation des Vektorgenoms in Abwesenheit von Kapsidproteinexpression sogar besser wurde, anders als bei den beschriebenen Minigenomen (Astell et al., 1996). Mit diesen Vektoren soll es möglich sein, Virusstocks mit nicht detektierbaren RCVs zu produzieren (Palmar und Tattersall, 2000).

Mit den in dieser Arbeit konstruierten Chimären und Pseudotypen haben wir Vektoren in der Hand, die zu den autonomen parvoviralen Vektoren mit den höchsten erreichbaren Titern gehören, genau wie unsere Basisvektoren. Dabei sind sie das einzige Beispiel, das bei dermaßen geringer RCV-Kontamination relativ hohe Titer sowohl in humanen und murinen Zellen ermöglicht. Damit ist sowohl die Anwendung in immunkompetenten Mausmodellen als auch im Menschen möglich.

Zur endgültigen Erreichung RCV-freier Stocks mit unseren Vektoren bieten sich mehrere Ansätze an. Ausgehend von Palmers und Tattersalls Ergebnissen sollten wir auch in unseren Vektoren und den Chimären die IRS-Sequenzen eliminieren. Dabei müssen die dann erreichbaren Titer überprüft werden. Auf Ebene der Helferplasmide ist Duponts Strategie der Reduktion der Homologie zwischen dem Helfer- und dem Vektorplasmid durch Kodon-„Wobbeling“ im Helferplasmid sicherlich eine vielversprechende, wenn auch sehr aufwendige Methode. Um sicher zu gehen, dass die Transkription wie auch die Translation ungestört ablaufen, sollten die Basentriplets nur in solche geändert werden, die auch in anderen Bereichen des viralen Genoms zu finden sind. Trotzdem konnte Dupont in den Bereichen, in denen diese Strategie angewendet worden ist, die Homologie auf nur 61% reduzieren. Deshalb denke ich, dass v.a. der Bereich des Helferplasmids, zu dem noch eine 100%-ige Homologie zum Vektorplasmid besteht, also der Bereich nt 2005 bis 2788 im MVMp-Helfer, bzw. nt 2009 bis 2791 im H1-Helfer, Ziel des Kodon-„Wobbeling“ sein sollte.

Sicherlich wäre es von großem Vorteil, Produktionsbedingungen zu schaffen, in denen homologe Rekombinationsereignisse vermindert werden, wie das in einer Verpackungszelllinie der Fall ist. Diese hat darüber hinaus auch noch den Vorteil einer vereinfachten Folgeproduktion durch Infektion. Das Entwickeln einer solchen Zelllinie für H1-Vektoren wurde parallel zu meiner Dissertation begonnen. Für MVMp-Vektoren sind

schon zwei solche Zelllinien beschrieben (Brandenburger & Russell, 1996; Bakkouri et al., 2000).

Das Verwenden rekombinationsdefizienter Zelllinien für die Virusproduktion könnte auch eine Lösung darstellen. Dabei muss zuerst getestet werden, inwieweit diese Zellen gut transfizierbar und wie gut sie als Virusproduzenten sind.

Durch den stetigen Wissensgewinn über den Kapsid-Zusammenbau und die virale Replikation könnten in Zukunft Kapsidproteine produziert werden, die dann in ein *in vitro* Replikations-System für die virale DNA gegeben werden und dort zu viralen Partikeln assemblieren. Das würde das Entstehen von RCVs völlig ausschließen. Auch unter dem Gesichtspunkt der Reinheit einer solchen Virussuspension wäre es sehr erstrebenswert, solch ein System zu kreieren, was aber mit dem heutigen Wissen weder möglich noch vorstellbar ist.

### **5.1.2 Wirtszelltropismus der Parvoviren**

Das feline Parvovirus (FPV) und das canine Parvovirus (CPV) unterscheiden sich in weniger als 2% ihrer DNA-Sequenz und zeigen trotzdem einen unterschiedlichen Wirtszelltropismus. So infizieren *in vitro* beide Viren Katzen- und Nerz-Zellen, aber nur canine Parvoviren können effektiv Hunde-Zellen infizieren (Truyen & Parrish, 1992). Für die Fähigkeit des CPV, canine Zellen zu infizieren, sind drei Regionen der Kapside verantwortlich. Das Verändern einzelner Aminosäuren in diesen Regionen genügt, um die Infizierbarkeit caniner, nicht aber feliner oder Nerz Zellen zu verhindern (Chang et al., 1992; Parker & Parrish, 1997). Maxwells Gruppe pseudotypisierte ein rekombinantes parvovirales Lulll-Genom mit FPV- oder CPV-Kapsid und konnte damit den kapsiddeterminierten Tropismus bestätigen. Nur das CPV-kapsidierte Lulll-Genom transduzierte canine Zellen (A72) effizient; das mit FPV pseudotypisierte Lulll-Genom dagegen nicht (Spitzer et al., 1996).

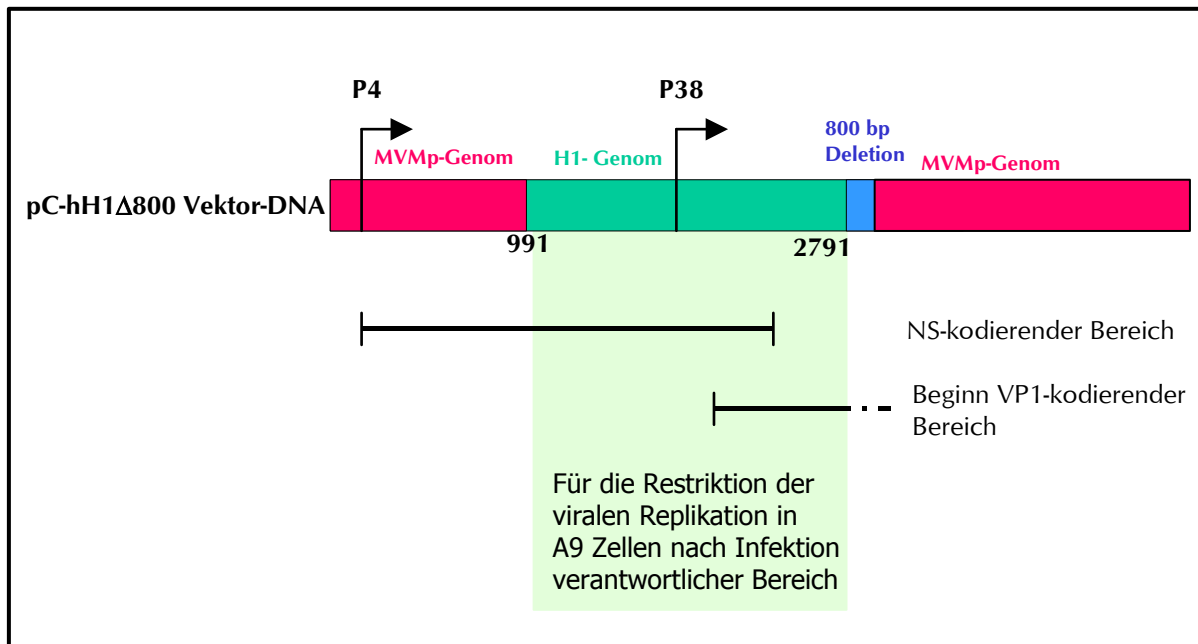
Auch der Tropismus von MVMp und MVMi ist kapsiddeterminiert. Durch Verändern nur einer der Aminosäuren 317 oder 321 im VP2-Protein des MVMi kann ein Virus produziert werden, das in A9 Zellen repliziert, in denen sonst nur das MVMp-Virus repliziert und produziert wird. Bei Ersetzen beider Aminosäuren entsteht ein Phänotyp, der dem des MVMp sehr ähnlich ist. Da sich bei den restringierten Mutanten sowohl eine reduzierte Genexpression als auch DNA-Replikation zeigt, muss die Restriktion schon in der frühen Phase der Infektion stattfinden (Ball-Goldrich & Tattersall, 1992).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde auch eine Pseudotypisierung durchgeführt. Allerdings wurde kein drittes Genom pseudotypisiert, sondern MVMp-GFP mit H1-Kapsiden und umgekehrt. Der Vorteil dieses Vorgehens ist, dass Aussagen über den Einfluss des Vektor-Genoms auf den Zelltropismus möglich werden. In allen benutzten humanen Zellen stellte sich dabei heraus, dass die verwendeten Kapside den Zelltropismus bestimmen. Für die U937, HeLa und U373 Zellen war das H1-Kapsid dafür verantwortlich, in MOLT-4 Zellen das MVMp-Kapsid, wobei in MOLT-4 Zellen zusätzlich das MVMp eine Rolle in der Determination des Tropismus spielte. Ebenso war das MVMp-Kapsid verantwortlich für das Gelingen der Infektion in den C3H/10T1/2 Zellen, einer Mäusezelllinie. In all diesen Zellen war für eine effiziente Infektion, gemessen an der Anzahl GFP positiver Zellen, das Kapsid verantwortlich. Wobei es mit Ausnahme der MOLT-4 Zellen keinen Einfluss hatte, ob es sich dabei um ein hH1-GFP- oder MVMp-GFP-verpacktes Genom handelte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Wirtszelltropismus der bisher untersuchten Parvoviren durch Änderungen in der VP-Sequenz determiniert wird.

Interessanter- und unerwarteterweise stellte sich der Tropismus in den murinen fibroblastischen A9 Zellen und den ihnen nahe verwandten L929 Zellen sowie den Ehrlich-Aszites-Zellen murinen Ursprungs ganz anders dar. Hier spielte es keine Rolle, ob zur Verpackung des MVMp-GFP-Genoms MVMp-Kapside oder H1-Kapside benutzt wurden, es kam immer zu einer vergleichbar hohen Anzahl GFP positiver Zellen. Andererseits konnte ein H1-Genom, auch wenn es in ein MVMp-Kapsid verpackt war, nach Infektion keine GFP-Expression bewirken. Das ist der erste uns bekannte Fall, in dem eindeutig gezeigt werden konnte, dass der Wirtszelltropismus nur über das virale Genom ohne Einfluss von Kapsidproteinen determiniert werden kann. Das Genom, nicht das Kapsid, determiniert den Wirtszelltropismus. Nur ein MVMp-Genom führt zu einer effizienten Transduktion dieser murinen Zellen, ganz im Gegensatz zu den oben beschriebenen Beobachtungen bei MVMp/MVMi und FPV/CPV. Durch das Verwenden der C-hH1/EGFP-Chimäre in A9 Zellen konnte der Teil des viralen Genoms, welcher für die Restriktion des H1-Genoms in A9 Zellen von Bedeutung ist, auf einen Teil zwischen den Nukleotiden 991 und 2791 eingeschränkt werden. Stammt dieser Teil in dem zur Infektion benutzten viralen Genom aus einem H1-Genom, so kann dieses virale Genom in A9 Zellen nicht replizieren und auch nicht zu einer GFP-Expression in L929 und Ehrlich-Aszites-Zellen führen. Dieser Bereich, dargestellt in Abb. 5-1, enthält Teile der NS1-kodierenden Sequenz so wie das zweite und dritte Exon des NS2-Proteines mit

jeweiligen splice-sites. Ebenso liegt der P38-Promotor auf diesem Fragment. Auch die Kap-Struktur des VP1 und der Beginn des VP1-Proteins mit Startkodon sind dort zu finden, wobei VP1 sowohl auf transkriptorischer als auch auf translatorischer Ebene keine Rolle spielen kann, da keine vollständigen VP-Proteine in diesen Vektoren gebildet werden; wenn, dann kann dieser Bereich genau wie der gesamte Rest des Bereiches nt 991 bis nt 2791 bei der Dekapsidierung oder als Ansatzpunkt zellulärer Faktoren eine Rolle spielen.



**Abb. 5-1: Darstellung des für die Restriktion in A9 Zellen verantwortlichen Genombereiches**

Hier ist das Genom der C-hH1-Chimäre dargestellt, die nach Infektion in A9 Zellen nicht zu einer Replikation des viralen Genoms führen kann. In Rot sind die DNA-Bereiche dargestellt, die aus dem MVMp-Genom stammen, in Blau die 800 bp Deletion zu Beginn von VP2 und in Grün der Bereich, der aus dem H1-Genom stammt und somit für die Restriktion verantwortlich sein muss. In ihm liegen der P38-Promotor, verantwortlich für die Transgenexpression, sowie ein Teil der NS- und der Beginn der VP1-kodierenden Sequenz.

