Aus dem Genzentrum der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. P. Cramer

Serotypen des Adeno-assoziierten Virus und ihre potentielle Anwendung in der Gentherapie von Tumoren

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

Lisa Wingenfeld

aus

München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Hallek
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. Haas
	Priv. Doz. Dr. H. Adler
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	Dr. H. Büning
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	19.04.2007

Inhaltverzeichnis

INHALTVERZEICHNIS 1

1. EINLEITUNG 3

1.1 ADENO-ASSOZIIERTE VIREN 3
1.1.1 ALLGEMEIN 3
1.1.2 GENOMORGANISATION 4
1.1.3 INFEKTIONSBIOLOGIE 5
1.1.4 SEROTYPEN 7
1.2 GENTHERAPIE 9
1.2.1 ALLGEMEIN 9
1.2.2 ADENO-ASSOZIIERTE VIREN IN DER GENTHERAPIE 10
1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 11

2. MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 MATERIAL 12
2.1.1 ZELLLINIEN 12
2.1.2 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL 14
2.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN 15
2.1.4 GERÄTE 15
2.1.5 BAKTERIENSTÄMME 16
2.1.6 PLASMIDE 16
2.2 METHODEN 17
2.2.1 KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN (BAKTERIEN) 17
2.2.1.1 Plattenkultur 17
2.2.1.2 Flüssigkultur 17
2.2.2 PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN 17
2.2.2.1 Endotoxinfreie Isolation über Anionenaustauschersäulen 17
2.2.2.2 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen 18
2.2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel 18
2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA 19
2.2.3 KULTIVIERUNG UND EINFRIEREN VON ZELLEN UND ZELLZAHLBESTIMMUNG 19
2.2.4 ADENOVIRUSFREIE HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON AAV-VEKTOREN ÜBER EINEN IODIXANOLGRADIENTEN 20
2.2.4.1 Transfektion 20
2.2.4.2 Aufschluss der HEK293 Zellen und Aufreinigung von AAV 20
2.2.5 CHARAKTERISIERUNG DER AAV-PRÄPARATIONEN 21

2.2.5.1 Bestimmung des genomischen Titers durch Dot-Blot 21
2.2.5.1.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden 22
2.2.5.1.2 Proteinase K-Verdau und Präparation durch Anionenaustauschersäulen . 22
2.2.5.1.3 Dot-Blot 22
2.2.5.1.4 Hybridisierung mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden 23
2.2.5.1.5 Detektion durch Chemilumineszenz 23
2.2.6 TRANSDUKTION DER ZELLEN MIT AAV-VEKTOREN 25
2.2.7 DETEKTION DER TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ DURCH DURCHFLUSSZYTOMETRIE 25

3. ERGEBNISSE 26

3.1 HERSTELLUNG DER ADENO-ASSOZIIERTEN VIRUSVEKTOREN 26
3.2. BESTIMMUNG DER TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ DER SEROTYPEN AUF INDIKATORZELLLINIEN 34
3.3. TRANSDUKTION HUMANER TUMORZELLLINIEN 37
3.4. TRANSDUKTION VERSCHIEDENER KOLONKARZINOM-ZELLLINIEN 41
3.5. TRANSDUKTION WEITERER MURINER ZELLLINIEN 45

4. DISKUSSION 47

4.1 BEDEUTUNG DER AAV-SEROTYPEN 47
4.2 KRITERIEN IM VERGLEICHSEXPERIMENT 48
4.3 TRANSDUKTION HUMANER MALIGNER ZELLLINIEN DURCH AAV-SEROTYPEN 1-5 50
4.4 SPEZIESABHÄNGIGES VERHALTEN VON AAV-1 UND AAV-2 52
4.5 AUSBLICK: POTENTIELLE THERAPEUTISCHE ANWENDUNG 52

5. ZUSAMMENFASSUNG 54

6. LITERATURVERZEICHNIS 55

1. Einleitung

1.1 Adeno-assoziierte Viren

1.1.1 Allgemein

Das Adeno-assoziierte Virus (AAV) gehört zur Gattung der Dependoviren, welche zusammen mit den Gattungen der autonomen Parvoviren und den Densoviren in der Familie der Parvoviridae zusammengefasst sind. Diese umfasst Viren mit einem linearen, einzelsträngigen DNA Genom von etwa 5 kb Größe und einem unbehüllten, ikosaedrischen Kapsid von 18 bis 30 nm Durchmesser (67). Es handelt sich damit um die Gruppe der kleinsten bekannten eukaryontischen DNA-Viren.

Das AAV vom Serotyp 2 (AAV2) wurde als Kontamination von Adenovirus-Präparationen entdeckt. Später wurde es als eigene Virusgattung identifiziert. Für die Replikation und Einleitung eines produktiven Infektionszyklus ist AAV2 auf die Koinfektion der Wirtszelle durch Helferviren angewiesen (10, 54). Als Helferviren bekannt sind Adenoviren, Herpes Simplex Viren, das humane Zytomegalievirus, Humanes Herpes Virus Typ 6 und Papillomaviren. Die Funktion der Helferviren kann zumindest teilweise durch chemische oder physikalische Karzinogene ersetzt werden (35, 78-80). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass Helferviren spezifische Veränderungen in der Wirtszelle induzieren, welche für die AAV2-Vermehrung notwendige Hilfsfunktionen verfügbar machen. In Abwesenheit von Helferviren kann AAV2 eine latente Form der Infektion etablieren, indem die Virus-DNA stabil in das Wirtszellgenom integriert. Diese Integration erfolgt in etwa 70% der Fälle ortsspezifisch in das humane Chromosom 19 und dort in 19q-14.4-qter (AAVS1) (45, 46, 63, 73).

1.1.2 Genomorganisation

Das lineare einzelsträngige DNA-Genom von AAV2 besteht aus 4679 Nukleotiden, und kann in drei funktionelle Einheiten unterteilt werden, und zwar in die ITR (invertierte terminale Wiederholung = *inverted terminal repeat*) und die zwei offenen Leserahmen (ORF) REP und CAP. Die Gene innerhalb der zwei ORF werden durch die drei Promotoren p5, p19 und p40 kontrolliert (vgl. Abb. 1.1.2.1). Die 145 bp lange ITR-Sequenz dient als Replikationsstart (10) und hat eine Bedeutung für die Regulation der Genexpression sowie für die Integration und Freisetzung des integrierten AAV2-Genoms beim Übergang vom latenten zum replikativen Lebenszyklus (11, 51). Der 5'-gelegene offene Leserahmen REP kodiert für die Rep-Proteine, eine Familie multifunktioneller regulatorischer Nicht-Struktur-Proteine. Sie sind an der ortsspezifischen Integration, der Replikations- und Transkriptionskontrolle, sowie an der Verpackung der einzelsträngigen DNA in das virale Kapsid beteiligt. Die großen Rep-Proteine (Rep78 und seine Spleißvariante Rep68), werden vom p5-Promotor, die kleinen Rep-Proteine (Rep52 und seine Spleißvariante Rep40) dagegen vom p19-Promotor aus kontrolliert. Der 3'-gelegene offene Leserahmen CAP kodiert für die drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3, welche das AAV2-Kapsid in einem Verhältnis von 1:1:10 bilden (54). Alle drei Kapsidproteine stehen unter der Kontrolle des p40-Promotors und verwenden das gleiche Stop-Kodon. VP2 und VP3 sind N-terminal verkürzte Varianten von VP1. Dabei wird die Synthese von VP1 durch alternatives Spleißen, VP2 durch das Translations-Initiationskodon ACG und VP3 durch das Initiationskodon AUG reguliert. Das vom AUG ausgehende VP3 wird ca. zehnmal stärker translatiert als das vom ACG initiierte VP2 (9). Das Molekulargewicht der Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 beträgt jeweils etwa 90 kDa, 72 kDa und 60 kDa. Alle drei Kapsidproteine sind notwendig für die Generierung von infektiösen Partikeln (69, 72). Die Kapsidassemblierung findet im Zellkern statt (75, 76).

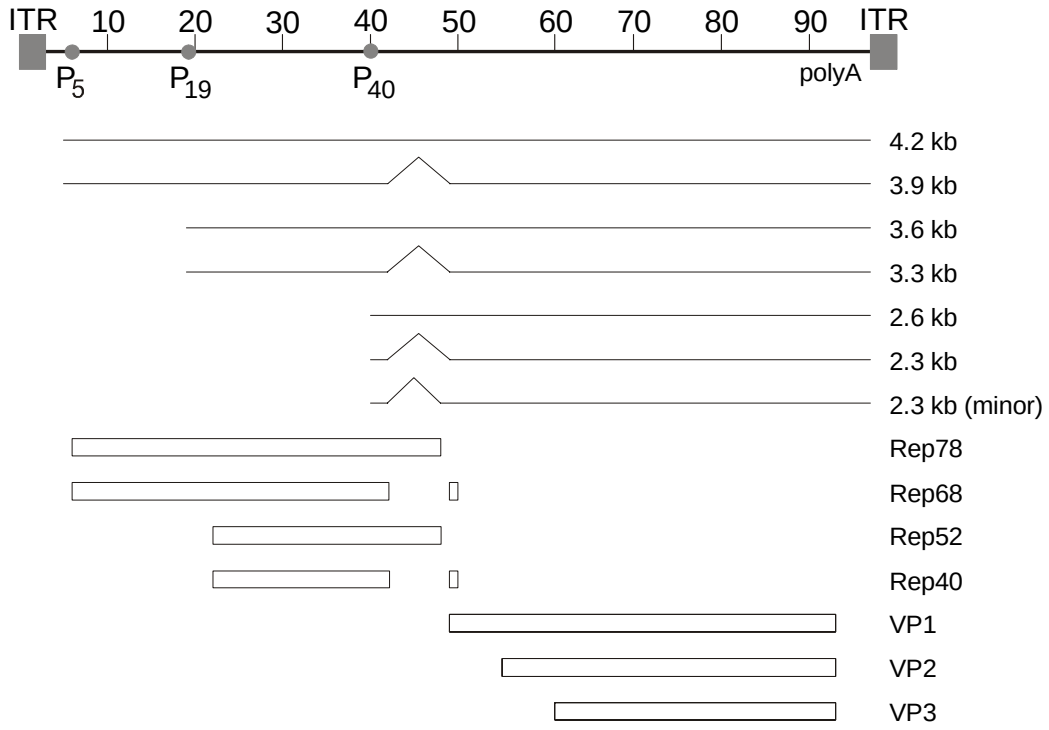


Abb. 1.1.2.1 Genomorganisation von AAV2. Das AAV2-Genom ist ca. 4,7 kb groß und hier schematisch auf einer Skala von 100 Einheiten gezeigt. Flankiert werden die zwei offenen Leserahmen, REP und CAP, auf beiden Seiten von ITRs (invertierte terminale Wiederholungen = *inverted terminal repeats*). An Position 5, 19 und 40 liegen die drei Promotoren, von denen aus die einzelnen mRNAs transkribiert werden. Die mRNAs kodieren für unterschiedliche regulatorische Proteine (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) sowie für die drei Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3).

1.1.3 Infektionsbiologie

Eine Infektion ist ein mehrstufiger Prozess. Er beginnt mit der Bindung des Virus an die Zelloberfläche, gefolgt von der Aufnahme des Virus in die Zelle. Dann beginnt der intrazelluläre Transport für die meisten Virusarten bis in den Zellkern hinein unter zur Hilfenahme von Zytoskelletkomponenten und zellulären Transportproteinen. Im Zellkern wird die virale Erbinformation entweder repliziert oder „gelagert“ (Abb1.1.3.1.).

Mit konventionellen biochemischen und mikroskopischen Methoden konnte bisher gezeigt werden, dass Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) als Primärrezeptor für AAV2 dient (71), indem AAV2 über entsprechende Ladungen mit dem Zuckeranteil des HSPGs interagiert. Neben dem Primärrezeptor scheinen Sekundärrezeptoren für die Aufnahme von AAV2 in die Zelle notwendig zu sein. Als Sekundärrezeptoren wurden z.B. der Fibroblast Growth Factor

Receptor 1 (FGFR1) und das $\alpha_v\beta_5$-Integrin beschrieben (8, 56, 70). Es wird vermutet, dass FGFR1 den Bindungsprozess an die Zelle unterstützt (8, 56), während die Bindung an das $\alpha_v\beta_5$-Integrin die Clathrin-vermittelte Endozytose induziert (64). Dieser endozytotische Prozess selber und die weiteren intrazellulären Prozesse sind noch wenig verstanden. Sangioglu et al. vermuten, dass die Bindung an $\alpha_v\beta_5$-Integrin noch einen weiteren Effekt hat. Sie vermuten, dass durch die Bindung Rac1 aktiviert wird, welches letztendlich über die Stimulation der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K) zur Reorganisierung der Mikrofilamente und Mikrotubuli führt, was nach der Endozytose für die Initiierung der intrazellulären Wanderung des AAV2 zum Zellkern benötigt wird. Für die Befreiung von AAV2 aus den Endosomen wird ein niedriger endosomaler pH-Wert benötigt (8, 18). In Analogie zu anderen Viren wird vermutet, dass ein niedriger pH-Wert eine Konformationsänderung bestimmter viraler Proteine induziert, die für die Freisetzung aus dem Endosom oder für einen erfolgreichen Eintritt in den Zellkern benötigt wird (49). Interessanterweise beinhaltet das VP1 eine potentielle Phospholipase A2 (PLA2)-Domäne, welche wahrscheinlich in diesen Prozess involviert ist. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass eine PLA2-Mutation eine Verzögerung der Genexpression hervorruft und weniger effizient transduziert (26). Wie AAV2 in den Zellkern gelangt und ob für diesen Prozess der Kernporenkomplex benötigt wird, ist unklar. Frau Lux aus unserer Arbeitsgruppe hat durch FISH- Analysen und Antikörperfärbungen gezeigt, dass virale Genome nicht aber intakte Kapside in den Zellkern gelangen, welches besagt, dass die Befreiung des viralen Genom aus dem Kapsid vor oder während des Kerneintritts stattfindet (47). Im Zellkern erfolgt in Anwesenheit eines Helfervirus die Replikation, während ohne Helfervirus der latente Lebenszyklus des AAV2 initiiert wird. Man vermutet, dass die viralen Vektoren, die auf AAV2 beruhen, Zellen analog zum Wildtyp-AAV2 transduzieren, wobei detaillierte Untersuchungen zu diesem Punkt noch fehlen.

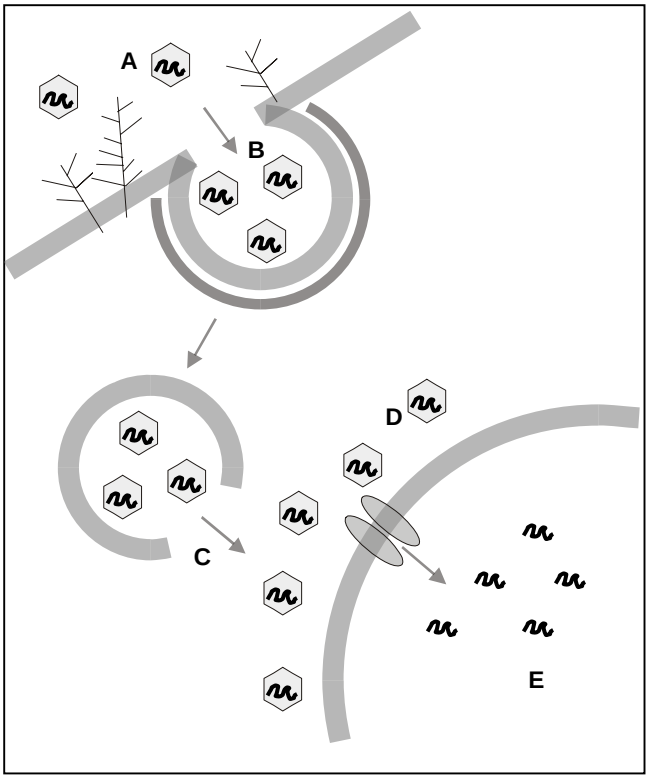


Abb1.1.3.1.

Schematische Darstellung der ersten Schritte der AAV Infektion.

(A) AAV bindet an HSPG, die Bindung wird durch FGFR 1 verstärkt.

(B) Aufnahme über Clathrin-coated pit vermittelte Endozytose in Endosomen ($\alpha_v ß_5$ Integrin beteiligt)

(C) Freisetzung aus Endosomen durch Ansäuerung

(D) Perinukleäre Akkumulation

(E) Transport der viralen Genome in den Zellkern

1.1.4 Serotypen

Basierend auf Studien zur Reaktivität von serotyp-spezifischen Antiköpern und auf Sequenzvergleichen wurden elf AAV-Serotypen (AAV1 - 11) identifiziert. AAV1 - 4 und AAV6 wurden als Kontaminationen aus Adenoviruspräparationen isoliert (3, 6, 38, 62). Aufgrund der hohen Homologie und Verteilung der homologen Bereiche im Genom des AAV6 wird vermutet, dass AAV6 durch Rekombinantion von AAV1 und AAV2 entstanden ist (77). AAV5 wurde aus einem humanen Kondylom gewonnen (7, 25). Seroepidemiologische Studien zeigen, dass AAV2, 3 und 5 beim Menschen endemisch sind, während AAV4 primär nicht-humane Primaten infiziert (55). Das natürliche Reservoir für AAV1 (und das sehr homologe AAV6) ist unklar, da es bisher noch nicht aus Geweben isoliert wurde und „reaktive“ Antikörper sowohl beim Menschen als auch bei Primaten nachgewiesen wurden (13, 15, 60). Vor kurzem wurden AAV7, 8, 10 und 11 in Gewebeproben von Affen, AAV9 in humanen Proben entdeckt (23, 24, 53).

Die neutralisierenden Antikörper gegen AAV2 wurden hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber allen elf Serotypen getestet. AAV1 und AAV3 reagieren partiell auf Antikörper

gegen AAV2, während AAV4-11 nur wenig oder keine Reaktion zeigen (13, 14, 23, 24, 32, 36, 53, 62, 77).

Da AAV2 der erste Serotyp war, von dem ein infektiöser Klon generiert werden konnte, wurde dieser Serotyp hauptsächlich für die Entwicklung von AAV-basierten Vektoren verwendet. Mittlerweile können auch Vektoren basierend auf den übrigen Serotypen hergestellt werden. Beim Vergleich der verschiedenen AAV-Vektoren zeigt sich, dass für die Transduktion bestimmter Gewebe andere Serotypen besser geeignet sind als AAV2.

Bei den folgenden Geweben wurde eine stärkere oder schnellere Transgen-Expression als bei AAV2 nachgewiesen (4, 16, 17, 19, 23, 24, 31, 33, 52, 53, 82).

