

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

Antiangiogene Gentherapie mittels eines
modifizierten AAV-Vektors

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

vorgelegt von
Tobias Herold

aus
Gießen

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

| | |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. Michael Hallek |
| Mitberichterstatter: | Priv. Doz. Dr. Marc Dellian Prof. Dr. Barbara Walzog |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Priv. Doz. Dr. Ulrich Hacker |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 24.07.2008 |

*Ein ehrenvolles Leben
wird nicht durch die Anzahl seiner Jahre bestimmt.*
Die Sprüche Salomons

In Gedenken an meinen Vater.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|----------------------------------------------------|----|
| 1. | Teil – Einleitung | 7 |
| 1.1. | Adeno-assoziierte Viren | 7 |
| 1.1.1. | Entdeckung | 7 |
| 1.1.2. | Systematik | 8 |
| 1.1.3. | Die Serotypen von AAV | 8 |
| 1.1.4. | Biologie von AAV-2 | 9 |
| 1.1.5. | Lebenszyklus von AAV-2 | 13 |
| 1.1.6. | AAV als Vektor für die Gentherapie | 19 |
| 1.2. | Angiogenese – Antiangiogenese - Angiostatin | 21 |
| 1.2.1. | Entdeckung und Entwicklung der Angiogenese | 21 |
| 1.2.2. | Biologie der Angiogenese | 22 |
| 1.2.3. | Angiostatin | 23 |
| 1.2.4. | Angiostatin in klinischen Studien und Perspektiven | 27 |
| 1.3. | Adeno-assoziierte Viren und Angiostatin | 28 |
| 2. | Teil – Material | 29 |
| 2.1. | Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 29 |
| 2.2. | Enzyme | 30 |
| 2.3. | Molekulargewichtsmarker für DNA | 30 |
| 2.4. | Plasmide und Nukleinsäuren | 31 |
| 2.5. | Oligonukleotide | 31 |
| 2.6. | Molekulargewichtsmarker | 32 |
| 2.7. | Antikörper | 32 |
| 2.8. | Proteine | 32 |
| 2.9. | Bakterienstämme | 33 |
| 2.10. | Medien und Zusätze für Prokaryonten | 33 |
| 2.11. | Zelllinien | 33 |
| 2.12. | Medien und Zusätze für Eukaryonten | 33 |
| 2.13. | Nachweis und Präparationssysteme | 34 |
| 2.14. | Geräte | 34 |
| 2.15. | Software | 36 |
| 2.16. | Sonstiges | 36 |
| 3. | Teil – Methoden | 38 |
| 3.1. | Kultivierung von und Arbeiten an Bakterien | 38 |
| 3.1.1. | Plattenkulturen | 38 |
| 3.1.2. | Flüssigkulturen | 38 |
| 3.1.3. | Anlegen einer Stock-Kultur | 39 |
| 3.1.4. | Herstellung elektrokompenter E. coli | 39 |
| 3.1.5. | Transformation elektrokompenter E. coli | 39 |
| 3.2. | Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren | 40 |
| 3.2.1. | Plasmidisolierung aus E. coli | 40 |
| 3.2.2. | DNA-Isolierung aus Viren | 41 |
| 3.2.3. | Endotoxinfreie Plasmidisolierung | 42 |

| | | |
|---------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4. | Elektrophoretische Auftrennung von DNA im nativen Agarosegel | 43 |
| 3.2.5. | Elektrophoretische Auftrennung von DNA im alkalischen Agarosegel | 44 |
| 3.2.6. | Southern Blot..... | 45 |
| 3.2.7. | Reinigung und Gelisolation von DNA..... | 46 |
| 3.2.8. | Konzentrationsbestimmung von DNA..... | 46 |
| 3.2.9. | Restriktionsfragmentlängenanalyse von DNA..... | 47 |
| 3.2.10. | DNA-Sequenzierung | 47 |
| 3.2.11. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 47 |
| 3.3. | Enzymatische Reaktionen an Plasmiden und DNA-Fragmenten..... | 49 |
| 3.3.1. | Spaltung von DNA mit Endonukleasen..... | 49 |
| 3.3.2. | Modifikation von DNA Fragmenten..... | 49 |
| 3.3.3. | Ligation von DNA Fragmenten..... | 50 |
| 3.3.4. | Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden | 51 |
| 3.4. | Kultivierung und Aufarbeitung von Zellen..... | 52 |
| 3.4.1. | Kultivierung von Zelllinien..... | 52 |
| 3.4.2. | Präparation von Nabelschnüren | 54 |
| 3.4.3. | Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer | 55 |
| 3.4.4. | Zellzahlbestimmung mittels AQueous One Soloution Cell Proliferation Assay .. | 55 |
| 3.4.5. | Transfektion von Zellen | 56 |
| 3.4.6. | Infektion von Zellen..... | 56 |
| 3.4.7. | Endothelzell-Assays..... | 57 |
| 3.5. | Gewinnung und Analyse von Proteinen | 58 |
| 3.5.1. | Gewinnung von Protein-Überständen..... | 59 |
| 3.5.2. | Gewinnung von Proteinen aus Zellen | 59 |
| 3.5.3. | Gewinnung von Proteinen aus Organen..... | 59 |
| 3.5.4. | Proteinanreicherung mittels StrataClean™ Resin..... | 60 |
| 3.5.5. | Proteinanalyse mittels SDS-PAGE | 61 |
| 3.6. | Adenovirusfreie Verpackung von AAV 2 und Iodixanol-Aufreinigung..... | 65 |
| 3.6.1 | Transfektion | 65 |
| 3.6.2 | Kultivierung und Ernte der Vektor produzierenden Zellen | 65 |
| 3.6.3 | Aufschluss der 293 Zellen..... | 66 |
| 3.6.4 | Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung | 66 |
| 3.6.5 | Lagerung der Viren | 67 |
| 3.6.6 | Bestimmung des genomischen Virustiters mittels Dot Blot | 67 |
| 3.7. | Statistische Methoden..... | 70 |
| 3.7.1 | Allgemeines..... | 70 |
| 3.7.2 | Durchgeführte statistische Tests..... | 70 |
| 4. | Teil - Ergebnisse..... | 71 |
| 4.1. | Selbstkomplementäre Adeno-assoziierte Viren..... | 71 |
| 4.1.1. | Allgemeines..... | 71 |
| 4.1.2. | Klonierungsstrategie des selbstkomplementären-Basis-Plasmids | 74 |
| 4.1.3. | Klonierung der GFP-Plasmide pssACMVGFP, pdsACMVGFP und pscACMVGFP | 77 |
| 4.1.4. | Virusproduktion von ssACMVGFP, dsACMVGFP und scACMVGFP | 79 |
| 4.1.5. | Analyse der viralen DNA-Struktur von ss, ds und scAGFP | 80 |

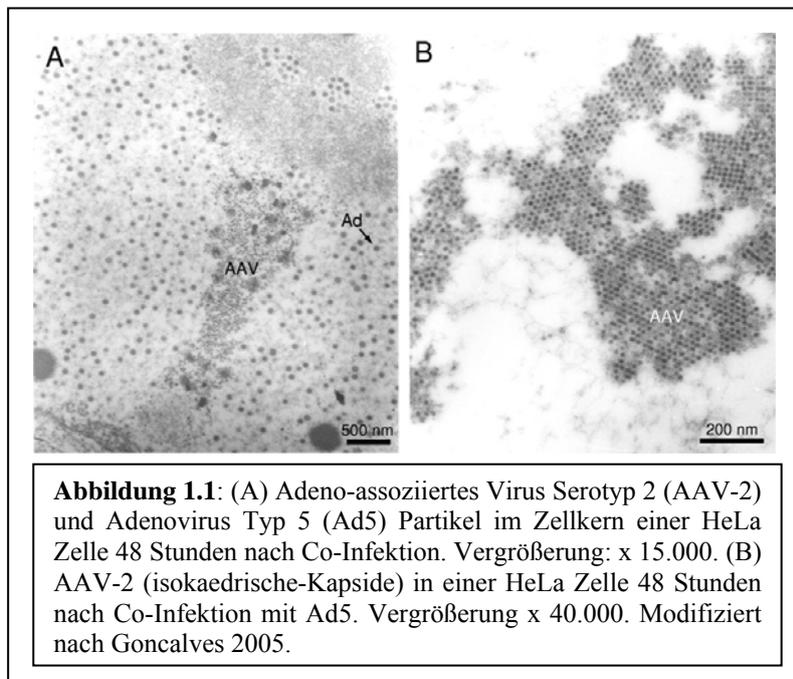
| | | |
|--------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.6. | Vergleich der GFP-Vektoren <i>in vitro</i> | 82 |
| 4.2. | Angiostatin..... | 83 |
| 4.2.1. | Ziele der Arbeiten mit Angiostatin..... | 83 |
| 4.2.2. | Vektor-Klonierungen | 83 |
| 4.2.3. | Plasmidanalyse der Klonierungen von pss/psc CMV/EF Angiostatin..... | 87 |
| 4.2.4. | Virusproduktion | 89 |
| 4.2.5. | Southern Blot..... | 90 |
| 4.2.6. | PCR | 91 |
| 4.2.7. | Angiogenese-Assays | 92 |
| 4.2.8. | Western Blot..... | 97 |
| 5. | Teil - Diskussion | 100 |
| 5.1. | Modifikation von Adeno-assoziierten Virus-Vektoren | 100 |
| 5.1.1. | Generierung und Testung von GFP-AAV-Vektoren | 100 |
| 5.1.2. | <i>Double-stranded-AAV</i> | 101 |
| 5.1.3. | <i>Self-complementary-AAV</i> | 102 |
| 5.1.4. | Beurteilung und Ausblick..... | 102 |
| 5.2. | Angiostatin-basierte antiangiogene Gentherapie..... | 103 |
| 5.2.1. | Allgemein | 103 |
| 5.2.2. | Die Rolle der antiangiogenen Gentherapie | 104 |
| 5.2.3. | Generierung und Testung antiangiogener AAV-Vektoren | 104 |
| 5.2.4. | Beurteilung und Ausblick..... | 111 |
| 6. | Teil - Zusammenfassung | 113 |
| 7. | Teil - Verzeichnis der Abkürzungen | 115 |
| 8. | Teil - Danksagung | 118 |
| 9. | Teil - Literaturverzeichnis..... | 119 |

1. Teil – Einleitung

1.1. Adeno-assoziierte Viren

1.1.1. Entdeckung

In den sechziger Jahren entdeckten verschiedene Arbeitsgruppen, die mit Simian Adenovirus Typ 15 (SV15) elektronenmikroskopische Untersuchungen durchführten, bei ihren Präparationen Verunreinigungen mit etwa 22 µm großen, isokaedrisch geformten Partikeln



(Hartley and Rowe 1960; Atchison, Casto et al. 1965; Atchison, Casto et al. 1966). Färbungen mit Acridine Orange zeigten, dass diese Partikel DNA enthielten, was den Verdacht darauf lenkte, dass es sich um Viren handeln könnte (Jamison and Mayor 1965). Daraufhin durchgeführte Versuche, Zellen mit diesen „Virus-ähnlichen-Partikeln“ zu

infizieren und so eine Vermehrung der Partikel zu erreichen, schlugen fehl. Atchison et al. konnten schließlich zeigen, dass eine Infektion stattfand und erst die Co-Infektion mit SV15 zur erfolgreichen Replikation führte. Das entdeckte Virus unterschied sich immunologisch von allen bekannten Adenoviren und wurde einer neuen Gruppe zugeordnet (Atchison, Casto et al. 1965). Aufgrund der Assoziation mit Adenoviren entstand die Bezeichnung Adeno-assoziiertes Virus (AAV) (Hoggan 1966).

1.1.2. Systematik

Adeno-assoziierte Viren werden der Familie der *Parvoviridae* zugerechnet (Siegl, Bates et al. 1985). Diese umfasst die Unterfamilien *Densovirinae*, die Invertebraten (Insekten) und *Parvovirinae*, die Vertebraten infizieren. Die *Parvovirinae* bilden die Genera *Parvovirus*, *Erythrovirus* und *Dependovirus*, zu der die Adeno-assoziierten Viren zählen (Büchen-Osmond 2003).

Die Mitglieder der Familie der *Parvoviridae* werden über ihre Größe definiert (von lateinisch: *parvum* für klein). Es handelt sich um einzelsträngige unbehüllte DNA-Viren.

Einzig bisher als humanpathogen beschriebener Vertreter der *Parvovirinae* ist das zum Genus des *Erythrovirus* zählende Parvovirus B-19, welches zu einem Erythema infectiosum, zu Arthropathien, bei hämatologisch Prädisponierten zu einer aplastischen Anämie und bei Schwangeren zum Hydrops fetalis mit Tod der Frucht führen kann (Young 1988; Fairley, Smoleniec et al. 1995; Vafaie and Schwartz 2004). Auch für AAV ist der Tod des Fötus bei einer Infektion schwangerer Mäuse beschrieben (Botquin, Cid-Arregui et al. 1994). Beim Menschen wurden AAV-Infektionen bei Spontanaborten festgestellt (Tobiasch, Rabreau et al. 1994). Inwieweit hier jedoch pathophysiologisch ein Zusammenhang besteht, ist nicht bekannt. AAV ist mit keiner bekannten Krankheit assoziiert und gilt allgemein als nicht humanpathogen (Monahan and Samulski 2000; McCarty, Monahan et al. 2001; Buning, Braun-Falco et al. 2004).

1.1.3. Die Serotypen von AAV

Als Mitglied des Genus der *Dependoviridae* lassen sich die Adeno-assoziierten Viren in eine Reihe unterschiedlicher Serotypen unterteilen. Ein Serotyp ist definiert als ein neu isoliertes Virus, das mit den für andere Serotypen neutralisierenden Antikörpern nicht kreuzreagiert.

Die ersten vier AAV-Serotypen wurden in den Sechziger Jahren als Kontaminationen von SV15-Präparationen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen entdeckt (Atchison, Casto et al. 1965; Rose, Hoggan et al. 1966; Casto 1967; Parks, Green et al. 1967). AAV-5 wurde 1984 aus genitalen Kondylomen isoliert (Bantel-Schaal and zur Hausen 1984). AAV-6, möglicherweise eine Rekombinante aus AAV-1 und AAV-2 (Xiao, Chirmule et al. 1999), wurde 1998 entdeckt (Rutledge, Halbert et al. 1998). Aus Gewebe von Rhesusaffen wurden

zuletzt im Jahre 2002 mittels PCR-Screening AAV-7 und AAV-8 isoliert (Gao, Alvira et al. 2002).

Die Serotypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Reaktion auf neutralisierende Antikörper (Huttner, Girod et al. 2003), sondern vor allem auch in ihrem natürlichen gewebsspezifischem Tropismus und ihrer Verbreitung unter Vertebraten. Während AAV-4, AAV-7 und AAV-8 hauptsächlich bei Affen gefunden wurden (Gao, Alvira et al. 2002), zeigten Untersuchungen an menschlichen Seren, dass die restlichen Serotypen womöglich beim Menschen endemisch verbreitet sind (Blacklow, Hoggan et al. 1968; Georg-Fries, Biederlack et al. 1984; Erles, Sebokova et al. 1999; Huttner, Girod et al. 2003). Es ist jedoch anzumerken, dass bisher lediglich die Serotypen 2, 3 und 5 direkt in humanem Gewebe nachgewiesen werden konnten (Blacklow, Hoggan et al. 1967; Bantel-Schaal and zur Hausen 1984; Tobiasch, Rabreau et al. 1994).

Die Unterschiede in der Kapsidstruktur der einzelnen Serotypen bedingen ein für jeden Serotyp einzigartiges gewebsspezifisches Infektionsmuster (Hacker, Wingenfeld et al. 2005). So zeigt AAV-2 einen Tropismus für viele verschiedene Gewebe, darunter Muskel- (Arruda, Stedman et al. 2004), Leber- (Xu, Sun et al. 2003; Harding, Koprivnikar et al. 2004), Gehirn- (Kaplitt, Leone et al. 1994; McCown, Xiao et al. 1996) und endotheliales Gewebe (Gnatenko, Arnold et al. 1997). AAV-2 ist jedoch im Vergleich zu AAV-5 deutlich weniger effizient beim Gentransfer in Epithelien der Lunge (Walters, Yi et al. 2001). Das erst kürzlich isolierte, bei Affen vorkommende AAV-8 zeigt eine sehr ausgeprägte Leberspezifität und birgt den Vorteil, dass aufgrund seiner isolierten Verbreitung unter Affen präformierte neutralisierende Antikörper beim Menschen wesentlich weniger wahrscheinlich sind (Gao, Alvira et al. 2002; Wang, Calcedo et al. 2005). Diese Variabilität innerhalb der AAV-Gruppe lässt eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten erahnen und für einige Zielorgane und Aufgaben werden sich bestimmte Serotypen herauskristallisieren (Rabinowitz, Bowles et al. 2004; Hacker, Wingenfeld et al. 2005, Wu, Asokan et al. 2006). Für diese Arbeit wurde das Viruskapsid von AAV-2 verwendet, die hergestellten Plasmide können jedoch in jedem anderen Serotyp verwendet werden.

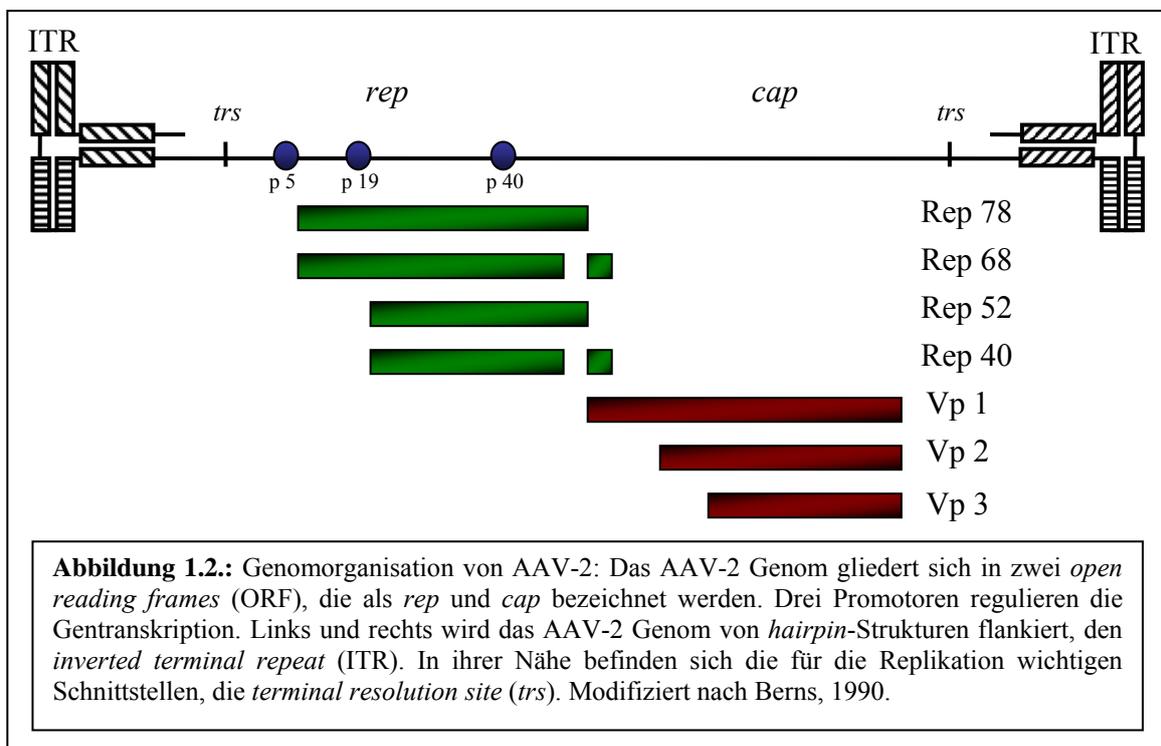
1.1.4. Biologie von AAV-2

Bei AAV-2 handelt es sich um den bisher am besten erforschten AAV-Serotyp. Anhand seiner Biologie soll der Aufbau und Lebenszyklus der Adeno-assoziierten Viren dargestellt werden, der mit Einschränkungen für alle Serotypen gilt.

1.1.4.1. Genomorganisation und Aufbau von AAV2

AAV-2 ist ein einzelsträngiges, unbekapseltes, replikationsdefizientes DNA-Virus, dessen Genom 4675 Nukleotide beinhaltet (Srivastava, Lusby et al. 1983; Cassinotti, Weitz et al. 1988). Dieses Genom umfasst zwei offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) und wird an beiden Enden jeweils von einer 145 Nukleotide umfassenden invertierten Wiederholung (*inverted terminal repeat*, ITR) flankiert (Srivastava, Lusby et al. 1983). Die ersten 125 Nukleotide der ITR stellen eine palindromische Sequenz dar und erlauben daher eine Rückfaltung. Die so entstandene Struktur wird als T-förmige Haarnadel (*T-shaped hairpin*) bezeichnet (Wang, Ponnazhagan et al. 1995).

Der (5')-ORF kodiert für vier Proteine, die nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht als Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 (*regulatory protein*, Rep) bezeichnet werden (Mendelson, Trempe et al. 1986). Rep78 und Rep68 besitzen die Fähigkeit, Strukturen der *hairpin*-DNA zu binden und an der terminalen Schnittstelle (*terminal resolution site*, TRS) einer Sequenz innerhalb der ITR zu schneiden (Endonuklease-Aktivität) (Im and Muzyczka 1992; Weitzman, Kyostio et al. 1996). Rep52 und Rep40 sind für den Zusammenbau des Virus während der Replikation zuständig (Collaco, Kalman-Maltese et al. 2003). Alle Rep-Proteine besitzen Helicase- und ATPase-Aktivität (Collaco, Kalman-Maltese et al. 2003).