Da das MVMp-GFP-Genom sowohl mit H1- als auch mit MVMp- Kapsid verpackt in A9 Zellen repliziert und GFP exprimiert, ist davon auszugehen, dass C-hH1/EGFP in die A9 Zelle aufgenommen wird. Zelluläre Oberflächenrezeptoren spielen also höchstwahrscheinlich keine Rolle bei diesem Wirtszelltropismus. Auch für MVMi und MVMp scheinen nicht Zelloberflächenrezeptoren für den unterschiedlichen Tropismus verantwortlich zu sein, da beide Viren gleich gut an der Zelloberfläche von A9 (permissiv für MVMp, aber nicht für MVMi) und an S49-1TB2 Zellen (permissiv für MVMi aber nicht für MVMp) binden (Spalholz & Tattersall, 1983). Auch das porcine Parvovirus (PPV) wird sowohl von permissiven als auch von nicht-permissiven Zellen aufgenommen, repliziert aber nur in den permissiven Zellen. Dabei führt eine Transfektion des PPV-Genoms auch nur in permissiven Zellen zur Replikation (Ridpath und Mengeling, 1988).

Vasudevacharya und Mitarbeiter untersuchten eine Variante des NADL-2 porcinen Parvovirus, P2, die anders als NADL-2 neben porcinen Zellen auch canine Zellen infizieren kann. Dabei stellte sich heraus, dass zwei Änderungen, eine im NS-Bereich und eine andere im Kapsidbereich nötig sind, um diese Tropismuserweiterung hervorzurufen (Vasudevacharya & Compans, 1992). Auch für MVMi wurde berichtet, dass für die Replikation und den lytischen Effekt in EL4 Zellen, anders als für MVMp in A9 Zellen, neben einem Bereich in der VP-Region (nt 3525 bis nt 4339) auch der nt 1084 bis nt 2070 Bereich in der NS-Region wichtig ist (Colomar et al., 1998). Dieser Bereich stellt einen Teilbereich des Genomabschnitts dar, der für die Restriktion der C-hH1/EGFP-Replikation in A9 Zellen verantwortlich ist.

Spalholz und Tattersall beschrieben außerdem, dass MVMp und MVMi nicht nur gleich gut an der Zelloberfläche von A9 (permissiv für MVMp, aber nicht für MVMi) und S49 1TB2 Zellen (permissiv für MVMi aber nicht für MVMp) binden, sondern auch dass die Konversion in beiden Zelltypen gleich effizient war, wenn auch mit drei Stunden Unterschied. Sie vermuteten deshalb einen Mangel intrazellulärer Faktoren, die erst nach der Initiation der DNA-Synthese (Konversion) aber vor detektierbarer viraler Genexpression eine Rolle spielen (Spalholz & Tattersall, 1983). Allerdings könnte man die Verzögerung des Erscheinens der mRF durchaus auch als Folge einer verlangsamten Dekapsidierung deuten. Für einen Zellfaktormangel spricht auch, dass Hybridzellen aus T-Lymphozyten, die permissiv für MVMi aber nicht für MVMp sind, und Fibroblasten, die permissiv für MVMp aber nicht für MVMi sind, permissiv für beide Viren sind (Tattersall & Bratton, 1983). Die Funktion eines solchen Zellfaktors kann mannigfaltig sein. So könnte er entweder mittelbar oder unmittelbar in den Replikationsvorgang eingreifen oder aber wie bei Beard und Previsani spekuliert, einen destabilisierenden Einfluss auf das Kapsid haben und somit eine wichtige Rolle im Dekapsidierungsvorgang spielen.

Previsani und Hirt zeigten außerdem, dass in EL4 Zellen, welche permissiv für MVMi aber nicht für MVMp sind, im Falle für MVMi die dRF zehn Stunden nach Infektion sichtbar war und für MVMp 24 Stunden nach der Infektion, aber nur in sehr geringer Menge. Dabei fanden sie heraus, dass die geringe Menge an dRF im Falle von MVMp aus nur wenigen EL4 Zellen stammt, welche die Replikation von MVMp erlaubten. Nach Transfektion von EL4 Zellen konnten beide Viren ähnlich gut replizieren und gleiche Virusmengen produziert werden. Interessanterweise destabilisierte der EL4-Zellextrakt MVMi-Partikel, aber nicht MVMp-Partikel; ein Vorgang, der für das Gelingen der

Dekapsidierung wichtig sein kann. Aufgrund dieser Beobachtungen sahen sie den Grund einer schlechten Permissivität der EL4 Zellen für MVMp in einem Dekapsidierungsproblem.

Für das in unseren Studien verwendete C-hH1/EGFP-Virus konnte gezeigt werden, dass nach Infektion von A9 Zellen weder die nichtstrukturalen Proteine exprimiert, noch die virale DNA amplifiziert wurde. Nach Transfektion, die mit dem entsprechenden Vektorplasmid erfolgte, war sowohl die DNA-Amplifikation als auch die Proteinexpression möglich. Dabei handelt es sich bei einem Plasmid schon um eine doppelsträngige DNA, die also anders als die bei einer viralen Infektion vorliegende ssDNA nicht mehr konvertiert werden muss. Das lässt genau wie in den oben beschriebenen Fällen auf eine Blockade in der frühen Infektionsphase schließen. Nach der Konversion kann die virale Replikation ablaufen, wenn auch nicht die gleiche Menge an replikativen Formen erreicht werden wie mit dem MVMp-Konstrukt C-MVMp/EGFP. Die Restriktion muss also nach dem Viruseintritt und vor Ende der Konversion liegen. Dabei können der Dekapsidierungsvorgang eine Rolle spielen oder zelluläre Faktoren, die während der Konversion benötigt werden, deren Bindung an das H1-Genom in A9 Zellen gestört ist oder aber zelluläre Faktoren, die an das H1-Genom in A9 Zellen binden und zu einer Inhibierung der Konversion führen. Die von Previsani und Mitarbeitern angewendete Versuchsdurchführung zur Abklärung eines Dekapsidierungsproblems mit A9-Zellextrakten scheint jedoch aus zwei Gründen fraglich: zum einen wird das H1-Kapsid, welches auch im C-hH1/EGFP-Virus vorliegt, bei dem MVMp-GFP/H1-Pseudotyp ohne Problem auch in A9 Zellen geöffnet; zum anderen kann auch die Verwendung eines MVMp-Kapsids mit einem H1-Genom den Block nicht überkommen. Im Falle einer gestörten Dekapsidierung handelt es sich also wahrscheinlich weniger um ein Problem der Kapsidöffnung, als um das unvollständige Lösen einiger VP-Proteine von der viralen DNA, die dann den nachfolgenden DNA-Transport in den Kern oder den Konversionsvorgang behindern. Eine andere Ursache für eine gestörte Konversion, könnte sein, dass noch nicht bekannte für die Konversion wichtige zelluläre Faktoren im Bereich von nt 991 bis nt 2791 binden müssen, dies aber nur können, wenn es sich dabei um ein MVMp- und nicht um ein H1-Genom handelt. Als letzte Möglichkeit kommt noch in Betracht, dass an das H1-Genom zelluläre A9-Faktoren binden, die dann eine Konversion verhindern, eine Art Abwehrmechanismus der Zelle. Um abzuklären, ob es sich um ein Problem der Dekapsidierung oder der



nachfolgenden Konversion handelt, muss man eine Transfektion von A9 Zellen mit ss H1-DNA vornehmen. Entsteht dabei die mRF, so kann es sich nur um ein Problem auf Ebene der Dekapsidierung handeln. Auch könnte man die ss DNA in einem *in vitro* Konverations-Assay mit A9-Zellextrakten (Baldauf et al., 1997) einsetzen und das Entstehen mRF überprüfen.

Man könnte auch eine Fraktionierung des für die Restriktion verantwortlichen viralen DNA-Bereiches vornehmen, um den verantwortlichen Bereich genauer zu kartieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kotransfektion von NS2(MVMp) mit C-hH1/EGFP deren Replikation leicht verbesserte; zu sehen in einer vermehrten Menge an mRF und dRF. Dabei zeigte die Kotransfektion mit den beiden nichtstrukturalen Proteinen NS1 und NS2 keinen stärkeren Effekt als die Kotransfektion mit NS2 allein. In diesem Zusammenhang wurde für NS2 von MVMp gezeigt, dass es für eine produktive Infektion von A9 Zellen mit MVMp-Wildtyp essentiell ist (Naeger et al., 1990). Dabei war die Replikationsrate von NS2-Deletionsmutanten verglichen mit dem Wildtyp wesentlich geringer. Auch für die Translation viraler Proteine und den Zusammenbau der Kapside ist NS2 in A9 Zellen nötig (Naeger et al., 1993; Cotmore et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist NS2 in den humanen NB324K Zellen, die auch permissiv für das murine MVMp Virus sind, entbehrlich (Naeger et al., 1990; Naeger et al., 1993).

Es kann also durchaus der Fall sein, dass es sich bei dem Phänomen der Restriktion von H1-Virus in A9 Zellen nach Infektion nicht nur um einen einzigen gestörten Vorgang handelt, sondern um eine Folge verschiedener verlangsamter oder nicht effizient ablaufender Prozesse.

Interessanterweise berichteten Soderlund-Venermo und Mitarbeiter kürzlich über einen neu entdeckten Parvovirus der Hamster, das HaPV-Virus, das ein sehr ähnliches Verhalten in A9 Zellen zeigt, wie das C-hH1/EGFP-Virus. HaPV hat 87% Homologie zu MVMp und 80% Homologie zu H1 (Besselsen et al., 1996). In den Hamsterzellen BHK und den humanen NB324K Zellen replizierte das Virus sowohl nach Infektion als auch nach Transfektion eines infektiösen Plasmids. Die Autoren berichteten aber, dass das HaPV nach Infektion von A9 Zellen keine Replikation der Virus-DNA zeigte, wohingegen nach Transfektion eines infektiösen pHaPV-Klons Replikation sichtbar war. Diese blieb jedoch niedriger als im Falle einer Transfektion eines infektiösen MVMp-Plasmids und verschwand wieder sechs Tage nach Transfektion (Soderlund-Venermo et al., 2001).

Diese Situation ist sehr ähnlich der mit den hH1/GFP-, C-hH1/GFP- und hH1-GFP/MVMp-Vektoren beschriebenen. Auch hier konnte nach Infektion von murinen A9 Zellen keine Replikation und keine GFP-Expression detektiert werden, wohingegen nach Transfektion sowohl das hH1/GFP-Genom als auch das C-hH1/EGFP-Genom replizierte. Auch in diesem Falle bleibt die Menge der produzierten monomeren und dimeren Formen hinter der von dem C-MVMp/EGFP (ein auf MVMp-basierendes Genom) zurück.

### **5.1.3 Pseudotypen als Chance für die wiederholte Applikation parvoviraler Vektoren**

Die Applikation autonomer Nagerparvoviren kann zu einer Serokonversion führen. So zeigten Toolan und Mitarbeiter, dass eine H1-Applikation im Menschen eine Virämie mit nachfolgender Serokonversion bewirkt (Toolan et al., 1965). Infektion neonataler Mäuse Ratten, Hamster und Mastomys mit MVMp oder H1 führt zur Serokonversion in diesen Tieren (Siegl, 1984; Kimsey et al., 1986, Haag et al., 2000b). Welche Auswirkung die gebildeten Antikörper dabei auf eine wiederholte Vektorapplikation haben und ob es sich immer um neutralisierende Antikörper handelt, ist noch ungeklärt. Nach unpublizierten Daten von Natalia Giese ist die zweite Applikation von MVMp-Vektoren weniger erfolgreich als die erste. Ein großer Teil der applizierten Vektoren wird offenbar eliminiert, so dass die Transgenexpression im Tumor innerhalb der ersten drei Wochen trotz gleichbleibender, wiederholt applizierter Vektormenge sinkt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass bei Umgehung der entstehenden Immunantwort die Effektivität der Therapie gesteigert werden könnte.