AAV1	Auge, Leber, Lunge, Muskel
AAV3	Myeloides hämatopoetisches System, Muskel
AAV4	Auge, Muskel, Zentrales Nervensystem
AAV5	Auge, Leber, Lunge, Muskel, Pankreas, Zentrales Nervensystem
AAV6	Auge, Leber, Lunge
AAV7	Leber, Muskel
AAV8	Leber, Muskel
AAV9	nicht beschrieben
AAV10	Muskel
AAV11	Muskel

Der Gewebetropismus der AAV-Vektoren wird hauptsächlich durch die Wechselwirkung zwischen dem jeweiligen serotyp-spezifischen Kapsid und der Zelle bestimmt, da bis zur Genexpression die gesamte Interaktion über das Kapsid erfolgt (siehe Abb1.1.3.1.). Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass Serotpyen, die einen zu AAV2 deutlich veränderten Tropismus aufweisen, eine nur sehr geringe Homologie in der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine aufweisen. Ein Beispiel ist AAV5 mit einer Homologie von nur 56,4 % (58). Die Infektionsbiologie der anderen Serotypen ist deutlich weniger erforscht als von AAV2. AAV1, 3 und 6 binden auch an HSPG, allerdings ist die Affinität zu HSPG niedriger als bei AAV2, sodass es fraglich ist, ob HSPG der Rezeptor dieser drei Serotypen ist (30, 34). Der Primärrezeptor von AAV4 und AAV5 ist Sialsäure. Dabei bindet AAV4 speziell an 2,3 O-

„linked“ Sialsäure und AAV5 an 2,3 N-„linked“ Sialsäure (42). Da AAV7 - 11, erst kürzlich isoliert worden sind, ist über ihre Rezeptoren noch nichts bekannt. Basierend auf den Arbeiten von Xiao et al. (77) und Halbert et al. (32), wurde für AAV gezeigt, dass es möglich ist Hybride aus Kapsiden des einen Serotyp mit dem Genom eines anderen Serotyp zu generieren. Diese Hybride wurden als Pseudoserotypen bezeichnet. Die Technik zur Generierung dieser Pseudoserotypen hat den Vorteil, dass sich die Vektoren nur durch ihre Kapside unterscheiden und der potentielle Einfluss der serotyp-spezifischen ITR-Struktur eliminiert wurde. Auch können weiterhin die bereits bekannten und getesteten Transgenplasmide, die beidseits von ITR-Strukturen des AAV-Serotyp 2 flankiert sind, verwendet werden ohne das aufwendige Umklonierungen nötig werden.

1.2 Gentherapie

1.2.1 Allgemein

Die Wahl des Gentransportsystems, dass als Vektor bezeichnet wird, ist entscheidend für den Erfolg der Gentherapie. Eine einfache reproduzierbare und effiziente Herstellung der Vektoren ist dabei sehr wichtig. Je nach Applikation sind weitere entscheidende Faktoren der Gewebetropismus, die Immunogenität, die Verpackungskapazität, die Dauer der Transgen-Expression und das Integrationspotential.
In der Mehrheit der Gentherapiestudien wurden adenovirale und retrovirale Vektoren eingesetzt. Als besonders problematisch zeigte sich bei den adenoviralen Vektoren das potentielle Risiko einer starken inflammatorischen Reaktion gegen das adenovirale Kapsid (2), während bei den retroviralen Vektoren das Risiko der Insertionsmutagenese besteht (28).

1.2.2 Adeno-assoziierte Viren in der Gentherapie

Eine vielversprechende Alternative zu Adenovirus- und Retrovirus-basierten Vektoren sind die Adeno-assoziierten Viren (AAV). AAV ist nicht humanpathogen und besitzt nur eine geringe Immunogenität. Dies scheint darauf zu beruhen, dass AAV antigenpräsentierende Zellen nicht oder nur sehr schlecht infizieren und somit keine zelluläre Immunreaktion auslösen (41). Außerdem ist die Häufigkeit der Integration des Vektorgenoms in das Genom der Wirtzelle verglichen zu den retroviralen Vektoren in vivo ausgesprochen niedrig. Bei einer intramuskulären Injektion von Mäusen lagen mehr als 99,5% der AAV-Vektor-DNA episomal vor (66). Zudem enthalten AAV-Vektoren keinerlei genomische Informationen für die Produktion viraler Proteine, was ein wichtiger Sicherheitsaspekt ist. Insgesamt kann man sagen, dass AAV-Vektoren verglichen mit anderen viralen Vektoren ein sehr sicheres Vektorsystem darstellen. Der Nachteil des AAV-Vektorsystems ist die limitierte Kodierungskapazität (<5kb) für das Transgen, wobei neue Strategien, wie z.B. die Verwendung von „Splice-Sites“ dieses Problem aufheben können (31, 61). Ein weiteres Problem ist die häufig seit der Kindheit bestehende Immunität gegen das Wildtyp-Virus (meist AAV2). Auf eine Applikation von AAV-Vektoren an Patienten, die bereits mit dem Wildtyp-AAV in Kontakt getreten sind, folgt eine Immunreaktion mit neutralisierenden Antikörpern, die eine effiziente Transduktion verhindern können (13, 14).

Das ursprüngliche Ziel der Gentherapie war das Ersetzen eines defekten Gens bei angeborenen Erkrankungen. Aber der Gegenstand der meisten klinischen Gentherapiestudien ist z.Z. die Gentherapie von Tumoren (The Journal of Gene Medicine Clinical Trial Database). Dies ist u.a. dadurch bedingt, dass der Misserfolg und die Nebenwirkungen der Chemotherapie und der Bestrahlung bei malignen Tumoren im fortgeschrittenen Stadium, die Gentherapie zu einer vielversprechenden Alternative machen. Interessanterweise wurde beobachtet, dass das AAV in der Lage ist Tumorzellen für die Chemotherapie und Bestrahlung zu sensitivieren und somit synergistisch wirkt (37, 44). Weiterhin wurden bei verschiedenen Tumoren ein Wachstumsstillstand durch AAV beschrieben (5) und p53-negative Zellen wurden durch das Wildtyp-AAV abgetötet (59).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Serotypen des AAV (AAV1 – AAV11) zeigen einen unterschiedlichen Gewebetropismus, der hauptsächlich durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine bedingt ist. Allerdings sind nach der Freisetzung des viralen Genoms serotyp-spezifische Einflüsse der ITR-Strukturen auf die Schnelligkeit, Dauer und Effizienz der Transgenexpression nicht auszuschließen. Durch die Entwicklung von Techniken zur Pseudotypisierung, wodurch Genome und Kapside von unterschiedlichen Serotypen kombiniert werden können, ist es möglich, bei Verwendung desselben Genoms (=bestimmtes Transgen flankiert von ITR eines bestimmten Serotyp) den Einfluss der jeweiligen serotyp-spezifischen Kapside auf die Effizienz der Transduktion bestimmter Zielzellen zu untersuchen und so den für die jeweilige Anwendung optimierten Serotyp zu detektieren. Außerdem kann für die weitere Anwendung, die bereits seit sehr langem vorhandenen und verwendeten Vektorplasmide, die alle auf AAV2 beruhen, weiterverwendet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, den optimalen AAV-Vektor für den Gentransfer in maligne Zellen unter den AAV-Serotypen 1-5 zu detektieren, wobei aus den oben genannten Gründen Pseudoserotypen Anwendung finden sollten. AAV6 wurde auf Grund seiner hohen Homologie zu AAV1 und AAV2 nicht mit einbezogen. AAV7 - 11 konnte leider nicht untersucht werden, da sie zu Beginn der Arbeit noch nicht beschrieben worden waren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

C166
Zelltyp: murines Dottersack-Endothel
Medium: DMEM (Biochrom) + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer: CRL2581 (ATCC)

Co115
Zelltyp: humanes kolorektales Adenokarzinom
Medium: DMEM/F12 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 5% FCS + 1% P/S
Herkunft: AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München

Colon-26
Zelltyp: murines kolorektales Adenokarzinom
Medium: DMEM mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München

COS-7
Zelltyp: Nierenzellen von afrikanischen grünen Affen
Medium: DMEM mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer: ACC 60 (DSMZ)

CT26
Zelltyp: murines kolorektales Adenokarzinom
Medium: MEM mit Earle's Salzen und GlutaMAX1(Invitrogen) + 5 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer: CRL-2638 (ATCC)

DLD-1
Zelltyp: humanes kolorektales Adenokarzinom
Medium: RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer: CCL-221 (ATCC)

EPLC-32M1
Zelltyp: humanes Bronchialkarzinom vom Plattenepithel-Typ
Medium: RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Neubauer, Klinikum der Philipps-Universität Marburg

GC-1 sg
Zelltyp: murine Spermatogonien
Medium: DMEM(Biochrom) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer: CRL-2053(ATCC)

H2.35
Zelltyp: murine Hepatozyten
Medium: DMEM(ATCC) + 200nM Dexametason + 4 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer: CRL-1995(ATCC)

HEK293
Zelltyp: humane embryonale Nierenzellen
Medium: DMEM mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer: CRL 1573 (ATCC)

HeLa
Zelltyp: humanes Zervixkarzinom
Medium: DMEM mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer: CCL-2 (ATCC)

HL-60
Zelltyp: humane akute myeloide Leukämie
Medium: RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Dreyling, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer: ACC 3(DSMZ)

HT29
Zelltyp: humanes kolorektales Adenokarzinom
Medium: McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin (Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer: HTB-38 (ATCC)

LNCAP
Zelltyp: humanes Prostatakarzinom
Medium: RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Schendel, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer: ACC 256 (DSMZ)

LOVO
Zelltyp: humanes kolorektales Adenokarzinom
Medium: RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft: AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer: ACC 350 (DSMZ)

LS180

Zelltyp:	humanes kolorektales Adenokarzinom
Medium:	RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft:	AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München
Bestellnummer:	CL-187 (ATCC)

MCA26

Zelltyp:	murines kolorektales Adenokarzinom
Medium:	DMEM/F12 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 5 % FCS + 1 % P/S
Herkunft:	AG Hallek, GSF-Hämatologikum, München

MDA-MB-453

Zelltyp:	humanes duktales Mammakarzinom
Medium:	RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft:	AG Hallek, Genzentrum der LMU München
Bestellnummer:	ACC 65 (DSMZ)

MV3

Zelltyp:	humanes Melanom
Medium:	DMEM mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft:	AG Hallek, Genzentrum der LMU München

NCEB-1

Zelltyp:	humanes Non-Hodgkin-Lymphom
Medium:	RPMI1640 mit GlutaMAX1(Invitrogen) + 20 % FCS + 1 % P/S
Herkunft:	AG Dreyling, GSF-Hämatologikum, München

SK-N-MC

Zelltyp:	humanes Neuroepitheliom
Medium:	DMEM ohne GlutaMAX1 (Invitrogen)
	+ Sodium Pyruvat 1 % + 10 % FCS + 1 % P/S
Herkunft:	AG Rein, MPI für Psychiatrie München
Bestellnummer:	HTB-10(ATCC)

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Benzonase	Merck, Darmstadt
Biomax Light Film	Kodak, Stuttgart
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim
Dexametason	Boehringer, Mannheim
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer Mannheim
DMEM	
-mit 4,5g/L Glucose, 1,5g/L $NaHCO_3$, Glutamin	ATCC, Wesel
-mit 1,0g/L Glucose, 3,7g/L $NaHCO_3$, Glutamin	Biochrom AG, Berlin

DMEM/F12 mit GlutaMAX1	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM High Glucose mit GlutaMAX1	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM High Glucose ohne GlutaMAX1	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNeasy®Tissue Kit	Qiagen, Hilden
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EndoFree® Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid	Fluka ChemieAG, Buchs, Schweiz
FCS (Fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
OptiPrep™	Sigma, Deisenhofen
McCoy's 5A Medium mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
MEM mit Earle's Salzen& GlutaMAX1	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker für DNA:	
-1kb Leiter	New England Biolabs, Schwalbach
-λ DNA Hind III	New England Biolabs, Schwalbach
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Pyruvat	Merck, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RPMI1640 mit GlutaMAX1	Invitrogen, Karlsruhe
SDS(Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween®20	Merck, Darmstadt

2.1.3 Puffer und Lösungen

siehe bei den einzelnen Methoden

2.1.4 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Hybaid
DotBlot Apparatur	Gibco BRL
Durchflusszytometer: C*oulter Epics XL-MCL*	Beckman, Krefeld
Eagle Eye	Stratagene
Spektralphotometer: *DU 640*	Beckman, Krefeld

2.1.5 Bakterienstämme

Die verwendeten Plasmide wurden in *E. coli* TOP10F' und *E. coli* DH10B amplifiziert:

TOP10F':

F' {*lac*I^{q}*Tn10*(Tet^{R})} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ (*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^{R}) *end*A1 *nup*G
(Invitrogen, Karlsruhe)

DH10B:

F' *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *end* A1 *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K λ-*rps*L *nup*G
(Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.6 Plasmide

Das pGFP stammt aus der Arbeitsgruppe Hallek (40), pXR1-5 und pXX6-80 wurden uns freundlicherweise von Prof. Jude Samulski (Chapel Hill, Universität North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt (57).

pGFP

Transgenplasmid: Expressionsplasmid für das grün fluoreszierende Protein (GFP) und einer Hygromycinresistenz. Die Expressionskassette ist beidseits von den ITRs (invertierte terminale Wiederholungen = *inverted terminal repeats*) flankiert.

pXR1-5

Helferplasmid: Expressionsplasmid für die Rep-Proteine von AAV2. Bei pXR3,-4,-5 sind teilweise Domäne aus den Rep-Proteinen des entsprechenden Serotyp eingefügt. Außerdem kodieren die Plasmide für die jeweiligen serotyp-spezifischen Kapsidproteine.

pXX6-80

Adeno-Helferplasmid: Expressionsplasmid für die adenoviralen Proteine VA, E2A und E4, die für die AAV-Herstellung benötigt werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen (Bakterien)

LB-Medium:	Bacto Trypton	1 %
	Yeast Extract	0,5 %
	NaCl	0,5 %
	NaOH	1 mM
	Bacto Agar (bei Platten)	1,5 %

Ampicillin: Stocklösung: 50 mg/ml in H_2O, steril filtriert
Endkonzentration: 50 µg/ml

2.2.1.1 Plattenkultur

Mit einer sterilen Impföse wurden Bakterien aus einer Flüssigkultur auf sterile LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C invertiert im Brutschrank inkubiert.
Zur Herstellung der Platten wurde das Medium versetzt mit Agarose nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bei 4 °C invertiert gelagert.
Zur Selektion der Bakterien wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

2.2.1.2 Flüssigkultur

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

2.2.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Endotoxinfreie Isolation über Anionenaustauschersäulen

Für sehr saubere Plasmidpräparationen wurden Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen (EndoFree® Plasmid Kit) eingesetzt. Es wurden Präparationen im "Midi"-, "Maxi"- und "Mega"-Massstab nach den Standardprotokollen und Systemkits Qiagen 100, 500 und 2500 durchgeführt.

2.2.2.2 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde für die Herstellung von Sonden und zur Kontrolle von Plasmiden eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurde dabei DNA zwischen 0,2 und 20 µg mit 1 bis 10 U Enzym/µg DNA versetzt. Die Spaltung erfolgte über ein bis zwei Stunden bei vorgegebener Temperatur (meist 37 °C) in 10 bis 100 µl Gesamtvolumen. Standardbedingungen wie erforderlicher 1x Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Kontrolle der Spaltung bzw. die präparative Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Agarosegel-elektrophorese.

2.2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Die Agarose wurde in Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgekocht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,3 µg/ ml versetzt. Das 0,8 %ige bis 1,5 %ige Agarosegel wurde in eine vorbereitete Form gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TBE-Puffer mit 30 bis 120 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids bei einer Wellenlänge von 366 nm im Eagle Eye sichtbar gemacht. Parallel aufgetragene DNA-Molekulargewichtsmarker erlaubten eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente.

Auftragspuffer:	Tris/HCl, pH 8,0	10	mM
	EDTA, pH 8,0	50	mM
	Ficoll	10	%
	Glycerin	10	%
	BPB	0,01	%
10x TBE:	Tris	890	mM
	Borsäure	890	mM
	EDTA	20	mM

2.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (DNA-Spektralphotometer DU 640, Firma Beckmann) bestimmt und Computer-unterstützt ausgewertet. Ein OD260 Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml dsDNA (48).

2.2.3 Kultivierung und Einfrieren von Zellen und Zellzahlbestimmung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37°C in Wasser-gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 in den jeweiligen geeigneten Medien.

Die Zellen wurden je nach Teilungsrate 2-3-mal die Woche umgesetzt. Bei den adhärenten Zelllinien wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1% Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 in frisches Medium aufgenommen. Bei den Suspensionszelllinien wurden zwei Drittel des Mediums mit den Zellen verworfen und zum restlichen Drittel neues Medium gegeben.

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei 4°C und 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in eine DMSO:FCS (1:9)-Mischung aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend eine Stunde auf Eis und dann über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff zur Aufbewahrung überführt wurden.

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

2.2.4 Adenovirusfreie Herstellung und Aufreinigung von AAV-Vektoren über einen Iodixanolgradienten

2.2.4.1 Transfektion

Die Virusverpackung wurde in HEK293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden $7{,}5x10^6$ Zellen in Zellkulturschalen von 150 mm Durchmesser ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und nach weiteren 2 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe der CaP Präzipitationsmethode mit insgesamt 37,5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Es wurde dazu ein molares Verhältnis von 1:1:1 zwischen dem Adenovirus-Helferplasmid (pXX6-80), dem Transgenplasmid (pGFP) und dem jeweils serotyp-spezifischen Helferplasmid (pXR1-5) verwendet. Pro Platte wurde 22,5 µg Adenovirus-Helferplasmid, 7,5 µg Transgenplasmid und 7,5 µg Helferplasmid in 1 ml 250 mM $CaCl_2$ pipettiert und gemischt, 1 ml HBS hinzugefügt und abermals gemischt. Der Ansatz wurde 2 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor er auf die Zellen gegeben wurde. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 wurde das Medium durch Medium (DMEM mit Antibiotika) mit 2% FCS ersetzt, und die Zellen erneut 24 Stunden inkubiert.

Transfektionspuffer (HBS):	HEPES, pH 7,2	50 mM
	NaCl	280 mM
	NaP	1,5 mM

2.2.4.2 Aufschluss der HEK293 Zellen und Aufreinigung von AAV

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen durch Abkratzen geerntet und bei 3000 x g pelletiert. Die Zellen wurden in 7,5 ml Lysispuffer aufgenommen und 3x im flüssigen Stickstoff eingefroren und im 37 °C warmen Wasserbad wieder aufgetaut und anschließend über Nacht bei –80 °C aufbewahrt. Die Präparation wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit Benzonase (50U/ml) versetzt um freie RNA und DNA abzubauen. Nach 30 min bei 37 °C wurde die Präparation für 20 min bei 3700 x *g* abzentrifugiert und der Überstand für die Weiterverarbeitung in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Unter dem Überstand wurde ein Iodixanolgradient aufgebaut indem die Suspension zunächst mit 15 % Iodixanollösung (7 ml), dann mit 25 % (5 ml), mit 40 % (5ml) und anschließend mit 60 % Iodixanollösung (6 ml) unterschichtet wurde, und zum Schluss mit PBS/MK überschichtet wurde. Der Gradient wurde für 1 Stunde in der Ultrazentrifuge mit 63000 rpm bei 18°C zentrifugiert. Anschließend wurde die 40% Phase, welche den Vektor enthält, abgenommen.

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

Lysispuffer:	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 8,5	50 mM

15 % Iodixanol:		**25 % Iodixanol:**		**40 % Iodixanol:**	
10xPBS	5 ml	10xPBS	5 ml	10xPBS	5 ml
1 M $MgCl_2$	50 µl	1 M $MgCl_2$	50 µl	1 M $MgCl_2$	50 µl
2,5 M KCl	50 µl	2,5 M KCl	50 µl	2,5 M KCl	50 µl
5 M NaCl	10 ml	Optiprep	20 ml	Optiprep	33,3 ml
Optiprep	12,5 ml	0,5 % Phenolrot	100 µl	Sigma Wasser	ad 50 ml
0,5 % Phenolrot	75 µl	Sigma Wasser	ad 50 ml		
Sigma Wasser	ad 50 ml				

60% Iodixanol:		**PBS/MK:**	
1 M $MgCl_2$	50 µl	10xPBS	10 ml
2,5 M KCl	50 µl	1 M $MgCl_2$	0,5 ml
Optiprep	50 ml	2,5 M KCl	0,5 ml
0,5 % Phenolrot	100 µl	Sigma Wasser	ad 0,5 ml

2.2.5 Charakterisierung der AAV-Präparationen

2.2.5.1 Bestimmung des genomischen Titers durch Dot-Blot

Der genomische Titer, d.h. die Anzahl DNA enthaltender Partikel pro ml, wurde über Dot-Blot und anschließende Fluoreszenz-Detektion mit Digoxigenin-markierten Sonden bestimmt. Die Markierung von DNA-Sonden wurde mit dem DIG-DNA-Labeling und Detektion-Kit nach dem Standard Protokoll der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Für Hybridisierung und Detektion wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll gearbeitet (High-SDS).