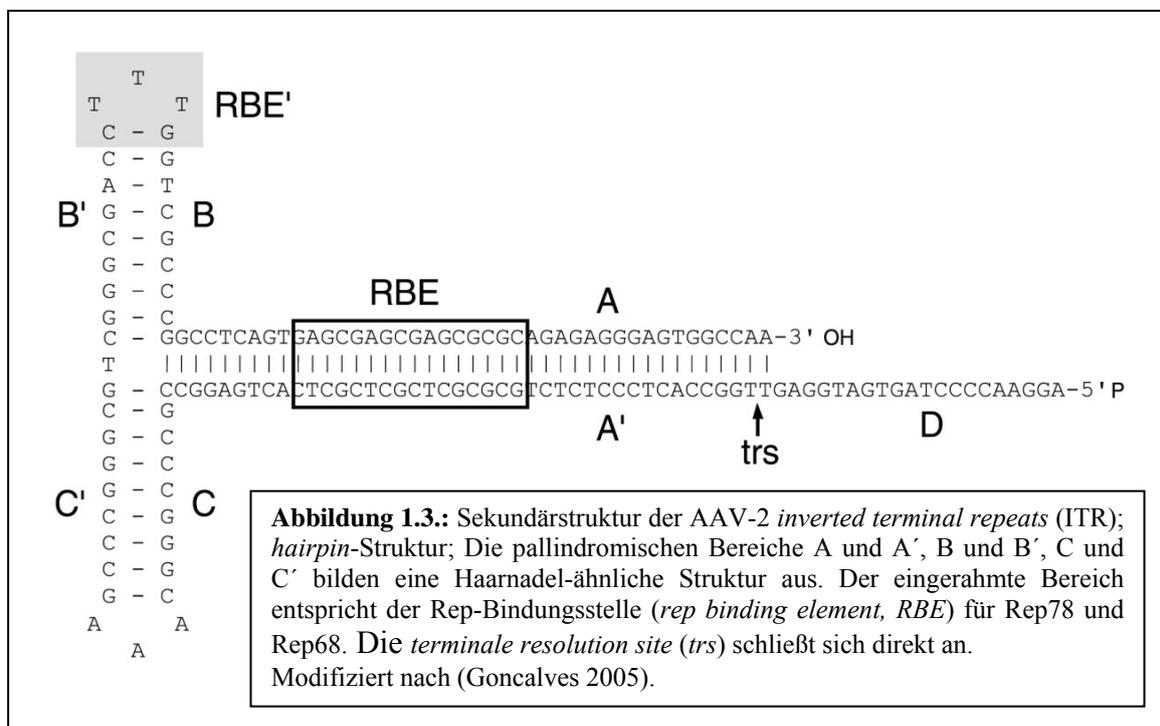


Der (3′)-ORF kodiert für drei Kapsidproteine (*capsid*, *cap*), VP1 (90kD), VP2 (72kD) und VP3 (60kD) (Becerra, Koczot et al. 1988). Der Tropismus von AAV-2 wird durch seine Kapsidproteine bestimmt. Insertionen in diesem Bereich verändern die natürliche Gewebsspezifität (Girod, Ried et al. 1999) und können die Neutralisation durch Antikörper verhindern (Huttner, Girod et al. 2003).

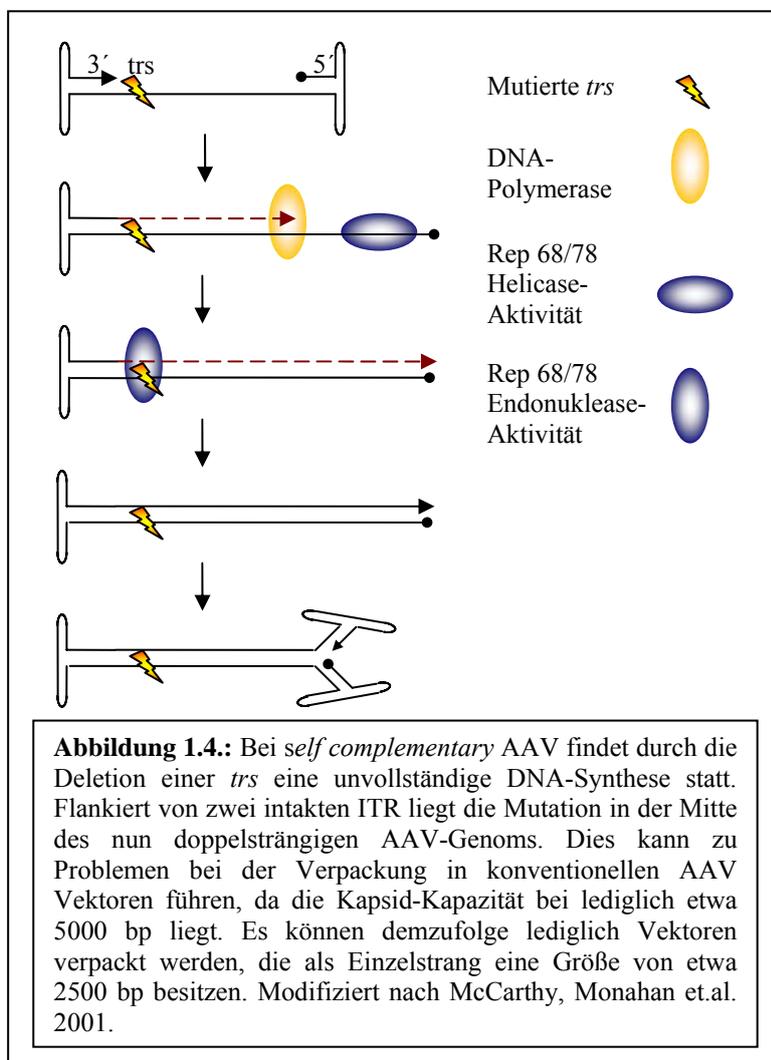
Primärrezeptor für AAV-2 ist Heparinsulfatproteoglykan (*HSPG*) (Summerford and Samulski 1998). Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (*human fibroblast growth factor receptor 1*, *hFGFR 1*) (Qing, Mah et al. 1999), das Integrin $\alpha_V\beta_5$ (Summerford, Bartlett et al. 1999) und der Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (*human hepatocyte growth factor receptor*, *hHGFR*) (Kashiwakura, Tamayose et al. 2005) fungieren als Co-Rezeptoren.

1.1.4.2. Die inverted terminal repeats, ITR

Die *inverted terminal repeats* des AAV-Genoms sind 145 Basenpaare (bp) große, das Genom flankierende Strukturen, die eine wichtige Funktion bei der AAV-DNA-Synthese, der Integration in das Wirtsgenom und beim sogenannten *rescue* ausüben. Die ersten 125 bp bilden eine palindromische Sequenz, die ihrerseits weitere palindromische Unter-Sequenzen beinhaltet (Srivastava, Lusby et al. 1983; Recchia, Perani et al. 2004).



Den einzelnen palindromischen Sequenzen wurden Buchstaben zugeordnet. Die Nukleotide 1 bis 41 (Region A) können mit den Nukleotiden 85 bis 125 (Region A') Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, die Nukleotide 42 bis 50 mit den Nukleotiden 54 bis 62 (Region B) und die Nukleotide 64 bis 72 mit den Nukleotiden 76 bis 84 (Region C). In den Regionen B und C gibt es jeweils drei Thymin- bzw. Adenosin-Reste, die keine entsprechenden Bindungspartner haben, sie bilden den oberen und unteren Bogen der Haarnadel-Struktur. Der Region D ist kein „Anti-Palindrom“ zugeordnet, sie bildet die einzelsträngige Basis der Haarnadel. Innerhalb der Region A findet sich ein (GAGC)₄-Motiv, das der Bindung von Rep-Proteinen (Rep78/68) dient. Diese Sequenz wird als Rep-Bindungsstelle (*rep binding site, rbs*) bezeichnet (Snyder, Im et al. 1993).



An Position 124 und 125 finden sich zwei Thyminde, zwischen denen Rep-Proteine, zum Beispiel bei der Replikation, einen Einzelstrangbruch verursachen (*nicking*). Diese Stelle wird als *terminale resolution site (trs)* bezeichnet. Deletiert man diese Schnittstelle auf lediglich einer der beiden ITR, so entfällt bei der DNA-Synthese (siehe auch 1.1.5.4.) der *nicking*-Vorgang auf dieser Seite.

Es entsteht eine DNA-Sequenz, die ein mutiertes ITR in der Mitte und zwei intakte ITR an jeder Seite trägt. Der DNA-Strang zwischen den ITR liegt somit doppelsträngig vor.

McCarthy et al. konnten zeigen, dass ein auf solche Weise modifiziertes selbst komplementäres Adeno-assoziiertes-Virus (*self complementary* AAV, *sc* AAV) nicht nur eine frühere Genexpression zeigt, sondern *in vitro* und *in vivo* eine wesentlich höhere

Transduktionseffizienz als bisherige einzelsträngige AAV-Vektoren besitzt (Fu, Muenzer et al. 2003; McCarty, Fu et al. 2003).

Der Grund hierfür liegt vermutlich in dem schon zu Beginn der Infektion vorliegenden Doppelstrang begründet, denn eine Infektion mit scAAV führt auch dann zur Genexpression, wenn die DNA-Synthese durch Zugabe eines Zytostatikums wie Hydroxyurea verhindert wird. Vermutlich erreicht das Virus durch eine frühzeitigere Genexpression die Möglichkeit, effektiver in solchen Zellen zu persistieren, aus denen konventionelle AAV-Vektoren eliminiert wurden (McCarty, Monahan et al. 2001; Zhong, Chen et al. 2004).

1.1.5. Lebenszyklus von AAV-2

Exemplarisch am Beispiel von AAV-2 wird im Folgenden der Lebenszyklus von Adeno-assoziierten Viren beschrieben. Viele Schritte der Virus-Zell-Interaktion sind nach wie vor unbekannt. Das hier beschriebene Modell basiert vorwiegend auf *in vitro* Ergebnissen mit der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa und der Technik des *single virus tracing* (Buning, Braun-Falco et al. 2004).

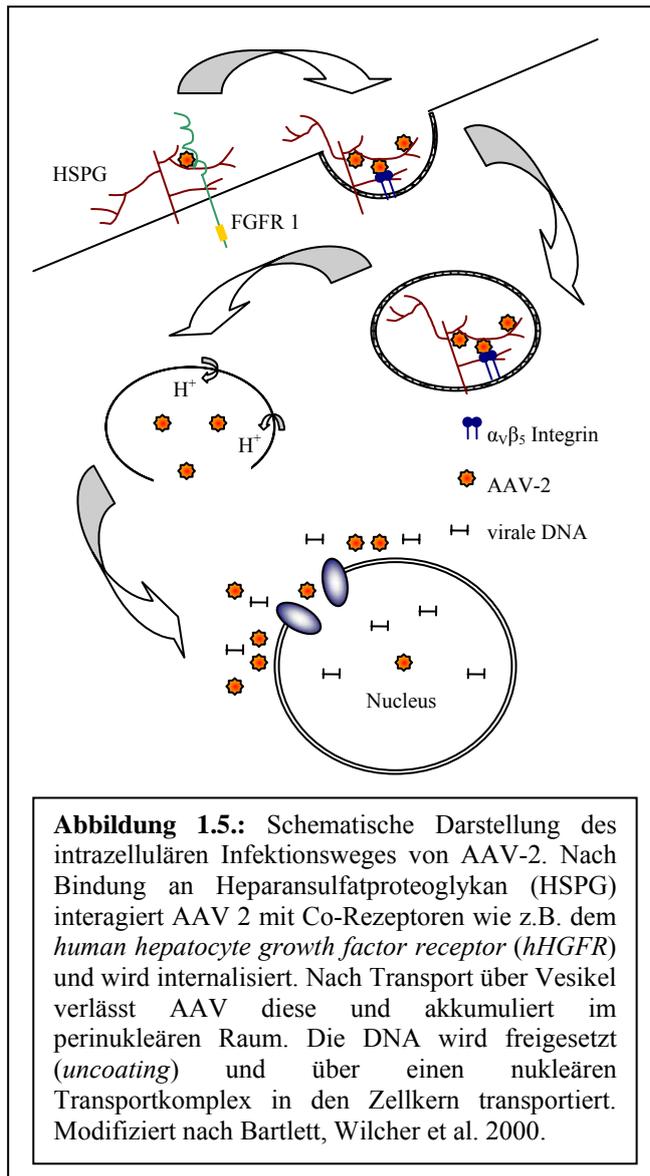
1.1.5.1. Virus - Zell-Interaktion

Adeno-assoziierte Viren diffundieren *in vitro* im Medium frei mit einer Diffusionskonstante von $D = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Kommt es zur Annäherung an eine Zelle verlangsamt sich die Bewegung und es findet ein Kontakt mit der Zellmembran statt. Entweder erfolgt nun die Aufnahme in die Zelle oder das Virus verlässt die Zelloberfläche, um nach kurzer Diffusion an einer anderen Stelle der Zellmembran erneut eine Annäherung zu starten.

Der Vorgang der Kontaktaufnahme kann sich mehrfach wiederholen. Im Durchschnitt sind 4,4 Kontaktaufnahmen nötig, bis das Virus in die Zelle aufgenommen wird (Seisenberger, Ried et al. 2001).

Vermutlich findet während der verlangsamteten Bewegung ein Kontakt mit Oberflächenstrukturen der Zelle statt. Für AAV-2 wurde Heparansulfatproteoglykan (HSPG) als Primärrezeptor ausgemacht. Es wird vermutet, dass durch HSPG eine erste Bindung an die Zelloberfläche erreicht wird (Summerford and Samulski 1998).



Um internalisiert zu werden, ist jedoch das Zusammenspiel verschiedener Co-Rezeptoren nötig.

Erst durch eine Bindung an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (*human fibroblast growth factor receptor 1, hFGFR 1*) (Qing, Mah et al. 1999), $\alpha_v\beta_5$ Integrin (Summerford, Bartlett et al. 1999) und den Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (*human hepatocyte growth factor receptor, hHGF*R) (Kashiwakura, Tamayose et al. 2005) kann AAV-2 in die Zielzelle eindringen. Die Rolle der einzelnen Co-Rezeptoren ist noch nicht vollständig geklärt. Während *hFGFR 1* wohl die Bindung von AAV-2 an *HSPG* verstärkt, ist die Bindung an $\alpha_v\beta_5$ Integrin und *hHGF*R vermutlich für den Beginn der Endozytose unabdingbar (Buning, Ried et al. 2003).

1.1.5.2. Von der Zellmembran zum Zellkern

Nach Rezeptorbindung wird AAV-2 sehr rasch mittels Clathrin-vermittelter-Endozytose in die Zelle aufgenommen (Bartlett, Wilcher et al. 2000). Um den Bindungsrezeptor bildet sich auf der intrazellulären Seite ein Netz aus Clathrin, das eine Einstülpung der Zellmembran (*pits*) bewirkt. Diese Einstülpung schreitet weiter voran, bis sich schließlich durch Abschnürung ein Vesikel bildet (Mousavi, Malerod et al. 2004). Der Transport des Vesikels zum Zellkern ist zumindest zum Teil Mikrofilament- und Mikrotubulin- abhängig, da eine Hemmung der Polymerisation dieser Proteine eine Akkumulation der AAV-2 Viren in Zellkernnähe verhindert (Sanlioglu, Benson et al. 2000). Die Vesikel werden von AAV-2 in einer frühen Phase verlassen, hierfür ist jedoch eine Absenkung des pH-Werts im endosomalen Kompartiment nötig. Schließlich akkumulieren die Viren im perinukleären

Raum. Sie setzen ihre DNA frei (*uncoating*), die über einen nukleären Transportkomplex in den Zellkern transportiert wird. Nur sehr wenige Kapside gelangen in den Nukleus. Bei adenoviraler Co-Infektion findet die Einschleusung in den Zellkern beschleunigt statt. Vermutlich fördert ein adenovirales Protein die Translokation (Xiao, Warrington et al. 2002; Ding, Zhang et al. 2005).

1.1.5.3. *Im Zellkern – Latenz oder Replikation*

Ist die AAV-DNA im Zellkern angelangt, hängt der weitere Verlauf von dem Vorhandensein von Co-Faktoren ab. Ist die Zelle intakt, integriert sich das AAV-2 Wildtyp-Virus (*wtAAV-2*) an einer spezifischen Stelle in das Wirtszellgenom. Es kommt zu einer latenten Infektion. Besteht dagegen eine Infektion mit einem Helfervirus, das sind im Falle von AAV-2 vor allem Herpes simplex Virus Typ I und II (Buller, Janik et al. 1981), Adenoviren (Bantel-Schaal and zur Hausen 1984) oder das humane Cytomegalie-Virus (CMV) (McPherson, Rosenthal et al. 1985), so kommt es zu einer Replikation von AAV. Eine Replikation findet ebenfalls statt, wenn eine mit AAV-2 latent befallene Zelle von einem Helfervirus superinfiziert wird. Es kommt zu einer Reaktivierung, wobei das AAV-Genom aus der Integrationsstelle im Wirtszellgenom „befreit“ wird (*rescue*) und die Replikation startet. Auf alle genannten Möglichkeiten wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.1.5.4. *DNA-Synthese von AAV-2*

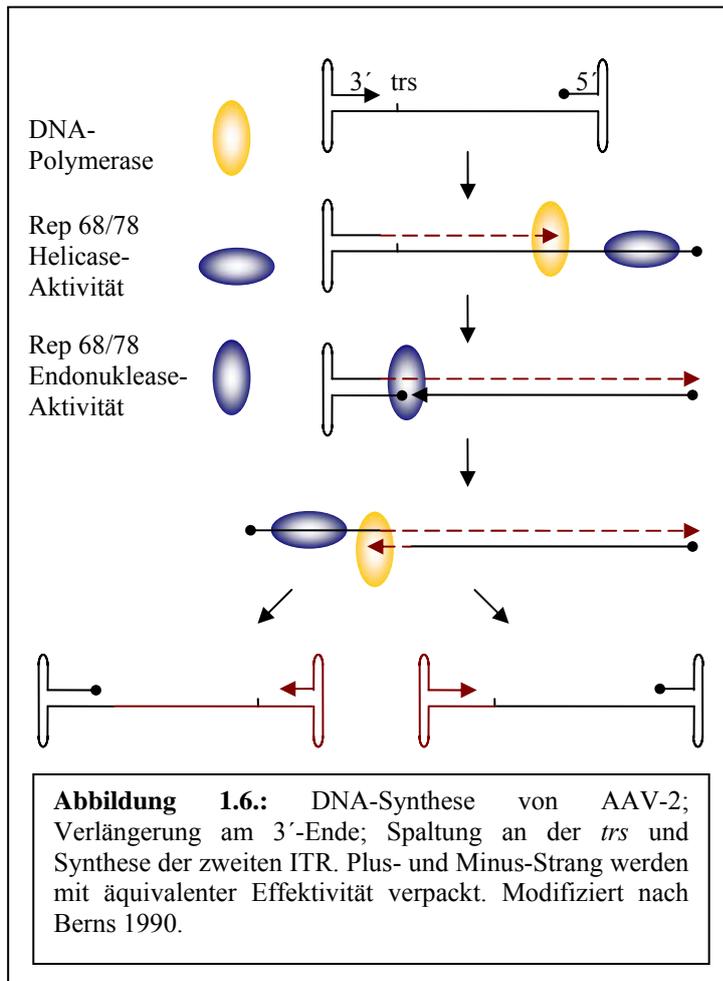
Da AAV-2 lediglich über ein einzelsträngiges DNA-Genom verfügt, ist für jede Genexpression durch das Virus die Synthese eines Doppelstrangs unabdingbar.

Diese DNA-Synthese ist zu Beginn identisch mit der DNA-Replikation bei einer Virusvermehrung, deshalb werden hier beide Synthesen gemeinsam dargestellt. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei einer latenten Infektion, wenn keine Helfervirusfunktion zur Verfügung steht, die Synthese nicht zur Vermehrung der AAV-Genome genutzt wird.

Viele Schritte der Synthese sind bisher nur in ihren Grundzügen bekannt und basieren auf Modellvorstellungen. Die Synthese selbst findet im Zellkern statt. Das AAV-Genom enthält keinen Bauplan für eine virale Polymerase. Die Synthese wird von einer unbekanntem Wirtszell-Polymerase durchgeführt. Als Startpunkt der Synthese dient das invertierte 3'-OH-Ende der ITR. Dieser vom Virus gestellte Primer wird von der Wirtszell-Polymerase

verlängert. Die gebildete Doppelstrang-DNA steht zur RNA-Synthese und damit zur Genexpression zur Verfügung (Brister and Muzyczka 2000).

Um eine komplette AAV-DNA-Neusynthese abzuschließen, sind die Funktionen von viralen Proteinen nötig. Die gegenseitige ITR wird durch Rep78/68-Proteine aufgefaltet (Helicase-Aktivität) und der von der Polymerase gebildete Gegenstrang bis zum Ende der ITR verlängert. Dort bricht die Synthese ab. Um die zweite ITR zu synthetisieren, ist ein komplexer Vorgang erforderlich.



Wie in Abschnitt 1.1.4.2. beschrieben befindet sich im Bereich der A-Palindrom-Sequenz an Position 22-33 der ITR eine Tetranukleotid-Repeat-Region (GAGC)₄, die sogenannte Rep-Bindungs-Stelle (*rep binding site*, *rbs*) (Snyder, Im et al. 1993). Hieran binden Rep78 und Rep68. Eine ATP-abhängige Isomerisation der A-Region führt zu einer Konformationsänderung, so dass die *terminale resolution site* (*trs*) an einer exponierten Position zu liegen kommt (Brister and Muzyczka 2000). Die Rep-Proteine führen einen Einzelstrangbruch an der *trs* herbei (Endonuklease-Aktivität), wodurch neue 3'- und

5'-Enden entstehen (Brister and Muzyczka 1999; Davis, Wu et al. 2000).

Nach dem Einzelstrangbruch, dem sogenannten *nicking*, bindet Rep68 kovalent an das neu entstandene 5'-Ende (Snyder, Im et al. 1990) und entfaltet die ITR (Helicase-Aktivität). An dem nach dem Strangbruch entstandenen neuen 3'-Ende kann die Wirtszell-Polymerase nun auch die zweite ITR synthetisieren. Der Replikationsvorgang ist beendet.

Es liegen jetzt zwei Stränge unterschiedlicher Polarität vor. Die als (+)- und (-)- Strang bezeichneten viralen Genome werden mit äquivalenter Effizienz verpackt (Siegl, Bates et al.

1985; Berns 1990) und können nach Trennung und Rückfaltung als Vorlage zur weiteren DNA-Synthese dienen.

1.1.5.5. *Latenz von AAV-2 in der Wirtszelle und spezifische Genomintegration*

In Abwesenheit von Helferviren findet keine Virusvermehrung statt und das AAV-Virus versucht sich in das Wirtszell-Genom zu integrieren. Die virale Genexpression wird herunter reguliert (Pereira, McCarty et al. 1997). Gelingt die Integration nicht, wird das Virus eliminiert.

Als bisher einziges bekanntes Vertebraten-infizierendes DNA-Virus integriert *wtAAV-2* an einer spezifischen Stelle in das Genom höherer Affen und Menschen (Hamilton, Gomos et al. 2004; McCarty, Young et al. 2004; Recchia, Perani et al. 2004). Diese Stelle wird als *AAVSI* bezeichnet (Philpott, Gomos et al. 2002) und befindet sich auf dem humanen Chromosom 19, genauer zwischen der Position q13.3 und qter (Kotin, Menninger et al. 1991; Samulski, Zhu et al. 1991). Dutheil et al. konnten das Transkript dieser Region als Teil des muskelzellspezifischen *slow skeletal troponin T gene (TNNT1)* identifizieren (Dutheil, Shi et al. 2000).

Der genaue Vorgang der ortsspezifischen Integration ist noch nicht verstanden, jedoch konnten Teile des Vorgangs aufgeklärt werden (McCarty, Young et al. 2004).