Der Hämagglutinationshemmungstest zeigt, dass die serologische Verwandtschaft autonomer Parvoviren gering ist. Sowohl MVMp als auch H1 zeigen außer mit dem eigenen Antiserum mit keinem anderen getesteten parvoviralen Antiserum (RV, RTV, HB, FPV, CPV, MVC, BPV, PPV, TXV, LPV) eine Hämagglutinationshemmung (Siegl, 1976).

Die Möglichkeit einer Pseudotypisierung von H1-Vektorgenomen mit MVMp-Kapsiden und umgekehrt, sowie die Pseudotypisierung von Lull-Genomen mit MVMp-, MVMi- und H1-Kapsiden ist möglich (Maxwell et al., 1993) und könnte eine wiederholte Applikation effektiver machen. Maxwell zeigte außerdem, dass die Pseudotypisierung eines Lull-Genoms auch mit Kapsidproteinen weniger nah verwandter Parvoviren, wie dem felines FPV- und dem caninen CPV-Parvovirus, möglich ist. Auch andere Kapside könnten dafür prinzipiell getestet werden. Dabei müssen natürlich im Folgenden drei Aspekte überprüft

werden: zum einen die Verpackungseffizienz, die sich in den Titern widerspiegelt; zum zweiten die Anzahl der entstehenden RCVs und drittens der Tropismus des entstandenen Pseudotyps. Wie meine Arbeit deutlich macht, handelt es sich bei der Determinierung des Tropismus immer um ein Wechselspiel zwischen Zelle und Vektor. So wurde für murine Zellen gezeigt, dass sowohl das Vektorgenom als auch das Kapsid determinierend für den Tropismus sein können. Während in allen bisher getesteten menschlichen Zellen das Kapsid wichtig für die Determination des Tropismus war, hat das Beispiel der MOLT-4 Zellen allerdings gezeigt, dass auch in humanen Zellen das Genom den Tropismus beeinflussen kann. Jeder behandelte Tumor sollte zuvor mit den Pseudotypen getestet werden, um die Effektivität des Pseudotyps in diesen Zellen zu überprüfen. Außerdem empfiehlt es sich, die entwickelten Pseudotypen auf das Hervorrufen klinischer Symptome *in vivo* zu testen. Ein geänderter Tropismus, sowie die z.B. in U937 festgestellte verstärkte Effektivität der Pseudotypen verglichen mit dem Ausgangskonstrukt, kann natürlich auch zu verändertem Verhalten *in vivo* führen, mit den positiven Auswirkungen, wie verstärkter Effizienz im Tumorgewebe oder negativen Folgen, wie der Entstehung klinischer Symptome.

#### **5.1.4 Einsatz der Parvoviren in der Krebstherapie als replikativ kompetente Viren**

Die hier vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der unbedingt notwendigen Vermeidung der Entstehung replikations-kompetenter Parvoviren in den benutzten Vektorsystemen. Dabei gibt es aber auch genau die entgegengesetzte Bewegung, die Nutzung replikations-kompetenter Viren für die Krebstherapie, also Wildtypviren oder leicht veränderten Viren, aber in jedem Fall Viren ohne Transgenexpression. Schon Mitte des letzten Jahrhunderts haben Kliniker verschiedene Viren in ihrer Wildtypform bei Krebspatienten angewendet, brachen diese Versuche aber wegen zu hoher Toxizität ab (Southam, 1960). Erst in letzter Zeit wurde dieser Gedanke wieder aufgenommen und verschiedene Viren, wie z.B. Adenoviren, Herpes simplex oder Reoviren, auf eine solche Einsatzmöglichkeit hin untersucht (Kirn et al., 2001). Für die Anwendung des Ratten-Parvovirus H1 in solchen Studien sprechen neben der schon beschriebenen preferentiellen Replikation in transformierten menschlichen Zellen auch andere Argumente. So ist bisher kein Krankheitsbild beim Menschen mit einer H1-Virusinfektion in Verbindung gebracht worden. Auch die Verabreichung von H1 an zwei

Krebspatienten verlief ohne klinische Symptome (Toolan et al., 1965). Dabei ist unbestritten, dass mögliche pathogene Eigenschaften des H1-Virus noch wesentlich detaillierter analysiert werden müssen, besonders im Hinblick auf die Immunsuppression der Patienten und den gleichzeitigen Einsatz anderer Medikamente. Ganz besonders ist dabei auch der Einfluss der Nagerparvoviren auf das menschliche Immunsystem zu studieren, da sowohl lymphozytische Zellen als auch andere Zellen des Immunsystems Ziel einer Infektion sein können (Jacoby et al., 1996) und direkte Folgen sowie auch Spätfolgen im Menschen noch völlig unbekannt sind. Auch der Einfluss der Serokonversion des Patienten auf die Eliminierung des applizierten Parvovirus` mit Konsequenzen für den Therapieerfolg sollte in diesem Zusammenhang näher untersucht werden. Das H1-Virus kann von vielen verschiedenen Zellen aufgenommen werden, unabhängig von der Zellzyklusphase. Das bedeutet einerseits, dass viel Virusmaterial „verloren“ geht und in verschiedenste Zellen aufgenommen wird, ohne einen therapeutischen Effekt zu zeigen. Dies macht die Verabreichung einer großen Menge an H1-Viren nötig, was wieder das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen erhöht. Andererseits werden durch diese Strategie auch nichtzyklisierende Tumorzellen infiziert, in denen die Viren latent, ohne zu integrieren, vorliegen (Richards & Armentrout, 1979) und bei beginnender Proliferation der Zelle aktiviert werden können. Ein gravierender Nachteil könnte allerdings sein, dass H1 und MVMP zwar verschiedenste humane und murine Tumorzellen infizieren und in ihnen replizieren, jedoch nur von den wenigsten in signifikanter Höhe reproduziert werden (Lopez-Guerrero et al., 1997; Guetta E. et al., 1990; Cornelis et al., 1988a). Diese Beobachtung ist in unserem Labor für verschiedenste Zellen bestätigt worden. Kann der zu behandelnde Tumor das H1-Virus nicht effizient produzieren, handelt es sich auch hier wie bei den rekombinanten Viren um ein „one-hit“-Verfahren und der Vorteil der Verwendung replikativ kompetenter Viren ist verloren. Die Fähigkeit zur H1-Produktion muss vor dem Viruseinsatz für das zu behandelnde Tumormodell abgeklärt werden.

## 5.2 Folgen einer H1-Infektion in U937-Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wollten wir den Mechanismus der parvoviralen Infektion, insbesondere der Zytotoxizität, an Hand des H1-Virus auf genregulatorischer Ebene untersuchen. Dafür wählten wir die humane monozytische U937 Zelllinie. In unserem Labor wurde gezeigt, dass eine Infektion mit H1-Virus in diesen Zellen zu einer Aktivierung der Kaspase 3 führt und Apoptose ähnlich einer TNF $\alpha$ -Behandlung induziert (Rayet et al. 1998). Derselbe Effekt wurde auch durch die in der Gentherapie verwendeten hH1/GFP-Vektoren erreicht. Im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, die beschreibt, dass auch durch UV-Licht inaktiviertes AAV Virus zu Apoptose führen kann (Ray et al., 2001), führten durch UV inaktivierte H1-Viren nicht zum apoptotischen Absterben der U937 Zellen (Rayet et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde der virale Effekt auf genregulatorischer Ebene untersucht. Dafür wurde der Verlauf einer H1-Virusinfektion in synchronisierten U937 Zellen verfolgt und der geeignete Zeitpunkt für einen Vergleich infizierter mit-nicht infizierten Zellen ermittelt. Die in ihrer Regulation veränderten Gene konnten anschließend in funktionelle Gruppen unterteilt werden.

### 5.2.1 Interaktion des H1-Virus mit der humanen monozytischen U937-Zelllinie

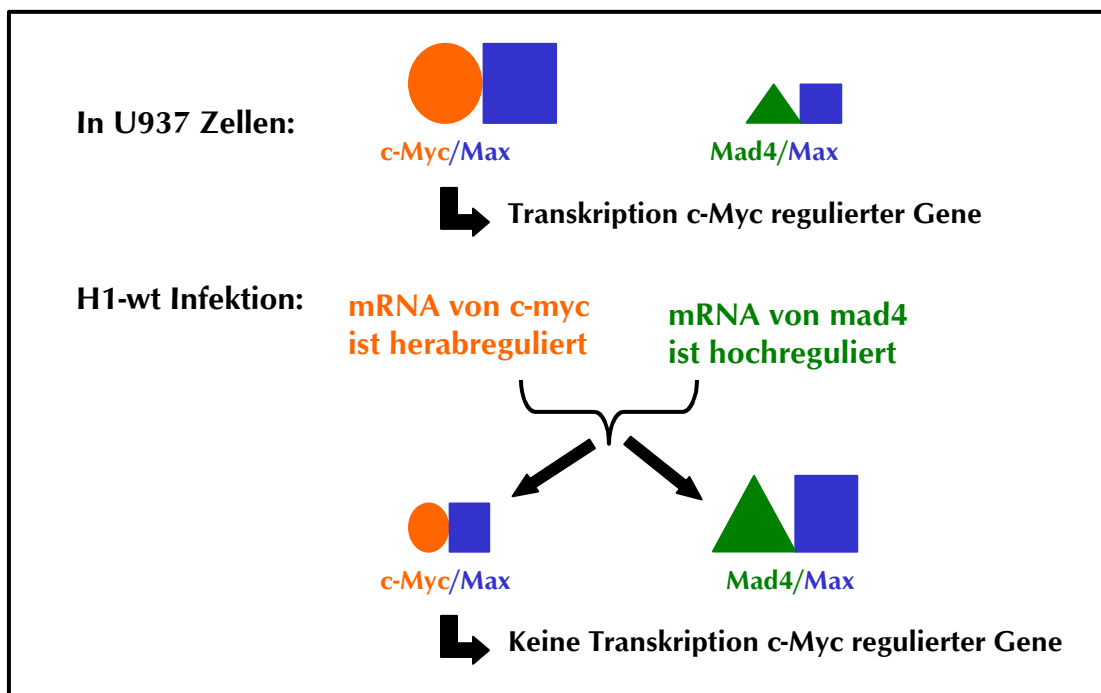
Die Effektivität und v.a. die Schnelligkeit mit der das H1-Virus die synchronisierten leukozytären U937 Zellen abtötet, ist erstaunlich. Die Bildung der monomeren replikativen Form (mRF) ist in der 2. Stunde nach dem Entfernen des Synchronisierungs-Mediums (=Zell-Release) zu sehen. Das Synchronisierungsmedium enthielt Methotrexat, das die DNA-Synthese hemmt, die Zellen in G1/S-Phase arretiert und keine Virusreplikation zulässt. Von dieser mRF kann dann die Transkription mit nachfolgender Expression geschehen, deutlich widerspiegelt in den durch Immunfluoreszenz detektierten NS1-positiven Zellen. Schon 2 Stunden nach Nachweis der Replikation zeigt ein deutlicher Prozentsatz der Zellen Nukleus-Fragmentierung im DAPI-Staining, nachgewiesenermaßen hier ein spätes Stadium der Apoptose (Rayet et al., 1998). 8 bis 10 Stunden nach Zell-Release der infizierten Zellen sind beinahe alle Zellen abgestorben außer der kleinen, in G<sub>0</sub> verweilenden Zellfraktion und womöglich eines geringfügigen Anteils gegen H1-Infektion resistenter Zellen. In nicht-synchronisierten Zellen zeigen 15 Stunden nach der Infektion erst 30% der Zellen, 25 Stunden nach der Infektion 60% der

Zellen Nukleusfragmentierung (Rayet et al., 1998). Dieser Unterschied lässt sich zum einen damit erklären, dass die Virus-DNA in dem synchronisierten Zellsystem schon dekapidiert im Kern vorliegt. Zum anderen muss das Virus nur kurze Zeit oder überhaupt nicht auf das Eintreten der Zellen in die S-Phase warten. Einmal im Kern einer U937 Zelle in S-Phase angelangt, dauert der Vorgang von der Konversion bis zum Absterben der Zelle nur ca. 5 bis 7 Stunden.