2.2.5.1.1 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Die zu markierende dsDNA (100 ng-3 µg) wurde 10 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend im NaCl/Eisbad schockgekühlt. Die Markierung wurde nach der sogenannten "random primer-labeling" Methode in 20 µl mit folgendem Ansatz durchgeführt:

Linearisierte ssDNA	300 ng
10x Hexanucleotid Mixture	2 µl
10x DIG dNTP Labeling Mixture	2 µl
Klenow Polymerase (2 U/µl)	1 µl
H_2O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Abschließend wurde die markierte DNA durch Zusatz von 0,1 Volumen 4 M LiCl und 3 Volumen eiskaltem Ethanol (100 %) für eine Stunde bei –80 °C präzipitiert und anschließend bei 4 °C und 14000 rpm für 30 min pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, die DNA für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer oder H_2O resuspendiert.

2.2.5.1.2 Proteinase K-Verdau und Präparation durch Anionenaustauschersäulen

Zur Probenvorbereitung für den Dot-Blot wurden 5-15 µl der Virus-/Vektorpräparation mit den DNeasy®Tissue Kit behandelt. Die Proben wurden dabei mit Proteinase K verdaut und über Anionaustauscherchromatographie vom Iodixonal befreit. Die gebundene DNA wurde mit 190 µl Elutionspuffer des DNeasy®Tissue Kits von der Säule eluiert.

2.2.5.1.3 Dot-Blot

Der genomische Virus-/Vektortiter wurde über Dot-Blot bestimmt. Dabei lässt man eine Digoxigenin markierte Sonde an das AAV Genom hybridisieren, welche wiederum von einem mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelten Antikörper detektiert wird. Die alkalische Phosphatase erzeugt bei Zugabe eines bestimmten Substrats (CSPD) eine Lumineszenzreaktion.
Über den Intensitätsvergleich der Lichtreaktion mit einem Standard bekannter Partikelkonzentration, kann auf die genomischen Partikel pro µl zurückgerechnet werden.

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen der Virus-/Vektor-DNA-Elutionen wurden in einer 96-Well Rundbodenplatte in die erste Reihe (C-H) pro Well 10 µl 10 M NaOH vorgelegt. Zusätzlich wurde in zwei Wells (Kontrollen: A, B) 198 µl 0,5 M NaOH vorgelegt. In die restlichen Reihen wurden jeweils 100 µl 0,5 M NaOH vorgelegt. Zu den 10 µl 10 M NaOH wurden jeweils die 190 µl vorbereiteter Virus-/Vektor-DNA-Lösung hinzugegeben, dadurch wird die 10 µl 10 M NaOH auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaOH verdünnt. Zu den 198 µl 0,5 M NaOH wurde als Referenz $32x10^8$ doppelsträngige Moleküle (=2 µl) des Plasmids pGFP eingesetzt. Dieses Plasmid enthält dieselbe Sequenz zwischen den viralen Verpackungssignalen, wie die Vektoren, deren DNA per Dot-Blot untersucht werden sollte.
Anschließend wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette eine serielle 1:1 Verdünnung erstellt. Dazu wurden die Reihen mit der Multikanalpipette gemischt und anschließend wurde aus jedem Well 100 µl in die nachfolgende Reihe überführt. Die 100 µl abgenommene Lösung des letzten Wells wurde verworfen. Danach wurde in jedes Well nochmals 100 µl 0,5 M NaOH dazu pipettiert und somit auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Die Platte wurde locker mit Parafilm überzogen und 60 min bei 37 °C inkubiert.
Vor dem Blotten wurde die positiv geladene Nylonmembran (Firma Roche, Mannheim) kurz in H_2O angefeuchtet und 5 min in 0,5 M NaOH inkubiert.
Die Proben der 96-Well-Platte wurden durch Wasserstrahlvakuum auf die Membran geblottet. Zum Crosslinking wurde die Membran anschließend 2 Stunden bei 80 °C oder 15 min bei 120 °C inkubiert und bis zur Hybridisierung zwischen Whatman-Papier bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.1.4 Hybridisierung mit Digoxigenin markierten DNA-Sonden

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

2.2.5.1.5 Detektion durch Chemilumineszenz

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

Die Membran wurde 2 mal je 5 min in 2x SSC-Waschlösung bei Raumtemperatur, 2 mal 15 min in 0,1x SSC-Waschlösung bei 65 °C und einmal 1 min in Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen, um unspezifische Assoziationen der DNA-Sonde an die Membran zu entfernen.

SDS-Hybridisierungslösung:	$Na_xH_y(PO_4)$, pH 7.2	125	mM
	NaCl	250	mM
	EDTA	1	mM
	Formamid	45	% (w/v)
	SDS	7	% (w/v)

2x SSC-Waschlösung für: 2x SSC mit 0,1 % SDS

0,1x SSC-Waschlösung: 0,1x SSC mit 0,1 % SDS

20x SSC-Puffer:	NaCl	3	M
	Natriumcitrat, pH 7,0	300	mM

Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran 30 min in Blockierungspuffer im Rollinkubator bei Raumtemperatur und anschließend wiederum 30 min in 15 ml Blockierungspuffer mit Anti-DIG-AP Antikörper (Verhältnis 1:10000) inkubiert.
Die Membran wurde dann 2 mal 15 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer gewaschen und 1 min in Detektionspuffer äquilibriert. Währenddessen wurde das Chemilumineszenzsubstrat CSPD® in Detektionspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt (500 µl Gesamtvolumen pro Membran). Die Membran wurde auf eine Folie gegeben, mit der vorbereiteten Lösung überschichtet und eingeschweißt. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurde die Membran 20 min im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die Membran wurde dann in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Kodak Biomax) zwischen 0,5 und 15 min exponiert und der Film zuletzt in einem Standardprozess entwickelt.

Maleinsäurepuffer:	Maleinsäure, pH 7,5	100	mM
	NaCl	150	mM

Blockierungspuffer:	Maleinsäurepuffer	90 %
	Blocking-Reagenz	10 %
Waschpuffer:	Maleinsäurepuffer	50 ml
	Tween-20	150 µl
Detektionspuffer:	Tris/HCl, pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM

2.2.6 Transduktion der Zellen mit AAV-Vektoren

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in Wasser-gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2-Gehalt in dem jeweiligen für die Zelllinie geeigneten Medium. Für die Transduktion wurden die jeweiligen Zelllinien auf Platten ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Infektion zu 50 % konfluent sind. Es wurden jeweils drei Wells für die Negativkontrolle, die nicht infiziert wurden, und für die jeweiligen Transduktionsansätze ausgesät. Die Zellen aus zwei Wells wurden direkt vor der Transduktion, d.h. ca. 24 Stunden nach Aussaat, geerntet und gezählt. Der Durchschnitt wurde zur Berechnung der zur Transduktion eingesetzten Menge an Vektorpräparation benötigt. Für die Transduktion wurden 1000 genomische Partikel pro Zelle eingesetzt. Die Zellen wurden direkt nach der Infektion in den Brutschrank (37 °C; 5 % CO_2) gestellt.

2.2.7 Detektion der Transduktionseffizienz durch Durchflusszytometrie

48 Stunden nach Transduktion wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 % Trypsin-EDTA vom Boden der Platte abgelöst. Das Medium mit den Zellen wurde dann bei 2700 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand, der potentiell noch Vektor beinhaltet, abgenommen und autoklaviert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert. Die Analyse der Genexpression erfolgte durch Fluoreszenzmessung in der Durchflusszytometrie. Bei jeder Messung wurden mindestens 5000 Zellen analysiert. Das Fluoreszenzsignal der Negativkontrolle wurde auf 1 % (= Hintergrund) gesetzt. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der WinMDI 2.8 FACS Software.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung der Adeno-assoziierten Virusvektoren

Um die Transduktionseffizienz von Tumorzellen auf Ebene der Kapsid-Interaktion der fünf Serotypen vergleichen zu können, wurde das gleiche Genom in die jeweiligen serotyp-spezifischen Viruskapside verpackt (57).

Für die Verpackung von AAV-Vektoren werden drei verschiedene Plasmide benötigt. Das Vektorplasmid mit dem zu verpackenden Genom, das beidseits von ITRs (invertierte terminale Wiederholungen = *inverted terminal repeats*) flankiert ist, das adenovirale Helferplasmid mit den adenoviralen Gene, die für die AAV-Herstellung benötigt werden, und das AAV-Helferplasmid mit den Rep-Proteinen, die für die Replikation und die DNA-Einschleusung in das Kapsid benötigt werden, und den Cap-Proteinen, die für die Ausbildung des Kapsid benötigt werden. Das Vektorplasmid (pGFP) besteht aus dem für das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodierenden Gen und einem Hygromycin-selektierbaren Markergen, das beidseits von ITRs des AAV2 flankiert ist. Das adenovirale Helferplasmid (pXX 6-80) kodiert für drei verschiedene adenovirale Proteine, VA, E2A und E4. Die Arbeitsgruppe von Prof. Samulski (University of North Carolina) hat uns AAV-Helferplasmide zur Verfügung gestellt, die für die jeweiligen serotyp-spezifischen Kapside kodieren und je nach Serotyp mehr oder weniger umfassende Veränderungen in den Nicht-Strukturproteinen aufwiesen. Laut Rabinowitz et al. waren diese Veränderungen nötig, da die Nicht-Strukturproteine bei der Virus-/Vektorherstellung die Einschleusung der Virus-/Vektor-DNA in das vorgebildete Kapsid übernehmen und dabei gleichzeitig mit dem serotyp-spezifischen Kapsid und der DNA, die von AAV2-ITR flankiert ist, in Interaktion treten (57). Yoon et al. zeigten, dass die ersten 232 Aminosäuren von AAV2-Rep benötigt werden, um an die AAV2-ITR zu binden und somit effizient das von AAV2-ITR flankierte Transgen zu replizieren und zu verpacken (83). King et al. zeigte wiederum, dass das Rep52 eine Helikase-Aktivität besitzt (68), das für eine effiziente Verpackung des viralen Genoms in das Kapsid benötigt wird (43). Die Arbeitsgruppe von Prof. Samulski konnte zeigen, dass die Substitution der jeweiligen serotyp-spezifischen Rep52-Sequenz die Virusproduktion des AAV3, -4 und -5 dramatisch steigern (57). Wegen der großen Ähnlichkeit der Sequenz von AAV2-Rep und AAV1-Rep war eine solche Substitution bei dem Helferplasmid für die Herstellung des AAV2/1 nicht nötig (Abb. 3.1, Abb. 3.2 und Abb. 3.3).

Abb. 3.4 zeigt repräsentativ eine elektrophoretische Auftrennung der Plasmide vor und nach Restriktionsenzymspaltung. Als DNA-Molekulargewichtsmarker wurden die 1kb Leiter und λ DNA Hind III von New England Biolabs (Schwalbach) eingesetzt. Das Ergebnis zeigt jeweils die korrekte Spaltung der jeweiligen Plasmide durch die entsprechenden Restriktionsenzyme.
Für die Vektorherstellung wurden HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) ausgesät und 24 Stunden später mit den drei Plasmiden transfiziert (Abb. 3.5). Die Ernte und der Aufschluss der Zellen erfolgt 48 Stunden später. Daran schließt sich die Aufreinigung über einen Iodixonalgradienten an. Nach der Ultrazentrifugation befinden sich die Vektoren in der 40 %-Phase, die gewonnen wird (Details Material und Methoden).
Anschließend wurde der genomische Titer (Anzahl der DNA enthaltender Partikel / µl) per Dot-Blot durch DNA-Hybridisierung bestimmt. Die DNA wurde aus den Vektoren mit Hilfe des DNeasy®Tissue Kit isoliert. Dabei wird die Vektor-DNA von den Kapsidproteinen und dem Iodixonal befreit, indem die Kapsidproteine durch Proteinase K abgebaut werden und die Vektor-DNA vom Iodixanol- und den Proteinresten durch Bindung an eine Anionen-austauschersäule getrennt werden. Nach Elution der DNA von der Säule kann sie für die weiteren Analysen eingesetzt werden. Bei der DNA-Hybridisierung wurden 10µl jeder einzelnen Fraktion wie im Material und Methodenteil detailliert beschrieben geblottet und hybridisiert. Abb 3.6 zeigt repräsentativ einen Dot-Blot-Ergebnis. In diesem Dot-Blot wurde für AAV1 ein genomischer Titer von 6,4 x 10^9 / µl, AAV2 und AAV3 von 1,3 x 10^{10} / µl, AAV4 von 8 x 10^8 / µl und AAV5 von 4 x 10^8 / µl bestimmt. Es wurden für die nachfolgenden Experimente immer gleiche genomische Partikelmengen (1000 genomische Partikel pro Zelle) eingesetzt.

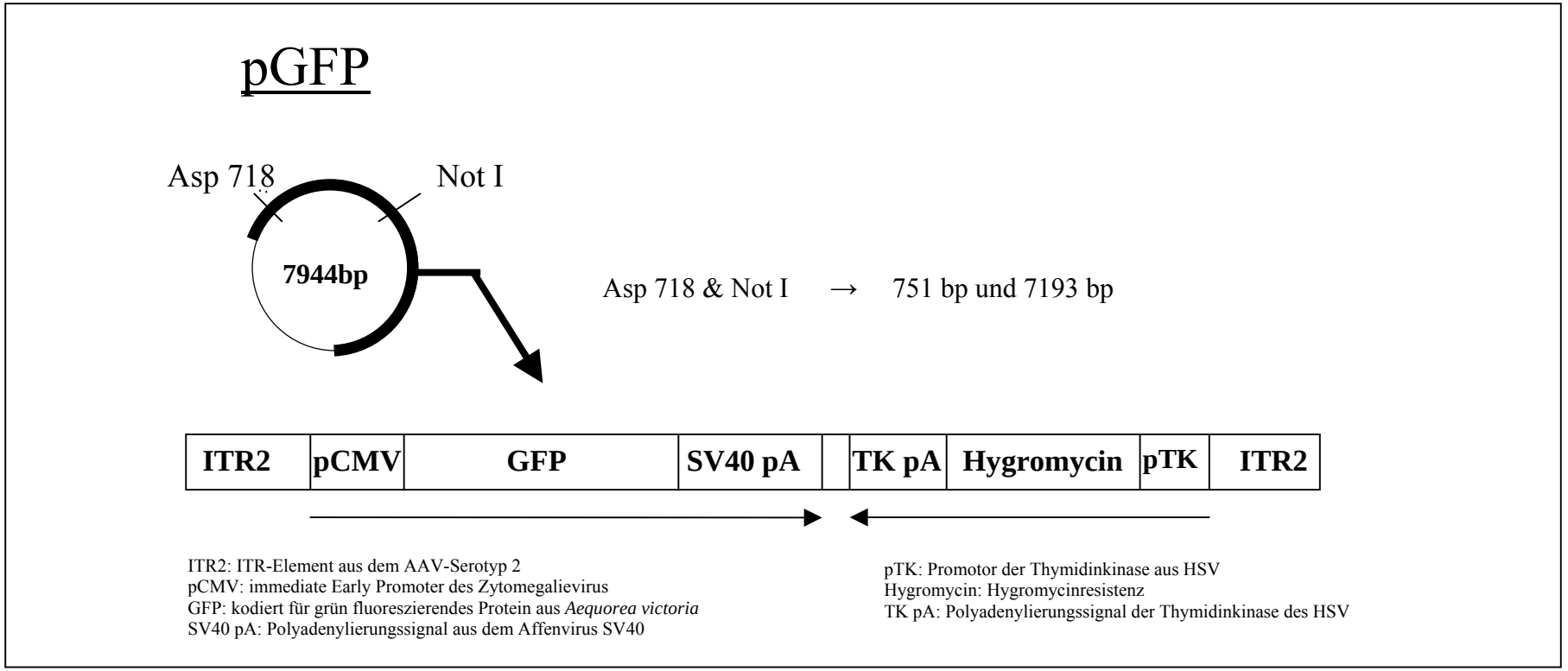
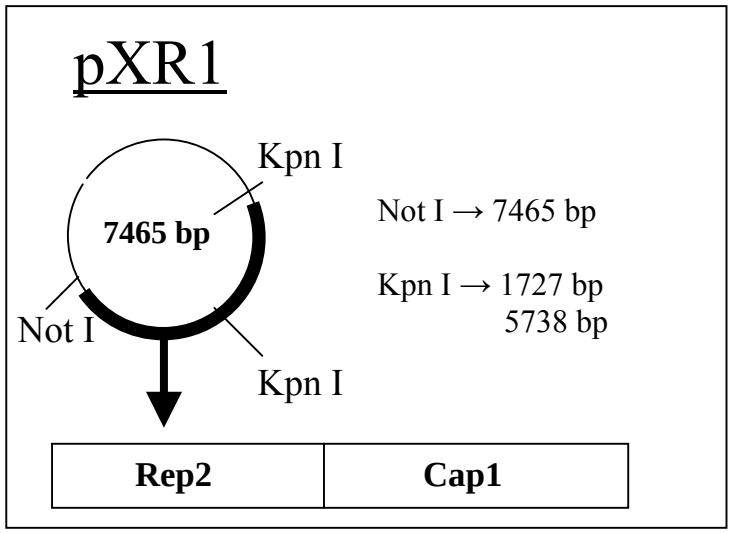
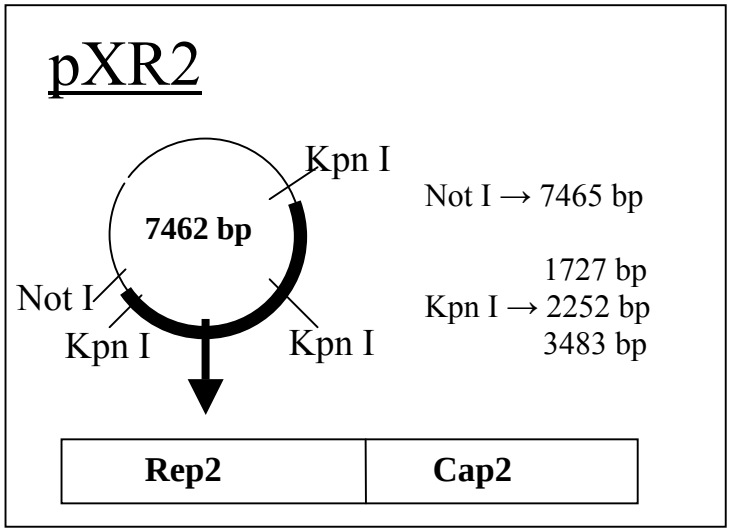


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Transgenplasmids pGFP mit den Endonuklease-Schnittstellen und den jeweiligen Fragmentlängen nach Spaltung.