Ähnlich des palindromischen Abschnittes A der *ITR* befindet sich in der Sequenz der *AAVSI* ebenfalls ein $(CAGC)_4$ -Motiv, welches als Rep-Bindungsstelle dient. Zudem weist die *AAVSI*-Sequenz eine *trs*-ähnliche-Schnittstelle in etwa gleichem Abstand zu *rbs* auf, wie dies im AAV-Genom der Fall ist (Linden, Winocour et al. 1996). Weitzman et al. konnten zeigen, dass Rep68 nicht nur an der Rep-Bindungsstelle im Bereich der *ITR* bindet, sondern auch an der *rbs*, die sich innerhalb der *AAVSI*-Sequenz befindet. Durch eine gleichzeitige Bindung von Virus-DNA und Wirtszell-Genom durch einen Komplex aus Rep78/68 kommt es zur Annäherung der beiden DNA-Stränge (Weitzman, Kyostio et al. 1994). Analog der in 1.1.5.4. beschriebenen Vorgänge bei der AAV-DNA-Synthese erfolgt nun ein Einzelstrangbruch durch Rep (*nicking*) an der *trs* der *AAVSI*-Sequenz. Es folgt eine DNA-Synthese von Teilen der *AAVSI*-Sequenz. Im Folgenden kommt es zu einer Inversion der neusynthetisierten *AAVSI*-Sequenz und das AAV-Genom wird eingefügt. Im vorletzten Schritt wird der synthetisierte freie Strang durch einen erneuten Matrizenwechsel wieder mit der *AAVSI*-Stelle verbunden und in das Wirtszell-Genom integriert. Zum Schluss erfolgt

eine Reparatur der DNA-Struktur und die abschließende Zweitstrangsynthese (Linden, Ward et al. 1996; Linden, Winocour et al. 1996; McCarty, Young et al. 2004).

1.1.5.6. *Reaktivierung von AAV aus einer latent infizierten Zelle*

Hat AAV-2 eine Zelle latent infiziert, kann es auch noch nach 100 Passagen wieder reaktiviert werden (McCarty, Young et al. 2004). Dieser Vorgang der Reaktivierung wird als *rescue* bezeichnet. Abhängig ist dieser Vorgang von einer Superinfektion mit Helfervirus. Wie AAV eine Superinfektion detektiert, ist vollkommen unbekannt, für den Vorgang des *rescue* konnte jedoch ein Modell erstellt werden.

Um AAV gentherapeutisch nutzbar zu machen, müssen große Mengen an Virus produziert werden. Dies wird mit der Tripel-Plasmid-Transfektion erreicht (siehe Material und Methoden 3.6.). Auf einem der drei transfizierten Plasmide befindet sich das therapeutische Gen, links und rechts von ITR flankiert. Dieses AAV-Konstrukt wird aus dem Plasmid wahrscheinlich in ähnlicher Weise wie die genomintegrierte AAV-Form befreit.

Der *rescue*-Vorgang führt zunächst zu einem Einzelstrangbruch innerhalb des integrierten AAV-Genoms, der von Rep-Proteinen gesteuert wird und analog zu den oben beschriebenen Replikationsvorgängen an der *terminal resolution site* (zwischen Position 124 und 125 des AAV-Genoms) im Bereich der ITR stattfindet.

Es folgt die Replikation der Basen 124 bis 1. Der einzelsträngige Matrizenstrang faltet sich gemäß seiner palindromischen Sequenz (A, B, C, A', D) in Haarnadel-Konfiguration. Die Faltung wird durch die Bindung von Rep-Proteinen an die Spitze der Haarnadelschleife unterstützt (Ryan, Zolotukhin et al. 1996).

Der neu synthetisierte Strang löst sich von der Matrize, so dass insgesamt drei DNA-Stränge vorliegen (der abgelesene Matrizenstrang, der ursprüngliche Komplementärstrang, an dem der initiale Strangbruch erfolgt und der neu synthetisierte DNA-Strang).

Der Matrizenstrang wird nun gewechselt und für die Vervollständigung der Replikation wird der ursprüngliche Komplementärstrang verwendet, während der ursprüngliche Matrizenstrang in Haarnadel-Konfiguration gefaltet bleibt. Nach vollständiger Synthese des neuen DNA-Teilstücks kann sich dieses ebenfalls gemäß seiner Komplementarität zu einem *hairpin* falten. Analog den Vorgängen bei der AAV-DNA-Synthese dient sich der zu replizierende DNA-Strang nun selbst als Primer und es kommt zu einer Replikation des gesamten integrierten AAV-Genoms. Das doppelsträngige Produkt besteht aus neu synthetisierter DNA und Teilen

der in das Wirtszell-Genom eingebauten DNA und kann nun eine Virusvermehrung initiieren (Ward, Elias et al. 2003).

1.1.5.7. Virusvermehrung

Die Virusvermehrung hängt eng mit der Synthese viraler Proteine zusammen, deshalb soll an dieser Stelle auf die Kinetik der AAV-Proteinsynthese eingegangen werden. Die folgenden Angaben zur Kinetik beziehen sich auf Messungen, die bei gleichzeitiger Infektion von 293 Zellen mit AAV und Adenovirus ermittelt wurden.

Als erstes Rep-Protein ist Rep78 nach bereits etwa 4 Stunden nachweisbar. Rep78 wird eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und Suppression zugesprochen (Pereira, McCarty et al. 1997). Nach 10 bis 12 Stunden ist außer Rep78 auch Rep52 nachweisbar, zwei Stunden später Rep68 und Rep40. Die Synthese der Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 zeigt eine analoge Kinetik zu Rep68 und Rep40. Ein Maximum der Protein-Synthese wird nach etwa 20 Stunden erreicht zusammen mit der maximalen Doppelstrang-AAV-DNA-Synthese, wohingegen die größte Menge an AAV-Einzelstrang erst etwa vier Stunden später nachweisbar ist (Redemann, Mendelson et al. 1989).

Der Zusammenbau der Kapside findet im Bereich des Nukleolus statt. Die aus VP1, VP2 und VP3 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:8 zusammengesetzten leeren Viruskapside erhalten am ehesten im Nukleoplasma die einzelsträngige DNA, mit der sie dann als vollständige AAV-Viren die Zelle verlassen können (Wistuba, Kern et al. 1997; Kronenberg, Kleinschmidt et al. 2001).

1.1.6. AAV als Vektor für die Gentherapie

„Gentherapie ist eine sich in der Entwicklung befindliche Behandlungsform genetisch bedingter Erkrankungen durch gezielte Veränderungen der Erbsubstanz des Menschen“ (Brockhaus).

„We have previously shown correction of X-linked severe combined immunodeficiency [SCID-X1] in 9 out of 10 patients by retrovirus-mediated gene transfer into autologous CD34 bone marrow cells. However, almost 3 years after gene therapy, uncontrolled exponential clonal proliferation of mature T cells has occurred in the two youngest patients. Both patients'

clones showed retrovirus vector integration in proximity to the LMO2 proto-oncogene promoter, leading to aberrant transcription and expression of LMO2. Thus, retrovirus vector insertion can trigger deregulated premalignant cell proliferation with unexpected frequency, most likely driven by retrovirus enhancer activity on the LMO2 gene promoter.”(Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003)

„The advent of viral gene therapy has brought adeno-associated Virus (AAV) into the limelight of virus research.”(McCarty, Young et al. 2004)

Der Begriff Gentherapie etwas weiter gefasst bedeutet lediglich das Einbringen von fremder DNA in eine Zelle, um durch die Expression von Proteinen eine gewünschte Wirkung zu erzielen. Hierfür gibt es eine ganze Reihe von Möglichkeiten. Eine davon ist der virale Gentransfer. Über Jahrmillionen haben Viren gelernt, sich in Zellen einzuschleichen und zelleigene Prozesse zu nutzen. Diese Viren als „trojanische Pferde“ zu verwenden, ist ein zentraler Ansatz der viralen Gentherapie.

Gentherapie, egal welcher Art, ist nicht ungefährlich. Das intakte Genom ist ein fragiles System. Eine kleine Veränderung reicht aus und eine Zelle gerät außer Kontrolle. Eine maligne Erkrankung kann die Folge sein (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003).

Derzeit sind 16044 genetische Erkrankungen bekannt (McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine 2000). Etwa 10% aller stationären Behandlungen erfolgen aufgrund einer genetisch bedingten Erkrankung (Harrison 2003).

Es gibt bisher keine etablierten Heilungsmöglichkeiten für genetische Erkrankungen, auch wenn sich einige inzwischen ohne Korrektur des Defektes, zum Beispiel durch Substitution des fehlenden Proteins, wie bei der Hämophilie A/B, behandeln lassen (Auerswald, von Depka Prondzinski et al. 2004). Die Ursache der jeweiligen Krankheit bleibt das defekte Gen und nur dessen Korrektur kann Heilung bedeuten.

Adeno-assoziierte Viren sind ein viel versprechendes Vektorsystem für eine virale Gentherapie. Sie bieten eine Reihe von Vorteilen wie fehlende Humanpathogenität und dauerhafte Genexpression. Ihr wichtigster Vorteil könnte jedoch sein, dass sie sich spezifisch in das Genom integrieren. So ist ein Kontrollverlust der zellulären Regulation durch zufällige Integration in sensiblen Bereichen eher unwahrscheinlich (Le Bec and Douar 2006).

Eine Reihe von Problemen steht einem breitem Einsatz im Wege. Zum einen ist AAV ein sehr kleines Virus und hat nur eine beschränkte Kapazität. Außerdem sind bei bis zu 80% der Bevölkerung neutralisierende Antikörper nachweisbar (Erles, Sebokova et al. 1999), so dass

eine Therapie ohne weiteres nicht möglich wäre. Die Integration in das Genom geschieht selten, betrifft nur *wtAAV* und ist derzeit noch nicht steuerbar. Der Tropismus von AAV ist sehr breit. Hieraus leitet sich eine geringe Spezifität ab.

Eine Reihe von Problemen, die jedoch nicht unüberwindbar sind. Es ist möglich, auch große Gene mit AAV zu transportieren (Goncalves, van Nierop et al. 2005). Veränderungen am AAV-Kapsid können eine Erkennung durch präformierte Antikörper verhindern (Huttner, Girod et al. 2003). Durch Insertionen von Liganden an bestimmten Stellen des Kapsids kann der Tropismus von AAV verändert und auf spezifische Gewebe umgelenkt werden (Girod, Ried et al. 1999).

Das Therapiespektrum viraler Gentherapie beinhaltet auch einen Einsatz bei malignen Erkrankungen. Durch direkte Infektion der malignen Zelle kann Tumorzellwachstum gestoppt oder durch einbringen von Selbstmordgenen eine Apoptose induziert werden. Bei generalisierten Prozessen kann z. B. durch Expression von antiangiogenen Substanzen eine Hemmung der Neoangiogenese erreicht werden und somit Tumorzellwachstum inhibiert werden (Raj, Ogston et al. 2001; Ma, Lin et al. 2002).

Die Weiterentwicklung von Vektorsystemen stellt für die Fortschritte bei der Gentherapie den entscheidenden Faktor dar. Adeno-assoziierte Viren gehören zu den viel versprechendsten Kandidaten auf diesem Gebiet (Buning, Braun-Falco et al. 2004; Harding, Koprivnikar et al. 2004; McCarty, Young et al. 2004; Recchia, Perani et al. 2004; Sarkar, Tetreault et al. 2004; Ding, Zhang et al. 2005; Wang, Calcedo et al. 2005).

1.2. Angiogenese – Antiangiogenese - Angiostatin

1.2.1. Entdeckung und Entwicklung der Angiogenese

Die Tatsache, dass Tumoren eine vom normalen Gewebe sich unterscheidende Gefäßstruktur aufweisen, ist seit Jahrhunderten bekannt. Vor allem Chirurgen waren mit diesem unvorhersehbaren Blutungsrisiko durch Gefäßaberrationen konfrontiert (Ferrara 2002). Bereits 1939 postulierten Ide et al. die Existenz eines tumorinduzierten Blutgefäßwachstum stimulierenden Faktors (Ide, Baker et al. 1939). Einige Jahre später zeigten Algire et al., dass das rasche Wachstum eines Tumortransplantates bei Mäusen auf ein ebenso rasches

Gefäßwachstum angewiesen ist (Algire, Chalkley et al. 1945; Algire, Chalkley et al. 1950). Lange Zeit blieb es still auf dem Gebiet der Angiogenese, bis 1968 erste Experimente darauf hindeuteten, dass Gefäßwachstum durch Tumoren mittels Wachstumsfaktoren stimuliert wird (Ehrmann and Knoth 1968; Greenblatt and Shubi 1968).

1971 war J. Folkman der Erste, der in gezielter Antiangiogenese eine mögliche Therapieoption für die Behandlung von Krebserkrankungen erkannte (Folkman 1971). Auf der Basis seiner Hypothese erfolgte die Entdeckung und Isolierung von „*tumor angiogenesis factor*“ aus humanen und murinen Tumoren (Folkman, Merler et al. 1971).

Nach und nach wurden mehr und mehr Faktoren mit Einfluss auf das Gefäßwachstum entdeckt, unter ihnen stimulierende Faktoren wie *epidermal growth factor (EGF)* (Gospodarowicz, Brown et al. 1978), *transforming growth factor α* und *β* (*TGF- α , $-\beta$*) (Roberts, Sporn et al. 1986) und *vascular endothelial growth factor (VEGF)* (Leung, Cachianes et al. 1989), aber auch hemmende wie *tumor necrosis factor- α* (*TNF- α*) (Frater-Schroder, Risau et al. 1987), *angiogenin* (Palmer, Scheraga et al. 1986; Folkman and Klagsbrun 1987) *angiostatin* (O'Reilly, Holmgren et al. 1994) und *endostatin* (O'Reilly, Boehm et al. 1997). Viele dieser Faktoren haben inzwischen ihre Wirksamkeit in präklinischen Studien bewiesen (O'Reilly, Holmgren et al. 1996; Boehm, Folkman et al. 1997; Ferrara 2004) und dies nicht nur in der Krebstherapie, sondern auch bei anderen mit pathologischer Gefäßneubildung assoziierten Krankheiten. Dazu gehören die diabetische Retinopathie (van Wijngaarden, Coster et al. 2005), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) (Emanuelli and Madeddu 2004) oder chronische Entzündungen (Bonnet and Walsh 2005).

Vor allem viele der antiangiogenen Faktoren werden gegenwärtig in klinischen Studien geprüft (National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov, <http://clinicaltrials.gov>). Ein Antikörper gegen *VEGF (Bevacizumab)* konnte als erste antiangiogene Substanz, die aus dieser Entwicklung hervorgegangen ist, einen deutlichen Überlebensvorteil in Kombination mit konventioneller Chemotherapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom zeigen (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004).

1.2.2. Biologie der Angiogenese

Nahezu jede Zelle des Körpers befindet sich in direkter Nachbarschaft zu einem kapillären Blutgefäß oder nicht weiter davon entfernt als 100 bis 200 μm , was der mittleren Diffusionsstrecke von Sauerstoff entspricht. Kapillaren mit einem Durchmesser von 8 bis 20

um sind von einer Schicht aus Endothelzellen ausgekleidet. Diese Zellen bedecken mit ungefähr 1000 m² etwa die Fläche eines Tennisplatzes. Eine Proliferation vaskulärer Endothelzellen ist unter normalen Bedingungen kaum nachweisbar, weniger als 0,01 Prozent der Endothelzellen befinden sich im mitotischen Zellzyklus. Die Lebensdauer von Endothelzellen liegt bei mehr als 1000 Tagen und kann in Gefäßen der Retina 5000 Tage betragen. Endothelzellen sind also unter normalen Bedingungen ruhende, stabile Zellen. Sie können jedoch aus diesem Ruhezustand erwachen und sich bei der Bildung neuer Blutgefäße sehr rasch teilen. Diesen Vorgang nennt man Angiogenese und er führt zur Neovaskularisierung.

Die physiologische Angiogenese wird strikt reguliert und ist von begrenzter Dauer. Sie ist essenziell für Embryonalentwicklung und Reproduktion. Beim Erwachsenen ist die Angiogenese bei der Wundheilung und beim Muskelaufbau auf Tage oder Wochen beschränkt (Harrison 2003).

Die pathologische Angiogenese verläuft im Gegensatz hierzu meistens kontinuierlich und ungebremst. Sie ist häufig verursacht durch Entzündungen oder Tumoren.

Autopsiestudien an Menschen, die zu Lebzeiten nie unter Krebs litten, haben gezeigt, dass Mamma-, Prostata- und Schilddrüsenkarzinome bei zum Teil über 90 Prozent der 50- bis 70-Jährigen mikroskopisch (*In-situ*-Läsionen) nachweisbar sind (Harach et al 1985, Soos et al. 2005, Sanchez-Chapado et al. 2003).

Die meisten menschlichen Tumoren entstehen also ohne angiogene Aktivität. Sie existieren über Jahre und Jahrzehnte als *In-situ*-Läsionen von mikroskopischer Größe mit einem Durchmesser von 0,2 bis 2 mm. Die klinisch manifesten Inzidenzen der oben genannten Karzinome liegen in der Gesamtbevölkerung bei etwa einem Prozent. Nur ein kleiner Prozentsatz der *In-situ*-Läsionen kann im Verlauf auf einen angiogenen Phänotyp umschalten (Folkman 1995). Die strikte Kontrolle der Angiogenese stellt also einen Schutzwall dar. Erst der „*angiogenic switch*“, die Verschiebung des Gleichgewichts hin zum Überwiegen der proangiogenen Moleküle, führt zur Entstehung klinisch manifester Tumoren (Carmeliet and Jain 2000; Harrison 2003).

1.2.3. Angiostatin

Wie in 1.2.2 beschrieben, stellt das Gefäßsystem ein Gleichgewicht an angiogenen Faktoren dar, das auf einer niedrigen Produktion proangiogener und einer Überproduktion antiangiogener Faktoren beruht (Folkman and Klagsbrun 1987). Endogene Inhibitoren der

Angiogenese sind physiologisch vorkommende Proteine, die der Bewahrung des Gleichgewichts dienen. Tumorwachstum kann ebenfalls mit einer Bildung dieser Proteine einhergehen. Es ist bekannt, dass bei manchen Krebserkrankungen die Entfernung des Primärtumors mit einem plötzlichen, schnellen Wachstum von Metastasen einhergehen kann und dass eine Tumorerkrankung (z.B. Brustkrebs) eine andere am Wachsen zu hindern vermag (z.B. malignes Melanom) (Folkman 1995; Harrison 2003). Diese klinische Beobachtung legt nahe, dass ein Primärtumor endogene Faktoren produzieren kann, die ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern. Angiostatin ist ein solcher endogener Angiogenese-Inhibitor. Es kann primäres und metastatisches Wachstum von Tumoren durch Blockierung der Gefäßanbindung verhindern (O'Reilly, Holmgren et al. 1994). In Tierexperimenten zeigte Angiostatin ausgesprochen potente Antitumoraktivität (O'Reilly, Holmgren et al. 1996) und wird derzeit in klinischen Studien auf seine Wirksamkeit beim Menschen untersucht (Cao and Xue 2004).

Angiostatin ist ein endogenes Protein, ein proteolytisches Fragment aus Plasminogen (O'Reilly, Holmgren et al. 1994). Es setzt sich aus mehreren Kringel-Domänen zusammen, die im Folgenden beschrieben werden.

1.2.3.1. *Kringel-Domänen von Angiostatin*

Angiostatin besteht aus den ersten vier *Kringel*-Domänen (K) des Plasminogens (Cao, Ji et al. 1996). *Kringel*-Domänen sind Aminosäuretertiärformen, die aus Tripel-Ring-Strukturen, welche durch drei Disulfidbrückenpaare verbunden sind, gebildet werden. Die Aminosäuresequenz eines *Kringels* umfasst etwa 80 Aminosäuren. Kringelstrukturen sind häufige Bestandteile von Proteinen. Ihre genaue Funktion ist nicht bekannt. Jedoch sind viele antiangiogene Proteine aus Kringel-Domänen aufgebaut und werden durch limitierte Proteolyse aus einem größeren Vorläuferprotein herausgeschnitten, was die Vermutung nahe legt, dass Kringel-Domänen eine wichtige Rolle in der Funktion dieser Proteine spielen (Cao, Cao et al. 2002).

Aminosäureanalysen von Angiostatin zeigen eine etwa 50-prozentige Homologie von K1, K2, K3 und K4 untereinander. Kristallografische Untersuchungen zeigen ebenfalls einen hohen Grad an Konformität (Abad, Arni et al. 2002).

Untersuchungen der einzelnen Kringel-Domänen auf ihr antiangiogenes Potential ergaben, dass K1 der potenteste Inhibitor ist, gefolgt von K3 und K2. K4 alleine konnte *in vitro* keine Inhibition erreichen. Es zeigte sich, dass eine kürzere Variante des Angiostatins, die lediglich

die Domänen K1 bis K3 beinhaltet, höhere antiangiogene Aktivität besitzt als das ursprünglich entdeckte Angiostatin Molekül (K1-4). Diese verkürzte Angiostatin-Variante wird zurzeit in einer klinischen Prüfung untersucht. Inwieweit eine Verkürzung des Moleküls Einfluss auf die Plasmahalbwertszeit hat, ist unbekannt. Vermutlich dürfte sie bei der K1-3 Variante verkürzt sein (Cao and Xue 2004).

Die Kringelstruktur des Angiostatins ist für dessen Wirkung essentiell. Veränderung der Faltung bzw. der Disulfidbrücken führen zu einem völligen Verlust der inhibitorischen Aktivität. Zum Beispiel muss von Bakterien produziertes Angiostatin erneut korrekt gefaltet werden, um Endothelzellwachstum zu hemmen (Cao and Xue 2004).

Plasminogen trägt insgesamt 5 Kringel-Domänen. Kringel 5, der hohe Homologien zu den anderen Kringel Domänen aufweist, wurde ebenfalls auf seine antiangiogenen Eigenschaften getestet. Überraschend zeigte sich, dass K5 den mit Abstand stärksten antiangiogenen Effekt vermittelt, der selbst den des K1-3 Fragments übertrifft (Cao, Chen et al. 1997).

Es lässt sich somit in Bezug auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten ein *ranking* der Angiostatin Fragmente aufstellen: K5> K1-3> K1-4> K1> K3> K2> K4. Zu betonen ist, dass diese Daten sich auf *in vitro*-Tests beziehen und *in vivo* der antiangiogene Effekt von K5 vermutlich aufgrund der verkürzten Plasmahalbwertszeit kaum nachweisbar ist (Cao and Xue 2004). Es konnte demonstriert werden, dass ein Fragment aus K1-5 eine ebenfalls sehr hohe antiangiogene Wirkung im *in vitro* Versuch zeigte (Cao, Wu et al. 1999).