### **5.2.2 Ergebnisse der cDNA-Arrays: Reaktion der U937 Zellen auf eine H1-Virus Infektion**

In unserem Labor wurde gezeigt, dass die Infektion von U937 Zellen mit H1-Virus zum apoptotischen Absterben dieser Zellen führt. Der programmierte Zelltod, Apoptose genannt, ist ein aktiver Vorgang, der unter Energieverbrauch stattfindet und durch charakteristische morphologische Veränderungen, wie Kondensation des Chromatins und Zellfragmentation in membran-umhüllte Vesikeln, gekennzeichnet ist. Bei diesem Vorgang spielt die Proteinfamilie der Kaspasen eine bedeutende Rolle. Für die U937 Zellen wurde gezeigt, dass die Pro-Kaspase 3 durch eine H1-Infektion aktiviert wird. Diese Aktivierung führt zur Spaltung des PARP (poly adp-ribose polymerase)-Proteins; ein Prozess, der typisch für die Apoptose ist (Rayet et al., 1998). Sowohl die Genexpression der Kaspase 3 als auch die des PARP-Gens wurden mit den cDNA-Arrays in den infizierten Zellen als erhöht erkannt. Neben Kaspase 3 waren auch Kaspase 2, 4 und 8 hoch reguliert. Kaspase 8 interagiert mit dem TNF-Rezeptor-Komplex (Muzio et al., 1996) und stellt damit die Verbindung zwischen Signalen an der Zellmembran und der Apoptose-Maschinerie im Inneren der Zelle dar (Medema et al., 1997). Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass TNF $\alpha$ -Behandlung von U937 Zellen zur Apoptose führt (Rayet et al., 1998). Von den U937 Zellen wurden durch wiederholte Infektion mit H1-Virus Zellklone isoliert, die resistent gegenüber dem zytopathischen Effekt von H1 waren, die sogenannten RU-Klone (Lopez-Guerrero et al., 1997). Diese zeigten nicht nur eine Resistenz gegenüber dem zytopathischen Effekt einer H1-Virusinfektion, sondern auch einer TNF $\alpha$ -Behandlung. Dabei ist die Apoptose-Maschinerie in diesen Zellen immer noch funktionstüchtig (Rayet et al., 1998). In dieser Veröffentlichung wird auch gezeigt, dass H1 nicht durch die Stimulation der TNF $\alpha$ -Produktion zur Apoptose führt. Jedoch scheinen TNF $\alpha$  und H1 zumindest einen Teil ihrer Apoptosekaskade gemeinsam zu haben. Unsere Ergebnisse spiegeln das auch wider in der Hochregulierung TNF-

Rezeptor-assoziiierter Gene, TNFAIP3 ( TNF $\alpha$ -induziertes Protein), TRAF5 (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 5) und PIG 7 ( LPS-induzierter TNF $\alpha$ -Faktor). Das Virus aktiviert also entweder den TNF-Rezeptor selbst und/oder die nachfolgende Kaskade. In U937 Zellen wird c-myc überexprimiert. H1-Infektion führt innerhalb weniger Stunden zu einer drastischen Herabregulierung von c-myc sowohl auf Protein, als auch auf mRNA Ebene. Auch in drei der vier RU-Klone findet man eine verminderte c-Myc-Protein Akkumulation. Max, der Interaktionspartner des c-Myc-Proteins, der an das c-Myc Protein bindet und so die zelluläre Transkription aktiviert, wurde dagegen in ähnlicher Menge in U937 Zellen und den RU-Klonen gebildet (Rayet et al., 1998). Mit den cDNA-Arrays konnten wir erkennen, dass das mad4-Gen, ein anderer Interaktionspartner von Max, hochreguliert war. Der entstehende Mad4-Max-Komplex führt zu einer Repression der Transkription; Mad4 konkurriert auf Grund seiner Ähnlichkeit zu c-Myc um die Bindung zu Max (Queva et al., 1998). Sowohl die Herabregulierung der mRNA von c-myc, als auch die Heraufregulierung von mad4 nach parvoviraler Infektion haben denselben Effekt: eine Verringerung des c-Myc-Max-Komplexes und dessen transkriptionelle Aktivität. Eine deregulierte c-Myc Expression ist in verschiedenen Tumoren als Grund der Apoptoseeinleitung bekannt (Canman & Kastan, 1995).



**Abb. 5-2: Interaktion von Mad4 und c-Myc mit Max**

Eine Infektion mit H1 führt sowohl zu einer Herabregulierung von c-myc mRNA, als auch zu einer Hochregulierung von mad4 mRNA. Beides resultiert in einer Verringerung des transkriptionell aktiven c-Myc/Max-Proteinkomplexes.

Es wurden auch Gene gefunden, die in die Zelladhäsion involviert sind. In diesen monozytischen Suspensionszellen ist das ein Zeichen für einen Differenzierungsvorgang. Die Infektion mit H1-Virus scheint also zu einer beginnenden Zelldifferenzierung zu führen. Es wurde schon berichtet, dass die oben erwähnten RU-Klone verglichen mit den parentalen monozytischen U937 Zellen, eine erhöhte Menge an oxygenen Metaboliten NO und  $O_2$  produzieren, was ein Kennzeichen des monozytischen Reifevorgangs ist (Lopez-Guerrero et al., 1997).

Roprech und seine Kollegen untersuchten K562 und KS-Zellen mit cDNA-Arrays (Roprech et al., 1999). Die neoplastischen K562 Zellen stammen von leukozytischen Zellen ab. Auch hier wurden durch wiederholte H1-Infektion Zellklone isoliert, die gegen den zytopathischen Effekt von H1 resistent waren, die sogenannten KS-Zellen. Jede einzelne KS Zelle produziert immer noch geringe Mengen an H1-Virus (Telerman et al., 1993). Bei einem Vergleich der beiden Zelllinien mit eine cDNA-Array fanden die Autoren eine Hochregulierung der Expression verschiedener Gene in den KS Zellen. Im einzelnen waren dies das TCP-1-Chaperon, das Syntaxin 11, ein Protein das in den intrazellulären Transport involviert ist, und das SIHA-1, für welches sie zeigten, dass es Apoptose induzieren und Tumorsuppression bewirken kann. Außerdem fanden sie auch eine regulatorische Untereinheit des 26s-Proteasoms (p40,5) (Roperch et al., 1999).

In unseren Experimenten fanden wir nach Infektion eine Hochregulierung der regulatorischen Untereinheit des 26s-Proteasoms, psmd2. Dieses bindet an die intrazelluläre Domäne des TNFR1-Rezeptors außerhalb dessen „death domain“ (Tsurumi et al., 1996). Das 26s-Proteasom spielt eine Rolle bei der Degradierung ubiquitiniertes Proteine. Viele der kurzlebigen zellulären Proteine, wie z.B. die in die Regulierung des Zellzyklus involvierten Proteine, werden so abgebaut. Dies könnte den Einfluss des H1-Virus` auf die Deregulation des Zellzyklusgeschehens widerspiegeln.

Interessanterweise finden sich 2 in die Östrogensynthese involvierte Gene (STS, HSD) nach Infektion hochreguliert. Für U937 Zellen ist beschrieben, dass sie sowohl einen Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  wie auch  $\beta$  besitzen (Vegeto et al., 1999). Die Aktivierung des Östrogen- oder Progesteronrezeptors in U937 Zellen durch einen endogenen oder exogenen Liganden kann die apoptotische Wirkung von  $TNF\alpha$  abschwächen (Vegeto et al., 1999). Es ist also zu überlegen, ob die U937 Zellen Östrogen produzieren, um den apoptotischen Effekt von H1 zu verlangsamen. Um diese Theorie zu untersuchen, könnte man die Östrogenrezeptoren blockieren und beobachten, ob daraufhin der Verlauf der Apoptose schneller eintritt. Dazu sollte man in einem nicht synchronisierten



Zellsystem arbeiten, um das sonst sehr enge Zeitfenster zu vergrößern. Außerdem sollte unbedingt die Expression sowohl der Östrogenrezeptoren als auch der beiden Enzyme STS und HSD in den RU-Klonen mit der Expression in den parentalen U937 Zellen verglichen werden. Auch kann man versuchen, das möglicherweise gebildete Östrogen nachzuweisen. In stabil mit einem NS2-exprimierendem Plasmid transfizierten Zellen kommt es nach MVM-Infektion zu einer Reduktion des Zell-Anteils, der durch Apoptose abstirbt (Mincberg et al., 1999). Auf Grund dieser Ergebnisse kann eine antiapoptotische Eigenschaft von NS2 diskutiert werden. Dabei könnte NS2 zu einer Induktion der Östrogensynthese führen, die dann zu einer Verlangsamung des Apoptose- Eintritts führen könnte.

Es wurden nur sehr wenige Gene herabreguliert gefunden, zwei davon sind sehr interessant: die Adenylatzyklase (ADCY) 1 und der aktivierende Transkriptionsfaktor (ATF) 1. Über das sogenannte CRE (*cyclic AMP response element*), das in der regulatorischen Region einiger zellulärer Gene und auch vieler viraler Promotoren enthalten ist, kann ein Gen aktiviert werden. Oberhalb des P4-Promotors wurde auch ein CRE gefunden, welches die NS1-, NS2-Expression beeinflusst (Perros et al., 1995). An die CRE-Sequenz bindet dabei ein sogenanntes CREB (*CRE-binding*)-Protein, welches vorher von Kinase A aktiviert wird. Kinase A erfordert selbst einen Aktivierungsschritt durch cAMP, welches durch die in diesem Fall herunterregulierte Adenylatzyklase hergestellt wird (Alberts, 1994). Der an dieses CRE-Element-bindende Transkriptionsfaktor ATF1 ist ebenfalls herabreguliert. Als Folge davon würde die NS1- und NS2-Expression gedrosselt. Somit wäre die Herunterregulierung von ADCY1 und ATF1 ein weiterer Abwehrversuch der Zelle. Allerdings könnte auch zutreffen, dass das Virus selbst die Herabregulierung der Adenylatzyklase verursacht. In diesem Falle sollte eine Zugabe von Dibuteryl-cAMP, welches von der Zelle aufgenommen werden kann und die Funktion von cAMP übernimmt, die Effekte der viralen Infektion, also die Apoptoseinduktion, zumindest verlangsamen, wenn nicht gar verhindern. Mit einem solchen Versuch kann man abklären, ob es sich bei der Herabregulierung der Adenylatzyklase um eine Abwehrreaktion der Zelle oder eine vom Virus induzierte Reaktion handelt, die Effekte des Virus` unterstützt.

Die Ergebnisse der cDNA-Arrays lassen sich zum einen gut in schon bekannte Phänomene einordnen und vervollständigen das Gesamtbild. Zum anderen ergeben sie auch interessante Ausgangspunkte für weitere Theorien, v.a. für Reaktionsmechanismen der Zelle auf das Virus. Dabei ist besonders von Vorteil, dass man nachprüfen kann,

inwieweit sich diese Ergebnisse in den RU-Klonen widerspiegeln. Im weiteren müssen die oben genannten Gene in Northern-Blots bestätigt werden. Danach kann man auch den Effekt auf Proteinebene überprüfen. Wenn möglich, sollte dann die biologische Relevanz der veränderten mRNA-Menge überprüft werden.