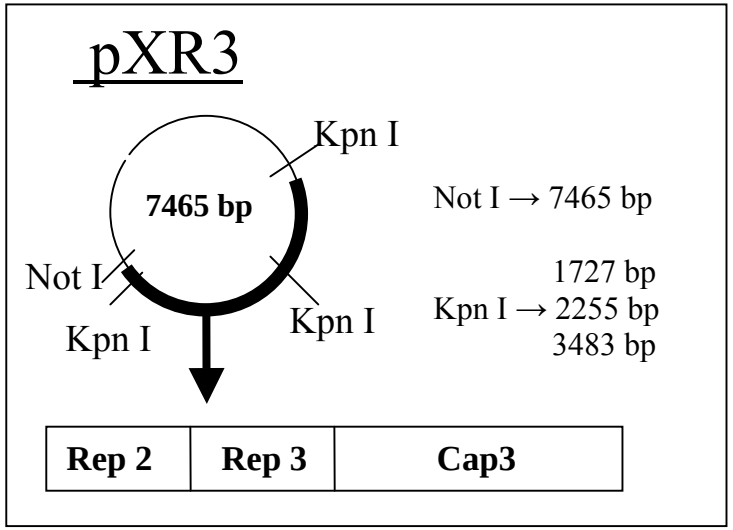
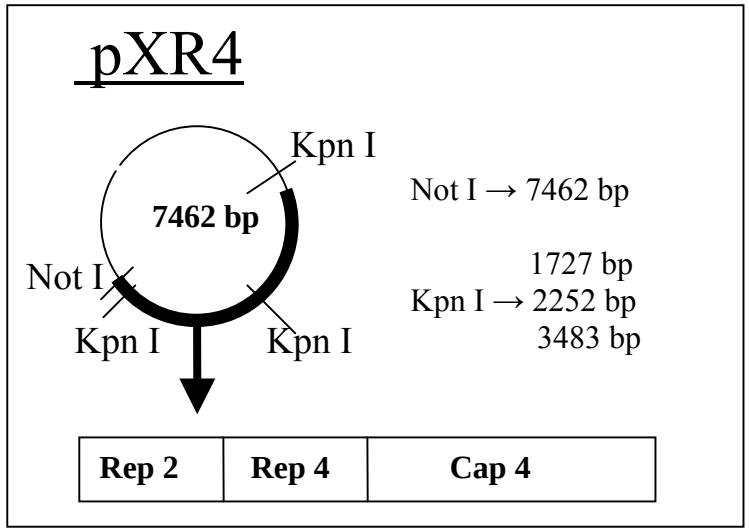
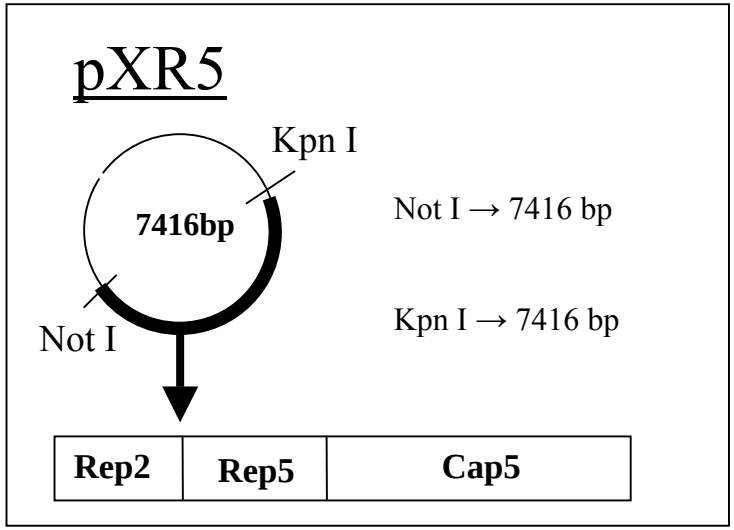


Abb. 3.2
Schematische Darstellung der AAV-Helferplasmide pXR 1-3
mit den Endonuklease-Schnittstellen und den jeweiligen Fragmentlängen nach Spaltung (55).





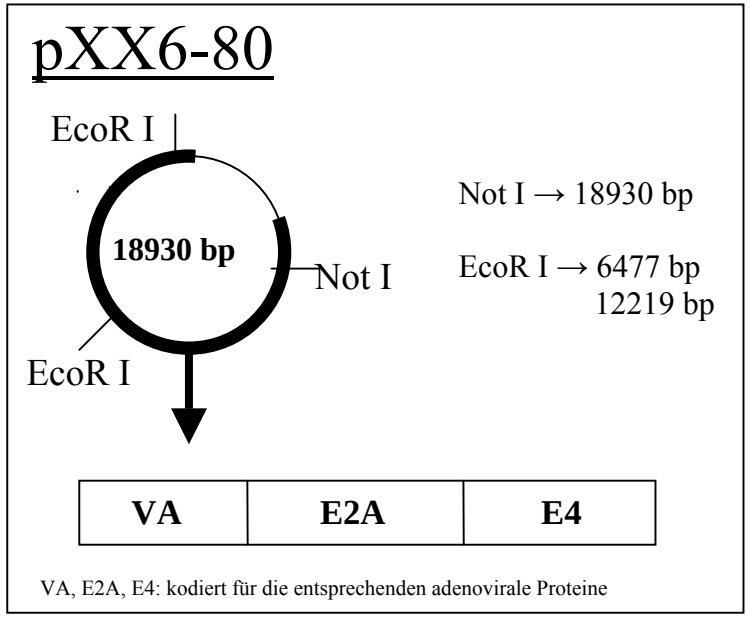


Abb. 3.3
Schematische Darstellung der AAV-Helferplasmide pXR 4 und pXR 5 sowie des Adenohelferplasmids pXX6-80 mit den Endonuklease-Schnittstellen und den jeweiligen Fragmentlängen nach Spaltung (55).

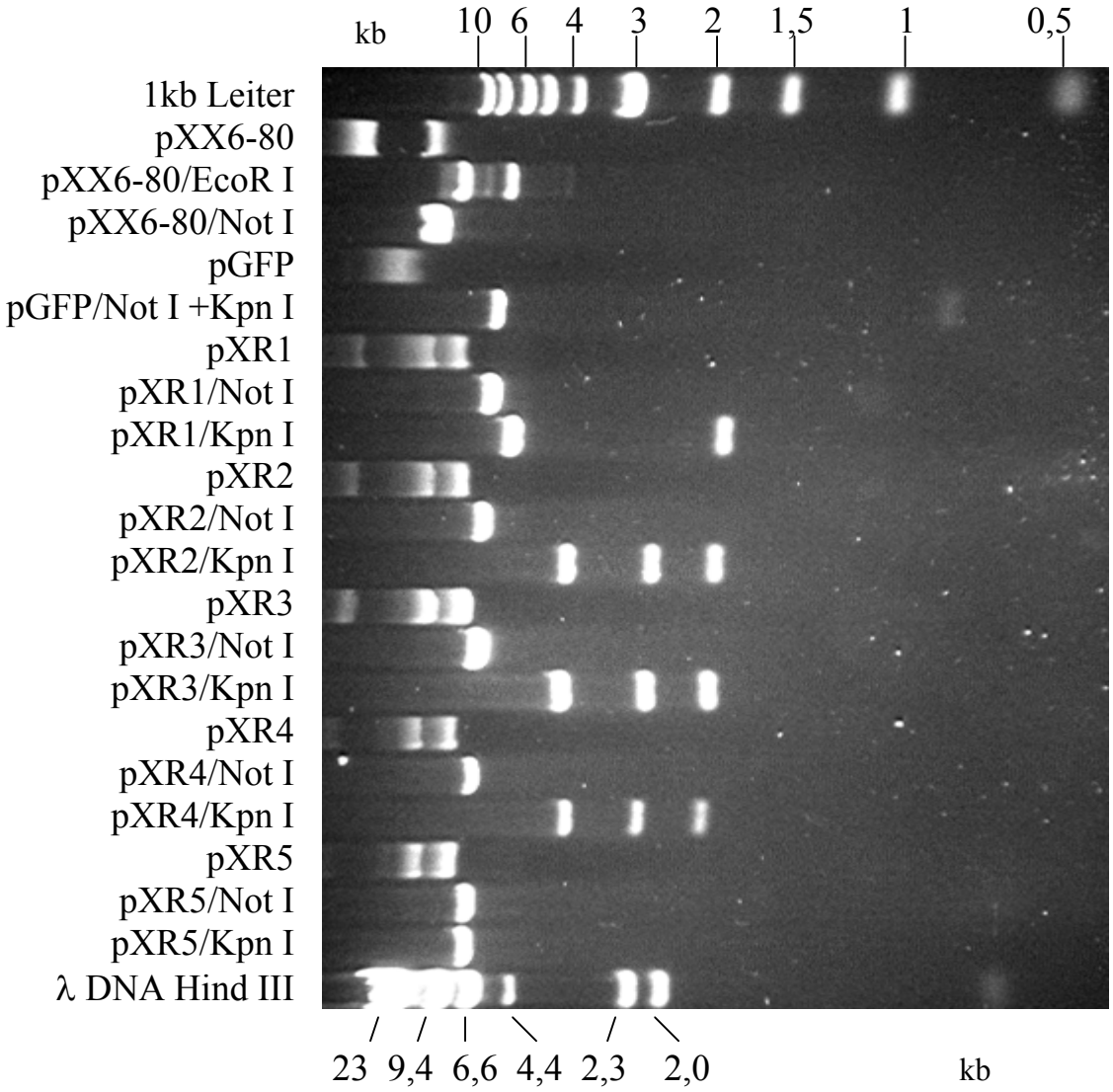


Abb. 3.4 Elektrophoretische Auftrennung der Plasmide pXX6-80, pGFP und pXR1-5 nach Restriktionsendonuklease-Spaltung in einem TBE-Agarosegel mit den angegebenen Enzymen. 1kb Leiter und λ DNA Hind III dienen als DNA-Molekulargewichtsmarker.

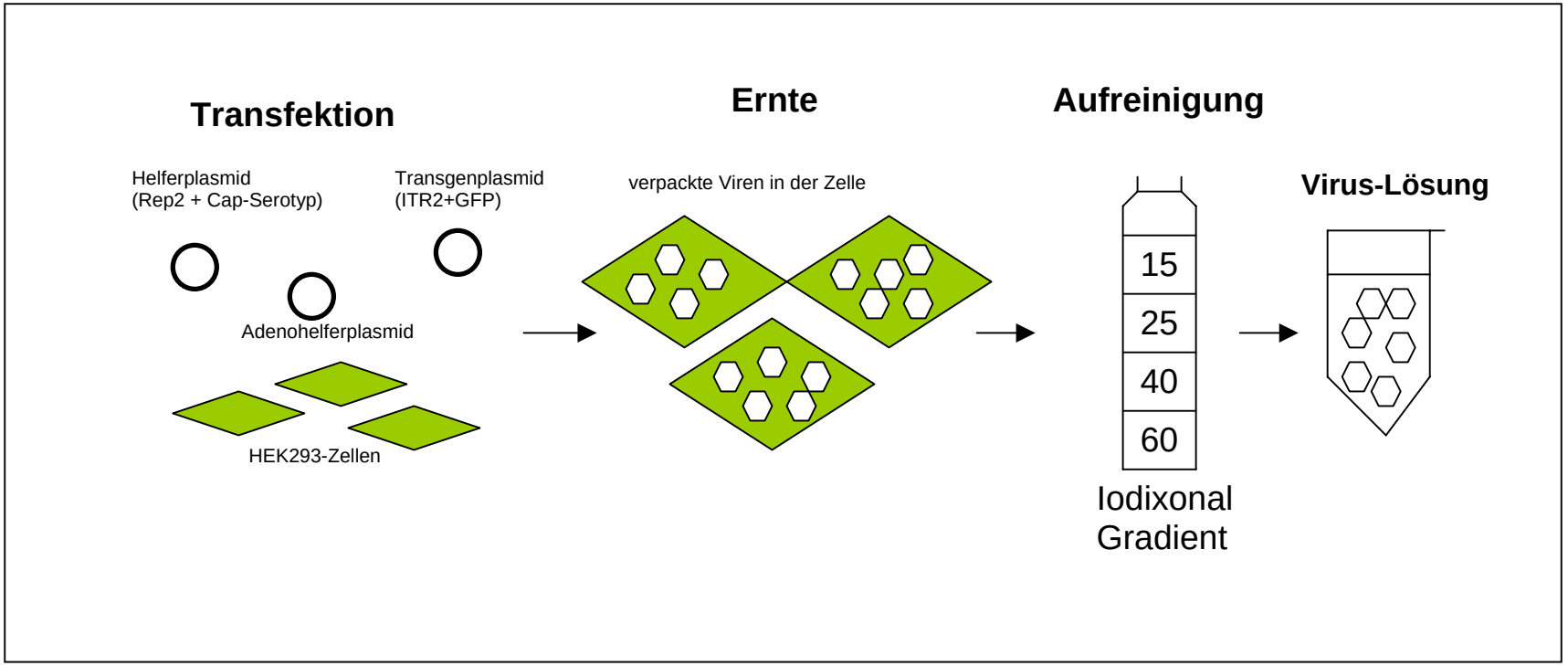


Abb. 3.5 Schmatische Darstellung der AAV-Herstellung (Details siehe Material und Methoden).

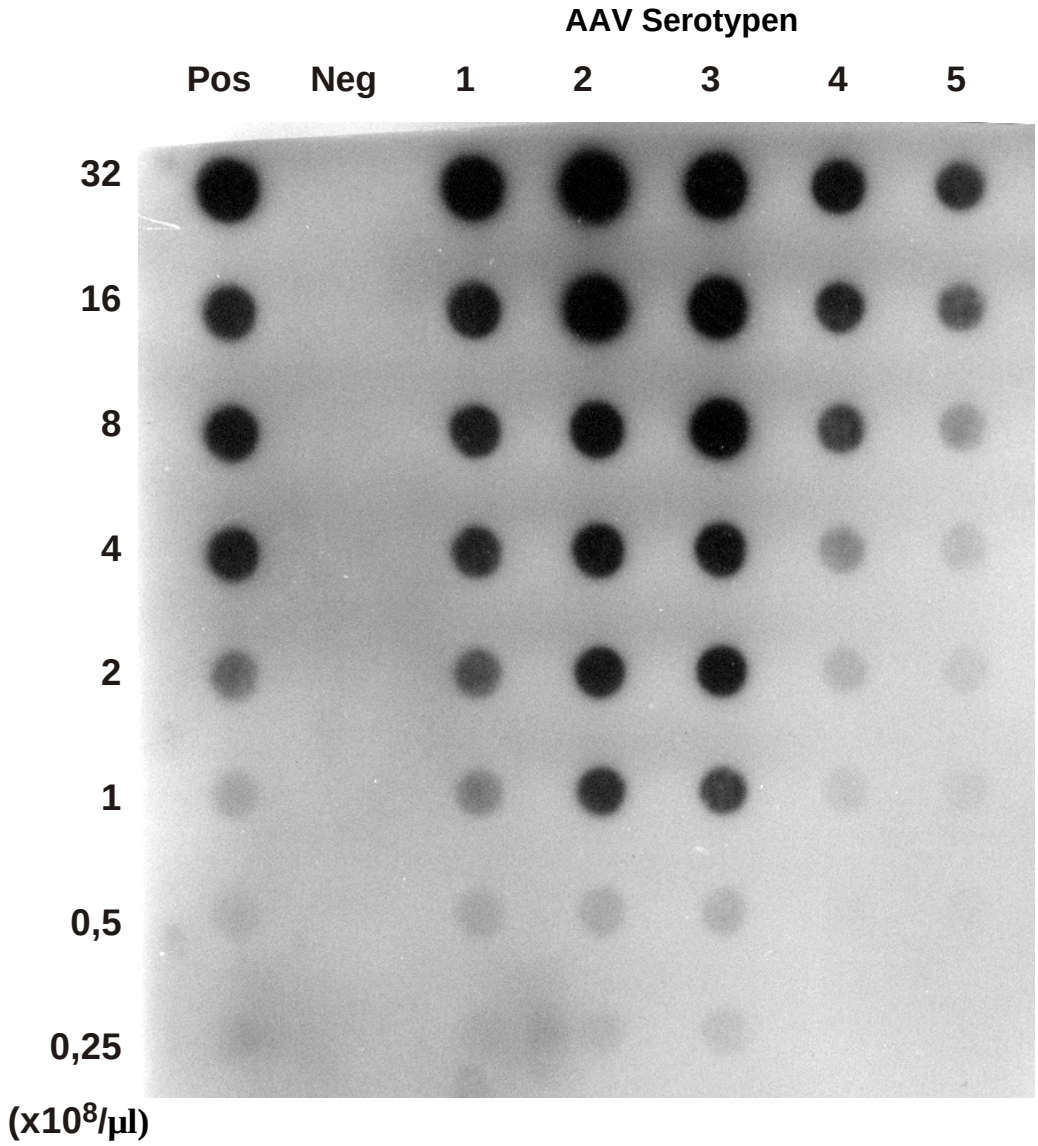


Abb. 3.6 Bestimmung des genomischen Titers (Anzahl DNA enthaltender Partikel / µl) durch die Dot-Blot-Methode. Über den Intensitätsvergleich der Lichtreaktion mit einem Standard bekannter Partikelkonzentration wurde auf die genomischen Partikel pro µl zurückgerechnet. In diesem Dot-Blot wurde für AAV1 ein genomischer Titer von 6,4 x 10^9 / µl, AAV2 und AAV3 von 1,3 x 10^{10} / µl, AAV4 von 8 x 10^8 / µl und AAV5 von 4 x 10^8 / µl bestimmt.

3.2. Bestimmung der Transduktionseffizienz der Serotypen auf Indikatorzelllinien

Als erstes wurden die Serotypen auf ihre Funktionalität geprüft. Wegen des unterschiedlichen natürlichen Reservoirs der Serotypen wurden sie jeweils auf einer humanen Zelllinie (HeLa) und einer Affenzelllinie (Cos-7) getestet. Bei HeLa ist bekannt, dass sie von AAV2 sehr gut transduziert wird und schon in Transduktionsstudien für AAV1 und AAV3-5 verwendet wurde (57). Cos-7 ist als Affenzelllinie das natürliche Reservoir des AAV4 (55). Die jeweiligen Zelllinien wurden so ausgesät, dass sie bei der Infektion zu 50% konfluent sind. Alle Ansätze inklusive der Kontrollen wurden als Triplets durchgeführt, um einen Mittelwert bestimmen zu können. 24 Stunden nach Aussaat erfolgte die Transduktion mit jeweils 1000 genomischen Vektor-Partikel pro Zelle, wobei die Negativkontrolle nur einen Mediumwechsel erhielt. Um die Diffusionsstrecke, die der Vektor zur Zelle zurücklegen muss, zu reduzieren, wurden zunächst nur 40% der normalerweise zur Kultivierung verwendeten Mediummenge eingesetzt. 2 Stunden nach der Infektion wurde die Mediummenge entsprechend erhöht. 48 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen geerntet. Im Durchflusszytometer wurde dann die Transduktionseffizienz (Prozentzahl der Transgen-positiven Zellen) anhand der GFP-Expression gemessen.

Abb. 3.7 zeigt repräsentativ ein Ergebnis der Durchflusszytometrie mit der HeLa- Zelllinie (humanes Zervixkarzinom). In diesem Experiment wurden folgende Werte bestimmt (Gemessen wurden für die einzelnen Vektoren die prozentuale Anzahl transgen-positiver Zellen): AAV1: 53,7 %, AAV2: 99,7 %, AAV3: 87,2 %, AAV4: 57,5 %, AAV5: 19,0 %.