1.2.3.2. *Proteolytische Angiostatin-Fragmente*

Wie bereits in Kapitel 1.2.3.1. angedeutet, handelt es sich bei dem Begriff Angiostatin um eine unscharfe Proteinbezeichnung. Als Fragment des Vorläuferproteins Plasminogen stellt es eine so genannte kryptische Struktur dar, also eine in einem Vorläufermolekül mit gänzlich anderer Funktion verborgene Sequenz. Zellen sezernieren also kein Angiostatin, sie produzieren verschiedenste Proteasen, die zirkulierendes Plasminogen schneiden, um Angiostatin freizusetzen. Da diese Proteasen Plasminogen an unterschiedlichen Stellen spalten, entstehen eine ganze Reihe unterschiedlicher Moleküle, die aufgrund ihres inhibitorischen Effektes auf Endothelzellen und ihrer Herkunft aus Plasminogen als Angiostatin bezeichnet werden.

1.2.3.3. *Entstehung von Angiostatin in vitro und in vivo*

So verschieden die unterschiedlichen Angiostatin-Fragmente sind, so verschieden sind die Wege ihrer Generierung. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den gegenwärtigen Stand des Wissens.

| Enzyme | Produkt | Referenz |
|----------------------------------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Matrix-Metalloproteinasen (MMP) | | |
| MMP-2/Gelatinase A | K1-3 | (O'Reilly, Wiederschain et al. 1999) |
| MMP-3/Stromelysin | K1-4, K5 | (Lijnen, Ugwu et al. 1998) |
| MMP-7/Matrilysin | K1-4 | (Patterson and Sang 1997) |
| MMP-9/Gelatinase B/Typ IV Kollagenase | K1-4 | (Patterson and Sang 1997) |
| MMP-12 | K1-3 | (Dong, Kumar et al. 1997) |
| Elastase | | |
| Elastase | K1-3, K1-4, K4, K5 | (Sottrup-Jensen, Zajdel et al. 1975; Takada, Sugawara et al. 1988; Cao, Chen et al. 1997) |
| Elastase + Pepsin | K5, K1, K2-3 | (Novokhatny, Kudinov et al. 1984) |
| Elastase + Chymotrypsin | K1 | (Lerch, Rickli et al. 1980) |
| Elastase + Staphylokokkus aureus V8 Protease | K1 | (Motta, Laursen et al. 1986) |
| Elastase + Streptokinase | K5 | (Vali and Patthy 1984) |
| Plasmin | | |
| Plasmin Autodigestion | K1-3, K1-4, K1-5, K1 | (Gately, Twardowski et al. 1997; Falcone, Khan et al. 1998; Cao, Wu et al. 1999; Stathakis, Lay et al. 1999; Kassam, Kwon et al. 2001; Kwon, Yoon et al. 2001) |
| Andere | | |
| 13 kDa Serinprotease | K1-5 | (Li, Yang et al. 2000) |
| 24 kDa Endopeptidase | K1-4 | (Lijnen, Van Hoef et al. 2000) |
| Cathepsin D | K1-4 | (Morikawa, Yamamoto et al. 2000) |
| Prostata spezifisches Antigen (PSA) | K1-4 | (Heidtmann, Nettelbeck et al. 1999) |

In vivo spielt wahrscheinlich die Freisetzung durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) die größte Rolle. In gesundem Gewebe konnte Angiostatin bisher nicht nachgewiesen werden, was die Vermutung nahe legt, dass es durch tumorspezifische Proteasen gebildet wird (Cao and Xue 2004).

1.2.3.4. *Antiangiogener Mechanismus von Angiostatin*

Angiostatin übt einen apoptotischen Effekt auf proliferierende Endothelzellen aus. Dies scheint die Ursache der *in vivo* gezeigten antiangiogenen Wirkung zu sein (Lucas, Holmgren et al. 1998; Hari, Beckett et al. 2000).

Screening-Verfahren zeigten eine Bindung von Angiostatin (K1-4) an ein bis dato unbekanntes Protein, welches als Angiomotin bezeichnet wird (Troyanovsky, Levchenko et al. 2001). Mutationen in einer Protein-Erkennungsdomäne von Angiomotin in Endothelzellen führten *in vitro* zu einem Verlust der Fähigkeit, gefäßähnliche Strukturen zu bilden. In einem transgenen Mausmodell führte diese Mutation zum Tode der Embryonen am Tag 9 (Levchenko, Aase et al. 2003). Ob Angiomotin Bestandteil einer zellulären Kaskade ist und welche Rolle die Bindung an Angiostatin spielt ist unbekannt.

Im Gegensatz hierzu zeigten Moser et al., dass Angiostatin an einer ATP-Synthase auf Endothelzellen bindet (Moser, Stack et al. 1999) und damit Endothelzellen durch eine Hemmung des ATP-Stoffwechsel an der Proliferation hindert (Moser, Kenan et al. 2001).

Der Mechanismus, durch den Angiostatin in der Lage ist, Endothelzellen zu hemmen, bleibt weitgehend unbekannt. Ein akzeptiertes theoretisches Modell existiert nicht (Cao and Xue 2004).

1.2.4. Angiostatin in klinischen Studien und Perspektiven

Angiostatin hat *in vitro* und im Tierversuch Erfolge bei der Hemmung von Angiogenese und einem damit verbundenen Tumorwachstum gezeigt (O'Reilly, Holmgren et al. 1994; Griscelli, Li et al. 1998; Lalani, Chang et al. 2004). Gegenwärtig wird von der Firma Entremed Angiostatin (K1-3) in einer klinischen Phase II-Studie als Kombinationstherapie mit Paclitaxel und Carboplatin bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom getestet (National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov, <http://clinicaltrials.gov>). Hier konnte eine Wirksamkeit der Substanz im klinischen Setting nachgewiesen werden (Kurup, Lin et al. 2006).

Bei der Übertragung von Ergebnissen aus Laborversuchen in die klinische Praxis sind oft Erwartungen nicht erfüllt worden. Ob Angiostatin das Potential für zukünftige klinische Anwendungen haben wird oder nicht, lässt sich derzeit nicht vorhersagen. Erste erfolgreiche Ergebnisse mit dem Angiogeneseinhibitor Bevacizumab, einem Antikörper gegen *VEGF*, stimmen zuversichtlich (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004). Auf der Basis dieses

Medikaments konnte erstmals gezeigt werden, dass über das Prinzip der Antiangiogenese eine wirksame Tumorthherapie möglich ist. Nach Jahrzehnten wären dies die ersten neuen Medikamente in der Krebstherapie, die einen gänzlich anderen Ansatzpunkt als herkömmliche Chemotherapeutika verfolgen. Doch letztendlich wird erst die klinische Praxis über den Erfolg dieser neuen Medikamentengeneration entscheiden. Bis dahin sind im Falle von Angiostatin noch eine Reihe von Fragen zu klären. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt, gleiches gilt für die Rolle von Angiostatin im Regulationsverhältnis von Endothelzellen. Bis zur Klärung dieser Punkte ist eine Vorhersage über den Ausgang der klinischen Tests nicht zu treffen, doch besteht berechtigte Hoffnung auf eine neue Generation von Krebstherapeutika, wie der VEGF-Antikörper Bevacizumab bereits eindrücklich demonstriert.

1.3. Adeno-assoziierte Viren und Angiostatin

In der vorliegenden Arbeit wurden modifizierte Adeno-assoziierte Viren zum Gentransfer des Angiogenese-Inhibitors Angiostatin verwendet. Die Arbeiten wurden mit einem AAV-2-Kapsid und murinem Angiostatin, welches aus den Kringel Domänen K1-4 besteht, durchgeführt. Wie einige Arbeiten zuvor bereits beschrieben haben, ist eine antiangiogene Genterapie möglich und effektiv in der Behandlung von Krebs im Mausmodell (Griscelli, Li et al. 1998).

Zu Beginn dieser Arbeit lag noch kein Nachweis über eine erfolgreiche antiangiogene AAV-vermittelte Genterapie vor. Diese wurde mittlerweile mehrmals erfolgreich von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt (Ma, Guo et al. 2002; Ma, Lin et al. 2002; Xu, Sun et al. 2003; Lalani, Chang et al. 2004; Ponnazhagan, Mahendra et al. 2004; Sun, Krissansen et al. 2005). Auf dem Gebiet der antiangiogenen Genterapie ist diese Arbeit dennoch einzigartig, da sie als erste Arbeit überhaupt ein selbstkomplementäres Adeno-assoziiertes Virus als genterapeutische Fähre für ein antiangiogenes Protein verwendet.

2. Teil – Material

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| Produkt | Hersteller |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------|
| (NH ₄)Cl | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| 10x PBS | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Agarose | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| CaCl ₂ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Desoxycholat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Dimethylformamide | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck KGaA, Schwalbach |
| DPX | Merck KGaA, Schwalbach |
| EDTA | Merck KGaA, Schwalbach |
| Essigsäure | Riedel-de-Haen, Taufkirchen |
| Ethanol | Merck KGaA, Schwalbach |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Formalin | Merck KGaA, Schwalbach |
| Formamid | Fluka, Taufkirchen |
| Glutaraldehyd | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Glycerin | Fluka, Taufkirchen |
| Glycin | Merck, Darmstadt |
| H ₂ O ₂ | Merck KGaA, Schwalbach |
| HEPES | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Iodixanol (OptiPrep™) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Isopropanol | Merck KGaA, Schwalbach |
| K ₂ HPO ₄ | Merck KGaA, Schwalbach |
| KCl | Merck KGaA, Schwalbach |
| KHCO ₃ | Merck KGaA, Schwalbach |
| KOAc | Merck KGaA, Schwalbach |
| LiCl | Merck KGaA, Schwalbach |
| Maleinsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| MgCl ₂ | Merck KGaA, Schwalbach |
| MnCl ₂ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck KGaA, Schwalbach |
| NaCl | Merck KGaA, Schwalbach |
| NaH ₂ PO ₄ | Merck KGaA, Schwalbach |
| NaMOPS (pH 7.0) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| NaOH | Fluka, Taufkirchen |
| Na ₂ SO ₃ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Na ₂ S ₂ O ₅ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Natriumcitrat | Merck KGaA, Schwalbach |

| | |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck, Darmstadt |
| Optiprep | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Phenolrot | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate | Pierce Biotechnology, USA |
| Tris | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Tween [®] 20 | Merck, Darmstadt |
| Xylol | Merck KGaA, Schwalbach |

2.2. Enzyme

| Produkt | Hersteller |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alkalische Phosphatase (CIP) | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Benzonase | Merck KGaA, Schwalbach |
| DNase | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Pfx DNA Polymerase Platinum [®] | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Proteinase K | Merck KGaA, Schwalbach |
| Restriktionsenzyme | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs, Schwalbach, Promega, Mannheim, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Stratagene GmbH, Heidelberg |
| T ₄ -DNA-Ligase | New England Biolabs, Schwalbach |
| T ₄ -DNA-Polymerase | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |

2.3. Molekulargewichtsmarker für DNA

| Produkt | Größe (bp) | Hersteller |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Lamda DNA/EcoRI+HindIII | 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 | Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| 1 kbp-Leiter | 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 | Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |

| | | |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 100 bp-Leiter | 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 3000 | Firma Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| Lamda DNA/Hind III, Digoxigenin- markiert | 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |

2.4. Plasmide und Nukleinsäuren

| Plasmid | Hersteller |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| dNTP Mix | Boehringer Ingelheim, Ingelheim |
| pBlast-mAngiostatin | InvivoGen, San Diego, USA |
| pBluescript KS- | Stratagene GmbH, Heidelberg |
| pGFP | A. Girod, LMU München |
| pSUB201+ | R.J. Samulski, University of North Carolina, Chapel Hill, USA |
| pTRACER-CMV | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| pRC 99 | AG Hallek, LMU München |
| pXX 6-80 | R.J. Samulski, University of North Carolina, Chapel Hill, USA |

2.5. Oligonukleotide

| Primer | Sequenz | Hersteller |
|-------------|-----------------------------|-----------------------|
| HpaI-Linker | Pho-GTC GTT AAC GAC | Metabion, Martinsried |
| ANG S1102 | TCG TAG ACC CTT CAA GAG ACC | Metabion, Martinsried |
| ANG A1422 | AAA GTC TGT AAC CAT CCA ACC | Metabion, Martinsried |
| ANG S1670 | AGA TGA ATT ATT GCC GCA ACC | Metabion, Martinsried |

| | | |
|--------------|-----------------------------|-----------------------|
| ANG A1818 | GAG TAA CCC TAC ACA TGA CCC | Metabion, Martinsried |
| ANG A2186 | TTG ACC TCC ATA GAA GAC ACC | Metabion, Martinsried |
| CMV S445 | GTA TCA TAT GCC AAG TAC GC | Metabion, Martinsried |
| CMV A555 | ATC TAC ATG ACG GTT CAT CC | Metabion, Martinsried |
| ENDO A1716 | CTC TAC AAA TGT GGT AGA TCC | Metabion, Martinsried |
| Poly S580 | ATC GAC GCC TAG TTC TAG TGG | Metabion, Martinsried |
| Rev ohne Mut | CCA ACT CCA TCA CTA GG | Metabion, Martinsried |
| FW mit Mut | GGA GTG GGT CGT TCT AG | Metabion, Martinsried |

2.6. Molekulargewichtsmarker

| Produkt | Hersteller |
|-------------------------------------------|------------------|
| Precision Plus Protein all blue standards | Bio-Rad, München |

2.7. Antikörper

| Antikörper | Spezifität | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| Anti-Human-Angiostatin | human, mouse Angiostatin | Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA |
| Anti-Plasminogen | human, mouse, rat Angiostatin | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase Conjugate | rabbit IgG | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

2.8. Proteine

| Proteine | Hersteller |
|------------------------------------------|------------------------------|
| Rekombinantes Murine VEGF ₁₆₄ | RELIATech GmbH, Braunschweig |
| Rekombinantes Human HGF | RELIATech GmbH, Braunschweig |

Recombinant Human FGF-2 (basic)

RELIATech GmbH, Braunschweig

2.9. Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Genotyp und Hersteller |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH10B | F-, <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ - <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> ; Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> TOP10F | F-, <i>lacI^qTn10</i> (Tet ^R) <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> ; Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | F-, <i>Tn10</i> , <i>proA⁺B⁺</i> , <i>lacI^q</i> , Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^r), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>glnV44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ; Stratagene GmbH, Heidelberg |

2.10. Medien und Zusätze für Prokaryonten

| Substanz | Hersteller |
|---------------------|----------------------------------------|
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Bacto Agar | Becton Dickenson, Le Pont de Claix, F |
| Bacto Trypton | Becton Dickenson, Le Pont de Claix, F |
| Blast-Flüssigmedium | Invivogen, San Diego, USA |
| Blast-Plattenmedium | Invivogen, San Diego, USA |
| Hefe-Extrakt | Becton Dickenson, Le Pont de Claix, F |

2.11. Zelllinien

| Zelllinien | Ursprung/Bezug |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HeLa | HeLa (HPV 18 transformierte Adenokarzinom-Zelllinie der Patientin <u>Henrietta Lacks</u>); ATCC: CCL 2 |
| 293 | 293 (Ad5 transformierte humane fetale Nierenzelllinie); ATCC: CRL 1573 |
| SVEC | SVEC4-10 (SV40 transformierte murine Endothelzelllinie); ATCC: CRL-2181 |
| HUVEC | HUVEC (<u>H</u> uman <u>U</u> mbilical <u>V</u> ein <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ells) |

2.12. Medien und Zusätze für Eukaryonten

| Substanz | Hersteller |
|--------------------------------|----------------------------|
| D-MEM mit Glutamax | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Advanced D-MEM mit Glutamax | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Endothelial Cell Growth Medium | PromoCell GmbH, Heidelberg |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Fötales Kälberserum | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| H ₂ O (für Virusreinigung) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| O _{PTI} PRO™ SFM | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| PBS | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin in PBS) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin und 0,2% EDTA in PBS) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trypsin (0.25% in PBS) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

2.13. Nachweis und Präparationssysteme

| System | Hersteller |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Cell Titer 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay | Promega GmbH, Mannheim |
| DIG-DNA-Labeling und Detektion-Kit | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| DNEasy [®] Tissue Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| EndoFree Plasmid [®] Midi-/Maxi-/Giga-Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| Qiafilter Plasmid [®] Midi-/Maxi-/Giga-Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen GmbH, Hilden |

2.14. Geräte

| Gerät | Hersteller |
|------------------------------------------|------------------------------------|
| 96-Well Spektralphotometer | Molecular Devices GmbH, Ismaning |
| Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur | Hybaid-AGS, Heidelberg |
| Autoklav | MMM, Planegg |
| Brutschränke | Heraeus, München |
| Biometra [®] T3000 Thermocycler | Biometra GmbH, Göttingen |
| BioRAD Mini Protean II™ | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| BioRAD Modul 200/2.0 Power Supply | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |

| | |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| DotBlot Apparatur | Invitrogen Corp., Karlsruhe |
| Eagle Eye | Stratagene GmbH, Heidelberg |
| FACS-Gerät | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| Film-Entwicklermaschine Optimax | Protec, Oberstenfeld |
| Gene Pulser | Bio-Rad, München |
| Gene Quant | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Heraeus Zentrifugen | Kendro, Langenselbold |
| Laminar Flow | Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold |
| Mikroskop | Leica, Pensheim |
| Mikrowelle | Sharp, Hamburg |
| Neubauer Zählkammer | Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| pH-Meter | Knick, Berlin |
| Pipettensatz: 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| QIAvac Vakuum-Sauger | Qiagen GmbH, Hilden |
| Rollhybridisierer | Hybaid-AGS, Heidelberg |
| Schüttelinkubator | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Speed-Vac | Bachhofer, Reutlingen |
| Spektralphotometer DU 640 | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| Tiefgefrierschränke | Forma Scientific GmbH, Marietta, USA |
| Tischzentrifuge | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf |
| Ultrazentrifuge | Beckmann, München |
| UV-Spektrometer Uvikon 941 | Kontron Instruments, Eching |
| Vortexer | Bender & Hobein, Heidelberg |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |

2.15. Software

| Software | Hersteller |
|----------------------|----------------------------------------------|
| Adobe Acrobat Reader | Adobe Systems Incorporated |
| Adobe Photoshop | Adobe Systems Incorporated |
| Clone Manager | Scientific & Educational Software, Cary, USA |
| EndNote | Thomson ResearchSoft |
| Microsoft Office | Microsoft Corporation |
| SPSS | SPSS Inc., Chicago, USA |

2.16. Sonstiges

| Produkt | Hersteller |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Biomax Light Film | Kodak, Stuttgart |
| Deckgläser | Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| Dialyse-Membran | Millipore GmbH, Schwalbach |
| Elektroporationsküvetten | Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Weseling-Berzdorf |
| Filmkassetten | Quantum Appligene, Heidelberg |
| Gewebekultur-Flaschen | Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH |
| Gewebekultur-Platten | Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH |
| GSA-Zentrifugenröhrchen | Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold |
| Hybridisierungsrohr | Schott AG, Mainz |
| Nylonmembran | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Objektträger | R. Langenbrinck, Teningen |
| Kanülen | Becton Dickenson Systems Plymouth, UK |
| Parafilm | Pechiney, Paris, F |
| Pipetten | Corning, Wiesbaden |
| Reaktionsgefäße | Josef Peske oHG, Aindling |
| Skalpelle | Paragon International Ltd., Sheffield, UK |
| Spritzen | Becton Dickenson Systems Plymouth, UK |
| SS34-Zentrifugenröhrchen | Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold |
| Ultrazentrifugations-Röhrchen | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| Whatman-Papier | Whatman International Ltd., Maldstone, UK |
| Zellkulturflaschen | TPP, Trasadingen, CH |
| Zellkulturplatten (96-, 48-, 24-, 12-, 6-Loch) | TPP, Trasadingen, CH |

| | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Zellkulturschalen | Nunc GmbH, Wiesbaden |
| Zellsieb 40 μm | Becton Dickenson Systems Plymouth, UK |
| Zentrifugenröhrchen | TPP, Trasadingen, CH |

3. Teil – Methoden

3.1. *Kultivierung von und Arbeiten an Bakterien*

3.1.1. Plattenkulturen

Für die Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit Bacto-Agar versetzt und autoklaviert. Nachdem das Nährmedium auf 55 °C abgekühlt war, wurde es mit entsprechenden Antibiotika zu Selektionszwecken versetzt und anschließend in sterile Petrischalen gegossen. Gelagert wurden die Agarplatten invertiert bei 4 °C.

Um einzelne Bakterienkolonien aus einem Bakterien-Gefrierstock, einer Flüssigkultur oder einem Transformationsansatz zu isolieren, wurden diese mittels einer sterilen Impföse oder eines Drygalski-Spatels auf einer Agarplatte verstrichen. Die Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37°C invertiert im Brutschrank inkubiert.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------|
| LB-Medium | Bacto Trypton | 1 | % |
| | Hefe-Extrakt | 0,5 | % |
| | NaCl | 0,5 | % |
| | NaOH | 1 | mM |
| | Bacto Agar (bei Platten) | 1,5 | % |
| Ampicillin | Stocklösung: 50 mg/ml in H ₂ O; sterilfiltriert; Endkonzentration 50 µg/ml | | |
| Blasticidin S | Endkonzentration 3-10 µg/ml | | |

3.1.2. Flüssigkulturen

Sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml) wurden mit 5 ml sterilem LB Medium und einem Antibiotikum versetzt. Das Animpfen erfolgte mittels einer sterilen Impföse aus einzelnen Bakterienkolonien oder einem Bakterien-Gefrierstock. Die Ansätze wurden dann für mindestens acht Stunden und 100-220 rpm im Schüttelinkubator bei 37 °C bebrütet.

3.1.3. Anlegen einer Stock-Kultur

Um transformierte Bakterien einzufrieren und so zu sichern, wurden diese wie in 3.1.2 beschrieben vermehrt. 500 µl Bakterienlösung wurden dann mit 500 µl Glycerin durchmischt und in ein Kryogefäß überführt. Diese Kulturen wurden dann bei -20 und -80 °C gelagert.

3.1.4. Herstellung elektrokompetenter E. coli

Unter sterilen Bedingungen wurden 10 ml autoklaviertes LB-Medium in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben und mit E. coli-Bakterien (DH10B) beimpft. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C und 120 rpm bebrütet. Am nächsten Tag wurden 500 ml vorgewärmtes LB-Medium in einem 2-Liter-Erlenmeyer-Kolben mit 10 ml der Über-Nacht-Kultur vermischt und wiederum bei 37 °C bebrütet. Nach einer Stunde wurde zum ersten Mal das Bakterienwachstum anhand der optischen Dichte des Mediums bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Die Bakterienlösung wurde so lange weiter auf dem Schüttelinkubator belassen, bis erneute Messungen der OD_{600} des Mediums Werte von 0,6 ergaben.