### **5.2.3 cDNA-Arrays als vielversprechende Technik in der Parvovirologie**

cDNA-Arrays könnten zum Erkenntnisgewinn verschiedenster Fragestellungen in der Parvovirologie beitragen. Das Vergleichen infizierter Zellen mit nicht-infizierten Zellen ermöglicht Aussagen über die Wechselwirkung zwischen Virus und Zelle. Durch das Analysieren verschiedener Zeitpunkte könnten sehr gut einzelne zelluläre Gene, die zu bestimmten Zeiten benötigt und hochreguliert werden, analysiert werden. Als kritische Zeitpunkte eignen sich z.B. der Infektionsbeginn vor dem Start der Replikation, der Beginn der Replikation selbst, der Moment vor Beginn zytotoxischer Effekte oder die Phase nach schon deutlich sichtbaren zytotoxischen Effekten. Das ist auch deshalb von Interesse, weil NS1 zu verschiedenen Zeiten der Infektion in unterschiedlichen Phosphorylierungsformen vorliegt (Corbau et al., 1999) Man kann deshalb durchaus über eine veränderte transaktivierende Eigenschaft und Funktion des Proteins spekulieren. Die hier vorgestellten U937 Zellen sind ein Beispiel für solch ein Zeitkurvenexperiment. Es würde sich anbieten, eine Probe kurz vor oder kurz nach Zell-Release zu nehmen, um die Effekte durch den Viruseintritt auf genregulatorischer Ebene zu studieren. Auch ein Vergleich zur Infektion mit leeren Kapsiden wäre dabei interessant. Eine weitere Probe könnte 2 Stunden nach Release genommen werden, wenn die NS1-Expression schon deutlich sichtbar ist und auch die virale Replikation begonnen hat um frühe Effekte von NS1 zu untersuchen. Zuletzt bietet sich an, so wie hier eine Probe nach 4 oder gar nach 5 Stunden zu nehmen, wenn die Zellen schon deutlich Apoptosemerkmale zeigen und vermehrt die späten Effekte von NS1 zu sehen sind. Solche Versuche wären sicherlich auch mit Zellen des natürlichen Wirts von Bedeutung, um zu sehen wie die Infektion im Einzelnen abläuft, z.B. A9 Zellen für MVMp oder EL4 Zellen für MVMi. Dies kann ganz neue Aspekte im Verstehen der viralen Replikation, des Nutzens der zellulären Replikationsmaschinerie und der zytotoxischen Wirkung der Parvoviren eröffnen. Auf der anderen Seite gibt ein solches System auch die Möglichkeit, Abwehrmechanismen auf genregulatorischer Ebene der Zelle zu beobachten, wie hier z.B. die Hochregulierung des MCP-3-Zytokins.

Durch das Erstellen von Expressionsprofilen verschiedener Zelllinien und durch den Vergleich dieser untereinander könnten Gengruppen gefunden werden, die für die erhöhte Empfindlichkeit tumorigener Zellen für die parvovirale Infektion verantwortlich sind. So könnten bestimmte Onkogene Grund einer besseren Infizierbarkeit sein. Dies würde ein gezieltes Suchen nach Tumoren ermöglichen, die sich am besten durch Parvoviren behandeln lassen könnten. Auf der anderen Seite könnten auch Faktoren für die Resistenz bestimmter Zellen gegenüber Parvoviren determiniert werden. Dabei sind besonders Zellmodelle interessant, bei denen sowohl mit Parvoviren gut infizierbare Zellklone, wie auch gegen Parvoviren resistente Klone existieren, wie sie für die hier verwendeten U937 Zellen in den RU-Klonen vorhanden sind (Lopez-Guerrero et al., 1997). Damit können einerseits für die parvovirale Infektion wichtige Faktoren untersucht, andererseits Mechanismen der Resistenzentstehung besonders detailliert studiert werden.

## 6 Zusammenfassung

Onkosuppressive Eigenschaften sowie geringe Pathogenität in adulten Tieren machen die beiden Nagerparvoviren MVMP und H1 zu attraktiven Vektoren für den Einsatz in der Tumor-Gentherapie. Daher wurden parvovirale Vektoren entwickelt, die an Stelle der Kapsidproteingene ein Transgen tragen können. Diese rekombinanten Vektoren können ihr Genom replizieren und das eingebrachte Transgen exprimieren, aber keine Nachkommenviren bilden. Zur Produktion solcher Vektoren werden das rekombinante Virusgenom und Helferplasmide zur Expression der Kapsidproteine kotransfiziert. Dabei kommt es durch homologe Rekombination zur Entstehung von replikationsfähigen Revertanten, RCVs (*replication competent viruses*). Diese RCVs sind in der Lage, ihre Kapsidproteine zu exprimieren und so Nachkommenviren zu bilden. Für die Anwendung von Vektoren in der Gentherapie muss der RCV-Anteil minimiert oder möglichst eliminiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu Strategien erarbeitet und überprüft. Durch die Konstruktion von Chimären und Pseudotypen aus MVMP und H1 konnten Virusstocks produziert werden, die keinen im Plaque-Assay detektierbaren RCV-Anteil zeigten. Das entspricht einer 100- bis 17.000-fachen Senkung des RCV-Anteils für die Chimären und Pseudotypen. Dabei wurden Titer erreicht, die im Bereich der Titer der Ausgangsvektoren lagen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit ist die Charakterisierung der Chimären und Pseudotypen hinsichtlich ihres Wirtszelltropismus. Durch den Einsatz der Pseudotypen und der Chimären konnte gezeigt werden, dass einzig durch einen 1800 bp langen H1-Genombereich, der im NS-kodierenden Bereich liegt, die Replikation des Ratten-H1-Virus in den murinen A9 Zellen unterbleibt und nicht etwa durch Determinanten im H1-Kapsid. Dies ist der erste Fall, in dem gezeigt wurde, dass der Wirtszelltropismus von Parvoviren nur durch eine nicht für das Kapsid kodierende Sequenz im viralen Genom bestimmt wird. Dabei liegt der Zeitpunkt der Restriktion nach dem Eintritt des Virus, aber noch vor Beginn der Transkription. Ursache für die gestörte Transkription ist dabei wahrscheinlich eine unvollständige Konversion der einzelsträngigen Virus-DNA in die doppelsträngige monomere replikative Form. Der Grund der gestörten Konversions-Reaktion kann eine Interaktion einzelner Kapsid-Proteine mit dem oben genannten H1-Genomabschnitt sein oder aber die fehlende Assoziation zellulärer Faktoren in eben

diesem H1-Genomabschnitt, die für die Konversion nötig sind. Denkbar ist auch die Interaktion eines zellulären Faktors mit dem H1-Genom, die dann die Konversion behindert.

In allen untersuchten murinen Zelllinien ist bis auf eine Ausnahme das MVMp-Genom, nicht aber das MVMp-Kapsid für den Tropismus ausschlaggebend. In den untersuchten humanen Zelllinien ist der Tropismus immer über das Kapsid determiniert.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Effekt einer Infektion mit dem Parvovirus H1 in U937 Zellen auf genregulatorischer Ebene mittels cDNA-Arrays untersucht. Für diese Zellen wurde schon gezeigt, dass eine H1-Infektion durch Aktivierung der Kaspase 3 zum apoptotischen Absterben der Zellen führt. Ebenso ist nach Infektion das sonst überexprimierte c-myc-Gen herabreguliert. Bereits publizierte Daten lassen die Vermutung zu, dass das H1-Virus den TNF $\alpha$ -Rezeptor entweder direkt stimuliert oder aber nachfolgende Schritte im TNF $\alpha$ -Signalweg. In dieser Arbeit wird unter Verwendung von cDNA-Arrays gezeigt, dass neben Kaspase 3, auch die Kaspasen 2, 4 und 8 nach Infektion hochreguliert werden. Ebenso werden mehrere mit TNF-Rezeptoren assoziierte Gene nach Infektion hochreguliert, sowie das in die Regulation der transkriptionellen Aktivität von c-myc involvierte mad4-Gen. Das Mad4-Protein bindet den Hauptinteraktionspartner des c-Myc-Proteines, nämlich das Max-Protein. Desweiteren werden zwei Gene nach Infektion hochreguliert, die in die Östrogensynthese involviert sind. Für Östrogene ist schon gezeigt worden, dass sie einen gewissen protektiven Effekt auf U937 Zellen gegen TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose haben. Die Hochregulation dieser Gene kann einen Abwehrmechanismus der U937 Zelle auf die Virusinfektion darstellen. Eine Untereinheit des 26s-Proteosoms sowie mehrere möglicherweise in Differenzierungsvorgänge oder apoptotische Vorgänge involvierte Gene sind ebenfalls durch eine Infektion hochreguliert. Es wurden nur wenige herabregulierte Gene gefunden, hierzu gehören die für die cAMP-Bildung verantwortliche Adenylatzyklase und der cAMP-abhängige aktivierende Transkriptionsfaktor 1. Die Ergebnisse der cDNA-Arrays stehen im Einklang mit publizierten Daten. Daneben geben sie interessante Hinweise auf weitere mögliche Effekte, zu denen eine H1-Virusinfektion in U937 Zellen führen kann. Diese Ergebnisse müssen in nachfolgenden Arbeiten bestätigt und näher analysiert werden.

## 7 Summary

### **Autonomous parvoviruses**

#### **Development of a second generation of vectors for cancer gene therapy and investigation of the effect of an infection on the cellular gene expression**

Oncosuppressive properties and a low pathogenicity in adult animals make the two rodent parvoviruses MVMp and H1 promising vectors for cancer gene therapy. Recombinant vectors were developed from genomes of these viruses in which a part of the capsid-protein-coding sequence was replaced by a transgene. These recombinant viruses can replicate their genome and express their transgene, but they are unable to produce progeny viruses. Such vectors are produced by cotransfection of the recombinant virus genome and a helper plasmid which provides the capsid proteins. During this procedure, RCVs (*Replication Competent Viruses*) can be generated, probably by homologous recombination. As a consequence, RCVs can express their capsid proteins and produce progeny viruses. In the present work, second-generation H1- and MVMp- based recombinant virus genomes were developed in order to minimise RCV levels in the recombinant virus preparations. By constructing chimeras and pseudotypes between MVMp and H1 viruses, virus preparations with high titres were obtained which did not show any detectable RCVs in plaque-assays. This corresponds to a 100-17000fold decrease of RCVs for the chimeras and pseudotypes.

In this work we also characterised the host-cell-tropism of the chimeras and the pseudotypes. The chimeric vectors and Pseudotypes allowed us to show that the restriction for viral replication of the rat H1 genome in murine A9 cells is not due to the H1 capsids, but can be ascribed to a 1800 bp long DNA region of the H1 genome, located in the NS coding sequence. To our knowledge this is the first report that convincingly shows that the tropism of a rodent parvovirus is determined by the viral genome. Since a recombinant MVMp genome packaged with either H1 or MVMp capsids led to viral DNA replication in A9 cells, virus entry is not responsible for the lack of recombinant H1 vector replication in these cells. After transfection of A9 cells with H1 viral DNA, replication and viral protein expression took place, whereas after H1 infection it did not. Thus we can conclude that the cause for the restricted H1 virus replication has to be found after virus entry but before the beginning of viral gene transcription. It is usually accepted that viral gene transcription needs the conversion of single-stranded

DNA into double-stranded monomeric replicative form. Most probably this conversion reaction is disordered in A9 cells for the H1 genome. A defective double-stranded conversion might be due to an interaction of VP proteins with the viral single stranded DNA sequence. Another possibility is an interaction of a cellular protein with the viral single stranded DNA which then leads to an inhibition of the viral DNA conversion. It might be also possible that a cellular factor which is needed for the conversion reaction can not bind to the H1 genome in A9 cells.

Interestingly, in most of the tested murine cell lines the tropism was determined by the MVMP genome, while for all human cell lines the tropism was determined by the virus capsid.