Jedes Tripel-Experiment wurde mindestens einmal wiederholt und der Mittelwert bestimmt. Bei HeLa zeigte AAV2 die höchste Transduktionseffizienz (99,5±0,2 %). AAV3 (90,9±1,5 %) und AAV1 (69,2±8,0 %) ermöglichten auch einen guten aber etwas schlechteren Gentransfer als mit AAV2. Dagegen transduzierten AAV4 und AAV5 deutlich schlechter (AAV4: 40,6±3,1 %, AAV5: 25,4±2,2 %). Die Ergebnisse der Cos-7 Zellen zeigten eine ähnliche Tendenz wie bei den HeLa-Zellen, außer für AAV4, welches einen signifikant besseren (>20 %) Gentransfer bei Cos-7-Zellen erbrachte als in HeLa-Zellen. Dies war zu erwarten, da es sich bei Cos-7 Zellen um Affenzellen handelt und AAV4 aus Affen isoliert wurde (1, 57). Die Transduktionseffizienz lag bei AAV1: 73,2±4,6%, AAV2: 96,8±0,9 %, AAV3: 93,4±1,5 %, AAV4: 60,9±1,2 % und AAV5: 25,4±3,7 % (Abb. 3.8).

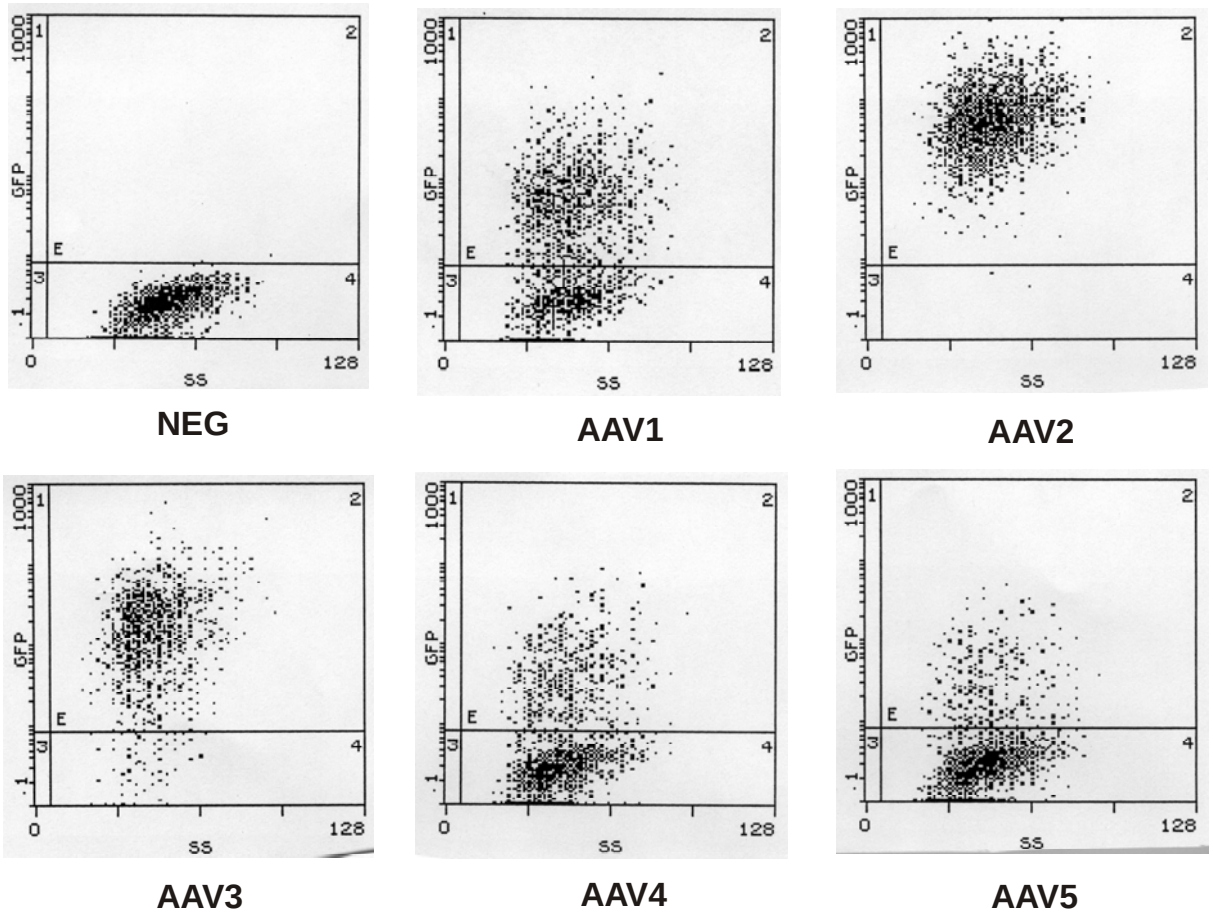


Abb. 3.7 Messung der GFP-Expression per Durchflusszytometrie bei der HeLa-Zelllinie. Die Stärke und Anzahl der gemessenen GFP exprimierenden Zellen (y-Achse) ist gegen die Grösse und Granularität (x-Achse, SS="Side Scatter") dargestellt. Die prozentuale Anzahl transgen-positiver Zellen betrug bei dieser Messung bei AAV1: 53,7 %, AAV2: 99,7 %, AAV3: 87,2 %, AAV4: 57,5 %, AAV5: 19,0 %.

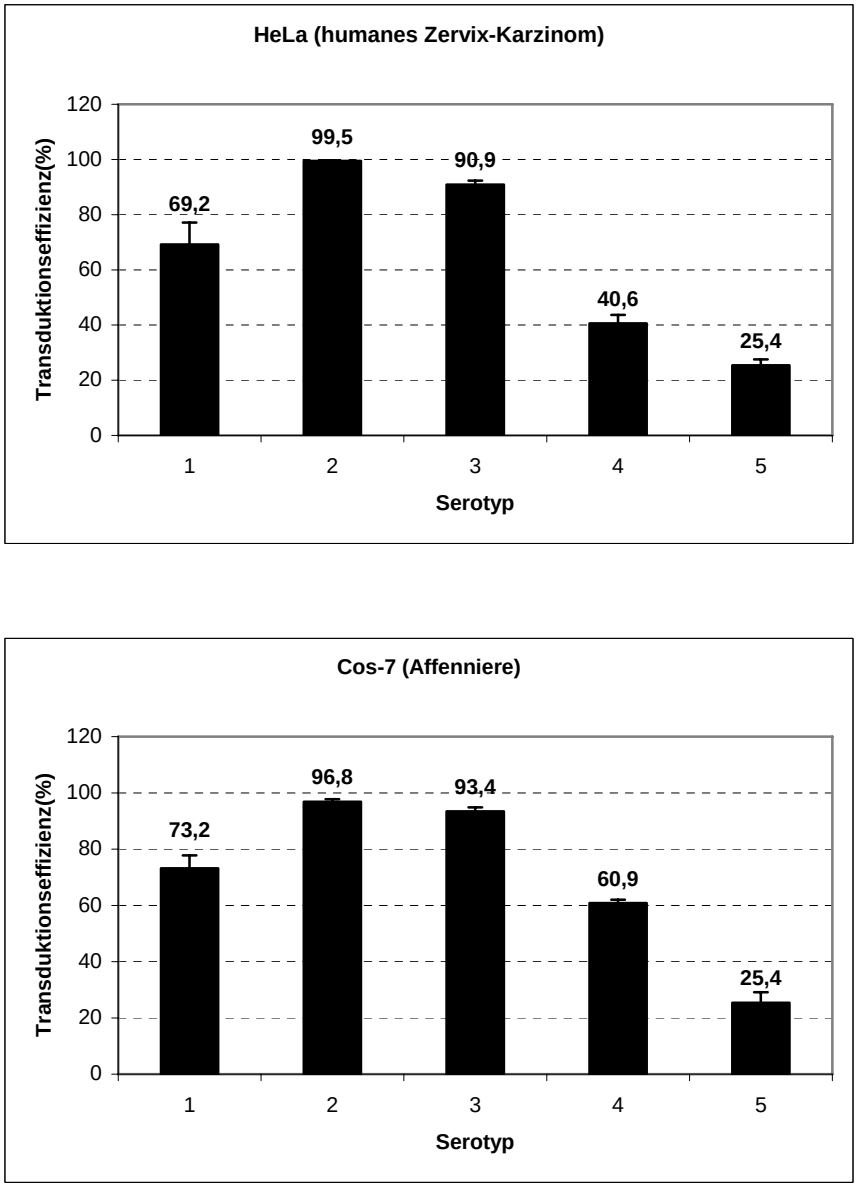


Abb. 3.8 Transduktion von HeLa- (humanes Zervixkarzinom) und Cos-7- (Affennierezellen) Zellen zur Charakterisierung der verschiedenen AAV-Serotypen.

Für beide Zelllinien wurden jeweils 1000 genomische Partikel der Serotypen 1-5 pro Zelle eingesetzt, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflusszytometrie bestimmt worden sind (Mittelwerte aus drei unabhängigen Triplikaten).

3.3. Transduktion humaner Tumorzelllinien

Ein effizienter Gentransfer in Tumorzellen ist essentiell für eine erfolgreiche Tumorgentherapie. Die häufigste Krebsart beim Mann ist das Prostatakarzinom, gefolgt vom Bronchial- und dem Kolonkarzinom. Frauen erkranken besonders häufig an Mammakarzinomen, aber auch mit steigender Tendenz an Bronchialkarzinomen und Kolonkarzinomen (Robert Koch-Institut, 2002). Wie effizient die unterschiedlichen Serotypen Tumorzellen transduzieren können, wurde in dieser Arbeit analysiert. Es wurde zunächst die Transduktionseffizienz von AAV 1-5 bei häufig vorkommenden humanen Tumorentitäten bestimmt. Hierzu verwandten wir folgende Zelllininen: Prostatakarzinom (LNPCA), Bronchialkarzinom (EPLC-32M1) und Mammakarzinom (MDA-MB-453) (Abb. 3.9). Das Kolonkarzinom wird in Kapitel 3.4 gesondert beschrieben. Die Zelllinien wurden analog zu den Zellen in Kapitel 3.2 ausgesät und transduziert. In allen drei Zelllinien erbrachte AAV2 den effizientesten Gentransfer mit einer Transduktionseffizienz, die von 77,9±2,4 % bei der Bronchialkarzinom-Zelllinie vom Plattenepithel-Typ (EPLC-32M1) bis zu 97,6±0,8 % bei der duktalen Mammakarzinom-Zelllinie (MDA-MB-453) und 97,6±1,6 % bei der Prostatakarzinom-Zelllinie (LNPCA) reichte. Bei EPLC-32M1 war AAV1 (43,0±3,9 %) der zweiteffizienteste Vektor nach AAV2. AAV3 und AAV5 erreichten eine ähnliche Transduktionseffizienz (jeweils 17,5±0,8 % und 18,5±1,9 %), während AAV4 nur 2,2±0,5 % der Zellen transduzierte. Bei MDA-MB-453 war AAV3 der zweiteffizienteste Vektor (77,9±2,0 %) nach AAV2. AAV1 und AAV4 erreichten eine ähnliche Transduktionseffizienz (jeweils 39,1±7,1 % und 37,4±0,8 %), während AAV5 eine niedrige Transduktionseffizienz aufwies (6,0±1,4 %). Bei LNPCA zeigten AAV1-3 ähnliche Transduktionseffizienzen von 91,5±1,0 % (AAV1), 97,6±1,6 % (AAV2) und 90,3±0,8 % (AAV3). Die Transduktionseffizienz von AAV4 und AAV5 war in diesen Zellen niedrig (jeweils 7,1±0,5 % und 4,3±0,4 %).

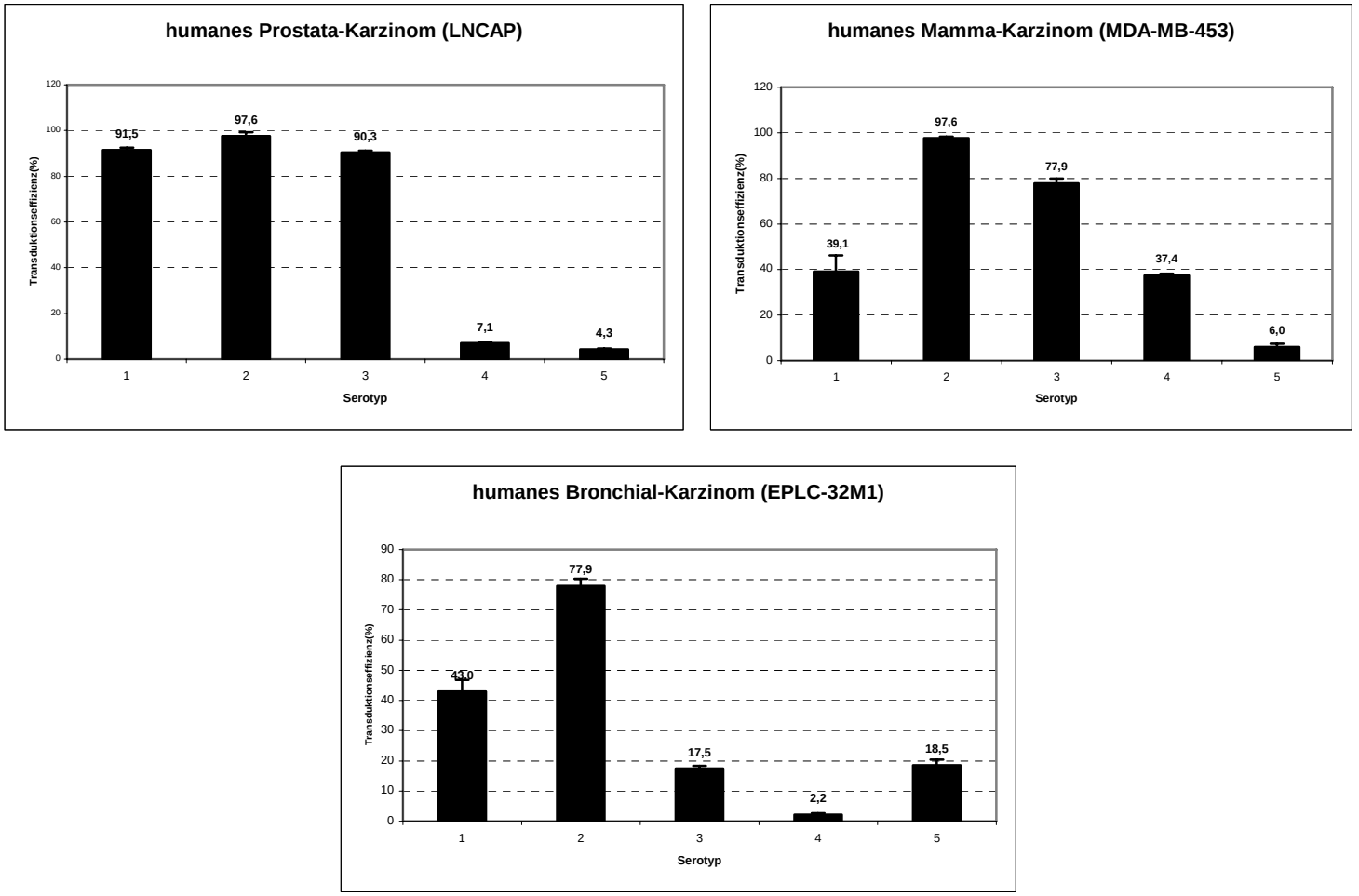


Abb. 3.9 Transduktionseffizienz in Prostata-CA (LNCAP)-, Mamma-CA (MDA-MB-453)- und Bronchial-CA (EPLC-32M1)-Zelllinien.

Alle Zelllinien wurden mit jeweils 1000 genomischen Partikeln der Serotypen 1-5 pro Zelle transduziert, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflusszytometrie bestimmt worden sind (Mittelwerte aus drei unabhängigen Triplikaten).

Um das Spektrum zu erweitern wurden weitere humane Tumorzelllinien untersucht: Neuroblastom (SK-H-MC), Melanom (MV3), Leukämie (HL-60) und Lymphom (NCEB-1) (Abb. 3.10). Die zwei soliden Tumorzelllinien SK-H-MC und MV3 wurden analog zu den Zellen in Kapitel 3.2 ausgesät und transduziert. Bei HL-60 und NCEB-1 wurden die jeweiligen Zelllinien in der Konzentration von 3,3 x 10^4 Zellen / ml Medium ausgesät und wie bei MV3 und SK-H-MC mit jeweils 1000 genomischen Partikel pro Zelle transduziert und nach 48 Stunden die Transduktionseffizienz im Durchflusszytometer gemessen.

Auch bei den beiden soliden Tumorzellen SK-H-MC und MV3 zeigte sich, dass das AAV2 der effizienteste Serotyp ist (jeweils 71,7±19 % und 89,7±3,7 %). Bei der Neuroblastom-Zelllinie SK-H-MC erreichte AAV1 eine Trasnduktionseffizienz von 35,2±22 % und war damit der zweiteffizienteste Vektor. AAV3-5 konnten diese Zellen nur wenig transduzieren (AAV3: 4,5±2,8 %, AAV4: 0,7±0,7 %, AAV5: 1,8±1,7 %). Bei der Melanom-Zelllinie MV3 war AAV1 zwar auch der zweiteffizienteste Vektor nach AAV2, aber deutlich weniger effizient (24,9±1,7 %). AAV3 und AAV4 erreichten eine ähnliche Transduktionseffizienz (jeweils 12,9±0,1 % und 11,4±0,7 %), während AAV5 nur 5,8±0,4 % der Zellen transduzierte.

Die akute myeloide Leukämie-Zelllinie HL-60 konnte von allen fünf Serotypen nicht transduziert werden. Die Transduktionseffizienz lag bei allen Serotypen unter 0,5 %.

Bei der Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie NCEB-1 zeigten AAV1 und AAV2 eine ähnliche niedrige Transduktionseffizienz (jeweils 22,9±11,8 % und 20,2±6,0 %). Auch AAV3-5 konnten diese Zellen nur wenig transduzieren (AAV3: 2,6±0,5 %, AAV4: 0,9±0,5 %, AAV5: 8,0±1,3 %).

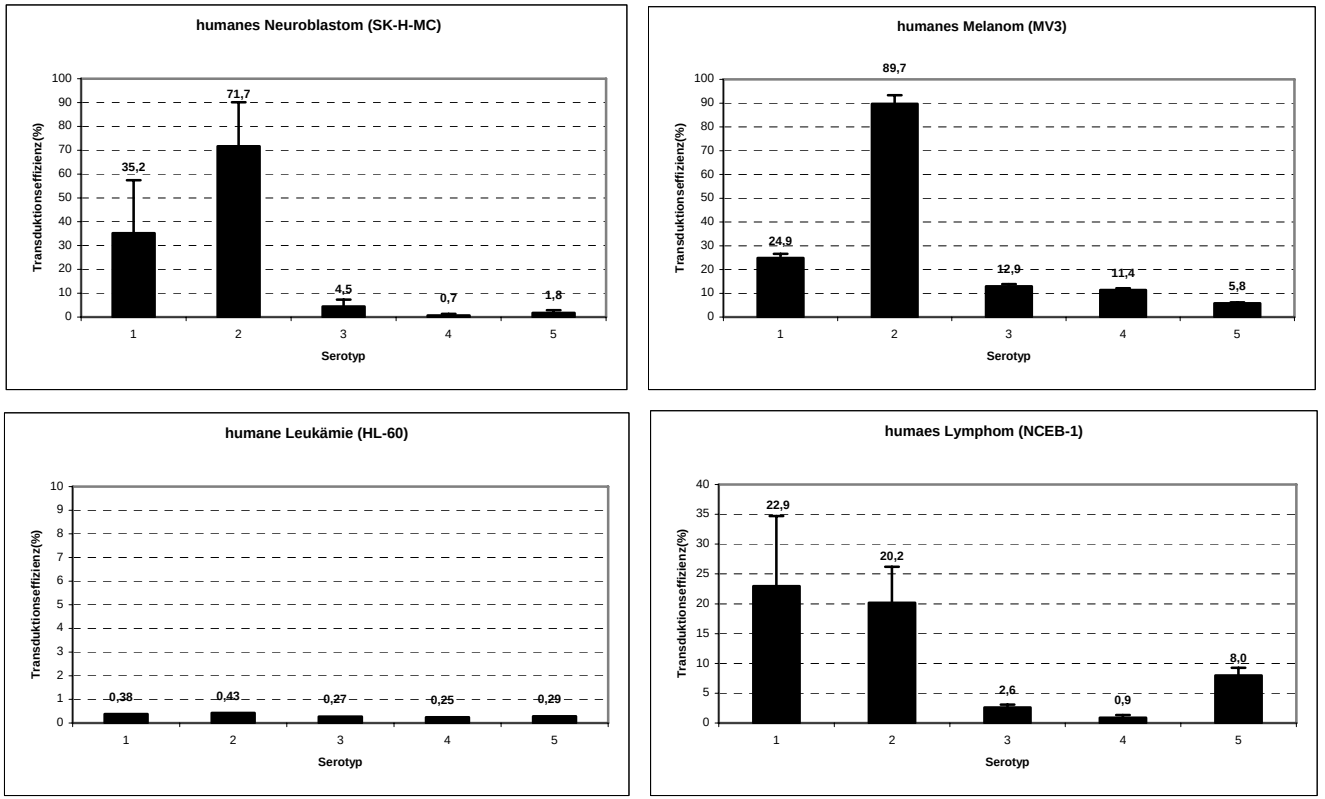


Abb. 3.10 : Bestimmung der Transduktionseffizienz (Transgen-positive Zellen) für die fünf verschiedenen AAV-Serotypen auf Neuroblastom (SK-H-MC)-, Melanom (MV3)-, Leukämie (HL-60)- und Lymphom (NCEB-1)-Zelllinien.