Das Bakterienmedium wurde auf Zentrifugengefäße verteilt und bei 7000 rpm für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Niederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Pellets wurden mit 800 ml eiskaltem, autoklaviertem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden zweimal in 800 ml einer eiskalten autoklavierten 10%igen Glycerin-in-Wasser-Lösung gewaschen und abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde im Folgenden in 80 ml einer eiskalten, sterilen 10%igen Glycerin-in-Wasser-Lösung resuspendiert, rasch in 50 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der elektrokompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen $0,5$ und $2,0 \times 10^9$ Kolonien pro µg DNA-Plasmid.

3.1.5. Transformation elektrokompetenter E. coli

Bei der Elektroporation werden durch elektrische Ströme die Zellwände von Bakterien künstlich für Plasmide durchgängig gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode der chemischen Transformation auf Grund ihrer höheren Effektivität vorgezogen.

Ein Ligationsansatz wurde für zwei Stunden gegen 250 ml steriles Wasser dialysiert. Elektrokompente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit dem dialysierten Ligationsansatz versetzt. Dieser Ansatz wurde gut durchmischt und wenige Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Küvette überführt und dem elektrischen Strom für 8,0 – 8,5 ms ausgesetzt (Einstellungen am Elektroporationsgerät: 2500 V, 25 μ F, 400 Ω). Die nun transformierten Bakterien wurden mit 0,5 ml LB-Medium versetzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Bebrütung bei 37 °C im Schüttelinkubator (100 rpm) für eine Stunde wurde die Bakteriensuspension auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versehenen Agarplatte ausplattiert. Diese wurde dann über Nacht invertiert bei 37 °C bebrütet.

3.2. Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

3.2.1. Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für Klonierungen wurden kleinere Mengen DNA benötigt, um einerseits DNA-Reaktionen durchzuführen und andererseits die erfolgreiche Transformation eines Ligationsansatzes nachzuweisen. Diese DNA wurden mit dem QIAprep Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gewonnen.

Aus einer Flüssigkultur (siehe 3.1.2) wurden 4 ml Bakteriensuspension verwendet. Diese wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und das Bakterienpellet in 250 μ l P1-Puffer (Resuspensionspuffer) resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Es folgte die Zugabe von 250 μ l P2-Puffer (Lysispuffer). Der Inhalt wurde einmalig geschüttelt und nach fünf Minuten erfolgte die Zugabe von 350 μ l N3-Puffer (Neutralisationspuffer). Wiederum wurde einmalig geschüttelt.

Nun wurden alle Ansätze bei 14000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig ohne Verletzung des Pellets abgenommen und auf QIAprep-Säulen pipettiert. Diese wurden nun mit dem QIAvac Vakuumsauger verbunden und der Inhalt durch Einschalten des Unterdruckes durchgesaugt. Die QIAprep-Säulen wurden mit 500 μ l PB-Puffer und 750 μ l PE-Puffer gewaschen, immer gefolgt von einem Durchsaugen mittels Unterdruck.

Die QIAprep-Säulen wurden in frischen Eppendorf-Gefäßen platziert und mit 50 μ l EB-Puffer und Zentrifugation bei 14000 rpm eluiert.

Die gewonnenen Plasmide wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|------------------------------------|-------------------|-------|---------|
| P1-Puffer (Resuspensionspuffer) | Tris/HCl (pH 8,8) | 50 | mM |
| | EDTA | 10 | mM |
| | RNase A | 100 | µg/ml |
| P2-Puffer (Lysispuffer) | NaOH | 200 | mM |
| | SDS | 1 | % |
| N3-Puffer | Qiagen System | | |
| PB-Puffer | Qiagen System | | |
| PE-Puffer | Qiagen System | | |
| EB-Puffer | Tris/HCl (pH 8,5) | 10 | mM |

3.2.2. DNA-Isolierung aus Viren

Die DNA-Isolierung aus Viren wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Eine Viruslösung (meist 5 bis 20 µl) wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt. Die verdünnte Viruslösung wurde mit 200 µl AL-Puffer und 20 µl Proteinase K versetzt, durchmischt und bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100%) und Vortexen wurde der Inhalt in DNeasy Mini Spin Columns überführt und zentrifugiert (8000 rpm, 1 min). Die säulengebundene DNA wurde einmal durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min mit 500 µl AW1 und einmal durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 3 min mit 500 µl Puffer AW2 gewaschen. Eluiert wurde die gebundene DNA zweimalig mit je 200 µl AE-Puffer (8000 rpm, 1 min).

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|----------------------------|---------------|-------|---------|
| AL-Puffer | Qiagen System | | |
| AW1-Puffer (Waschpuffer) | Qiagen System | | |
| AW2-Puffer (Waschpuffer) | Qiagen System | | |
| AE-Puffer (Elutionspuffer) | Qiagen System | | |
| Proteinase K | Qiagen System | | |

3.2.3. Endotoxinfreie Plasmidisolierung

Für Sequenzierungen, Virenverpackungen und Proteingewinnungen wurden größere Mengen endotoxinfreier Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde mittels Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen gewonnen (Qiagen EndoFree® Plasmid Purification). Präparationen im Maßstab „Midi“, „Maxi“ und „Mega“ wurden durchgeführt. Für endotoxinfreie Präparationen wurden die entsprechenden Endo-Free-Versionen der oben genannten Kits verwendet. Der Vorgang folgte dem entsprechenden Protokoll der Firma Qiagen für 100, 500 und 2500 ml Bakteriensuspension.

Eine E. coli-Flüssigkultur (siehe 3.1.2) wurde als Starterkultur verwendet. Mit ihr wurde eine größere Menge LB-Medium (100, 500 oder 2500 ml) beimpft. Die Verdünnung lag bei 1:1000.

Das angeimpfte LB-Medium wurde für 12 Stunden bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. Im Folgenden wurde die Bakterienlösung zentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 45 min) und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in gekühltem P1-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von P2-Puffer wurde die Lösung vorsichtig geschüttelt und für fünf Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von gekühltem P3-Puffer und die gesamte Lösung wurde sorgfältig durchmischt. Nun wurde der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefallene DNA und die Proteinanteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (9000 rpm, 40 min, 4 °C). Anschließend wurde der Puffer ER beigesetzt, um Endotoxin zu entfernen. Es wurde sorgfältig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Anionenaustauscher-Säulen mit QBT-Puffer äquilibriert. Der klare, plasmidhaltige Überstand wurde auf die Säulen gegossen. Die Säulen wurden mit QC-Puffer gewaschen und anschließend mit QN-Puffer oder QF-Puffer die DNA eluiert. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation (4000 rpm, 60 min, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend nach Absaugung des Überstandes mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4000 rpm, 30 min, 4 °C). Die nächsten Schritte erfolgten unter einer Sterilwerkbank. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und die DNA in 150 bis 1500 µl sterilem, endotoxinfreiem TE-Puffer in einem sterilen Eppendorf-Gefäß aufgenommen.

Die so gewonnene DNA wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen weiterverwendet bzw. geöffnet.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|-----------------------|-------------------|-------|---------|
| P1-Puffer | Tris/HCl (pH 8,8) | 50 | mM |
| (Resuspensionspuffer) | EDTA | 10 | mM |

| | | | |
|--------------------------------------|-------------------|------|-------|
| | RNase A | 100 | µg/ml |
| P2-Puffer (Lysispuffer) | NaOH | 200 | mM |
| | SDS | 1 | % |
| P3-Puffer (Neutralisationspuffer) | KOAc (pH 4,8) | 2,55 | M |
| ER-Puffer | Qiagen System | | |
| QBT-Puffer (Äquilibriumspuffer) | NaCl | 750 | mM |
| | MOPS, pH 7,0 | 50 | mM |
| | EtOH | 15 | % |
| | Triton X-100 | 0,15 | % |
| QC-Puffer (Waschpuffer) | NaCl | 1 | mM |
| | MOPS, pH 7,0 | 50 | mM |
| | EtOH | 15 | % |
| QF-Puffer (Elutionspuffer) | NaCl | 1,25 | M |
| | Tris/HCl (pH 8,5) | 50 | mM |
| | EtOH | 15 | % |
| QN-Puffer (Elutionspuffer) | NaCl | 1,6 | M |
| | MOPS, pH 7,0 | 50 | mM |
| | Isopropanol | 15 | % |
| TE-Puffer (Resuspensionspuffer) | Tris/HCl (pH 8,0) | 10 | mM |
| | EDTA | 1 | mM |

3.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA im nativen Agarosegel

Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente, sowie zur präparativen Trennung wurde DNA in einem Agarosegel durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt.

Zum Gießen eines 0,8%igem bis 2%igem Agarosegels wurde eine entsprechende Menge Agarosepulver mit 100 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) im Mikrowellenherd aufgeschlämmt. Nach Abkühlung auf 60 °C wurde die Agaroselösung in vorbereitete Formen gegossen und mit Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Mit Hilfe des Gelkammes wurden Luftblasen eliminiert und das ganze Gel mit dem zugesetzten Ethidiumbromid vermischt. Nach Polymerisierung der Agarose wurde das Gel in eine entsprechende Apparatur eingesetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls TBE. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die Geltaschen mit

einer Pipette getestet. Die Proben wurden mit 0,1 Volumen Auftragspuffer versetzt und behutsam in die entsprechenden Taschen pipettiert. Es wurde immer ein DNA-Marker zur Fragment-Längenabschätzung verwendet.

Die Gelkammer wurde verschlossen und bei Spannungen zwischen 30 und 120 Volt betrieben. Die mit Ethidiumbromid interkalierten DNA-Banden wurden mittels UV-Licht (366 nm) im Eagle Eye sichtbar gemacht und fotografiert.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|--------------------------------------|----------------|-------|---------|
| Auftragspuffer (10x) | Glycerin | 50 | % |
| | EDTA, pH 8,0 | 100 | mM |
| | Bromphenolblau | 0,25 | % |
| | Xylencyanol FF | 0,25 | % |
| 10x Tris-Borat- EDTA-Puffer (TBE) | Tris | 890 | mM |
| | Borsäure | 890 | mM |
| | EDTA | 20 | mM |

3.2.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA im alkalischen Agarosegel

Zum Nachweis der Größe von Einzelstrang-DNA mussten Hybridisierungen bzw. eventuelle Rehybridisierungen verhindert werden. Um dies zu gewährleisten, wurden Agarosegele unter alkalischen Bedingungen gefahren. Das denaturierende Milieu verhinderte Doppelstrangbildungen und schaffte somit ein vergleichbares, größenabhängiges Laufverhalten.

Die Agarose wurde mit Wasser im Mikrowellenherd aufgeschlämmt. Nach Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit Natriumhydroxid bis zu einer Konzentration von 50 mM und EDTA bis zu einer Konzentration von 1 mM versetzt. Das 1%ige alkalische Agarosegel wurde in vorbereitete Formen gegossen und nach dem Erstarren in eine entsprechende Gelapparatur eingespannt. Die DNA-Proben wurden mit NaOH und EDTA bis zu einer Konzentration von 50 mM und 1 mM versetzt und mit 0,2 Volumen alkalischem Auftragspuffer durchmischt. Die Positivkontrolle wurde aufgrund ihrer pH-Empfindlichkeit ohne diese Aufbereitung direkt in den Geltaschen aufgetragen. Es wurde ein alkalischer Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 40 bis 50 Volt über 5 bis 8 Stunden durchgeführt. Aufgrund der starken Wärmeentwicklung wurde die Apparatur im Kühlraum (4 °C) platziert. Anschließend wurde das Gel für 2 Stunden in Neutralisierungspuffer

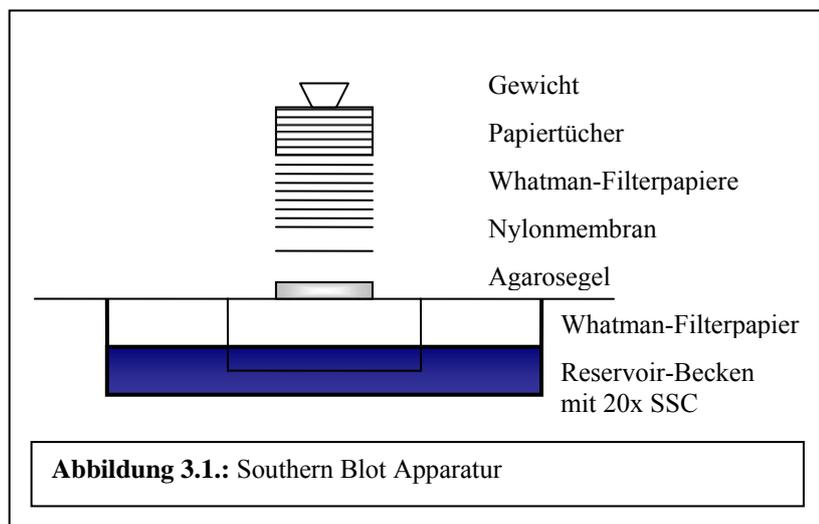
geschwenkt. Um die im Gel aufgetrennte DNA sichtbar zu machen wurde ein Southern Blot durchgeführt.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|---------------------------------|-----------------------|-------|---------|
| Alkalischer Auftragspuffer (5x) | NaOH | 300 | mM |
| | EDTA | 6 | mM |
| | Pancoll (1,0777 g/ml) | 18 | % |
| | Xylencyanol FF | 0,25 | % |
| Alkalischer Laufpuffer | NaOH | 50 | mM |
| | EDTA | 1 | mM |
| Neutralisierungspuffer | Tris/HCl (pH 7,5) | 1 | M |
| | NaCl | 1,5 | M |

3.2.6. Southern Blot

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wird beim Southern Blot durch Diffusionskräfte auf eine Nylonmembran transferiert, dort fixiert und mit Hilfe markierter DNA nachgewiesen.

Gele nach Art von 3.2.4 und 3.2.5 wurden nach der DNA-Auftrennung für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt, kurz mit Wasser gespült und dann 20 min in Denaturierungspuffer inkubiert. Sie



wurden anschließend sehr vorsichtig mit den Taschen nach unten blasenfrei auf ein mit 20x SSC getränktes Whatman-Filterpapier gelegt, das auf einer Glasscheibe lag und dessen Enden in ein Becken mit einem Reservoir von 20x SSC ragten. Es wurde nun eine befeuchtete, auf Größe der Gele

zugeschnittene Nylonmembran auf das Gel aufgebracht. Anschließend folgten 8 trockene, zugeschnittene Whatman-Filterpapiere. Den Abschluss bildeten trockene Papiertücher, die durch ein Gewicht beschwert, auf das Gel drückten. Die Apparatur wurde 12 bis 16 Stunden belassen, dann wurde die Nylonmembran vorsichtig entfernt und die nun auf ihr befindliche DNA durch Inkubation für 15 min bei 120 °C fixiert. Die Nylonmembran wurde nun analog des Dot Blot-Protokolls entwickelt (siehe auch 3.6.6.4.).

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|----------------------|----------------------|-------|---------|
| 20x SSC | NaCl | 3 | M |
| | Natriumcitrat pH 7,0 | 300 | mM |
| | Maleinsäure pH 7,5 | 100 | mM |
| Denaturierungspuffer | NaOH | 0,5 | M |
| | NaCl | 1,5 | M |

3.2.7. Reinigung und Gelisolation von DNA

Um einzelne DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren oder DNA von Enzymen zu reinigen oder umzupuffern, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Die isolierten Gelstücke wurden gewogen und mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt und über 10 min bei 50 °C geschmolzen. Nach Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol erfolgte der Transfer auf QiaQuick-Säulen. Diese wurden eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Die in den Säulen gebundene DNA wurde einmal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (14000 rpm, 1 min) und anschließend in 20 bis 50 µl EB-Puffer eluiert (14000 rpm, 1 min).

Um DNA von Enzymen und Salzen zu reinigen, wurde ein analoges Verfahren angewandt.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|-----------|-------------------|-------|---------|
| QG-Puffer | Qiagen System | | |
| PE-Puffer | Qiagen System | | |
| EB-Puffer | Tris/HCl (pH 8,0) | 10 | mM |

3.2.8. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentrationen wurden mittels eines Spektralphotometers (Gene Quant, Firma Amersham oder DU 640, Firma Beckmann) bestimmt und ausgewertet. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 260 nm. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ konnte der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Werte von 1,8 bis 2,0 entsprachen maximaler Reinheit. Niedrigere Werte zeigten Verunreinigungen, zum Beispiel durch Proteine, an.

Alternativ wurde zur Bestimmung kleinster DNA-Mengen, zum Beispiel bei Klonierungen, die Konzentration in einem Agarosegel, durch Vergleich der Bandenintensität mit einem DNS-Längen-Marker bekannter Konzentration, abgeschätzt.

3.2.9. Restriktionsfragmentlängenanalyse von DNA

Um bei Klonierungen schnell verschiedene Klone voneinander zu unterscheiden, wurde eine Restriktionslängenfragmentanalyse durchgeführt. Mittels CloneManager (Software) wurden geeignete Schnittstellen gesucht und die DNA mit den entsprechenden Endonukleasen gespalten. Der gesamte Ansatz wurde dann mit Auftragspuffer versetzt und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Aus dem Bandenmuster konnte auf das ursprüngliche Plasmid und somit auf einen bestimmten Klon geschlossen werden.

3.2.10. DNA-Sequenzierung

Sequenzanalysen wurden von der Arbeitsgruppe Blum im Genzentrum München nach dem Kettenabbruch- und Fluoreszenzverfahren durchgeführt.

3.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR sollten zusätzliche Informationen über die Struktur der produzierten Viren gewonnen werden.

Bei der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) handelt es sich um eine Methode, die schnell kurze DNA-Fragmente vermehrt. Dies geschieht mittels Primern und Desoxy-Nukleotiden durch eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq-Polymerase, gewonnen aus *Thermus aquaticus*). Durch Variationen der Temperatur kann dieser Vorgang bis zu 30-50 mal wiederholt werden. Es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA (vorausgesetzt Substrat steht in ausreichender Menge zur Verfügung). Diese amplifizierte DNA kann dann z.B. im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Probleme treten bei einer PCR u.a. aufgrund übermäßiger Länge des zu vermehrenden Fragments (größer 1 kbp) und G/C-Reichtums auf. Diese Bedingungen waren bei den durchgeführten Versuchen gegeben. Aufgrund fehlgeschlagener Versuche bei normalen PCR-Bedingungen wurde deshalb auf das PCR_x Enhancer System (Invitrogen, Karlsruhe) zurückgegriffen. Dieses verwendet ein auf Magnesiumionen basierendes System in Verbindung mit einer nicht näher beschriebenen Enhancer-Lösung. Zudem wurde Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (ebenfalls Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Es wurde ein Primer gewählt (5'-CCA ACT CCA TCA CTA GG-3') (Rev ohne Mut), der in der Nähe einer intakten ITR bindet. Dieser fungiert bei einem ss-Virusgenom (zwei intakte ITR) als doppelter Primer (bindet in der Nähe beider ITR) aufgrund des komplementären Aufbaus der ITR. Ein zweiter Primer (5'-GGA GTG GGT CGT TCT AG-3') (FW mit Mut) wurde so gewählt, dass er in der Nähe einer mutierten ITR binden konnte.

Zunächst wurde Vektor-DNA, wie unter 3.2.2 beschrieben, gewonnen. Dann wurden Ansätze nach folgendem Muster hergestellt:

| Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl) | |
|-------------------------------|-----------------------|
| DNA (Konzentration unbekannt) | 5 µl |
| Pfx Puffer (10x) | 5 µl (1 x) |
| Primer (10µM each) | je 2 µl (0,4 µM each) |
| MgSO4 (50 mM) | 1 µl (1 mM) |
| Enhancer Solution (10x) | 15 µl (3 x) |
| dNTP-Mix (10 mM) | 2 µl (0,4 mM each) |
| Platinum® Pfx DNA Polymerase | 1 µl (2,5 units) |
| H2O ad 50 µl | x µl |

Dieser Ansatz wurde gründlich durchmischt und dann mittels Biometra® T3000 Thermocycler amplifiziert. Es wurde ein Programm mit den folgenden Parametern verwendet:

| Vorgang | Temperatur/Zeit |
|--------------------|-----------------|
| (1.) Denaturierung | 95 °C/ 3 min |
| Denaturierung | 95 °C/ 45 sec |
| Annealing | 55 °C/ 40 sec |
| Extend | 68 °C/ 3 min |

Dieser Vorgang wurde 35-mal durchlaufen, dann folgte eine Pausenphase bei 4 °C bis zum nächsten Morgen. Die gewonnenen Fragmente wurden dann im Agarosegel aufgetrennt und visualisiert (vgl. auch 3.2.4).

3.3. Enzymatische Reaktionen an Plasmiden und DNA-Fragmenten

3.3.1. Spaltung von DNA mit Endonukleasen

Für Klonierungen und zur anschließenden Überprüfung auf erfolgreiche Insert- und Deletionsklonierung wurde DNA mittels Restriktionsendonukleasen gespalten. Ein sogenannter „DNA-Verdau“ wurde mit 0,2 bis 10 µg DNA und 1 bis 30 U Enzym durchgeführt. Die Spaltungen erfolgten über 1,5 Stunden bei vorgegebener Temperatur (meist 37 °C) in 15 bis 100 µl Gesamtvolumen. Erforderliche Puffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Das Ergebnis eines „DNA-Verdaus“ wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe auch 3.2.4).

3.3.2. Modifikation von DNA Fragmenten

3.3.2.1. Auffüllen 5'-überhängender Enden mit Klenow Fragment-der DNA-Polymerase I

Zum Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden wurde die 5'-3'-DNA-Polymerase Aktivität des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I verwendet.

Hierzu wurde der „DNA-Verdau“ nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mit 0,5 µl dNTP (2 mM), 0,5 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und Wasser mit dem entsprechenden Restriktionspuffer bis zu einem Volumen von 20 µl versetzt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C wurde die Polymerase anschließend bei 70 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert. Um die angefallenen Enzyme und Salze von der DNA zu trennen und um diese aufzukonzentrieren, wurde der Ansatz anschließend mittels QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt (siehe 3.2.7).

3.3.2.2. Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Um eine intramolekulare Religation der geschnittenen Vektoren bei Klonierungen zu verhindern, wurde der 5'-Phosphorsäureester mit dem Enzym alkalische Phosphatase abgespalten.

Nach einer Restriktionsspaltung wurden dem Ansatz 1 µl *cip* (1 U/µl, *calf intestinal phosphatase*) und Wasser mit dem entsprechenden Puffer (Herstellerangaben) bis zu einem Endvolumen von 50 µl zugesetzt. Nach einer Inkubation des Ansatzes über 30 Minuten bei 37 °C wurde die alkalische

Phosphatase durch Zusatz von EDTA (Endkonzentration 5 mM) und Erhitzen auf 85 °C für 15 Minuten inaktiviert.

3.3.2.3. *Phosphorylierung von Oligonukleotiden*

Für Klonierungen, bei denen Oligonukleotide eingesetzt wurden, mussten diese am 5'-Ende phosphoryliert werden, um von der T₄-DNA-Ligase mit dem Vektor verknüpft zu werden.