The second part of this work focused on the effect that H1 virus infection on cellular gene expression. For this purpose, the cDNA array technique was used. It was previously shown that parvovirus H1 infection leads to the activation of caspase 3 and apoptotic cell death of the human monocytic U937 cell, in a way similar to the apoptotic cell death induced by TNF $\alpha$ . Moreover, the c-myc gene, overexpressed in these cells, is down-regulated during H1 infection. In agreement with these data, we were able to show -by comparing the gene expression profiles between buffer treated and H1 infected synchronised U937 cells- genes coding for caspases 2, 4 and 8 were up-regulated after H1 infection. In addition, different genes associated with the TNF $\alpha$  complex were found to be up-regulated, as well as the mad4 gene, which is able to inhibit the transcriptional activity of c-myc by binding its main partner max. Moreover, 2 genes involved in oestrogen-synthesis were found to be up-regulated after infection. Oestrogen was shown to have some protective effect against TNF $\alpha$  induced apoptosis in U937 cells. Induction of these genes might reflect a defence mechanism of the cell. Also, a gene encoding for a subunit of the 26s proteasome and different genes involved in differentiation processes or in apoptosis were up-regulated in infected cells. Few genes were shown to be down-regulated after infection, such as the adenylate cyclase and cAMP dependent transcription factor 1. Altogether, our data give a better understanding of the molecular pathways which are used by the parvovirus and enlighten the diversity of cellular responses to a H1 virus infection in U937 cells.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus	HEPES	N-2-Hydroxyethylpipeazin-N`-2-ethansulfonsäure
Abb.	Abbildung		
Ak	Antikörper	HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
Ag	Antigen		
ATP	Adenosintriphosphat	IP	Immunpräzipitation
bp	Basenpaar	<i>ITR</i>	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	kb	Kilobase
bzw	beziehungsweise	kDa	Kilodalton
°C	Grad Celsius	l	Liter
ca.	circa	Kap.	Kapitel
cDNA	complementary DNA	KLS	Kern-Lokalisations-Sequenz
Ci	Curie	λ	Lambda (Wellenlänge)
cm	Zentimeter	LB	<i>Liquid Broth</i> -Medium
CMV	Cytomegalie-Virus	Lsg.	Lösung
cpm	Zerfälle pro Minute <i>counts per minute</i>	M	molar
d	Tag	mA	Milliampere
Da	Dalton	MEM	<i>Eagles Minima Essential</i> Medium
dATP	Desoxyribodenosintriphosphat	min	Minute
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat	ml	Mililiter
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum	μg	Mikrogramm
d.h.	das heißt	MKS	Multiple Klonierungsstelle
DMEM	<i>Dubeko-modifiziertes Eagle</i> Medium	mM	millimolar
DMSO	Dimethylsulfoxid	MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure	mRF	monomere repliative Form
DNase	Desoxyribonuklease	mRNA	<i>messenger RNA</i> ,
dNTP	Desoxyribonucleosid-5`-Triphosphat	MVM	<i>minute virus of mice</i>
dRF	Dimere replikative Form	n.d.	nicht detektierbar
ECL	enhanced chemiluminescence	ng	Nanogramm
E. coli	Escherichia coli	nm	nanometer
EDTA	Ethylen-bis(oxyethylenitrilo) tetraessigsäure	nM	nanomolar
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	NS1/2	Nichtstrukturprotein 1/2
EtBr	Ethidiumbromid	nt	Nukleotid(e)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>	OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
FKS	fetales Kälberserum	ORF	<i>Open Reading Frame</i>
FSC	<i>forwardscatter</i> , Vorwärtsstreulicht	ori	Offenes Leseraster <i>origin of replication</i>
g	Gramm	p...	Plasmid
GFP	green fluorescent protein	p.a.	<i>pro analysi</i> zur Analyse
h	Stunde	p.r.	<i>post release</i>
H1	H1 Virus	PAA	Polyacrylamid
hH1	Hybrid H1 Virus	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PBS	Phosphatgepufferte Salzlg.



pfu	plaque forming units Plaques bildende Einheiten	TAE-Puffer	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
Poly A	Polyadenylierungsstelle	TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
RCV	<i>Replication Competent Virus</i>	TEMED	N,N,N',N-Tetramethylethyldiamin
RNA	Ribonukleinsäure	TNF	Tumor Nekrose Faktor
RNase	Ribonuklease	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
rpm	Umdrehungen pro Minute	U	<i>unit</i> , Einheit
RSV	Rous-Sarkoma-Virus	UV	Ultraviolett
RT	Raumtemperatur	ü.N.	über Nacht
RT-PCR	reversed transcriptased <i>Polimerase Chain Reaction</i>	V	Volt
RU	Replikative Einheit	v.a.	vor allem
s	Sekunde	Vol.	Volumen
s	siehe	VP1/2	Virales Strukturprotein 1/2
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i>	VTE	Virus-TE
ss	<i>single-stranded</i> , einzelsträngig	v/v	Volumen/Volumen
SSC	<i>Sidescatter</i> , Seitwärtsstreulicht	wt	Wildtyp
SSC	<i>sodium chlorid/sodium citrat</i>	w/v	Gewicht/Volumen
SV40	<i>simian virus 40</i>	x	-fach, mal
Tab.	Tabelle	z.B.	zum Beispiel
		zpE	zytopathischer Effekt
		Δ	Deletion

## 9 Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D.** 1994. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publisher.
- Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S., and Caillet-Fauquet, P.** 1997. The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol.* **71**:4671-8.
- Astell, C.R., Smith, M., Chow, M.B., Ward, D.C.** 1979. Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication. *Cell.* **17**:691-703
- Astell, C.R., Thomson, M., Merchlinsky, M., Ward, D.C.** 1983. The complete DNA sequence of minute virus of mice, and autonomous parvovirus. *Nucleic Acid Res.* **11**:999-1018
- Astell, C.R., Chow, M.B., Ward, D.C.** 1985. Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J. Virol.* **54**:171-177
- Astell, C.R., Liu, Q., Harris, C.E., Brunstein, J., Jindal, H.K., and Tam, P.** 1996. Minute virus of mice cis-acting sequences required for genome replication and the role of the trans-acting viral protein, NS-1. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **55**:245-85
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hannon, W.H.** 1965. Adenovirus-associated defective parvovirus particles. *Science.* **149**:754-756
- Bakkouri, K.E., Clement, N., Velu, T., and Brandenburger, A.** 2000. Amplification of MVM(p) vectors through serial infection of a new packaging cell line. *Tumor Targeting.* **4**:210-217
- Baldauf, A.Q., Willwand, K., Mumtsidu, E., Nuesch, J.P., and Rommelaere, J.** 1997. Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative-form DNA. *J Virol.* **71**:971-80.
- Ball-Goodrich, L.J., and Tattersall, P.** 1992. Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J. Virol.* **66**:3415-3423
- Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K.** 2000. Cyclin A activates the DNA polymerase delta-dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:5522-7.
- Bass, L.R. and Hetrick, F.M.** 1978. Human lymphoblastoid cells as hosts for parvoviruses H-1 and rat virus. *J Virol.* **25**:486-90.
- Bates, R.C., Snyder, C.E., Banerjee, P.T., and Mitra, S.** 1984. Autonomous parvovirus Lulll encapsidates equal amounts of plus and minus DNA strands. *J Virol.* **49**:319-24.
- Berns, K.I.** 1996. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher.
- Berns, K.I., Pinkerton, T.C., Thomas, G.F., and Hoggan, M.D.** 1975. Detection of adeno-associated virus (AAV) specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology.* **68**:556-560
- Besselsen, D.G., Pintel, D.J., Purdy, G.A., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L., Hook, R.R., Jr., and Riley, L.K.** 1996. Molecular characterization of newly recognized rodent parvoviruses. *J Gen Virol.* **77**:899-911.
- Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., Rommelaere, J., and Salome, N.** 1999. Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J Virol.* **73**:7769-79.

- Boone, C., Sasaki, M., and McKee, W.** 1965. Characterization of an in vitro strain of Ehrlich-Lette ascites carcinoma subjected to many periodic mouse passages. *J Natl Cancer Inst.* **34**:725-40.
- Brandenburger, A., Coessens, E., El Bakkouri, K., and Velu, T.** 1999. Influence of sequence and size of DNA on packaging efficiency of parvovirus MVM-based vectors. *Hum.Gene Ther.* **10**:1229-1238
- Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B., and Rommelaere, J.** 1990. NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology.* **174**:576-84.
- Brandenburger, A. and Russell, S.** 1996. A novel packaging system for the generation of helper-free oncolytic MVM vector stocks. *Gene Ther.* **3**:927-931
- Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D.J., Rommelaere, J., and Salome, N.** 1996. Non-structural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J. Virol.* **70**:7527-7534
- Brody, S.L. and Crystal, R.G.** 1994. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci.* **716**:90-101; discussion 101-3.
- Brown, K.E., Anderson, S.M., and Young, N.S.** 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* **262**:114-7.
- Brownstein, D.G., Smith, A.L., Johnson, E.A., Pintel, D.J., Naeger, L.K., and Tattersall, P.** 1992. The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol.* **66**:3118-24
- Brunstein, J. and Astell, C.R.** 1997. Analysis of the internal replication sequence indicates that there are three elements required for efficient replication of minute virus of mice minigenomes. *J Virol.* **71**:9087-95.
- Bukrinsky, M.I., Sharova, N., McDonald, T.L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W.G., and Stevenson, M.** 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:6125-9.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P., and Rommelaere, J.** 1990. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *Embo J.* **9**:2989-95.
- Canman CE, Kastan MB.** 1995. Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes. *Semin Cancer Biol.* **6**:17-25.
- Cater, J.E. and Pintel, D.J.** 1992. The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol.* **73**:1839-43.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L., and Fischer, A.** 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* **288**:669-72.
- Chang, S.F., Sgro, J.Y., and Parrish, C.R.** 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol.* **66**:6858-67.
- Chen, Y.Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B.L., Cornelis, J.J., and Rommelaere, J.** 1986. Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res.* **46**:3574-9.
- Chen, Y.Q., Tuynder, M.C., Cornelis, J.J., Boukamp, P., Fusenig, N.E., and Rommelaere, J.** 1989. Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic. *Carcinogenesis.* **10**:163-7.
- Christensen, J., Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** 1997. Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *J Virol.* **71**:5733-41

- Christensen, J., Pedersen, M., Aasted, B., and Alexandersen, S.** 1995. Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus. *J Virol.* **69**:1802-9.
- Clement, N., Avalosse, B., El Bakkouri, K., Velu, T., and Brandenburger, A.** 2001. Cloning and sequencing of defective particles derived from the autonomous parvovirus minute virus of mice for the construction of vectors with minimal cis-acting sequences. *J Virol.* **75**:1284-93.
- Colomar, M.C., Hirt, B., and Beard, P.** 1998. Two segments in the genome of the immunosuppressive minute virus of mice determine the host-cell specificity, control viral DNA replication and affect viral RNA metabolism. *J Gen Virol.* **79**:581-6.
- Corbau, R., Nuesch, J.P.F., Salome, N., and Rommelaere, J.** 1999. Phosphorylation of the viral non-structural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology.*
- Cornelis, J.J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B.L., Namba, M., and Rommelaere J.** 1988a. Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvovirus H-1 and minute virus of mice. *J. Virol.* **62**:1679-1686
- Cornelis, J.J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S.F., Tal, J., Rommelaere, J.** 1988b. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**:3438-3444
- Cornelis, J.J., Chen, Y.Q., Spruyt, N., Duponchel, N., Cotmore, S.F., Tattersall, P., Rommelaere, J.** 1990. Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* **64**:2537-2544
- Cotmore, S.F., Sturzenbecker, L.J., Tattersall, P.** 1983. The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology.* **129**:333-343
- Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** 1986. The NS1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res.* **4**:243-250
- Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**:91-174
- Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** 1989. A genome-linked copy of the NS1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* **63**:3902-3911
- Cotmore, S.F., D'Abramo, A.M., Carbonell, L.F., Bratton, J., and Tattersall, P.** 1997. The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology.* **231**:267-289
- Cotmore, S.F., Christensen, J., Nuesch, J.P., and Tattersall, P.** 1995. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]<sub>2-3</sub>. *J Virol.* **69**:1652-60.
- Cotmore, S.F. and Tattersall, P.** 1986. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol.* **58**:724-32.
- Cotmore, S.F. and Tattersall, P.** 1990. Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology.* **177**:477-87.
- Cotmore, S.F. and Tattersall, P.** 1992. In vivo resolution of circular plasmids containing concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA and their subsequent replication as linear molecules. *J Virol.* **66**:420-31.
- Cotmore, S.F. and Tattersall, P.** 1994. An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *Embo J.* **13**:4145-52.