Alle Zelllinien wurden mit jeweils 1000 genomischen Partikeln der Serotypen 1-5 pro Zelle transduziert, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflusszytometrie bestimmt wurden (Mittelwerte aus drei unabhängigen Triplikaten).

3.4. Transduktion verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien

Das Kolonkarzinom ist die dritthäufigste Krebsart des Mannes und die zweithäufigste Krebsart der Frau. Um zu untersuchen, ob die Transduktionseffizienz der verschiedenen Serotypen für den Gentransfer in Zellen gleicher Abstammung vergleichbar ist, wurden die Transduktionseffizienz von AAV1-5 mit 1000 genomischen Partikel pro Zelle auf mehreren humanen Kolonkarzinom-Zelllinien (Co-115, DLD-1, LS-180 und LOVO) bestimmt. Die Zelllinien wurden analog zu den Zellen in Kapitel 3.2 ausgesät und transduziert. Auch hier war AAV2 am effizientesten in allen vier Zelllinien (Abb. 3.11).

Der Bereich der Transduktionseffizienz reichte von 42,7±1,4 % (LOVO) bis 96,1±0,4 % (DLD-1). AAV3 zeigte die zweithöchste Transduktionseffizienz in allen getesteten Zellen im Bereich von 21,4±0,1 % (LOVO) bis 93,9±2,3 % (DLD-1). AAV1 erreichte die dritthöchste Transduktionseffizienz bei LOVO, DLD-1 und Co-115, aber nur wenige der LS-180 Zellen wurden transduziert (4,7±1,0 %). AAV4 und AAV5 erbrachten eine niedrige Transduktionseffizienz im Bereich zwischen 0,7±0,3 % (AAV5 / LOVO) und 13,8±0,3 % (AAV4 / Co-115). Interessanterweise konnte eine andere humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 von allen fünf Serotypen nicht effizient transduziert werden (Abb. 3.12). Die Transduktionseffizienz bei dem Einsatz von 1000 genomischen Partikeln pro Zelle lag durchweg unter 6 % bei AAV2, AAV3 und AAV4 und unter 2,5 % bei AAV1 und AAV5, sodass der Unterschied in der Transduktionseffizienz unter den Serotypen nicht interpretierbar war.

Weiterhin wurden murine Kolonkarzinom-Zelllinien (C26, CT26 und MCA26) auf die Vergleichbarkeit der Transduzierbarkeit der menschlichen Kolon-Zelllinien mit Kolon-Zelllinien anderer Spezies untersucht (Abb. 3.13). Bei allen drei Zellen war nicht wie bei den humanen Kolon-Zelllinien AAV2 sondern AAV1 der effizienteste Vektor im Bereich von 9,8±1,1 % bei MCA26 bis 34,9±1,7 % bei C26, gefolgt von AAV2 mit der zweithöchsten Transduktionseffizienz im Bereich von 6,5±1,0 % (MCA26) bis 19,8±1,6 % (C26). AAV3-5 konnten diese Zellen nur wenig transduzieren. Die Transduktionseffizienz lag bei allen drei Zelllinien unter 3 %.

Zusammengefasst war AAV2 in humanen Kolonkarzinomzellen durchgängig der effizienteste Vektor für den Gentransfer und AAV1 bei murinen Kolonkarzinomzellen. Die Reihenfolge der Transduktionseffizienz unter den Serotypen zeigte ein gleichartiges Muster bei allen Kolonkarzinom-Zelllinien.

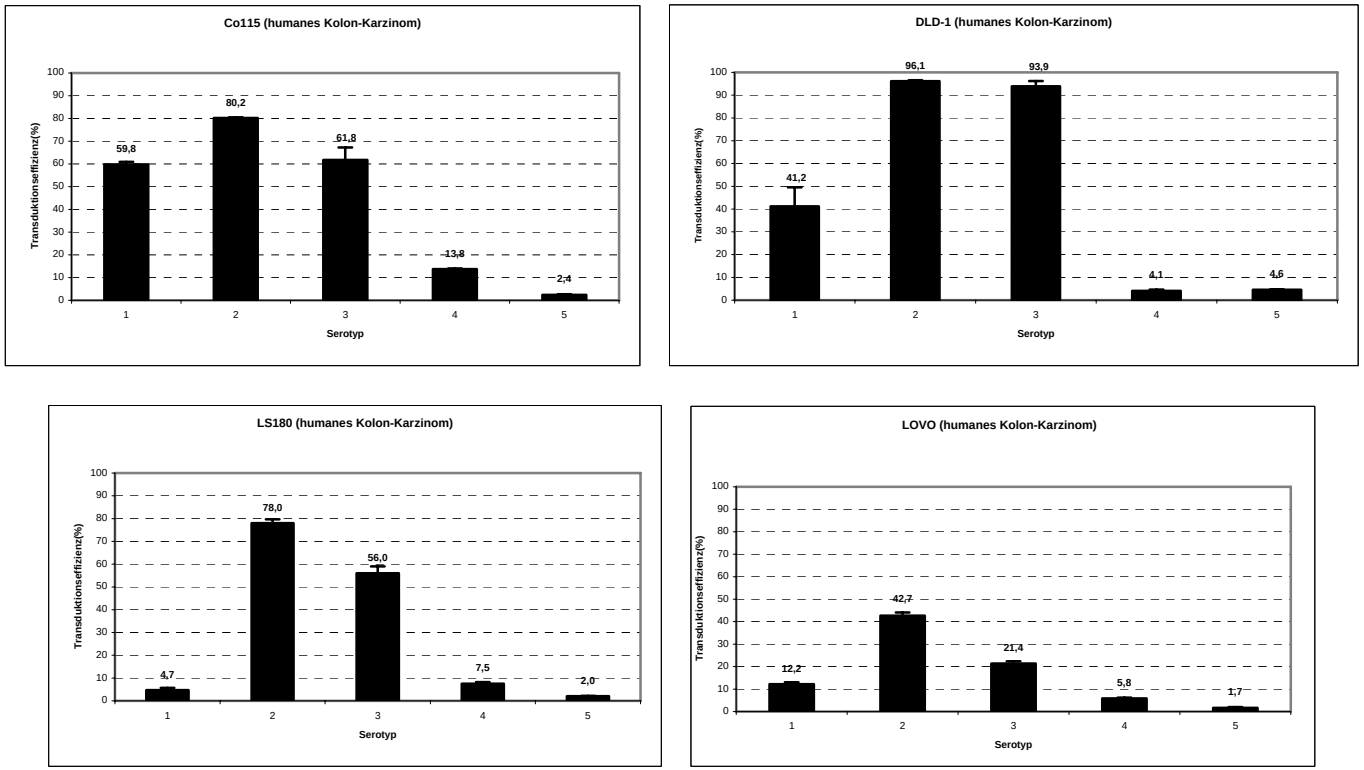


Abb. 3.11: Bestimmung der Transduktionseffizienz der verschiedenen AAV-Serotypen in den humanen Kolonkarzinomzelllinien Co115, DLD-1, LS180 und Lovo. Alle Zelllinien wurden mit jeweils 1000 genomischen Partikeln der Serotypen 1-5 pro Zelle transduziert, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflusszytometrie bestimmt wurden (Mittelwert aus drei unabhängigen Triplikaten).

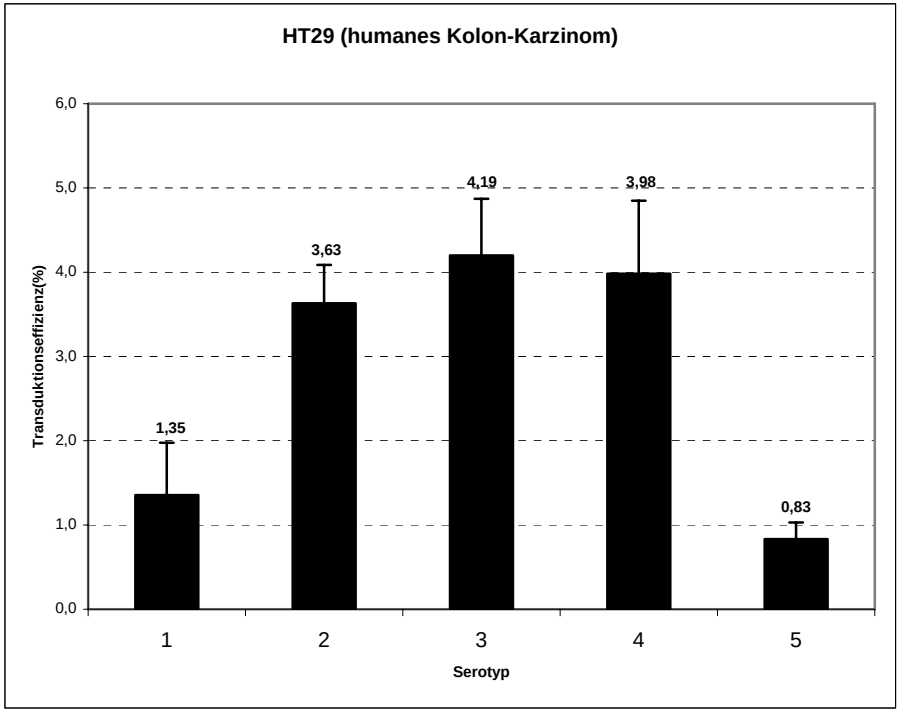
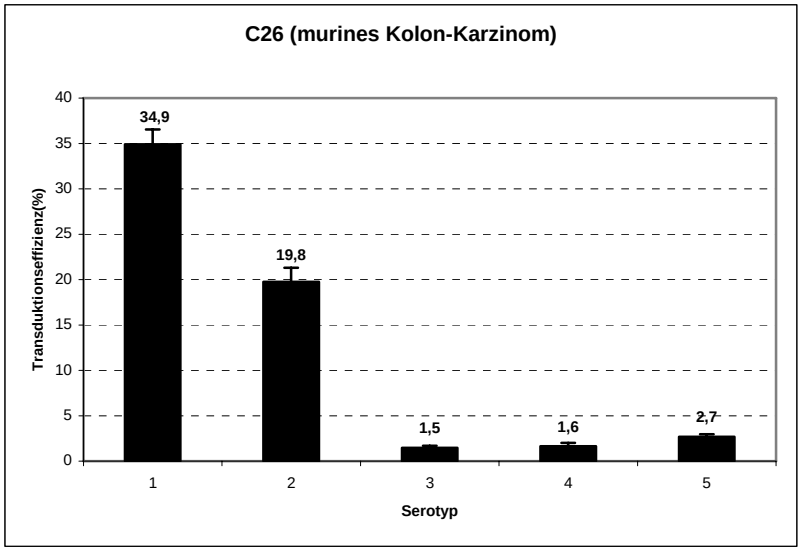
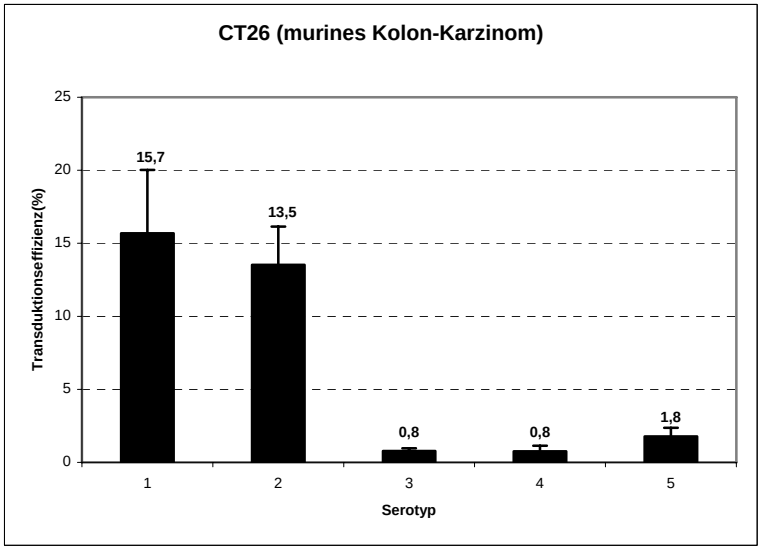


Abb. 3.12:

Bestimmung der Transduktionseffizienz der verschiedenen AAV-Serotypen auf der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29.

Es wurden jeweils 1000 genomische Partikel der Serotypen 1-5 pro Zelle eingesetzt, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflußzytometrie bestimmt wurden (Mittelwerte aus drei unabhängigen Triplikaten).





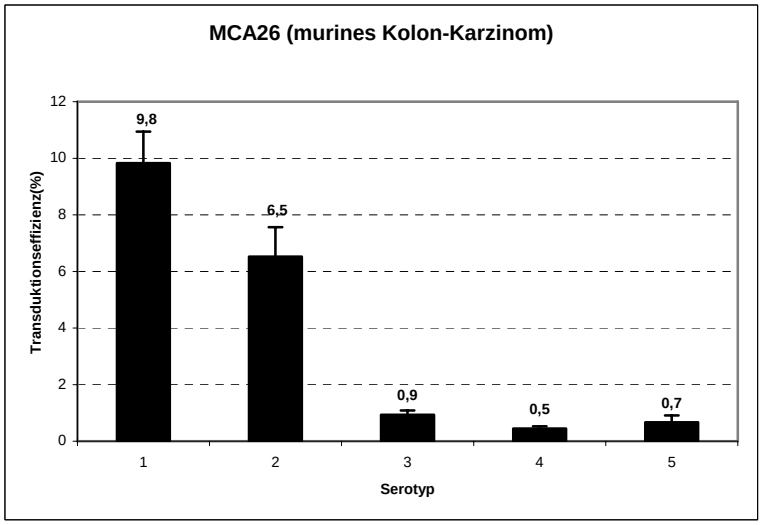


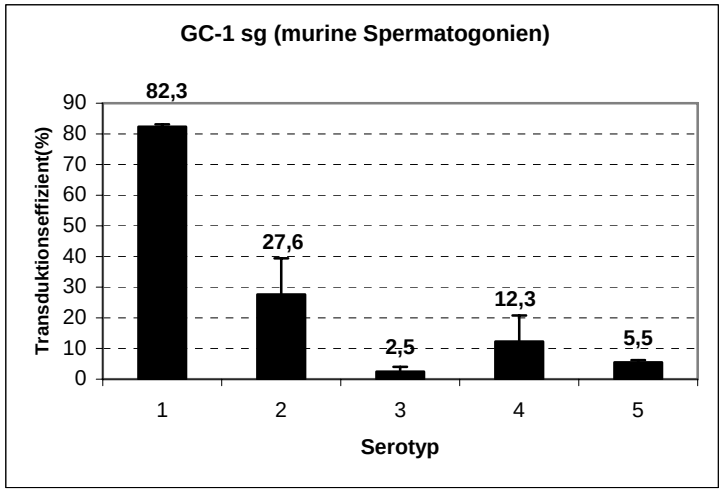
Abb.3.13: Bestimmung der Tranduktionseffizienz der verschiedenen AAV-Serotypen auf den murinen Kolonkarzinomzelllinien C26, MCA-26 und CT26.

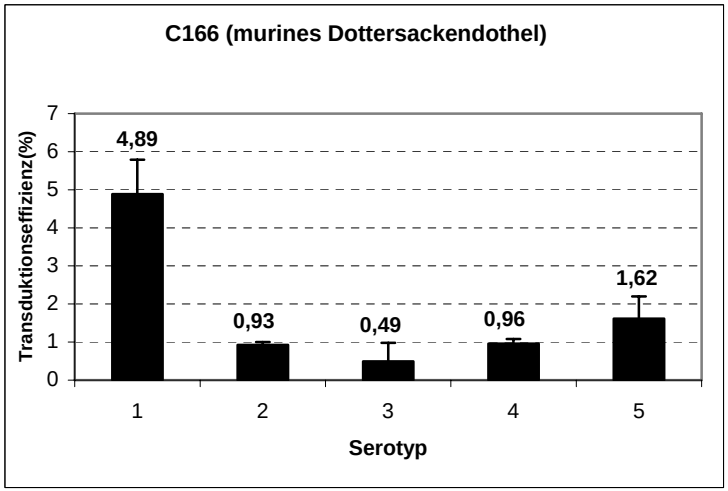
Es wurden jeweils 1000 genomische Partikel der Serotypen 1-5 pro Zelle eingesetzt, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflußzytometrie bestimmt wurden (Mittelwerte aus drei unabhängigen Triplikaten).

3.5. Transduktion weiterer muriner Zelllinien

Wie im Kapitel 3.4. gezeigt, konnte AAV1 die murinen Kolonkarzinom-Zelllinien besser transduzieren als AAV2, das bei den humanen Zelllinien durchgehend die beste Transduktionseffizienz unter den fünf Serotypen gezeigt hat. Um zu untersuchen, ob sich diese Tendenz auch bei anderen murinen Zelllinien zeigt, wurden weitere murine Zelllinien getestet: Spermatogonien (GC-1 sg), Dottersackendothel (C166) und Hepatozyten (H2.35) (Abb. 3.14). Die Zelllinien wurden analog zu den Zellen in Kapitel 3.2 ausgesät und transduziert.

Bei der murinen Spermatogonien-Zelllinie (GC-1 sg) konnte sehr schön gezeigt werden, dass AAV1 mit Abstand der effizienteste Vektor war (82,3±0,8 %). Danach folgte AAV2 mit einer deutlich niedrigeren Transduktionseffizienz von 27,6±11,8 %. Der dritteffizienteste Vektor war AAV4 mit einer Transduktionseffizienz von 12,3±8,54 %. AAV3 und AAV5 konnten die Zellen nur wenig transduzieren (AAV3: 2,5±1,6 % und AAV5: 5,5±0,7 %). Die murinen Dottersackendothelzellen (C166) und Hepatozyten (H2.35) konnten von allen fünf Serotypen nicht effizient transduziert werden. Die Transduktionseffizienz bei dem Einsatz von 1000 genomischen Partikeln pro Zelle lag durchwegs unter 6,5 %. Bei C166 lag die Transduktionseffizienz von AAV1 (4,9±0,9 %) geringfügig über der Effizienz der anderen Serotypen, deren Transduktionseffizienz unter 2,2 % lagen. Um zu untersuchen, ob AAV1 einen stärkeren Tropismus für murines Gewebe besitzt als AAV2, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.