Die Phosphorylierungen wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

3.3.2.4. *Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden*

Um kurze DNA-Sequenzen (so genannte Linker) in Plasmide inserieren zu können, mussten die von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisierten einzelsträngigen Oligonukleotide hybridisiert werden. Zu diesem Zweck wurden komplementäre Oligonukleotidpaare verwendet.

Je 50 µg der komplementären Oligonukleotide (1µg/µl) wurden zusammen mit 20 µl Puffer X und 80 µl sterilem Wasser vermischt. Der Ansatz wurde für 15 Minuten auf 65 °C erhitzt, um dann sehr langsam über Nacht abzukühlen. Am nächsten Tag standen die hybridisierten Oligonukleotide (Linker) zur Verfügung.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|----------|-------------------|-------|---------|
| Puffer X | Tris/HCl (pH 7,4) | 100 | mM |
| | NaCl | 1500 | mM |

3.3.3. Ligation von DNA Fragmenten

3.3.3.1. *Ligation von backbone und insert*

Ligationen von DNA-Fragmenten und Vektoren wurden mit der T₄-DNA-Ligase durchgeführt. Es wurden zwischen 100 und 200 ng dephosphorylierter Vektor im Verhältnis 1 : 3 bzw. 5 mit Insertfragment ligiert. Das molare Verhältnis zwischen Vektor (*backbone*) und *insert* ergab sich aus dem zu ligierenden DNA-Ende. Bei „*blunt end*“-Ligationen wurde ein Verhältnis von 1 : 5, bei „*sticky end*“-Ligationen eines von 1 : 3 gewählt (Sambrook 1989).

Die Ligationen wurden mit 10 U T₄-DNA-Ligase (5 U/μl) und Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt. Die Reaktion erfolgte entweder über 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C. Anschließend wurde der Ansatz für 2 Stunden dialysiert und in elektrokompente Bakterien transformiert. Als Negativkontrolle diente mit *cip* behandeltes *backbone* ohne *insert*.

3.3.3.2. Ligation von hybridisierten Oligonukleotiden (Linker) und backbone

Um hybridisierte Oligonukleotide und *backbone* miteinander zu verbinden, wurde T₄-DNA-Ligase verwendet. Es wurden 200 ng dephosphorylierter *backbone*-DNA mit 1 μg phosphoryliertem doppelsträngigem Linker ligiert. Die Ligation wurde mit 5% PEG 4000 Lösung und 10 U Ligase (5 U/μl) in einem Gesamtvolumen von 20 μl im Ligase-Puffer durchgeführt. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für erneute 2 Stunden dialysiert und in elektrokompente Bakterien transformiert. Als Negativkontrolle diente mit *cip* behandeltes *backbone* ohne *insert*.

3.3.4. Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Mit Digoxigenin markierte DNA-Sonden wurden zur Analyse im Dot und Southern Blot verwendet. Zur Markierung der DNA wurde das DIG-DNA-Labeling and Detektion-Kit der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die Markierung erfolgte nach der so genannten „*random primer labeling*“-Methode.

Die Herstellung der Sonde begann mit der Auswahl eines passenden DNA-Fragmentes mit Hilfe des Clone Managers. Die optimale Länge eines solchen DNA-Stückes liegt laut Herstellerangaben zwischen 200 und 300 Basenpaaren. Ein solches Fragment wurde mit Restriktionsenzymen aus dem entsprechenden Plasmid geschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion isoliert. Die verwendete doppelsträngige DNA-Menge betrug 300 ng.

Das Fragment wurde nun bei 100 °C für zehn Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend im Eisbad für mindestens zwei Minuten schockgekühlt. Die DNA lag nun als Einzelstrang vor.

Es wurde ein Markierungsansatz auf Eis hergestellt:

| Ansatz | Substanz | Menge |
|-------------------|-------------------------|------------|
| Markierungsansatz | Linearisierte ssDNS | x μl |
| | 10 x Hexanukleotide Mix | 2 μl (1 x) |

| | |
|------------------------|--------------|
| 10 x dNTP Labeling Mix | 2 µl (1 x) |
| Klenow Enzym 2 U/µl | 1 µl (0,1 U) |
| Aqua dest. | ad 20 µl |

Der Ansatz wurde zentrifugiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die markierte DNA wurde mit 0,1 Volumen 4 M LiCl und 3 Volumen eiskaltem Ethanol (100%) versetzt und über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde das Präzipitat für 30 Minuten und 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für fünf Minuten an der Luft getrocknet. Dann folgte die Resuspension in 50 µl TE-Puffer und zur besseren Lösung des Pellets die Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C.

Ein Teil der Sonde wurde zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren, der andere Teil wurde mit 15 ml Prähybridisierungspuffer versetzt und ebenfalls zur späteren Verwendung bei Dot oder Southern Blot eingefroren.

3.4. *Kultivierung und Aufarbeitung von Zellen*

3.4.1. **Kultivierung von Zelllinien**

Als Nährlösung für die verwendeten Zelllinien dienten die unten aufgeführten Medien der Firma Invitrogen. DMEM-Medium wurde mit fötalem Kälberserum unterschiedlicher Konzentration (3-10%), Penicillin (100 µg/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) angereichert. Für primäre Endothelzellen (HUVEC) wurden Spezialmedien der Firma PromoCell verwendet.

Die Zellen wurden in Kulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow der Zellkultur durchgeführt.

| Zelllinie | Medium |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 293 (Ad5 transformierte humane fetale Nierenzelllinie); ATCC: CRL 1573 | DMEM, 10% FCS |
| HeLa (HPV 18 transformierte Adenokarzinom-Zelllinie der Patientin <u>Henrietta Lacks</u>); ATCC: CCL 2 | DMEM, 10% FCS |
| SVEC4-10 (SV40 transformierte murine Endothelzelllinie); ATCC: CRL-2181 | DMEM, 5% FCS |

| | |
|---------------------------------------------------------|------|
| HUVEC (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>) | ECGM |
|---------------------------------------------------------|------|

| Medium | Substanz | Konzentration |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------|
| DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>) | DMEM | Invitrogen |
| | Phenol Red | Invitrogen |
| | L-Glutamine | Invitrogen |
| | D-Glucose | 4500 mg/L |
| | HEPES Puffer | 25 mM |
| | Aqua dest. | ad 20 µl |
| ECGM (<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>) | Endothelial Cell Basal Medium | PromoCell |
| | Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin | 0,4% |
| | Fetal calf serum (FCS) | 2% |
| | Epidermal growth factor (EGF) | 0,1 ng/ml |
| | Hydrocortison | 1 µg/ml |
| | basic FibroblastFactor (bFGF) | 1 ng/ml |

3.4.1.1. Adhäsionszellen

Adhäsionszellen wurden als "Monolayer"-Kulturen im entsprechenden Medium kultiviert. Die Zellen wurden in Plastik-Petrischalen bzw. Plastik-Gewebekultur-Flaschen gehalten. Um diese Kulturen weiterführen zu können, wurde das Medium spätestens nach drei Tagen gewechselt und falls nötig, die Zellen im Verhältnis bis 1 : 10 gesplittet. Dies geschah durch Waschen mit vorgewärmten PBS-Puffer und 1-5-minütiger Inkubation bei 37 °C mit 1-5 ml einer 37 °C warmen Trypsin/EDTA-Lösung. Die Lösung wurde im Folgenden mit normalem Medium inaktiviert und die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen und Ausspülen der Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde dann im entsprechenden Verhältnis gesplittet und mit Medium aufgefüllt.

3.4.1.2. Stammkulturen, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Stammkulturen aus Zelllinien zu bilden, war es nötig, diese über längere Zeiträume zu konservieren. Mittels 5 ml eiskalten Einfriermediums wurden ca. 10^7 Zellen aufgenommen und in 1 ml Kryo-Gefäße aliquotiert. Diese wurden über Nacht bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag zur Langzeitaufbewahrung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen in 37 °C warmen Wasser schnell aufgetaut und anschließend in das entsprechende Medium überführt. Die weitere Kultivierung entsprach dem normalen Ablauf. Zur Entfernung von DMSO-Resten wurde ein Mediumwechsel innerhalb der ersten 24 h durchgeführt.

| Medium | Substanz | Konzentration |
|----------------|----------|---------------|
| Einfriermedium | DMEM | 40% |
| | FCS | 50% |
| | DMSO | 10% |

3.4.2. Präparation von Nabelschnüren

3.4.2.1. Herkunft der Nabelschnüre

Die verwendeten Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der gynäkologischen Abteilung des Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt. Sie wurden in 100 ml sterilen Glasflaschen in PBS bei +4 °C aufbewahrt. Die Präparation erfolgte nur, wenn der Zeitpunkt der Entbindung nicht länger als 24 Stunden zurücklag.

3.4.2.2. Isolierung von HUVEC aus Nabelschnüren

Die Präparation der Nabelschnüre orientierte sich an den in der Literatur publizierten Methoden (Jaffe, Nachman et al. 1973). Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Sterilwerkbank, Laminar Flow), ebenso lagen alle Instrumente und Materialien steril vor.

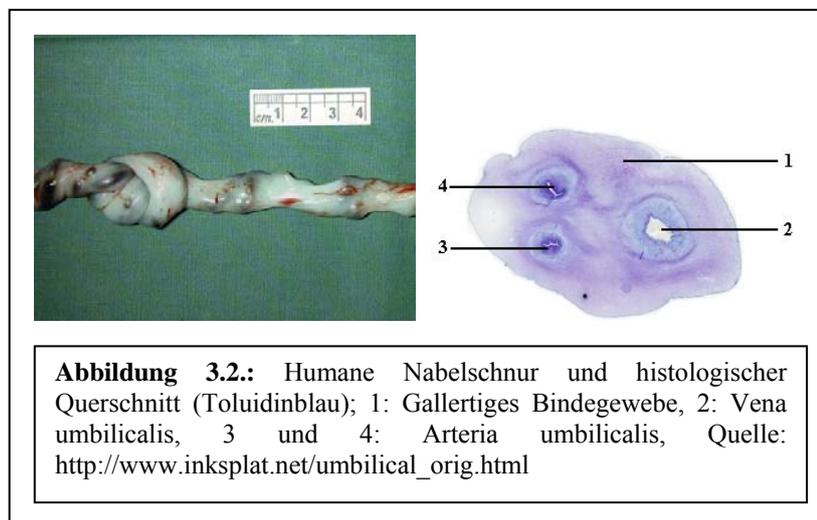


Abbildung 3.2.: Humane Nabelschnur und histologischer Querschnitt (Toluidinblau); 1: Gallertiges Bindegewebe, 2: Vena umbilicalis, 3 und 4: Arteria umbilicalis, Quelle: http://www.inksplat.net/umbilical_orig.html

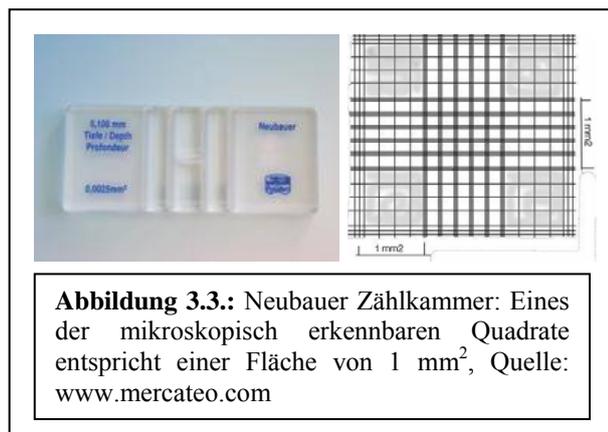
Die Nabelschnüre wurden mittels steriler Kompressen gereinigt und die Anatomie der Gefäße (2 Arterien, eine Vene, siehe Abbildung) mittels Aufsuchen und Platzierung von Knopfkanülen dargestellt. Die in der Nabelschnurvene platzierte Knopfkanüle wurde mittels Klemmchen fixiert. Entsprechend

war das Vorgehen auf der Gegenseite. Mit PBS wurde die Nabelvene gründlich gespült und von etwaigen Blutresten gereinigt. Anschließend wurde sie mit 10 ml 37 °C warmer Trypsin/EDTA-Lösung gefüllt und unteres sowie oberes Ende dicht verschlossen. Nach einer Inkubation von ca. 30 min wurde die Trypsin/EDTA-Lösung aus der Nabelvene in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Nabelvene wurde noch mehrmals mit PBS gespült und der Durchfluss ebenfalls in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Die gewonnene Suspension wurde zentrifugiert (1200 rpm, 10 min), der

Überstand vorsichtig abgesaugt und das gewonnene Pellet mittels ECGM resuspendiert und nach Analyse der Zellzahl auf entsprechende Kulturflaschen verteilt.

3.4.3. Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer

Um Zellen in kalkulierbarer, vergleichbarer Menge aussäen zu können, war es nötig, ihre Konzentration in einer Zellsuspension zu bestimmen. Wie die Abbildung zeigt, ist die Neubauer Zählkammer

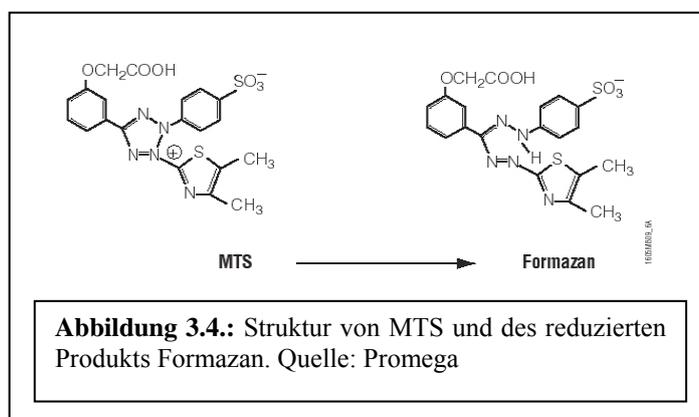


Zählkammer in 9 gleiche Quadrate mit je 1 mm^2 Fläche aufgeteilt. Die Höhe der Kammer beträgt $0,1 \text{ mm}$. Die Kammer wurde mit ca. $20 \mu\text{l}$ Zellsuspension gefüllt. Es wurden die 4 Eck-Quadrate mit einem Gesamtvolumen von $0,4 \text{ mm}^3$ ausgezählt. Das Ergebnis wurde durch 4 dividiert und dann mit 10^3 multipliziert. Das Resultat entsprach der Zellzahl pro μl .

3.4.4. Zellzahlbestimmung mittels AQueous One Solution Cell Proliferation

Assay

Um die Zellzahl bei den durchgeführten Proliferationsversuchen schnell zu bestimmen, wurde das AQueous One Solution Cell Proliferation-Kit der Firma Promega verwendet. Hierbei handelt es sich



um eine colorimetrische Methode. Ein Metabolit [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS) wird durch reduzierende Einflüsse lebender Zellen in Formazan umgewandelt. Diese Konversion entsteht durch reduzierende Enzyme unter Zuhilfenahme von

NADPH/NADH in metabolisch aktiven Zellen. Formazan absorbiert Licht bei 490 nm Wellenlänge und kann mittels 96-Well ELISA-Reader (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) gemessen werden. Die Menge des umgesetzten Formazans und die Absorption der Wellenlänge

sind direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Zur Verifizierung dieses Zusammenhangs wurden für die Zelllinien SVEC und HUVEC Korrelationsuntersuchungen durchgeführt (siehe Ergebnisse).

Zur Anwendung kam das AQueous One Soloution Reagent ausschließlich im 96-Well Maßstab. Je 15 µl der Lösung wurden jedem Well zugesetzt und der ganze Ansatz für 2 Stunden unter normalen Zellkulturbedingungen (37 °C. und 5% CO₂) inkubiert. Die Messung erfolgte dann bei 490 nm im ELISA-Reader.

3.4.5. Transfektion von Zellen

Die Transfektion von HeLa und 293 Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der in der Literatur veröffentlichten Techniken (Chen and Okayama 1987; Xiao, Li et al. 1998).

HeLa/293 Zellen wurden auf 15 cm Zellkultur-Petrischalen ausgesät und bis zu 70%iger Konfluenz kultiviert. Dies wurde erreicht durch Aussaat von $7,5 \times 10^6$ Zellen am Tag 0 der Transfektion. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel. Nach 3 Stunden wurde ein Transfektionsansatz vorbereitet. Pro transfizierter Platte (15 cm) wurden 30-40 µg DNA mit 1 ml 250 mM CaCl₂-Lösung in einem Falcon-Röhrchen vermischt. Nach der Zugabe von 1 ml HBS (pH 7,2) wurde der Ansatz sehr vorsichtig gevortext und nach 2 Minuten tropfenweise auf der 15 cm Zellkulturschale verteilt. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37 °C mit 5% CO₂-Atmosphäre.

Mit Hilfe dieser Technik konnten Transfektionseffizienzen von bis zu 90% erzielt werden.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------|---------|
| HBS-Puffer, pH mittels NaOH auf 7,2 eingestellt, sterilfiltriert | HEPES | 50 | mM |
| | NaCl | 280 | mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,5 | mM |
| | Sigma-H ₂ O | ad 100 | % |

3.4.6. Infektion von Zellen

Das Virus wurde dem Stock (-80 °C) entnommen und langsam auf Eis aufgetaut. Die Zellzahl wurde abgeschätzt oder bestimmt. Das Verhältnis der genomischen viralen Partikel, die pro Zelle verwendet werden sollten, wurde abgeschätzt. Zur Infektion bei Proliferationsmessungen wurden etwa 5×10^3 genomische Partikel pro Zelle verwendet.

Das Virus wurde mit Medium vermischt und in der festgelegten Konzentration auf der Zellkulturplatte verteilt.

3.4.7. Endothelzell-Assays

3.4.7.1. *Matrigel™ tube formation-Assay*

Bei Matrigel™ (BD Bioscience) handelt es sich um flüssiges Basalmembran-Extrakt produziert von der EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) Maus-Sarkom-Zelllinie (Grant, Lelkes et al. 1991). Diese Tumorzelllinie produziert eine Vielzahl von Proteinen der extrazellulären-Matrix. Eine Hauptkomponente ist Laminin, gefolgt von Kollagen IV und Heparansulfatproteoglykan. Dieses Gemisch polymerisiert, um ein Netz ähnlich der Basalmembran zu bilden. Endothelzellen, die auf dieser Matrix kultiviert werden, bilden so genannte Tubes aus. Diese *tube formation* kann durch verschiedene Stoffe gehemmt werden (Auerbach, Lewis et al. 2003). Eine Hemmung ist unter anderem durch Angiostatin möglich (Trojanovsky, Levchenko et al. 2001).

24 Loch-Platten wurden mit 50 µl Matrigel™ pro Well bestückt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Wells vorsichtig mit PBS gespült, um überschüssiges, nicht polymerisiertes Matrigel™ zu entfernen. Es wurden je 5×10^4 HUVEC pro Well ausgesät. Um die biologische Aktivität Angiostatins nachzuweisen, wurden nach 4 Stunden Überstände aus zuvor mit den entsprechenden Viren infizierten HeLa Zellen zu den Wells gegeben (siehe 3.5.1). Ebenso wurde mit den Kontrollen verfahren. Die *tube formation* wurde nach 24 Stunden unter dem Mikroskop (40x) begutachtet und fotografiert. Es war im Laufe der Experimente nicht möglich, die hohe Störanfälligkeit der *tube formation* zu eliminieren. Zudem stand die für eine statistische Auswertung nötige Bilderkennungs- und Analysesoftware nicht zu Verfügung, so dass die Experimente zugunsten der Endothelzellproliferationstests eingestellt wurden.

3.4.7.2. *Endothelzellproliferations-Assay*

Endothelzellen benötigen für ihre Proliferation Wachstumsstimulantien. Besonders deutlich erkennbar an der primären Endothelzelllinie HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), die ohne die im ECGM-Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren, wie unter anderem *basic fibroblast growth factor* (bFGF), nicht kultivierbar ist (Jaffe, Nachman et al. 1973). Gleiches gilt in

gewissem Maße für die immortalisierte Zelllinie SVEC für die sowohl bFGF, *hepatocyte growth factor* (HGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) Wachstumsstimulantien sind.

Angiostatin hemmt selektiv durch Wachstumsfaktoren hervorgerufene Proliferation. So ist es z.B. möglich, HGF- (Wajih and Sane 2003) und bFGF- (O'Reilly, Holmgren et al. 1996; Wu, O'Reilly et al. 1997) bedingte Proliferation zu hemmen, solche die durch VEGF hervorgerufen wird, jedoch nicht (Wajih and Sane 2003).

Auf dieser Hemmung basiert der im Folgenden beschriebene Endothelzell-Proliferations-Assay. Es handelt sich um eine modifizierte Variante der in der Literatur beschriebenen Assays (Auerbach, Lewis et al. 2003).

HUVEC und SVEC Zellen wurden abtrypsiniert und auf 96-Well Platten ausgesät. Die Suspensionen wurden in solchem Maße verdünnt, dass pro Well exakt 100 µl Zellsuspension pipetiert werden konnte. HUVEC zu 5×10^3 /Well in ECGM und SVEC zu $2,5 - 3 \times 10^3$ /Well in DMEM/FCS 3% (Zellzahlbestimmung siehe 3.4.3).

Die Zugabe der Stimulantien, z.B. bFGF oder VEGF, und der Hemmstoffe, z.B. Überstände oder Vektoren, erfolgte nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂. Es wurden folgende Konzentrationen verwendet: bFGF 10 - 20 ng/ml, HGF 10 - 20 ng/ml, VEGF 50 ng/ml (näheres zu Kontrollen und Hemmstoffen siehe jeweils Ergebnisse 4.2.7.2).

Die Zellen wurden anschließend für 72 bis 120 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (siehe 3.4.4) im ELISA-Reader. Die gewonnenen Daten wurden mittels Excel und SPSS ausgewertet (siehe 3.7).

3.5. Gewinnung und Analyse von Proteinen

Für manche Aufgabenstellungen war es nötig, geringe Mengen bestimmter Proteine, zum Beispiel GFP und Angiostatin, herzustellen. Dies wurde durch Transfektion oder Infektion von HeLa oder 293 Zellen mit dem entsprechenden Plasmid oder durch rAAV-vermittelten Gentransfer und Kultivierung über drei Tage erreicht. Je nachdem, ob das Protein eine sekretorische Komponente hatte, wurde entweder der Überstand, oder das Zelllysate zur Analyse verwendet. Um schnell und einfach den Erfolg der Transfektion beziehungsweise Infektion beurteilen zu können, wurden GFP Kontrollen mitgeführt, die sich im Fluoreszenzmikroskop leicht beurteilen ließen. Die gewonnenen Proteine wurden dann meist im Western Blot analysiert.

3.5.1. Gewinnung von Protein-Überständen

Zu den Methoden für die Infektion und Transfektion von Zellen siehe Kapitel 3.4.5 und 3.4.6. Zell-Überstände wurden unter der Sterilwerkbank abgenommen, auf Eis gelagert und für zwei Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand zur späteren Verwendung sofort bei -80 °C eingefroren.