- Cotmore, S.F. and Tattersall, P.** 1998. High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J Virol.* **72**:8477-84.
- Curiel, D.T., Gerritsen, W.R., and Krul, M.R.** 2000. Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **7**:1197-9.
- Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J., and Jauniaux, J.C.** 1998. Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J Virol.* **72**:4149-56.
- Deleu, L., Fuks, F., Spitkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S., and Rommelaere, J.** 1998. Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells. *Mol Cell Biol.* **18**:409-19.
- Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., and Rommelaere, J.** 1999. Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol.* **73**:3877-85.
- Dinsart, C., Cornelis, J.J., and Rommelaere, J.** 1996. Recombinant autonomous parvoviruses: New tools for the gene therapy of cancer. *Chimica Oggi/Chemistry Today.* **9**:32-8
- Donahue, R.E., Kessler, S.W., Bodine, D., and al., e.** 1992. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp Med.* **179**:1125-1135
- Douar, A.M., Poulard, K., Stockholm, D., and Danos, O.** 2001. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol.* **75**:1824-33.
- Dupont, F., Tenenbaum, L., Guo, L.-P., Spegelaere, P., Zeicher, M., Rommelaere, J.** 1994. Use of an autonomous parvovirus vector for selective transfer of a foreign gene into transformed human cells of different tissue origins and its expression therein. *J. Virol.* **68**:1397-1406
- Dupont, F., Karim, A., Dumon, J.C., Mine, N., and Avalosse, B.** 2001. A novel MVMP-based vector system specifically designed to reduce the risk of replication-competent virus generation by homologous recombination. *Gene Ther.* **8**:921-9.
- Dupressoir, T., Vanacker, J.M., Cornelis, J.J., Duponchel, N., and Rommelaere, J.** 1989. Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **49**:3203-3208
- Faisst, S., Schlehofer, J.R., and zur Hausen, H.** 1989. Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation. *J Virol.* **63**:2152-8.
- Faust, E.A. and Ward, D.C.** 1979. Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication. *J Virol.* **32**:276-92.
- Gardiner, E.M. and Tattersall, P.** 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol.* **62**:2605-13.
- Guetta, E., Graziani, Y., and Tal, J.** 1986. Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J.Natl.Cancer Inst.* **76**:1177-1180
- Guetta, E., Minberg, M., Mousset, S., Bertinchamps, C., Rommelaere, J., and Tal, J.** 1990. Selective killing of transformed rat cells by minute virus of mice does not require infectious virus production. *J Virol.* **64**:458-62.
- Haag, A.** 2000c. Tumorthherapie mit natürlichen und rekombinanten autonomen Parvoviren im autologen Mastomys- und heterologen Nacktmaus-Modell: Dissertation.

- Haag, A., Menten, P., Van Damme, J., Dinsart, C., Rommelaere, J., and Cornelis, J.J.** 2000a. Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther.* **11**:597-609
- Haag, A., Wayss, K., Rommelaere, J., and Cornelis, J.J.** 2000b. Experimentally induced infection with autonomous parvoviruses, minute virus of mice and H-1, in the African multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Comp Med.* **50**:613-21.
- Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A.** 2001. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol.* **75**:4080-90.
- Hardt, N., Dinsart, C., Spadari, S., Pedrali-Noy, G. and Rommelaere, J.** 1983. Interrelation between viral and cellular DNA synthesis in mouse cells infected with the parvocirus minute virus of mice. *J. Gen. Virol.* **64**:1991-1998.
- Harris, C.E., Boden, R.A., and Astell, C.R.** 1999. A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J Virol.* **73**:72-80.
- Haubrich, R., McCutchan, J.A., Holdredge, R., Heiner, L., Merritt, J., and Merchant, B.** 1995. An open label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1IIIIBenv/rev retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum Gene Ther.* **6**:941-55.
- Hauses, M. and Schackert, H.K.** 2000. [Gene therapy of malignant tumors]. *Zentralbl Chir.* **125**:41-6.
- He, Y.D. and Friend, S.H.** 2001. Microarrays-the 21st century dividing rod? *Nature medicine.* **7**:673-679
- Hirt, B.** 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**:365-9
- Hodgson, C.P.** 1995. The vector void in gene therapy. *Bio Technology.* 222-225
- Hurta, R.A., Lee, j., and Voskas, D.** 2001. Transformation by H-ras can result in aberrant regulation of ornithine decarboxylase gene expression by transforming growth factor-beta(1). *J. Cell Biochem.* **81**:39-55
- Jacoby, R.O., Ball Goodrich, L.J., Besselsen, D.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., and Smith, A.L.** 1996. Rodent parvovirus infections. *Lab.Anim.Sci.* **46**:370-380
- Jacoby, R.O., Johnson, E.A., Ball Goodrich, L., Smith, A.L., and McKisic, M.D.** 1995. Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization. *J.Virol.* **69**:3915-3919
- Jongeneel, C.V., Sahli, R., McMaster, G.K., Hirt, B.** 1986. A precise map of the splice junctions in the RNAs of the minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J. Virol.* **59**:564-573
- Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., Bacon, K.B., and Zlotnik, A.** 1995. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* **155**:203-209
- Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., van Damme, J., Cotmore, S.F., D'Abramo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C., and Cornelis, J.J.** 1999. Cis-requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Human Gene Therapy.* **10**:1619-1632
- Kilham, L., Olivier, L.J.** 1959. A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology.* **7**:428-437
- Kimsey, P.B., Engers, H.D., Hirt, B., and Jongeneel, C.V.** 1986. Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice. *J.Virol.* **59**:8-13
- King, J.A., Dubielzig, R., Grimm, D., and Kleinschmidt, J.A.** 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J.* **20**:3282-91.

- Kirn, D., Martuza, R.L., and Zwiebel, J.** 2001. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med.* **7**:781-7.
- Kirn, D.H. and McCormick, F.** 1996. Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today.* **2**:519-27.
- Kirschstein, K.O. Smith, and Peters, E.A.** 1968. Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 670-3
- Kollek, R., Tseng, B.Y., and Goulian, M.** 1982. DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro. *J Virol.* **41**:982-9.
- Kordes, E., Savelyeva, L., Schwab, M., Rommelaere, J., Jauniaux, J.C., and Cziepluch, C.** 1998. Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics.* **52**:90-4.
- Kotin, R.M.** 1994. Prospects of the use of adeno-associated virus as vector for the human gene therapy. *Hum-Gene-Ther.* **5**:793-801
- Krady, J.K. and Ward, D.C.** 1995. Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol Cell Biol.* **15**:524-33.
- Kripke, M.L.** 1979. Speculations on the role of ultraviolet radiation in the development of malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst.* **63**:541-8.
- Labieniec-Pintel, L., Pintel, D.J.** 1986. The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J. Virol.* **57**:1163-1167
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Le Gal La Salle, G., J. J. Robert, S. Berrard, V. Ridoux, L. D. Stratford Perricaudet, M. Perricaudet, and Mallet, J.** 1993. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science.* 988-90
- Legendre, D. and Rommelaere, J.** 1992. Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J Virol.* **66**:5705-13.
- Legendre, D. and Rommelaere, J.** 1994. Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol.* **68**:7974-85.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M.** 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J.* **11**:3053-8.
- Li, X., Rhode, S.L.,** 1991. Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro. *Virology.* **184**:117-130
- Linsler, P., Bruning, H., Armentrout, R.W.** 1977. Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J. Virol.* **24**:211-221
- Lopez-Guerrero, J.A., Rayet, B., Tuyinder, M., Rommelaere, J., and Dinsart, C.** 1997. Constitutive activation of U937 promonocytic cell clones selected for their resistance to parvovirus H-1 infection. *Blood.* **89**:1642-1653
- Lum, G.S. and Schreier, A.W.** 1963. Study of a virus isolated from chloroleukemic Wistar rat. *Cancer research.* **23**:1742-1747
- Martuza, R.L.** 2000. Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation.* **105**:105-109

- Maxwell, I.H., Spitzer, A.L., Maxwell, F., Pintel, D.J.** 1995. The capsid determinant of fibrotropism for the MVMp strain of minute virus of mice functions via VP2 and VP1. *J. Virol.* **69**:5829-5832
- Maxwell, I.H., Long, C.J., Carlson, J.O., Rhode, S.L., 3rd, and Maxwell, F.** 1993. Encapsidation of a recombinant Lullll parvovirus genome by H1 virus and the fibrotropic or lymphotropic strains of minute virus of mice. *J Gen Virol.* **74**:1175-9.
- Mayr, A., Gedek, B., Kaaden, O.R., and Mahnel, H.** 1984. Parvoviridae, p. 226. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- McPherson, R.A., Rosenthal, L.J., and Rose, J.A.** 1985. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology.* **147**:217-22.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E.** 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J.* **16**:2794-804.
- Miller, A.D.** 1990. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther.* **1**:5-14.
- Minberg, M., Miller, C., Pintel, D., and Tal, J.** Overexpression of NS2 results in enhanced viral DNA replication and delayed apoptotic cell death following MVM infection. *In: 1st Parvovirus Euroconference, Granada, 1999.*
- Morgan, R.A. and Anderson, W.F.** 1993. Human gene therapy. *Annu Rev Biochem.* **62**:191-217
- Morgan, W.R., Ward, D.C.** 1986. Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs. *J. Virol.* **60**:1170-1174
- Mousset, S., Cornelis, J., Spruyt, N., and Rommelaere, J.** 1986. Transformation of established murine fibroblasts with an activated cellular Harvey-ras oncogene or the polyoma virus middle T gene increases cell permissiveness to parvovirus minute- virus-of-mice. *Biochimie.* **68**:951-955
- Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet-Fauquet, P., and Rommelaere, J.** 1994. The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol.* **68**:6446-53.
- Murphy, F.A. and al., e.** 1995. Virus Taxonomy. New York: Springer Verlag, Wien.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M.** 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* **85**:817-27.
- Muzyczka, N.** 1992. Use of adenoassociated virus as a general transduction vektor for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* **158**:97-129
- Naeger, L.K., Cater, J., and Pintel, D.J.** 1990. The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J Virol.* **64**:6166-75.
- Naeger, L.K., Salome, N., and Pintel, D.J.** 1993. NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol.* **67**:1034-43.
- Nishikawa, M. and Huang, L.** 2001. Nonviral Vectors in the New Millennium: Delivery Barriers in Gene Transfer. *Human Gene Therapy.* **12**:861-870
- Nüesch, J.P., Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** 1992. Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology.* **191**:406-16.



- Nüesch, J.P., Cotmore, S.F., and Tattersall, P.** 1995. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology*. **209**:122-35.
- Nüesch, J.P. and Tattersall, P.** 1993. Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology*. **196**:637-51.
- Oleksiewicz, M.B., and Alexanderson, S.** 1997. Subcellular localization of aleutian mink disease parvovirus proteins and DNA during permissive infection of brandell feline kidney cells. *J. Virol.* **70**:3243-3247
- Op de Beek, A., and Caillet-Fauquet, P.** 1997. The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *J. Virol.* **71**:5323-5329
- Op de Beek, A.A., F., Mousset, S., Rommelaere, J., Caillet-Fauquet, P.** 1995. The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ.* **6**:781-787
- Palmer, G. and Tattersall, P.** 2000. *Autonomous Parvoviruses as Gene Transfer Vehicles*, p. 178-202. Basel: Karger.
- Paradiso, P.R.** 1981. Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J Virol.* **39**:800-7.
- Parker, J.S., Murphy, W.J., Wang, D., O'Brien, S.J., and Parrish, C.R.** 2001. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol.* **75**:3896-902.
- Parker, J.S. and Parrish, C.R.** 1997. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J Virol.* **71**:9214-22.
- Parker, J.S. and Parrish, C.R.** 2000. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol.* **74**:1919-30.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., and Baltimore, D.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:8392-6.
- Perros, M., Deleu, L., Vanacker, J.-M., Kherrouche, Z., Spruyt, N., Faisst, S., Rommelaere, J.** 1995. Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in ras-transformed cells. *J. Virol.* **69**:5506-5515
- Previsani, N., Fontana, S., Hirt, B., and Beard, P.** 1997. Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMp3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell-specific differences in virus uncoating in vitro. *J Virol.* **71**:7769-80.
- Pujol, A., Deleu, L., Nüesch, J.P., Cziepluch, C., Jauniaux, J.C., and Rommelaere, J.** 1997. Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J Virol.* **71**:7393-403.
- Queva, C., Hurlin, P.J., Foley, K.P., and Eisenman, R.N.** 1998. Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene.* **16**:967-77.
- Ray, K., Ogston, P., Beared, P.,** 2001. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature.***412**: 914-917.
- Rayet, B., Lopez-Guerrero, J.A., Rommelaere, J., and Dinsart, C.** 1998. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol.* **72**:8893-903.