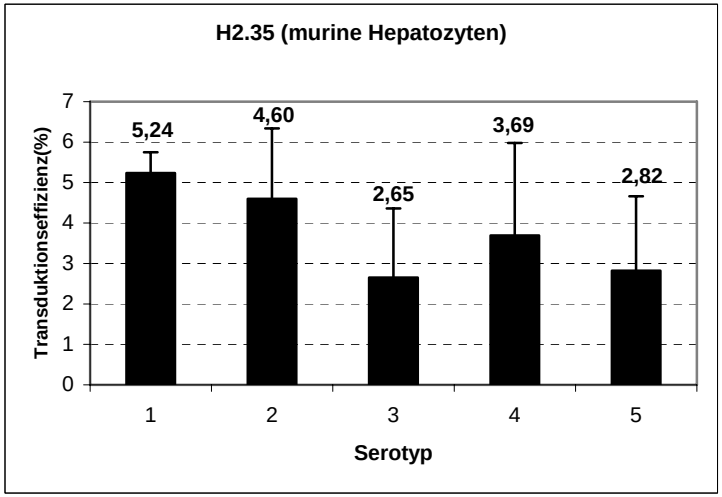


Abb. 3.14: Bestimmung der Tranduktionseffizienz der verschiedenen AAV-Serotypen auf den GC-1 sg (murine Spermatogonien), C166 (murines Dottersackendothel) und H2.35 (murine Hepatozyten).

Für alle Zelllinien wurden jeweils 1000 genomische Partikel der Serotypen 1-5 pro Zelle eingesetzt, welche auf der x-Achse dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozentzahl mit Standardabweichung dargestellt, welche in der Durchflußzytometrie bestimmt worden sind (Mittelwerte aus drei unabhängigen Triplikaten).

4.Diskussion

4.1 Bedeutung der AAV-Serotypen

In dieser Arbeit wurden erstmals die Serotypen 1 bis 5 der Adeno-assoziierten Viren (AAV) in Bezug auf die Transduzierbarkeit humaner Tumor-Zelllinien verglichen. Bisher gab es keine Informationen über die Eignung der verschiedenen AAV-Serotypen als Vektoren für die humane Tumorgentherapie. Die Serotypen weisen unterschiedliche Gewebetropismen auf, die für deren Ausnutzung in der AAV-Gentherapie von großer Relevanz sein könnten. Diese unterschiedlichen Gewebetropismen beruhen zum Teil darauf, dass die Serotypen jeweils an unterschiedliche zelluläre Rezeptoren binden. Der Primärrezeptor von AAV2 ist das Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG). Als Sekundärrezeptoren wurden der Fibroblast Growth Factor Receptor 1 sowie das $\alpha_v ß_5$-Integrin beschrieben (56, 70, 71). Bei AAV1 und 3 wird diskutiert, dass auch sie HSPG als Primärrezeptor nutzen, welches aber noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (33, 34). Als Primärrezeptor von AAV4 ist die 2,3 O-„linked“ Sialsäure beschrieben, während AAV5 an 2,3 N-„linked“ Sialsäure bindet (42). Sialsäure ist der Hauptbestandteil des Muzins, welches von Tumorzellen häufig überexpremiert wird (65).
In dieser Arbeit haben wir jeweils die gleiche Transgen-Kassette, flankiert von AAV2-ITR, im jeweiligen serotyp-spezifischen Kapsid verpackt. Durch den Einsatz dieser Vektoren konnten wir den alleinigen Einfluss der unterschiedlichen Kapsidstrukturen auf die Transduktionseffizienz vergleichen. Die Effizienz der Herstellung, also der genomische Titer dieser Vektoren stellte sich bei AAV1 und 3 als vergleichbar mit der Effizienz für AAV2 (AAV1: 6,4 x 10^9 / µl, AAV2: 1,3 x 10^{10} / µl, AAV3: 1,3 x 10^9 / µl) heraus. AAV4 und AAV 5 konnten nur weniger effizient verpackt (jeweils 8 x 10^8 / µl und 4 x 10^8 / µl) (Abb. 3.6) werden.

4.2 Kriterien im Vergleichsexperiment

Es wurden bisher mehrere Versuche unternommen, die Transduktionseffizienz der unterschiedlichen Serotypen zu vergleichen. Leider ist hierbei nicht einheitlich vorgegangen worden, sodass ein direkter Vergleich der bisherigen Studien nicht möglich ist. Um eine relevante Aussage über die Zugänglichkeit bestimmter Gewebe und Zelltypen für die jeweiligen Serotypen treffen zu können, müssen folgende Punkte beachtet werden:

Einsatz gleicher genomischer Partikelmengen pro Zelle

Um die Bedeutung des HSPGs (Primärrezeptor der AAV2) für die Vektoren AAV1-5 zu untersuchen, haben Rabinowitz et al. die Transduktionseffizienz der jeweiligen Vektoren auf den HSPG-negativen Hamstereierstock-Zelllinien (CHO K1 pgsA, -pgsD, -pgsE) verglichen. Sie verwendeten dabei dieselben Vektoren wie in dieser Arbeit, führten jedoch ihre Experimente basierend auf dem transduzierenden Titer (Anzahl der Partikel, die fähig sind eine Zelle erfolgreich zu transduzieren / µl), durch den sie zusätzlich zum genomischen Titer (Anzahl der DNA enthaltender Partikel / µl) bestimmten. Dieser Titer wurde anhand von Bezugszelllinien, die als für die jeweiligen Vektoren gut zu transduzierende Zelllinien definiert worden sind, bestimmt. Die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa wurde als Bezugszelllinie für AAV1-3 und AAV5, die Affennieren-Zelllinie Cos-1 für AAV4 eingesetzt (57). Die Bezugszelllinien wurden transduziert und die Transgen-positiven Zellen ausgezählt und somit der Titer berechnet. Problematisch ist hier, dass die Serotypen unterschiedliche Gewebetropismen aufweisen, und somit ein Vergleich der Transduktionseffizienz unter den Serotypen basierend auf diesem Titer nicht möglich ist. Dies ist im Rahmen dieser Studie und bei vielen vorangegangenen Studien vernachlässigt worden. In der Studie von Rabinowitz et al. wurde zwar die gleiche Anzahl transduzierender Partikel eingesetzt, allerdings wich diese von der genomischen Partikelzahl der jeweiligen Serotypen ab (Das Verhältnis der in den Experimenten eingesetzte genomischen Partikelzahl war AAV1: AAV2: AAV3: AAV4: AAV5 = 1,2: 5,6: 9,1: 2,3: 5,4). Folglich wurden einige Serotypen über- und andere unterschätzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchungen zur Transduzierbarkeit der verschiedenen Tumorzelllinien jeweils die gleiche genomische Partikelzahl verwendet. Durch das Experiment mit der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa konnte gezeigt werden, dass sich die Vektoren in ihrer Transduktionseffizienz unterscheiden (AAV1: 69,2±8,0 %, AAV2:

99,5±0,2 %, AAV3: 90,9±1,5 %, AAV4: 40,6±3,1% und AAV5: 25,4± 2,2%), aber prinzipiell zur Transduktion befähigt sind (Abb. 3.8).

Verpackung identischer Genome in die jeweilige serotyp-spezifischen Kapside

Die ITR (Invertierte Terminale Wiederholung = *inverted terminal repeats*)-Strukturen, die die Wildtyp- und die Vektorgenome flankieren, stellen die Verpackungssignale der Adeno-Assoziierten Viren dar. Ihnen wird außerdem ein Einfluss auf die Promotoraktivität zugeschrieben (22, 27). Da sich die ITRs der verschiedenen Serotypen unterscheiden, steht zu vermuten, dass es serotyp-spezifische ITR-Promoter-Interaktionen gibt. Vergleicht man verschiedene Serotypen, deren Genom – nicht wie in dieser Arbeit jeweils von den AAV2-spezifischen ITR-Strukturen – sondern von den jeweiligen serotyp-spezifischen ITR-Strukturen flankiert werden, basieren die beobachteten Tropismusunterschiede sowohl auf Differenzen in der Zell-Kapsid-Interaktion als auch auf Differenzen in der ITR-Promoter-Interaktion. Problematisch wird es wenn wie im Fall von Hugh et al. verschiedene Serotypen miteinander verglichen werden, die nur z.T. die serotyp-spezifischen ITRs enthalten. In dieser Arbeit untersuchten Hughes et al die Anwendbarkeit von rekombinanten AAV- 2, 4 und 5 Vektoren für die Transduktion von Neuroblasten. Für den AAV2- und den AAV4-Vektor wurden die ITR-Sequenzen des Serotyp 2, für den AAV5-Vektor die ITR-Sequenz des Serotyp 5 verwendet (39). Ein solcher Vergleich ist nicht zulässig, da in diesem Fall der Einfluß der AAV4-ITR nicht mit in die Untersuchungen einging.

In dieser Arbeit wurden die Serotypen als Pseudoserotypen verpackt. Das heißt: in das jeweilige serotyp-spezifische Kapsid wurde immer das gleiche Genom (ein Transgen flankiert von der ITR-Sequenz eines ausgewählten Serotyp; in dieser Arbeit AAV2) eingesetzt (57). Durch die Verwendung identischer ITR-Strukturen konnte ein möglicher Effekt auf die Genexpression von dieser Seite normalisiert werden, so dass wir in unseren Untersuchungen allein den Einfluss der serotyp-spezifischen Viruskapside (Vektor-Bindung an zelluläre Rezeptoren, Transport zum Zellkern, Freisetzung des Genoms aus den Kapsiden) auf den Zelltropismus untersuchen konnten.

Einheitliche Aufreinigung und Titerbestimmung

Es gibt mehrere Aufreinigungsmethoden für AAV. Zunächst allerdings war nur die $CsCl_2$-Dichtegradienten-Zentrifugation als einzige Methode bekannt, welche sich als zeitaufwendig und ineffektiv herausgestellt hat. Zolotukhin et al. zeigten, dass für die Aufreinigung von AAV-Präparationen ein Iodixanolgradient geeigneter ist (Zolotukhin et al., 2002). Im Gegensatz zu dem hyperosmotischen anorganischen Salz ($CsCl_2$) kann die Iodixanol-Lösung

isosmotisch in allen Dichten hergestellt werden. Diese Eigenschaft macht Iodixanol zum idealen Medium für den Aufreinigungsprozess. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung einer adenovirusfreien AAV-Verpackung in Kombination mit einem Iodixonalgradienten AAV-Präparationen generiert werden können, die in der Lage sind, Zellen zu transfizieren, die bisher nicht von AAV transduziert werden konnten (74). Je nach Aufreinigungsmethode unterscheiden sich die resultierenden Viruspräparationen. Daher sollten bei Vergleichsexperimenten die zu vergleichenden Vektoren einheitlich aufgereinigt werden. Gao et al. (24) verglichen Vektoren, die unterschiedlich aufgereinigt worden sind und damit nicht vergleichbar waren. Sie verglichen die frisch entdeckten Serotypen AAV7 und AAV8 mit AAV1 und AAV2 in murinen Muskeln. Dabei wurden die Heparin gut bindenden AAV2-Vektoren durch Heparinaffinitäts-Chromatographie, die restlichen Vektoren mit Hilfe der $CsCl_2$-Dichtegradienten-Zentrifugation-Methode aufgereinigt.

Wichtig ist es auch den Titer der zu vergleichenden Vektoren einheitlich zu bestimmen. Mastakov et al. (50), die AAV2- mit AAV5-Vektoren im Bezug auf die Transduktionseffizienz des zentralen Nervensystems der Ratten verglichen haben, bestimmten den genomischen Titer von AAV2 durch Real-time PCR und den Titer des AAV5 durch die Dot-Blot-Hybridisierung.

Wir haben in dieser Arbeit alle verwendeten Vektoren einheitlich über einen Iodixonalgradienten aufgereinigt und den genomischen Titer durch die Dot-Blot-Hybridisierung bestimmt.

4.3 Transduktion humaner maligner Zelllinien durch AAV-Serotypen 1-5

Mit Ausnahme von AAV2 wurden die AAV-Serotypen bisher nur auf “gesundem” Gewebe, hauptsächlich an Auge, Pankreas, zentralem Nervensystem, Muskel, Lunge und Leber untersucht. Davidson et al. haben Vektoren basierend auf AAV2, -4 und -5 in den lateralen Hirnventrikel der Maus injiziert. In dieser Studie haben AAV4- und AAV5-Vektoren die Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) im Durchschnitt 10-fach effizienter transduziert als die AAV2-Vektoren (17). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aber beobachtet werden, dass die vom ZNS stammende SK-H-MC (Neuroblastom)-Zelllinie von AAV4 und AAV5 schlechter transduziert wird als von den restlichen Serotypen. Natürlich könnte SK-H-

MC, die eine pathologisch transformierte Zelllinie darstellt, andere Rezeptoren aufweisen als die normalen Zellen des ZNS. Diese Diskrepanz könnte aber auch darauf beruhen, dass Davidson et al. unter den zu vergleichenden Vektoren bis zu 30-fach variierende genomische Partikelzahlen eingesetzt hat – ein Vorgehen, das für den Vergleich von Transduktionseffizienzen fraglich erscheint.

Eine höhere Effizienz von AAV5 im murinen Lungenepithel wurde von Auricchio et al. beschrieben, der die Transduktion der Lungenepithelzellen durch AAV1, -2 und -5 nach nasaler Inhalation untersuchte (4). Bei unserer Untersuchung der EPLC-32M1 (Bronchialkarzinom)-Zelllinie, die von dem Lungenepithel abstammt, konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. AAV5 wies im Vergleich zu AAV1 und AAV2 eine deutlich niedrigere Transduktionseffizienz auf. Unsere Experimente erfolgten alle nur in Zellkultur. Die Zellen waren am Tag der Transduktion nicht konfluent. Auricchios Ergebnisse dagegen wurden in vivo generiert. Die Lungenepithelzellen bilden einen Zellverbund, der eine apikale und eine basale Seite hat, die sich in ihrem Rezeptorrepertoire unterscheiden. Duan et al. beschrieben, dass die apikale Seite der Lungenepithelzellen, die zum Luftweg gewandt ist und bei einer inhalativen Applikation für die Vektoren der einzige Eintrittsweg ist, von AAV2 zu einem 200-fach geringerem Maß transduziert werden als von den basolateralen Seiten der Lungenepithelzelle, die den Blutgefäßen und den benachbarten Lungenepithelzellen zugewandt sind (20). Im Zuge des in dieser Arbeit in-vitro durchgeführten Experiments hatten die Vektoren mit Ausnahme der am Plastik-haftenden Oberfläche ungehinderten Zugang zu allen Seiten der Lungenepithelzelle, was ein deutlicher Unterschied zu der in vivo-Situation darstellt. In weiteren Untersuchungen zeigten Duan et al, dass die AAV2-Vektoren nach Aufnahme in die Zelle über die apikale Seite eine andere intrazelluläre Prozessierung erfahren als nach Aufnahme über die basolateralen Seiten. Es werden Differenzen im endosomalen Transport vermutet. Auch scheinen hierbei Proteasomen eine wichtige Rolle zu spielen, da durch die Zugabe von Proteasomen-Inhibitoren die AAV2-vermittelte Transduktion von apikal mit der von basolateral vergleichbar wurde (21). Die Funktion der Proteasomen bei der AAV-Infektion bzw. der Effekt der Proteasomeninhibitoren auf die AAV-Infektion ist noch nicht geklärt. Für alle fünf Serotypen (AAV1-AAV5) konnte durch Zugabe von Proteinase-Inhibitoren eine Erhöhung der Transduktionseffizienz erreicht werden (29, 81) was allerdings bisher in vivo für die Lungenepithelzellen nur für AAV2 untersucht und beschrieben wurde (21).

4.4 Speziesabhängiges Verhalten von AAV-1 und AAV-2

Bei den drei murinen Kolonkarzinom-Zelllinien (C26, CT26 und MCA26) war AAV1 der effizienteste Vektor im Gegensatz zu den humanen Tumorzelllinien, bei denen AAV2 am effizientesten transduziert hat. Um zu untersuchen, ob die murinen Zelllinien generell besser für AAV1 zugänglich sind als für AAV2, wurden weitere murine Zelllinien untersucht. GC-1 sg (murine Spermatogonien) konnte diese Hypothese am ehesten untermauern. C166 (murines Dottersackendothel) und H2.35 (murine Hepatozyten) wurden nur schlecht transduziert, sodass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden konnte. Es müssten weitere Untersuchungen mit höherer Vektordosis und mit weiteren murinen Zelllinien durchgeführt werden, die den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Dieser Frage sollte jedoch nachgegangen werden, da aus der Bestätigung dieser These abgeleitet werden könnte, dass die in vielen in-vivo-Experimenten mit Mäusen nachgewiesene Tendenz der Serotypen nicht automatisch auf den Menschen übertragbar wäre (4, 16, 31, 52, 82).

4.5 Ausblick: Potentielle therapeutische Anwendung

AAV ist ein vielversprechender Vektor für die Tumorgentherapie. Es wurde beschrieben, dass AAV Tumorzellen für die Chemotherapie und Bestrahlung sensibilisieren und die Therapie somit unterstützen können (37, 44). Weiterhin wurde bei verschiedenen Tumoren nach AAV-Infektion ein Wachstumsstillstand beschrieben (5), und p53-negative Zellen wurden durch das Wildtyp-AAV abgetötet (59). Durch die Serotypen des AAVs wurde die mögliche Verwendbarkeit von AAV als Tumorgentherapie-Vektor erweitert. Bei AAV2 unzugänglichem Tumorgewebe könnten andere Serotypen verwendet werden, die an alternative Rezeptoren binden und dadurch in Zellen eindringen können, die für AAV2 unzugänglich sind, weil sie wenig HSPG (Primärrezeptor des AAV2) auf der Zelle exprimieren (84) oder ihnen die AAV2-Sekundärrezeptoren fehlen.
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AAV2 für humane maligne Zelllinien am besten geeignet ist. Es muss aber auch beachtet werden, dass bei AAV1 und AAV3 teilweise ebenfalls eine hohe Transduktionseffizienz beobachtet worden ist. Diese Serotypen könnten als Alternative für die AAV2-Vektoren dienen, wenn Patienten neutralisierende Antikörper gegen AAV2 besitzen oder während der Therapie entwickelt haben (12-14, 23, 31, 36, 62, 77). Gao et al.

haben gezeigt, dass diese Serotypen trotz des Vorhandenseins neutralisierender Antikörper gegen AAV2 zur Transduktion befähigt sind. Erst bei Serumverdünnungen von 1:80 (AAV1) und 1:5120 (AAV3) konnten nur 50% der Indikatorzellen transduziert werden, während diese Inhibition für AAV2 bereits bei einer Verdünnung von 1:81920 erreicht wurde.
Theoretisch könnten auch AAV4- oder AAV5-Vektoren eingesetzt werden, die jeweils bei AAV4 fast (Verdünnung von 1:20) oder bei AAV5 gar nicht von AAV2 neutralisierenden Seren inhibiert werden. Allerdings war ihre Transduktionseffizienz in dieser Arbeit durchgehend niedrig, sodass für eine effiziente Anwendung in der Tumorgentherapie weitere Optimierungen erfolgen müssen.