3.5.2. Gewinnung von Proteinen aus Zellen

Um Proteine aus Zellen zu gewinnen, war es nötig, diese zu lysieren, ohne die interessierenden Proteine zu zerstören. Dies wurde mit dem N2a Lysispuffer erreicht.

Nach dem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit 4 °C kaltem N2a Lysispuffer inkubiert. Für konfluent wachsende Zellen in einer 6-Well-Platte wurden je Well 200 µl N2a Lysispuffer verwendet. Nach zwei Minuten wurde das Lysat entnommen und bei 14000 rpm für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand zur spätere Verwendung, zum Beispiel im Western Blot, bei -80 °C eingefroren.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|-----------------|------------------|--------|---------|
| N2a Lysispuffer | Tris/HCl; pH 7,5 | 10 | mM |
| | NaCl | 100 | mM |
| | EDTA | 10 | mM |
| | Nonidet P40 | 0,5 | % |
| | Triton X 100 | 0,5 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

3.5.3. Gewinnung von Proteinen aus Organen

Um Proteine aus Organen zu isolieren, wurde ein modifiziertes Protokoll der in der Literatur veröffentlichten verwendet (Hofmann, Kessler et al. 2003).

Die tiefgefrorenen Organe wurden auf Eis langsam aufgetaut und in hohe Falcon-Röhrchen überführt. Die Proben sollten zwischen 20 und max. 500 µg schwer sein. Größere Organe wie z.B. Leber und Muskel wurden mit dem Skalpell zerkleinert.

Dann erfolgte die Zugabe des Lysispuffers. Es wurde etwa das dreifache Volumen an Lysispuffer verwendet. Mittels Homogenisator wurde das Gemisch nun vermengt. Die Proben wurden anschließend für 15 Minuten auf Eis gelagert. 200 bis 500 µl der Proteinlösung wurden entnommen und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und danach sofort in Eis schockgekühlt und bei 4 °C für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Hieraus erfolgten dann die Proteinkonzentrationsbestimmungen und die weiteren Messungen z.B. mittels Western Blot. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|--------------------|-------------------|--------|---------|
| Lysispuffer | Tris/HCl pH 7,5 | 200 | mM |
| | Triton X-100 | 2 | % |
| | Lämmli Puffer | 1 | x |
| | H ₂ O | ad 100 | % |
| Lämmli Puffer (5x) | Tris/HCl pH 6,8 | 250 | mM |
| | SDS | 10 | % |
| | Glycerin | 43 | % |
| | Bromphenolblau | 0,15 | % |
| | β-Mercaptoethanol | 25 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

3.5.4. Proteinanreicherung mittels StrataClean™ Resin

Mittels StrataClean™ Resin der Firma Stratagene® können geringe Proteinkonzentrationen bis auf ein z.B. mittels Western Blot detektierbares Maß aufzukonzentriert werden.

10 µl der StrataClean-Lösung wurden mit 1 ml einer Proteinlösung gemischt und für 1 Minute gevortext. Anschließend wurden die an StrataClean-Kügelchen gebundenen Proteine bei 2000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Der Protein-Kügelchen-Mix wurde mit 2 x SDS-PAGE Auftragspuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden nun in die Geltaschen aufgetragen.

3.5.5. Proteinanalyse mittels SDS-PAGE

Zur Analyse von Proteinen wurden SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt.

Nach Proteindenaturierung erfolgte die elektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel. Dieses bildet durch Vernetzung der Polyacrylamid-, (PAA)-Moleküle eine netzartige Struktur, deren „Maschenweite“ durch unterschiedliche PAA Konzentrationen variiert werden kann. Durch die Beladung mit stark negativ geladenen Detergenz (SDS) wird der Einfluss unterschiedlicher Oberflächenladungen auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine aufgehoben (überlagert). Die Auftrennung erfolgt dann ausschließlich nach dem Molekulargewicht. Es wurden Sammel- und Trenngel verwendet. Diese Methode erlaubt durch eine Ankonzentrierung der Proteine im niederprozentigen Sammelgel, eine schärfere Auftrennung der Proteinbanden.

3.5.5.1. Gießen der PAA Gele

Es wurden Gelkammern der Firma Bio-Rad verwendet. Zu Beginn wurden die Apparatur und vor allem die Glasplatten sorgfältig mit 70%igem Ethanol gereinigt und getrocknet. Dann erfolgte der sorgfältige Zusammenbau der Apparatur, um ein späteres Auslaufen der Gele zu verhindern. Die ganze Apparatur wurde im Abzug platziert. Es folgte das Gießen des Trenngels. Die in den Versuchen verwendeten PAA-Konzentrationen reichten von 10 bis 15%.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|----------------|------------------|--------|---------|
| Trenngel (10%) | PAA | 10 | % |
| | Tris/HCl; pH 8,8 | 375 | mM |
| | SDS | 0,1 | % |
| | APS | 0,1 | % |
| | TEMED | 0,06 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

PAA (Polyacrylamid), APS (Ammoniumperoxodisulfat) und zuletzt TEMED (Tetramethylethylendiamin) wurden im Abzug dazugegeben. Es wurde vorsichtig durchmischt und behutsam in die Gelkammer gegossen. Das Trenngel wurde dann mit Isopropanol überschichtet, um eine ungestörte Polymerisation zu gewährleisten, als Kontrolle diente der zurückbehaltene Rest. Nach etwa 20 Minuten und erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und mit

Wasser nachgespült. Das Trenngel wurde anschließend mit dem Sammelgel überschichtet, welches äquivalent dem Trenngel im Aufzug vermischt worden war. Um die Geltaschen im Sammelgel besser sichtbar zu machen, enthielt dieses Gel Bromphenolblau (BPB).

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|----------------|------------------|--------|---------|
| Sammelgel (5%) | PAA | 5 | % |
| | Tris/HCl; pH 8,8 | 375 | mM |
| | SDS | 0,1 | % |
| | APS | 0,1 | % |
| | TEMED | 0,06 | % |
| | BPB | 2 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

Der Kamm wurde vorsichtig in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingelassen. Es wurde darauf geachtet, dass etwa 1-2 cm Abstand zwischen Unterrand, Tasche und Anfang des Trenngel blieben. Nach etwa 20 Minuten war auch dieses Gel auspolymerisiert und die Gele wurden in die Laufkammer eingespannt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|----------------|------------------|--------|---------|
| SDS-Laufpuffer | Tris | 250 | mM |
| | Glycin | 1,92 | M |
| | SDS | 1 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Danach wurde kurz zentrifugiert und die Proben in den Taschen aufgetragen. Es wurde zusätzlich immer ein Längenmarker aufgetragen (z.B. All Blue, Firma Bio-Rad). Die Elektrophorese wurde bei 120 bis 200 V durchgeführt.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|--------------------|------------------|-------|---------|
| Lämmli Puffer (5x) | Tris/HCl; pH 6,8 | 250 | mM |
| | SDS | 10 | % |
| | Glycerin | 43 | % |

| | | | |
|--|--------------------------|--------|---|
| | β -Mercaptoethanol | 25 | % |
| | Bromphenolblau | 0,15 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

3.5.5.2. *Coomassiegefärbte Polyacrylamid-Gele*

Zum schnellen, unspezifischen Nachweis von Proteinen wurde Coomassie-Brilliant-Blue R-250 verwendet. Der Farbstoff lagert sich unspezifisch an den basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt diese blau.

Das SDS-Gel wurde der Apparatur vorsichtig entnommen und für 30-60 Minuten in auf 80 °C vorgewärmter Coomassie-Färbelösung geschwenkt.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|-----------------------|--------------------------------|--------|---------|
| Coomassie-Färbelösung | Ethanol | 40 | % |
| | Essigsäure | 10 | % |
| | Coomassie-Brilliant-Blue R-250 | 0,1 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

Die Entfärbung wurde ebenfalls für 30-60 Minuten in auf 80 °C vorgewärmter Coomassie-Entfärbelösung durchgeführt. Zur Beschleunigung des Vorgangs wurden Papiertücher in die Entfärbelösung gelegt und gelegentlich ausgetauscht.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|--------------------------|------------------|--------|---------|
| Coomassie-Entfärbelösung | Ethanol | 40 | % |
| | Essigsäure | 10 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

Das fertige Gel wurde mittels Durchlichtscanner archiviert oder in Plastik eingeschweißt und aufbewahrt.

3.5.5.3. *Transfer der Proteine für Analysen mittels Western Blot*

Das Blotting der Proteine wurde mit Hilfe einer Semi-Dry-Transfer-Unit elektrisch durchgeführt. Dazu wurden zunächst auf die Plattenkathode drei mit Transferpuffer getränkte Whatman-

Filterpapiere gelegt. Nitrozellulose oder PVDF-Membran wurden kurz in Wasser geschwenkt und dann ebenfalls in Transferpuffer inkubiert. Die Membran wurde auf den Whatman-Filterpapieren positioniert. Die Gelkammer wurde demontiert und das Gel vorsichtig auf die Membran gelegt. Den Abschluss bildeten nochmals drei in Transferpuffer getauchte Whatman-Filterpapiere. Der entstandene Stapel wurde mit der Plattenanode verschlossen und bei 55 mA 1 bis 1,5 Stunden geblottet.

| Puffer | Substanz | Menge | Einheit |
|----------------------------------------|----------------|-------|---------|
| Transferpuffer für das Semi-Dry-System | SDS-Laufpuffer | 80 | % |
| | Ethanol | 20 | % |

3.5.5.4. Immunhistochemischer Nachweis der Proteine (Western Blot)

Die folgenden Blockierungen, Waschschritte und Antikörperinkubationen wurden wegen der erheblichen Materialersparnis in einem 50 ml Falcon-Gefäß durchgeführt.

Die Membran wurde zur Blockierung freier Bindungsstellen entweder über Nacht bei 4 °C oder im Rollinkubator bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 3 bis 5%igem Milchpulver in TBST (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) blockiert. Es folgte die Zugabe des ersten Antikörpers in einer Konzentration von 1:500 bis 1:2000 in TBST für eine Stunde, je nach Affinität und Konzentration des Antikörpers. Dann wurde dreimal mit TBST für 10 Minuten gewaschen. Die Zugabe des zweiten Antikörpers erfolgte meist in einer Konzentration von 1:5000 in TBST mit 3%igem Milchpulver für eine weitere Stunde. Es wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Die Membran wurde dem Falcon mit der Pinzette entnommen und kurz mit Wasser gespült. Zur Erreichung der Chemolumineszenz wurde die Membran für 5 Minuten in *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Firma Pierce Biotechnology) geschwenkt, dann wurde sie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurden dann Filme (Kodak BioMax Light Films) aufgelegt und zwischen einer Sekunde und 20 Minuten belichtet.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|--------|------------------|--------|---------|
| TBST | Tris/HCl; pH 8,0 | 10 | mM |
| | NaCl | 150 | mM |
| | Tween 20 | 0,05 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

3.6. Adenovirusfreie Verpackung von AAV 2 und Iodixanol-Aufreinigung

Adeno assoziierte Viren wurden mit Hilfe von 293 Zellen ohne adenovirale Koinfektion hergestellt. Die verpackungsrelevanten adenoviralen Gene wurden durch ein Plasmid bereitgestellt. Statt des früher verwendeten CsCl-Gradienten erfolgte die Aufreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung und Iodixanol-Dichtegradienten-Zentrifugation. Alle Tätigkeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt, es wurden ausschließlich sterile Lösungen verwendet (Xiao, Li et al. 1998; Zolotukhin, Byrne et al. 1999)

3.6.1 Transfektion

Am Tag 0 der Virusverpackung wurden $7,5 \times 10^6$ 293 Zellen in Kulturschalen von 15 cm Durchmesser ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in DMEM Medium mit 10% FCS. Für eine durchschnittliche Virenproduktion wurden 15 Kulturschalen pro Vektor verwendet.

Am folgenden Tag (nach 24 Stunden, dem ersten Tag der Virusproduktion) wurde das Medium durch frisches ersetzt. Drei Stunden später erfolgte die Transfektion mittels der CaCl₂-Präzipitationsmethode (siehe 3.4.5). Es wurden 37,5 µg Plasmid pro Kulturschale im molaren Verhältnis von 1:1:1 (7,5 µg : 7,5 µg : 22,5 µg) von Vektor-, Helfer- (pRC 99 (Girod, Ried et al. 1999)) und Adenoplasmid (pXX 6-80 (Xiao, Li et al. 1998)) transfiziert. Es wurde ausschließlich endotoxinfreie DNA verwendet.

3.6.2 Kultivierung und Ernte der Vektor produzierenden Zellen

Nach 24 Stunden (am zweiten Tag der Virusproduktion) wurde das Medium erneut gewechselt, diesmal jedoch wurde DMEM Medium mit lediglich 2% FCS verwendet, um das Wachstum der 293 Zellen zu bremsen.

Am dritten Tag erfolgte die Ernte. Das Medium wurde abgenommen und verworfen, die Zellen wurden mit sterilen Schabern (Zell-Hebern) von den Kulturplatten sorgfältig gelöst, in wenigen Millilitern Medium aufgenommen und in sterilen Zentrifugenbechern gesammelt. Um ein Zellpellet zu erhalten, wurde bei 3000 G für zehn Minuten zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen.

3.6.3 Aufschluss der 293 Zellen

Das gewonnene Pellet wurde in 7,5 ml Lysispuffer resuspendiert.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|-------------|------------------|--------|---------|
| Lysispuffer | Tris/HCl pH 8,5 | 50 | mM |
| | NaCl | 150 | mM |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

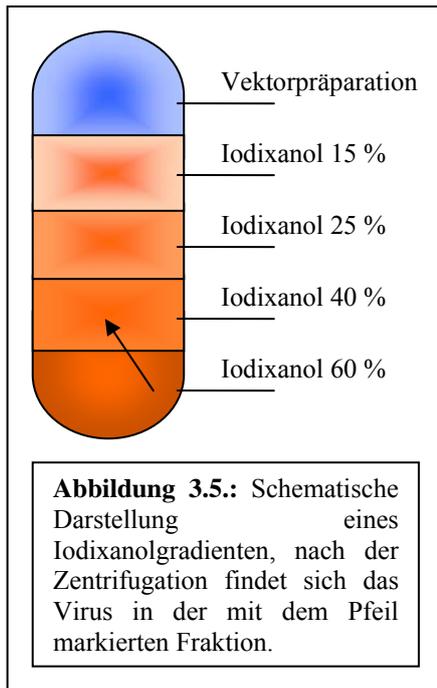
Der Aufschluss der 293 Zellen erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und nach einigen Minuten abrupten Auftauens bei 37 °C im Wasserbad. Das erhaltene Zelllysat wurde bei -80 °C zur weiteren Verarbeitung am nächsten Tag eingefroren.

Am vierten Tag der Viruspräparation wurde das Zelllysat vom Vortag im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit 50 U/ml Benzonase versetzt, um freie DNS und RNS abzubauen. Nach 30 Minuten bei 37 °C wurde der ganze Ansatz bei 3700 G für 20 Minuten zentrifugiert.

3.6.4 Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Um Vektoren größerer Reinheit zu erhalten, wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung mit anschließendem Iodixanol-Dichtegradient durchgeführt. Der Vorteil des Dichtegradienten besteht darin, aufgrund des unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens zum einen Zelldetritus zu entfernen und zum anderen nicht verpackte, leere Viruskapside von verpackten zu trennen.

Hierzu wurde das Volumen des Überstandes nach der Benzonasebehandlung bestimmt und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit Hilfe der Formel: $V_x \times 0,538$ auf eine Endkonzentration von 35% eingestellt. Nach 20 Minuten auf Eis wurde für 20 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der ersten Fällung befand sich das Virus im Überstand. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, das Pellet verworfen. Es wurde eine zweiten Fällung mit einer Endkonzentration von 55% Ammoniumsulfat (Formel: $V_x \times 1,22 - V_x \times 0,538$) durchgeführt. Nach Inkubation auf Eis für 20 Minuten wurde diese mit 12000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Virus befand sich nun im Pellet, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 7,5 ml PBS-MK resuspendiert und in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Hierin wurde ein Iodixanolgradient aufgebaut, indem die Viruslösung zunächst mit 15% (7 ml), dann mit 25% (5



ml), 40% (5ml) und zuletzt mit 60% Iodixanol (6 ml) unterschichtet wurde. Zum Abschluss wurde der Gradient mit PBS-MK je nach Erfordernis überschichtet.

Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden verschweißt und anschließend in der Ultrazentrifuge mit 65000 rpm bei 18 °C für eine Stunde zentrifugiert. Die Gradienten wurden der Zentrifuge sehr vorsichtig entnommen und in eine Haltevorrichtung in der Sterilwerkbank eingespannt. Die 40%-Phase, welche das Virus enthielt, wurde mit einer Hohlneedle abgenommen. Je nach gewünschtem Reinheitsgrad schwankte das gewonnene Volumen zwischen einem und drei Millilitern.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|--------|---------------------------|--------|---------|
| PBS-MK | Phosphate-Buffered Saline | ad 100 | % |
| | MgCl ₂ | 1 | mM |
| | KCl | 2,5 | mM |

3.6.5 Lagerung der Viren

Die produzierten AAV Viren wurden bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden sie auf Eis aufgetaut.

3.6.6 Bestimmung des genomischen Virustiters mittels Dot Blot

Um mit vergleichbaren Vektortitern arbeiten zu können, wurden Konzentrationsbestimmungen der Virusstöcke durchgeführt. Der genomische Virustiter wurde über Dot-Blot und über anschließende Fluoreszenzdetektion mit Digoxigenin-markierten Sonden bestimmt.

Mit dieser Methode war es möglich die unterschiedlichen Viruspräparationen untereinander und mit einem DNA-Standard zu vergleichen (16×10^8 doppelsträngige Moleküle/ μ l). Die Technik basiert auf einer modifizierten Anwendung eines Southern Blots (siehe 3.2.6).

Zu Beginn wurden die Viren durch einen Proteinase K-Verdau oder das DNeasy Kit der Firma Qiagen von ihrem Kapsiden befreit. Die gewonnene DNA wurde denaturiert und auf eine Nylonmembran geblotet, wo sie mittels einer Digoxigenin-gelabelten DNA-Sonde sichtbar gemacht werden konnte.

3.6.6.1. *Herstellung der Verdünnungsreihe*

In einer 96-Well Platte wurden die Proben vorbereitet. In der obersten Reihe wurden die Kontrollen und Proben auf 200 µl bei einer Konzentration von 2N NaOH aufgefüllt. In den folgenden Reihen wurden je Well 100 µl 2 N NaOH vorgelegt. Im Folgenden wurde mit einer Multikanalpipette eine Verdünnungsreihe hergestellt. Mit der Obersten Reihe wurde begonnen und nach sorgfältigem Durchmischen wurden 100 µl in die nächste Reihe pipettiert. Der Vorgang wiederholte sich bis zum Ende der 8 Reihen. Die letzten 100 µl wurden verworfen. Die so entstandene Verdünnungsreihe wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.6.6.2. *Blotten der DNS*

Während der Inkubationszeit wurde die Dot Blot-Apparatur zusammengebaut. Die Apparatur spiegelte in ihrem Aufbau eine 96-Well Platte wieder. An der offenen Unterseite wurde die Nylonmembran platziert. Unter der Nylonmembran befand sich eine ebenfalls einer 96-Well-Platte nachempfundene Absaugvorrichtung die einen stetigen Unterdruck erzeugte und somit Proben, die in eine der Öffnungen auf die Membran pipettiert wurden, durch sie hindurch saugte.

Die Nylonmembran wurde mit H₂O und anschließend 2 N NaOH angefeuchtet und die Öffnungen auf Durchgängigkeit geprüft. Dann wurden die Proben in die entsprechenden Öffnungen pipettiert und durchgesaugt. Mit 200 µl 2 N NaOH pro Well wurde nachgespült.

Die DNA wurde durch trockenes Erhitzen auf 120 °C für 30 Minuten auf der Membran fixiert.

3.6.6.3. *Hybridisierung*

Die Membran wurde vorsichtig in einer Hybridisierungsröhre platziert und mit 42 °C warmen Prähybridisierungspuffer für mindestens 15 Minuten im auf 42 °C vorgewärmten Rollinkubator inkubiert.

Während dieser Zeit wurde die Digoxigenin-gelabelte DNA-Sonde aufgetaut und für 10 Minuten im Wasserbad bei 100 °C gekocht. Ein Eiswasserbad wurde vorbereitet und die Sonde darin

abgeschreckt. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer gegen die Sonde ausgetauscht und die Membran mit dieser bei 42 °C über Nacht inkubiert.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|---------|
| Prähybridisierungspuffer (steril filtriert) | Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,2 | 125 | mM |
| | NaCl | 250 | mM |
| | EDTA | 1 | mM |
| | Formamid | 45 | % |
| | SDS | 7 | % |
| | H ₂ O | ad 100 | % |

3.6.6.4. Dot Blot Entwicklung

Am nächsten Tag wurde die Sonde abgegossen und wieder bei -20 °C eingefroren. Sie konnte wieder verwendet werden. Die Membran wurde zwei Mal mit je 50 ml auf 50 °C vorgewärmten 2 x Waschpuffer für je 5 Minuten im 50 °C warmen Rollhybridisierer gewaschen. Derselbe Vorgang wurde mit 0,1 x Waschpuffer ebenfalls je 50 ml vorgewärmt auf 65 °C für je 20 Minuten im auf 65 °C erwärmten Rollhybridisierer durchgeführt. Es folgte ein kurzer Waschschriff mit 50 ml Waschpuffer bei Raumtemperatur. Anschließend wurde mit 35 ml Blockingpuffer bei Raumtemperatur für 35 Minuten blockiert. Dem folgte der Austausch gegen 15 ml Blockingpuffer, denen 1,5 µl Anti-Dig-Antikörper zugesetzt wurden. Hiermit wurde die Membran weitere 35 Minuten inkubiert. Zwei Waschschriffe mit je 50 ml Waschpuffer bei Raumtemperatur für je 15 Minuten folgten. Die Membran wurde der Hybridisierungsröhre entnommen und für eine Minute in Detektionspuffer geschwenkt. Dann wurde direkt auf die Membran 500 µl Detektionspuffer, welcher mit 5 µl CSPD versetzt war, gegeben und das Ganze eingeschweißt und für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank belassen.