- Rhode, S.L.** 1973. Replication of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. *J. Virol.* **11**:856-861
- Rhode, S.L., Paradiso, P.R.** 1983. Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J. Virol.* **45**:173-184
- Richards, R.G., Armentrout, R.W.** 1979. Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J. Virol.* **30**:397-399
- Ridpath, J.F. and Mengeling, W.L.** 1988. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res.* **10**:17-27.
- Rommelaere, J., Cornelis, J.J.** 1991. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J. Virol. Methods.* **33**:233-251
- Roperch, J.P., Lethrone, F., Prieur, S., Piouffre, L., Israeli, D., Tuynder, M., Nemani, M., Pasturaud, P., Gendron, M.C., Dausset, J., Oren, M., Amson, R.B., and Telerman, A.** 1999. SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:8070-3.
- Russell, S.J., Brandenburger, A., Flemming, C.L., Collins, M.K., and Rommelaere, J.** 1992. Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J. Virol.* **66**:2821-2828
- Salomé, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J.** 1990. Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes. *Oncogene.* **5**:123-130
- Santaren, J.F., Ramirez, J.C., and Almendral, J.M.** 1993. Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: Involvement of phosphorylated VP2 subtypes in viral morphogenesis. *J. Virol.* **67**:5126-5138
- Schmidt-Wolf, G. and Schmidt-Wolf, I.G.H.** 1994. Human cancer gene therapy. *Ann. Hematol.* **69**:273-9
- Schoborg, R.V. and Pintel, D.J.** 1991. Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation, RNA processing and protein stability. *Virology.* **181**:22-34.
- Segovia, J.C., Bueren, J.A., and Almendral, J.M.** 1995. Myeloid depression follows infection of susceptible newborn mice with the parvovirus minute virus of mice (strain i). *J. Virol.* **69**:3229-32.
- Segovia, J.C., Gallego, J.M., Bueren, J.A., and Almendral, J.M.** 1999. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **73**:1774-84.
- Sen, S., Erba, E., and D'Incalci, M.** 1990. Synchronisation of cancer cell lines of human origin using methotrexate. *Cytometry.* **11**:595-602
- Sgro, J.Y. and Spencer, S.** Encyclopedia of Virology.
- Siegl, G., Gautschi, M.** 1973. The multiplication of parvovirus Lulll in a synchronized culture system. *Arch. Ges. Virusforsch.* **40**:105-127
- Siegl, G.** Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses. In: K. I. Berns (ed.) The Parvoviruses, pp. 297-362. New York: Plenum Press, 1984.
- Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E., Tattersall, P.** 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology.* **23**:61-73

- Smith, T.A., Mehaffey, M.G., Kayda, D.B., Saunders, J.M., Yei, S., Trapnell, B.C., McClelland, A., and Kaleko, M.** 1993. Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nat Genet.* **5**:397-402.
- Soderlund-Venermo, M., Riley, L.K., and Pintel, D.J.** 2001. Construction and initial characterization of an infectious plasmid clone of a newly identified hamster parvovirus. *J Gen Virol.* **82**:919-27.
- Somia, N. and Verma, I.M.** 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet.* **1**:91-9.
- Southam, C.M.** 1960. Present status of oncolytic virus studies. *NY Acad. Sci.* **22**:656-673
- Spalholz, B.A., Tattersall, P.** 1983. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J. Virol.* **46**:937
- Spegelaere, P., Cornelis, J.J., Tuynder, M., and Rommelaere, J.** 1994. Lack of a detectable effect of capsid proteins on the cell-dependent activity of parvovirus MVMp promoters. *Res. Virol.* **145**:5-12
- Spitzer, A.L., Maxwell, F., Corsini, J., and Maxwell, I.H.** 1996. Species specificity for transduction of cultured cells by a recombinant Lull rodent parvovirus genome encapsidated by canine parvovirus or feline panleukopenia virus. *J Gen Virol.* **77**:1787-92.
- Su, Z.Z., Luo, Z.Y., Guo, L.P., Li, J.Z., and Liu, Y.L.** 1988. Inhibitory effect of parvovirus H-1 on cultured human tumour cells or transformed cells. *Sci Sin [B].* **31**:69-80.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K.** 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* **17**:565-77.
- Takahashi, T., Ozawa, K., Takahashi, K., Asano, S., and Takaku, F.** 1990. Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood.* **75**:603-10.
- Tattersall, P., Cawte, P.J., Shatkin, A.J., Ward, D.C.** 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. *J. Virol.* **20**:273-289
- Tattersall, P., and Ward, D.C.** 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature.* **263**:106-109
- Tattersall, P., Bratton, J.** 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**:944-955
- Tattersall, P. and Cotmore, S.** 1986. The rodent parvoviruses. In: Bhatt, P.H., et al. Viral and mycoplasma infections of laboratory rodents: Effects on biomedical research. New York: Academic Press,.
- Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoir, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J., and Amson, R.** 1993. A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:8702-6.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Larue Charlus, S., Severin, F., Becker, N., and Schlehofer, J.R.** 1994. Detection of adenoassociated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J-Med-Virol.* **44**:215-22
- Toolan, H.W., Buttle, G.A.H., Kay, H.E.M.** 1962. Isolation of the H-1 and H-3 viruses directly from human embryos. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **3**:368
- Toolan, H.W., Rhode, S.L., Gierthy, J.F.** 1982. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors in syrian hamsters by prior infection with H-1 parvovirus. *Cancer Res.* **42**:2552-2555
- Toolan, H.W., Saunders, e.I., southam, c.m., moore, A.e., and levin, a.g.** 1965. H-1 virus viremia in the human. *Proc. Soc. Biol. Med.* 711-715
- Truyen, U. and Parrish, C.R.** 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J Virol.* **66**:5399-408.

- Truyen, U. and Parrish, C.R.** 1995. The evolution and control of parvovirus host ranges. *Seminars in Virology*. **6**:311-317
- Tsurumi, C., Shimizu, Y., Saeki, M., Kato, S., Demartino, G.N., Slaughter, C.A., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Yamasaki, M., Hendil, K.B., Toh-e, A., Tanahashi, N., and Tanaka, K.** 1996. cDNA cloning and functional analysis of the p97 subunit of the 26S proteasome, a polypeptide identical to the type-1 tumor-necrosis-factor- receptor-associated protein-2/55.11. *Eur J Biochem*. **239**:912-21.
- Tullis, G.E., Labieniec-Pintel, L., Clemens, K.E., and Pintel, D.** 1988. Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol*. **62**:2736-44.
- Vanacker, J.M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V., and Rommelaere, J.** 1996. Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element. *J Virol*. **70**:2369-77.
- Vasudevacharya, J. and Compans, R.W.** 1992. The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology*. **187**:515-24.
- Vegeto, E., Pollio, G., Pellicciari, C., and Maggi, A.** 1999. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells under TNF-alpha-induced apoptosis. *FASEB J*. **13**:793-803
- Verma, I.M. and Somia, N.** 1997. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature*. **389**:239-42.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., and Vuento, M.** 1998. Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol*. **72**:802-6.
- Wetzel, K., Menten, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., Grone, H.J., Giese, N., Vecchi, A., Sozzani, S., Cornelis, J.J., Rommelaere, J., and Dinsart, C.** 2001. Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med*. **3**:326-37.
- Wilcox, M.E., Yang, W., Senger, D., Rewcastle, N.B., Morris, D.G., Brasher, P.M., Shi, Z.Q., Johnston, R.N., Nishikawa, S., Lee, P.W., and Forsyth, P.A.** 2001. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst*. **93**:903-12.
- Willwand, K. and Hirt, B.** 1991. The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting. *J Virol*. **65**:4629-35.
- Willwand, K., Mumtsidu, E., Kuntz-Simon, G., and Rommelaere, J.** 1998. Initiation of DNA replication at palindromic telomeres is mediated by a duplex-to-hairpin transition induced by the minute virus of mice nonstructural protein NS1. *J Biol Chem*. **273**:1165-74.
- Wilson, G.M., Jindal, H.K., Yeung, D.E., Chen, W., and Astell, C.R.** 1991. Expression of minute virus of mice major non-structural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology*. **185**:90-98
- Wolter, S., Richards, R., and Armentrout, R.W.** 1980. Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim Biophys Acta*. **607**:420-31.
- Young, R.A.** 2000. Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell*. **102**:9-15.
- Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., and Tijssen, P.** 2001. A viral phospholipase A2 is required for Parvovirus Infectivity. *Development cell*. **1**:291-302
- Zhang, Y., Chirmule, N., Hildinger, M., Croyle, M., Guanf-ping, G., and Wilson, J.M.** 2000. Immunology of AAV as vectors for human gene therapy. *VIIIth Parvovirus workshop Quebec (Canada)*. p64

**Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., and Muzyczka, N.** 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**:973-85.

# DANKSAGUNG

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

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jean Rommelaere für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt Dr. Christiane Dinsart für die Themenstellung, ihre stete Diskussionsbereitschaft bei Fragen jeglicher Art und das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit. Auch Dr. Jan Cornelis möchte ich sehr für die vielen Diskussionen und die konstruktive Kritik danken, sowie für das bereitwillige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Kaaden bedanke ich mich für die externe Betreuung dieser Arbeit und deren Vertretung vor der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, sowie die Unterstützung bei organisatorischen Fragen. Auch Prof. Dr. Truyen danke ich für sein offenes Ohr bei jeglichen organisatorischen Fragen.

Dem gesamten Labor 2.206 möchte ich sehr für die angenehme, immer hilfsbereite und „lachfreudige“ Atmosphäre danken, die ich die ganzen Jahre über genossen habe und die sich auch außerhalb des Labors fortsetzte. Im Besonderen danke ich Alexandra Dege, die mich zu Beginn meiner Arbeit in die Geheimnisse der Zellkultur, der Klonierung und jeglicher „Kits“ einwies; Susanne Lang, die mit mir das Abenteuer der Doktor-Arbeit begann, Tim Kayser, der immer zu einer Diskussion und einem Scherz bereit war, Marta Enderlin für ihr Lebensmotto, Lia Tesfay, mit der ich voller Freude tausende von Zellen ausgesät habe und nicht zuletzt Ginette Balboni.

Der gesamten übrigen Abteilung möchte ich für ihre Offenheit und Diskussionsbereitschaft danken, dadurch durfte ich in den vergangenen Jahren viel dazulernen. Besonders erwähnen will ich: Dr. Jürg Nüesch, Dr. Nathalie Salomé, Dr. Jean-Claude Jauniaux, Dr. Natalia Giese, Dr. Celina Cziepluch, Dr. Tarig Bashir, Zahari Raykov, Xanthippi Apsi, Anabell Grewenig, Dr. Dirk Grimm und nicht zuletzt Sylvie Lachmann, der Dame mit dem Berliner Humor.

Dr. Natalie Salomé danke ich für die Einweisung in die Technik der Immunpräzipitation.

Dr. Christian Merker und seinen Mitarbeitern danke ich für die Hybridisierung der Unigeneset I Filter.

Nicht vergessen möchte ich auch unsere „Mensagruppe“ mit wechselnder Besetzung, die den täglichen Mensagang zu einem erfreulichen Ereignis werden ließ.

Sincere thanks are given to the „Heidelbergian-Multi-Kulti-Mix“ for all the dinners, discussions , night- and day-events! They became real good friends of mine, we spent a very good time together. I could in every situation count on them. Special thanks to Gian Marco for his patience with the „competitors“ and the nice breaks during writing time. Also thanks to Sandra and Marco for sharing the pleasure of writing in the mildly hot “archive-room“ and all the good laughs we had. Den treuen Münchnern, Kissingern und Augsburgern, die mich durch diese Zeit begleitet haben und das Entstehen dieser Arbeit hautnah miterleben durften und manchmal auch mussten, sei gesagt, dass ich mich darüber sehr gefreut habe.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich die ganze Zeit über unterstützt haben und voll Interesse meinen beruflichen und privaten Weg begleitet haben. Vielen, vielen Dank!