5. Zusammenfassung

Gentherapie ist ein vielversprechender neuer Ansatz für die Tumortherapie. Daher ist die Entwicklung eines effizienten Vektorsystems von großer Bedeutung. Bisher wurden unterschiedliche Serotypen des Adeno-assoziierten Virus (AAV) beschrieben, welche einen erheblichen Unterschied im Tropismus für bestimmte Gewebearten und Zelltypen aufweisen. Daraufhin haben wir systematisch den effizientesten Serotyp unter den AAV Serotypen 1 bis 5 bezüglich der Effektivität des Gentransfers in humanen Tumorzellen untereinander verglichen. Um alle Einflüsse außer denen, die auf das Kapsid zurückzuführen sind, auszuschließen, enthalten alle fünf Serotypen die gleiche Transgen-Kassette, einheitlich flankiert von der ITR (Invertierte terminale Wiederholung = *inverted terminal repeat*) des AAV-Serotyp 2. AAV2 war der effizienteste Serotyp in einer Reihe klinisch relevanter Tumorzelllinien mit einer Transduktionseffizienz von über 99,5±0,2 % bei nur 1000 genomische Partikeln / Zelle. Transduktionseffizienzen um die 70 % konnte durch den Serotyp 1 in Prostata- und Zervixkarzinom und durch den Serotyp 3 in Prostata-, Mamma-, Kolon- und Zervixkarzinom beim Einsatz von 1000 genomischen Partikeln pro Zelle erzielt werden. AAV4 und AAV5 haben durchgehend schlecht transduziert. Die höchste Transduktionseffizienz unter den humanen Tumorzelllinien betrug für AAV4, 40,6±3,1 % und 25,4±2,2 % für AAV5 beim Zervixkarzinom.

Die jüngsten Fortschritte in der AAV-Vektor-Technologie weisen darauf hin, dass AAV-basierte Vektoren für die Tumorgentherapie eingesetzt werden können. Unsere Vergleichsanalysen zeigen, dass AAV2 zwar der am vielversprechenste Kandidat für eine solche Anwendung ist, aber AAV1 und AAV3 auch als gute Alternativen verwendet werden können. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn eine Anwendung mit AAV2 durch neutralisierende Antikörper verhindert wird. Gao et al. konnten zeigen, dass diese Serotypen trotz des Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen AAV2 zum effizienten Gentransfer befähigt sind. Die Transduktionseffizienz von AAV4 und AAV5 ist generell zu niedrig, was eine effiziente Anwendung in der Tumorgentherapie derzeit unmöglich macht.

Bei Untersuchungen einiger muriner Zelllinien stellten wir fest, dass sie sich am besten von AAV1 transduzieren lassen. Um nachzuweisen, ob AAV1 generell murine Zellen besser transduziert als AAV2, müssten weitere Untesuchungen durchgeführt werden. Dies ist für die zukünftige AAV-Forschung von Bedeutung, da eine Bestätigung unserer Beobachtung bedeuten würde, dass die Ergebnisse aus den zahlreichen in-vivo-Experimenten mit Mäusen nicht auf den Menschen übertragbar wären.

6. Literaturverzeichnis

1. Amiss, T. J., D. M. McCarty, A. Skulimowski, and R. J. Samulski. 2003. Identification and characterization of an adeno-associated virus integration site in CV-1 cells from the African green monkey. J Virol 77:1904-15.

2. Anonym. 2002. Assesment of adenoviral vector safety and toxicity of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. Hum. Gene Ther. 13:3-13.

3. Atchison, R. W., B. C. Casto, and W. M. Hammon. 1965. Adeno-associated defective virus particles. Science 149:754-756.

4. Auricchio, A., E. O'Connor, D. Weiner, G. P. Gao, M. Hildinger, L. Wang, R. Calcedo, and J. M. Wilson. 2002. Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. J Clin Invest 110:499-504.

5. Bantel-Schaal, U. 1995. Growth properties of a human melanoma cell line are altered by adeno-associated parvovirus type 2. Int J Cancer 60:269-74.

6. Bantel-Schaal, U., H. Delius, R. Schmidt, and H. zur Hausen. 1999. Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses. J Virol 73:939-47.

7. Bantel-Schaal, U., and H. zur Hausen. 1984. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. Virology 134:52-63.

8. Bartlett, J. S., R. Wilcher, and R. J. Samulski. 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. J Virol 74:2777-85.

9. Becerra, S. P., F. Koczot, P. Fabisch, and J. A. Rose. 1988. Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. J Virol 62:2745-54.

10. Berns, K. I. 1990. Parvovirus replication. Microbiol Rev 54:316-29.

11. Berns, K. I., R. M. Kotin, and M. A. Labow. 1988. Regulation of adeno-associated virus DNA replication. Biochim Biophys Acta 951:425-9.

12. Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, M. S. Sereno, C. D. Brandt, H. W. Kim, R. H. Parrott, and R. M. Chanock. 1971. A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. Am J Epidemiol 94:359-66.

13. Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, A. Z. Kapikian, J. B. Austin, and W. P. Rowe. 1968. Epidemiology of adeno-associated virus infection in a nursery population. Am. J. Epidemiol. 88:368-378.

14. Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, and W. P. Rowe. 1968. Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. J. Natl. Cancer Inst. 40:319-327.

15. Boucher, D. W., W. P. Parks, and J. L. Melnick. 1970. A sensitive neutralization test for the adeno-associated satellite viruses. J Immunol 104:555-9.

16. Chao, H., P. E. Monahan, Y. Liu, R. J. Samulski, and C. E. Walsh. 2001. Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. Mol Ther 4:217-22.

17. Davidson, B. L., C. S. Stein, J. A. Heth, I. Martins, R. M. Kotin, T. A. Derksen, J. Zabner, A. Ghodsi, and J. A. Chiorini. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 97:3428-32.

18. Douar, A. M., K. Poulard, D. Stockholm, and O. Danos. 2001. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. J Virol 75:1824-33.

19. Duan, D., Z. Yan, Y. Yue, W. Ding, and J. F. Engelhardt. 2001. Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation. J Virol 75:7662-71.

20. Duan, D., Y. Yue, Z. Yan, P. B. McCray, Jr., and J. F. Engelhardt. 1998. Polarity influences the efficiency of recombinant adenoassociated virus infection in differentiated airway epithelia. Hum Gene Ther 9:2761-76.

21. Duan, D., Y. Yue, Z. Yan, J. Yang, and J. F. Engelhardt. 2000. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. J Clin Invest 105:1573-87.

22. Flotte, T. R., S. A. Afione, R. Solow, M. L. Drumm, D. Markakis, W. B. Guggino, P. L. Zeitlin, and B. J. Carter. 1993. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. J Biol Chem 268:3781-90.

23. Gao, G., L. H. Vandenberghe, M. R. Alvira, Y. Lu, R. Calcedo, X. Zhou, and J. M. Wilson. 2004. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 78:6381-8.

24. Gao, G. P., M. R. Alvira, L. Wang, R. Calcedo, J. Johnston, and J. M. Wilson. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 99:11854-9.

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

26. Girod, A., C. E. Wobus, Z. Zadori, M. Ried, K. Leike, P. Tijssen, J. A. Kleinschmidt, and M. Hallek. 2002. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. J Gen Virol 83:973-8.

27. Haberman, R. P., T. J. McCown, and R. J. Samulski. 2000. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. J Virol 74:8732-9.

28. Hacein-Bey-Abina. 2003. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N. Engl. J. Med. 348:255-256.

29. Hacker, U. T., L. Wingenfeld, D. M. Kofler, N. K. Schuhmann, S. Lutz, T. Herold, S. B. King, F. M. Gerner, L. Perabo, J. Rabinowitz, D. M. McCarty, R. J. Samulski, M. Hallek, and H. Buning. 2005. Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. J Gene Med.

30. Halbert, C. L., J. M. Allen, and A. D. Miller. 2001. Adeno-associated virus type 6 (AAV6) vectors mediate efficient transduction of airway epithelial cells in mouse lungs compared to that of AAV2 vectors. J Virol 75:6615-24.

31. Halbert, C. L., J. M. Allen, and A. D. Miller. 2002. Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. Nat Biotechnol 20:697-701.

32. Halbert, C. L., E. A. Rutledge, J. M. Allen, D. W. Russell, and A. D. Miller. 2000. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. J Virol 74:1524-32.

33. Handa, A., S. Muramatsu, J. Qiu, H. Mizukami, and K. E. Brown. 2000. Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. J Gen Virol 81:2077-84.

34. Hauck, B., and W. Xiao. 2003. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. J Virol 77:2768-74.

35. Heilbronn, R., J. R. Schlehofer, A. O. Yalkinoglu, and H. Zur Hausen. 1985. Selective DNA-amplification induced by carcinogens (initiators): evidence for a role of proteases and DNA polymerase alpha. Int J Cancer 36:85-91.

36. Hildinger, M., A. Auricchio, G. Gao, L. Wang, N. Chirmule, and J. M. Wilson. 2001. Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. J Virol 75:6199-203.

37. Hillgenberg, M., J. R. Schlehofer, M. von Knebel Doeberitz, and P. Klein-Bauernschmitt. 1999. Enhanced sensitivity of small cell lung cancer cell lines to cisplatin and etoposide after infection with adeno-associated virus type 2. Eur J Cancer 35:106-10.

38. Hoggan, M. D., N. R. Blacklow, and W. P. Rowe. 1966. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A 55:1467-74.

39. Hughes, S. M., F. Moussavi-Harami, S. L. Sauter, and B. L. Davidson. 2002. Viral-mediated gene transfer to mouse primary neural progenitor cells. Mol Ther 5:16-24.

40. Huttner, N. A., A. Girod, L. Perabo, D. Edbauer, J. A. Kleinschmidt, H. Buning, and M. Hallek. 2003. Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. Gene Ther 10:2139-47.

41. Jooss, K., Y. Yang, K. J. Fisher, and J. M. Wilson. 1998. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. J Virol 72:4212-23.

42. Kaludov, N., K. E. Brown, R. W. Walters, J. Zabner, and J. A. Chiorini. 2001. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. J Virol 75:6884-93.

43. King, J. A., R. Dubielzig, D. Grimm, and J. A. Kleinschmidt. 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. Embo J 20:3282-91.

44. Klein-Bauernschmitt, P., M. von Knebel Doeberitz, M. Ehrbar, K. Geletneky, J. Kleinschmidt, and J. R. Schlehofer. 1996. Improved efficacy of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitisation of human tumour cells. Eur J Cancer 32A:1774-80.

45. Kotin, R. M., J. C. Menninger, D. C. Ward, and K. I. Berns. 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. Genomics 10:831-4.

46. Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi, and K. I. Berns. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. Proc Natl Acad Sci U S A 87:2211-5.

47. Lux, K., N. Goerlitz, S. Schlemminger, L. Perabo, D. Goldnau, J. Endell, K. Leike, D. M. Kofler, S. Finke, M. Hallek, and H. Buning. 2005. Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. J Virol 79:11776-87.

48. Maniatis, A., S. Tsakanikas, M. Stamatellou, and K. Papanastasiou. 1989. Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. Blood 74:1177.

49. Marsh, M., and A. Helenius. 1989. Virus entry into animal cells. Adv Virus Res 36:107-51.

50. Mastakov, M. Y., K. Baer, C. W. Symes, C. B. Leichtlein, R. M. Kotin, and M. J. During. 2002. Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. J Virol 76:8446-54.

51. McLaughlin, S. K., P. Collis, P. L. Hermonat, and N. Muzyczka. 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. J Virol 62:1963-73.

52. Mingozzi, F., J. Schuttrumpf, V. R. Arruda, Y. Liu, Y. L. Liu, K. A. High, W. Xiao, and R. W. Herzog. 2002. Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector. J Virol 76:10497-502.

53. Mori, S., L. Wang, T. Takeuchi, and T. Kanda. 2004. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. Virology 330:375-83.

54. Muzyczka, N. 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol 158:97-129.

55. Parks, W. P., D. W. Boucher, J. L. Melnick, L. H. Taber, and M. D. Yow. 1970. seroepidemiological and ecological studies of the adeno-associated satellite viruses. Infect. Immun. 2:716-722.

56. Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki, and A. Srivastava. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. Nat Med 5:71-7.

57. Rabinowitz, J. E., F. Rolling, C. Li, H. Conrath, W. Xiao, X. Xiao, and R. J. Samulski. 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. J Virol 76:791-801.

58. Rabinowitz, J. E. a. R. J. S. 2000. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. Virology 278:301-308.

59. Raj, K., P. Ogston, and P. Beard. 2001. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. Nature 412:914-7.

60. Rapoza, N. P., R. W. Atchinson. 1967. Association of AAV-1 with simian adenoviruses. Nature 215:1186-1187.

61. Reich, S. J., A. Auricchio, M. Hildinger, E. Glover, A. M. Maguire, J. M. Wilson, and J. Bennett. 2003. Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. Hum Gene Ther 14:37-44.

62. Rutledge, E. A., C. L. Halbert, and D. W. Russell. 1998. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. J Virol 72:309-19.

63. Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein, and L. A. Hunter. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. Embo J 10:3941-50.

64. Sanlioglu, S., P. K. Benson, J. Yang, E. M. Atkinson, T. Reynolds, and J. F. Engelhardt. 2000. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. J Virol 74:9184-96.

65. Sata, T., J. Roth, C. Zuber, B. Stamm, and P. U. Heitz. 1991. Expression of alpha 2,6-linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal human colonic mucosa. A lectin-gold cytochemical study with Sambucus nigra and Maackia amurensis lectins. Am J Pathol 139:1435-48.

66. Schnepp, B. C., K. R. Clark, D. L. Klemanski, C. A. Pacak, and P. R. Johnson. 2003. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J Virol 77:3495-504.

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

68. Smith, R. H., and R. M. Kotin. 1998. The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. J Virol 72:4874-81.

69. Smuda, J. W., and B. J. Carter. 1991. Adeno-associated viruses having nonsense mutations in the capsid genes: growth in mammalian cells containing an inducible amber suppressor. Virology 184:310-8.

70. Summerford, C., J. S. Bartlett, and R. J. Samulski. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. Nat Med 5:78-82.

71. Summerford, C., and R. J. Samulski. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. J Virol 72:1438-45.

72. Tratschin, J. D., I. L. Miller, and B. J. Carter. 1984. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. J Virol 51:611-9.

73. Weitzman, M. D., S. R. Kyostio, R. M. Kotin, and R. A. Owens. 1994. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 91:5808-12.

74. Wendtner, C. M., D. M. Kofler, H. D. Theiss, C. Kurzeder, R. Buhmann, C. Schweighofer, L. Perabo, S. Danhauser-Riedl, J. Baumert, W. Hiddemann, M. Hallek, and H. Buning. 2002. Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. Blood 100:1655-61.

75. Wistuba, A., A. Kern, S. Weger, D. Grimm, and J. A. Kleinschmidt. 1997. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. J Virol 71:1341-52.

76. Wistuba, A., S. Weger, A. Kern, and J. A. Kleinschmidt. 1995. Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. J Virol 69:5311-9.

77. Xiao, W., N. Chirmule, S. C. Berta, B. McCullough, G. Gao, and J. M. Wilson. 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol 73:3994-4003.

78. Yakobson, B., T. A. Hrynko, M. J. Peak, and E. Winocour. 1989. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. J Virol 63:1023-30.

79. Yakobson, B., T. Koch, and E. Winocour. 1987. Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. J Virol 61:972-81.

80. Yalkinoglu, A. O., H. Zentgraf, and U. Hubscher. 1991. Origin of adeno-associated virus DNA replication is a target of carcinogen-inducible DNA amplification. J Virol 65:3175-84.

81. Yan, Z., R. Zak, G. W. Luxton, T. C. Ritchie, U. Bantel-Schaal, and J. F. Engelhardt. 2002. Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. J Virol 76:2043-53.

82. Yang, G. S., M. Schmidt, Z. Yan, J. D. Lindbloom, T. C. Harding, B. A. Donahue, J. F. Engelhardt, R. Kotin, and B. L. Davidson. 2002. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. J Virol 76:7651-60.

83. Yoon, M., D. H. Smith, P. Ward, F. J. Medrano, A. K. Aggarwal, and R. M. Linden. 2001. Amino-terminal domain exchange redirects origin-specific interactions of adeno-associated virus rep78 in vitro. J Virol 75:3230-9.

84. Zabner, J., M. Seiler, R. Walters, R. M. Kotin, W. Fulgeras, B. L. Davidson, and J. A. Chiorini. 2000. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. J Virol 74:3852-8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Hallek meinen besonderen Dank ausdrücken, dass er mir die Möglichkeit gab, auf diesem vielversprechenden und aufregenden Gebiet unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen meine Doktorarbeit anzufertigen.

Besonders dankbar bin ich zudem Frau Dr. Hildegard Büning, die mich von Anfang bis zum Ende hindurch hervorragend betreut hat und mir immer ein großes Vorbild war, von der ich viel lernen konnte.

Danken möchte ich auch Herr Dr. Ulrich Hacker und Frau Dr. Susan King, die mir besonders bei den Experimenten an den Kolonkarzinomzellen behilflich waren.

Herzlichen Dank an die Arbeitsgruppe Dreyling, Neubauer, Rein und Schendel, die mir freundlicherweise Zelllinien zu Verfügung gestellt haben.

Natürlich habe ich Andreas, Bernhard, Daniela, David, Franz, Jan, Jörg, Kristin, Kerstin, Luca, Nadja, Nico, Marcus, Sandra, Tobias aus der Arbeitsgruppe Hallek nicht vergessen, die jederzeit hilfsbereit waren und die mich in schwierigen Zeiten aufgeheitert haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich hiermit meinem Vater und Großvater aussprechen, die mir während der gesamten Ausbildungszeit eine große Stütze waren.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Mutter und meinen Schwestern Marie und Tomoko und meiner Verwandtschaft in Japan, die aus der Ferne immer an mich gedacht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Annie und Beni und meinen anderen Freunden, die mir während des Studiums zur Seite standen

Lebenslauf : Lisa Wingenfeld (geb. am 17.01.1980 in München)

Schullaufbahn

1986 – 1990 Grundschule an der Schleißheimerstraße, München
1990 – 1992 Aobadai Elementary School, Yokohama
1992 – 1995 Aobadai Junior Highschool, Yokohama
1995 – 1998 Kawawa Senior Highschool, Yokohama

Studium

10/1998 – 5/2005 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2000 Physikum
08/2001 1. Staatsexamen
03/2004 2. Staatsexamen
05/2005 3. Staatsexamen

Famulaturen

Chirurgie 2001 Kitasato University Hospital, Yokohama
2002 Singapore General Hospital, Singapur
Gynäkologie 2002 Klinikum Großhadern, München
Rechtsmedizin 2002 Institut der Rechtsmedizin der Universität München
HNO 2003 Klinikum Großhadern, München

Praktisches Jahr

Innere Medizin Städt. Krankenhaus München-Harlaching (4 Monate)
Chirurgie Kitasato University Hospital, Yokohama, Japan (4 Monate)
Kinder- und Jugend- Heckscher Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychiatrie Psychotherapie des Bezirks Oberbayern, Rosenheim (2 Monate)
Kitasato University Hospital, Yokohama, Japan (2 Monate)

Dissertation

Serotypen des Adeno-assoziierten Virus und ihre potentielle Anwendung in der Gentherapie von Tumoren. Experimentelle Studie unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek und Dr. Hildegard Büning (Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln).

Publikation

Hacker, U. T., L. Wingenfeld, D. M. Kofler, N. K. Schuhmann, S. Lutz, T. Herold, S. B. King, F. M. Gerner, L. Perabo, J. Rabinowitz, D. M. McCarty, R. J. Samulski, M. Hallek, and H. Buning. Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. J.Gene Med. 2005: 7:1429-1438.

Beruf

Rechtsmedizinisches Institut der Universität Duisburg-Essen
Wissenschaftliche Mitarbeiterin seit 09/2005

München, den 24.04.2007