In der Dunkelkammer wurden dann Filme (Kodak BioMax Light Films) aufgelegt und für 5 bis 20 Minuten belichtet.

| Ansatz | Substanz | Menge | Einheit |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|---------|
| Maleinsäurepuffer; pH 7,5 mit 10 N NaOH eingestellt, autoklaviert | Maleinsäure | 100 | mM |
| | NaCl | 150 | mM |
| 2 x Waschpuffer | 20 x SSC | 10 | % |

| | | | |
|-------------------|-------------------------------|------|----|
| | SDS | 0,1 | % |
| 0,1 x Waschpuffer | 20 x SSC | 0,5 | % |
| | SDS | 0,1 | % |
| Waschpuffer | Maleinsäurepuffer | 99,7 | % |
| | Tween 20 | 0,3 | % |
| 20 x SSC | NaCl | 3 | M |
| | Natriumcitrat; pH 7,0 | 300 | mM |
| Blockingpuffer | Maleinsäurepuffer | 99 | % |
| | Blocking Reagenz (Boehringer) | 1 | % |
| Detektionspuffer | Tris/HCl; pH 9,5 | 100 | mM |
| | NaCl | 100 | mM |

3.7. *Statistische Methoden*

3.7.1 Allgemeines

Die durchgeführten statistischen Untersuchungen wurden mit den Programmen Excel (Microsoft) und SPSS (SPSS GmbH Software) durchgeführt. Die SPSS-Version wurde freundlicherweise durch das Institut für medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt.

Alle Daten wurden in Excel übertragen und visualisiert. Danach erfolgte die weitere statistische Bearbeitung mit SPSS. Soweit möglich wurden Daten als Boxplot dargestellt.

3.7.2 Durchgeführte statistische Tests

Bei den analysierten Daten handelte es sich um Auswertungen von Zellkulturexperimenten. Es wurde von nicht normalverteilten Werten ausgegangen. Bei Vorliegen von unabhängigen Stichproben wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4. Teil - Ergebnisse

4.1. *Selbstkomplementäre Adeno-assoziierte Viren*

4.1.1. Allgemeines

Bei Adeno-assoziierten Viren handelt es sich um einzelsträngige DNA-Viren. Die genetische Information liegt direkt nach Infektion als Einzelstrang (ss) DNA in infizierten Zellen vor. Eine Genexpression erfordert eine Komplementärstrang-Synthese (Hoggan, Blacklow et al. 1966).

Es zeigte sich, dass diese Zweitstrangsynthese ein wichtiger limitierender Schritt auf dem Weg zur Genexpression ist und die Transduktionseffizienz maßgeblich beeinflusst (Ferrari, Samulski et al. 1996; Nakai, Storm et al. 2000). So liegt die Transduktionseffizienz von AAV-2 auch bei hohen infektiösen Titern in der Mausleber bei lediglich ca. 1-5%, obwohl Vektor-DNA in nahezu allen Hepatozyten detektiert werden kann (Snyder, Miao et al. 1997). Die Transgenexpression kann durch Adenovirus-Coinfektion, welche die Zweitstrangsynthese fördert, deutlich erhöht werden (Miao, Nakai et al. 2000). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der limitierende Schritt im Hinblick auf eine hohe Transduktionseffizienz von AAV-2 in der Mausleber die Synthese eines doppelsträngigen Genoms ist. Ein selbstkomplementäres (also doppelsträngiges) Virus enthält demgegenüber bereits primär eine doppelsträngige DNA (McCarty, Fu et al. 2003).

Die Vorteile dieser modifizierten AAV-Vektoren beruhen vermutlich in erster Linie auf der Fähigkeit, ohne Zweitstrangsynthese Genexpression zu erreichen (McCarty, Fu et al. 2003). Auf diese Weise beginnt die Proteinsynthese direkt nach der Infektion. Im Vergleich hierzu dauert es ca. zwei Wochen bis bei ssAAV *in vivo* eine Genexpression erkennbar wird (Miao, Nakai et al. 2000). Wohl aufgrund der früh einsetzenden Synthese und Aktivität des transduzierten Genoms wird der AAV-Vektor in einem deutlich geringeren Prozentsatz durch die Zelle inaktiviert oder eliminiert. So steigt etwa die Transduktionseffizienz *in vivo* in der Mäuseleber von 1-5% der Leberzellen für ssAAV auf bis zu 50% für scAAV (McCarty, Fu et al. 2003).

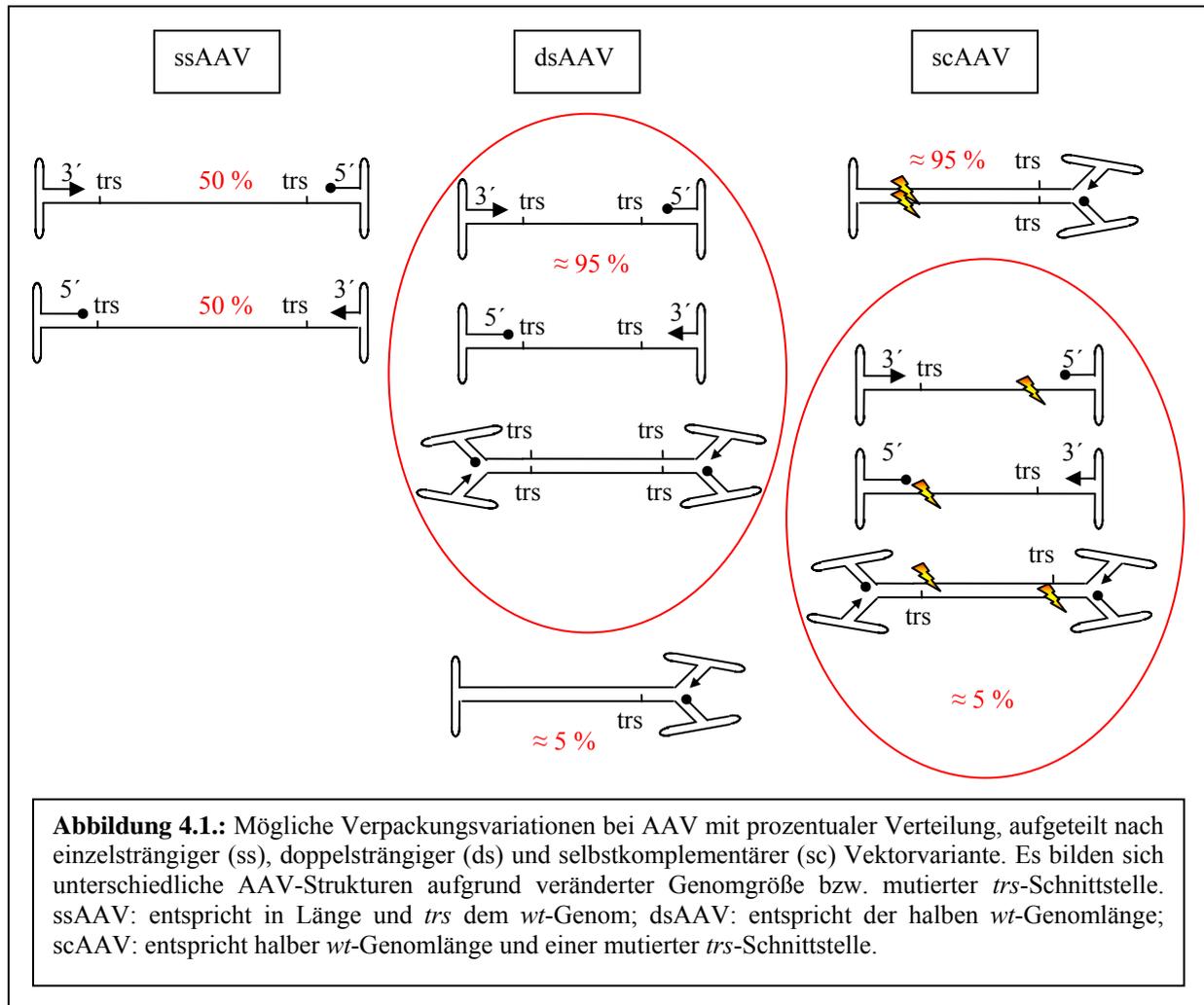
Wenn das Genom eines AAV-Vektors die Hälfte der Größe seiner Wild-Typ-Variante beträgt, können entweder zwei Kopien des Genoms oder eine dimere Variante in das Kapsid verpackt werden. Liegen zwei Kopien desselben Genoms in einem Kapsid vor, so kann es sich bei diesen entweder um Plus- oder Minusstränge handeln.

Treffen zwei + oder zwei – Stränge aufeinander so liegen in der infizierten Zelle lediglich zwei Einzelstränge des Genoms vor. Für die Genexpression ist eine Komplementärstrangsynthese erforderlich. Es kommt zu denselben Vorgängen wie bei der Infektion durch ein konventionelles Wild-Typ-Genom. Liegen jedoch ein + und ein – Strang im Kapsid vor, so können diese, aufgrund ihrer entgegen gesetzten Polarität hybridisieren und so einen Doppelstrang bilden. Sie sind somit nicht auf eine Komplementärstrangsynthese angewiesen.

Verwendet man verkürzte (maximal halbe Wild-Typ-Länge) AAV-Vektoren tritt noch ein zweiter Effekt auf. Der während der AAV-Replikation stattfindende *nicking*-Vorgang (siehe Einleitung) an der *trs* einer ITR läuft lediglich mit einer gewissen, nicht vollständigen Effektivität ab. Bei halbierten AAV-Wild-Typ-Varianten werden diese nicht geschnittenen Varianten aufgrund ihrer im Vergleich kürzeren Länge dennoch verpackt. Es liegen somit zu einem kleinen Prozentsatz dimere Varianten des AAV Genoms vor. Infizieren diese Varianten eine Zelle, sind sie ebenfalls nicht auf eine Komplementärstrangsynthese angewiesen, da durch Rückfaltung des Dimers ein doppelsträngiges (selbstkomplementäres) Genom entsteht.

Diese Effekte bei verkürzten AAV-Vektoren, bei denen zum Teil doppelsträngige Varianten entstehen, führen zu einer heterogenen Virenpopulation, bei der etwa 95% der Viren als konventionelle Vektoren mit einzelsträngiger DNA vorliegen und etwa 5% entweder als +/- Kombination oder als dimere, rückfaltende, also selbstkomplementäre Version.

Die Produktion von scAAV über ein verkürztes Wild-Typ-Genom ist demnach also wenig effektiv. Um die Bildung der dimeren Variante zu fördern und um eine homogenere Virenpopulation zu erreichen, in der die dimere Variante des AAV überwiegt, ist eine Deletion der *trs* in einer der ITR in einem verkürzten AAV-Vektor notwendig. Durch Deletion der Schnittstelle (siehe Einleitung) fehlt die Möglichkeit für den Rep-Proteinkomplex an dieser Stelle zu schneiden und es entstehen zu einem sehr hohen Prozentsatz dimere scAAV-Varianten (hierzu siehe auch Abbildung 4.1.).



4.1.1.1. Erklärungen zur AAV-Nomenklatur:

- AAV Wild-Typ-Virus oder Vektoren mit konventioneller Länge des Genoms ohne ITR-Mutation liegen als Einzelstränge vor und werden als *single stranded AAV* (ssAAV) bezeichnet.
- AAV-Vektoren mit halbiertem Wild-Typ Genom ohne mutierte ITR, die entweder als +, -, +/+, -/- oder +/- Strang oder aufgrund eines nicht geschehenen *nicking*-Vorgangs als Dimer vorliegen, werden als *double stranded AAV* (dsAAV) bezeichnet.
- Viren mit einer mutierten ITR und einer Länge des Genoms von maximal der des halben AAV-Wild-Typ-Genoms liegen vorwiegend als Dimer, also selbstkomplementär, vor und werden als *selfcomplementary AAV* (scAAV) bezeichnet.

4.1.1.2. Aufgaben, Fragestellungen und Ziele der Arbeit an und mit selbstkomplementären AAV-Vektoren:

- Konstruktion der für ssAAV-, dsAAV- und scAAV-Vektoren benötigten Plasmide, sowie eines sc-Basisplasmids.
- Analyse der Klonierung sowie der Struktur der klonierten und produzierten viralen Vektoren.
- Testung der Vektoren unter *in vitro* Bedingungen mit der Frage, ob sich durch selbstkomplementäre AAV-Vektoren eine Verbesserung hinsichtlich der verzögerten Genexpression und der Höhe der Genexpression erreichen lässt?
- Bestätigung der von McCarty et al. veröffentlichten Ergebnisse über selbstkomplementäre AAV-Vektoren.

Die Arbeiten an selbstkomplementären AAV-Vektoren erfolgte in einem Gemeinschaftsprojekt mit Herrn Dipl. chem. Franz Gerner. Die Analyse der Struktur von AAV-GFP kodierenden Vektoren erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau cand. med. Sandra Lutz. Daten aus diesem Projekt sind zum Teil ebenfalls Bestandteil der Dissertationsarbeiten der oben genannten.

4.1.2. Klonierungsstrategie des selbstkomplementären-Basis-Plasmids

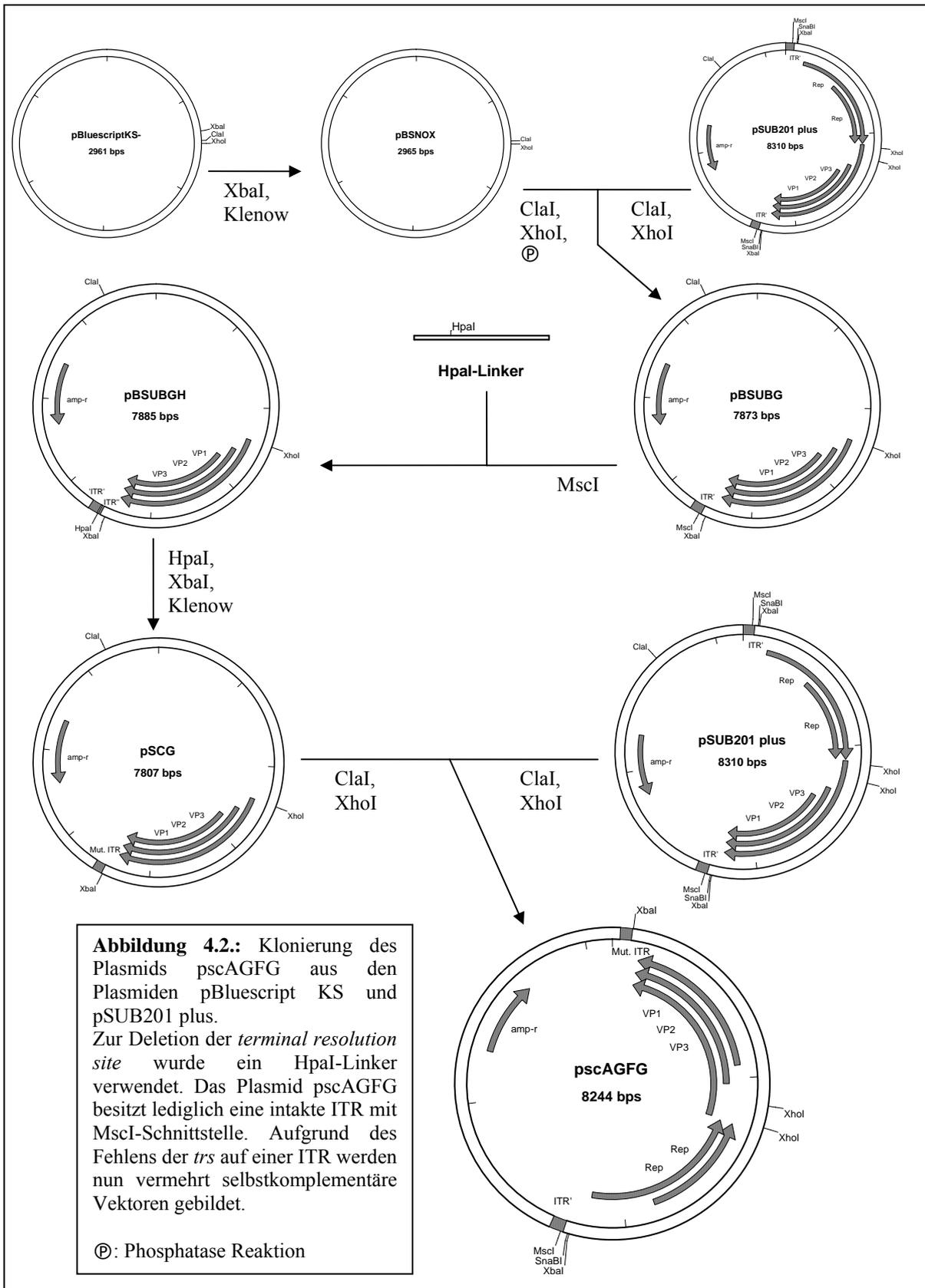
Für die Herstellung des selbstkomplementären-Basis-Plasmids musste die *trs* einer AAV-ITR deletiert werden. In Ermangelung natürlicher Schnittstellen in diesem DNA-Bereich waren hierfür einige Vorklonierungen erforderlich.

Der kommerziell erhältliche Klonierungsvektor pBluescript KS- (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) diente als Ausgangsplasmid. Die in diesem Vektor enthaltene XbaI-Schnittstelle wurde durch Öffnen des Vektors mit XbaI und Auffüllen des 5'-Überhangs mittels einer Klenow-Reaktion und Religation deletiert. Der neu entstandene Vektor wurde als pBSNOX bezeichnet.

Das AAV-Wildtyp-Genom lag auf dem Vektor pSUB201(+) vor. Um lediglich an einer ITR eine *trs*-Deletion durchzuführen wurde eine ITR isoliert. Die Vektoren pBSNOX und pSUB201(+) wurden mit ClaI und XhoI geschnitten. Das mit 4924 bp größte Fragment aus pSUB201(+) wurde isoliert und in das geöffnete pBSNOX-Plasmid kloniert. Das entstandene neue Plasmid enthielt lediglich eine ITR und wurde als pSUBG bezeichnet. Um nun die *trs* zu deletieren (siehe

Einleitung), wurde ein HpaI-Linker mit der Sequenz **5'-GTC GTT AAC GAC-3'** in die in der ITR vorhandene MscI-Schnittstelle eingefügt. Diese Schnittstelle wurde durch das Einfügen des Linkers zerstört. Das neue Plasmid wurde als pBSUBGH bezeichnet. Dieser Klonierungsschritt entspricht dem in der Literatur vorgeschriebenen Vorgehen (Snyder, Im et al. 1993; McCarty, Fu et al. 2003). Die eigentliche Deletion der *trs* erfolgte durch das Schneiden des Plasmids mit HpaI und XbaI, Auffüllung des 5'-Überhangs mittels Klenow-Reaktion und Religation. Das neue Plasmid wurde als pscG bezeichnet (siehe Abbildung 4.2.).

Zum Schluss wurde die ursprünglich ausgeschnittene und nun mutierte Sequenz durch Spaltung mit ClaI und XhoI von pscG und pSUB201(+) in pSUB201(+) reinsertiert. Das entstandene Plasmid mit dem Namen pscAGFG entspricht dem ursprünglichen pSUB201(+) bis auf eine Deletion der *trs* in einer ITR. Durch die eingefügte Veränderung der ITR kann der Rep-Proteinkomplex bei der DNA-Vermehrung nicht mehr an der *trs* spalten und es entstehen selbstkomplementäre AAV-Vektoren, vorausgesetzt die DNA-Sequenz zwischen den ITR ist nicht länger als etwa die Hälfte des Wildtyp-Genoms.

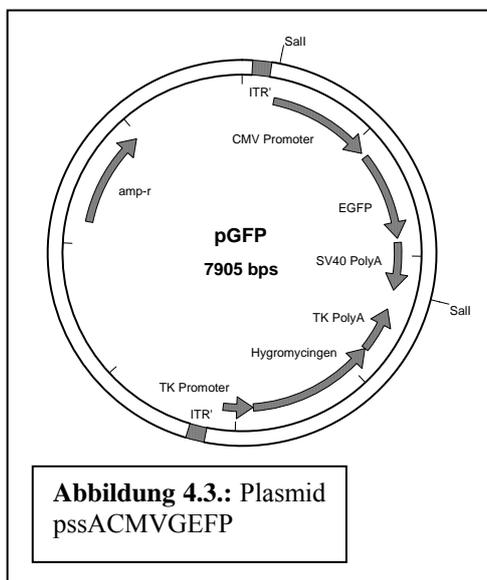


4.1.3. Klonierung der GFP-Plasmide pssACMVGFP, pdsACMVGFP und pscACMVGFP

Um Untersuchungen zum Einfluß der Modifikation auf die Vektoren und ihre Infektionsbiologie durchzuführen, wurde eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) (Cormack, Valdivia et al. 1996), ein modifiziertes Chromophor der Qualle *Aequorea victoria* verwendet (Shimomura 2005).

Die Funktion eines Chromophors besteht darin, dass es nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Licht einer anderen Wellenlänge emittieren kann. Das Absorptionsmaximum von eGFP ist eingipflig und liegt bei 490 nm (Heim, Cubitt et al. 1995).

4.1.3.1. Klonierung von pssACMVGFP



Das konventionelle pssACMVGFP-Plasmid (ursprüngliche Bezeichnung: pGFP) lag in der Arbeitsgruppe vor und wurde zur Herstellung der ssAAV-Variante verwendet (Girod, Ried et al. 1999).

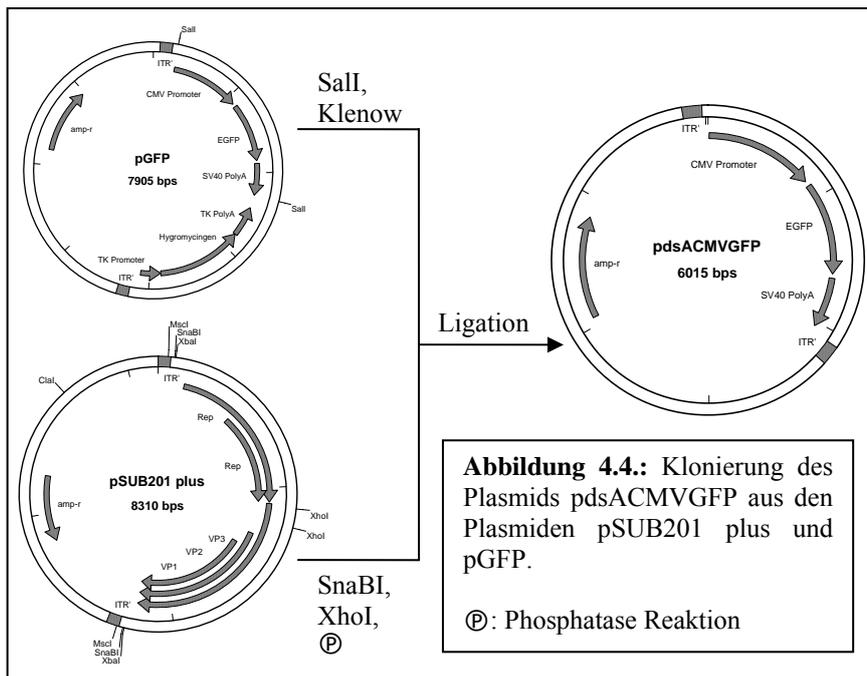
Dieses Plasmid wurde sowohl anhand des Bandenmusters nach Verdau mit Restriktionsenzymen als auch durch Sequenzierung überprüft.

4.1.3.2. Klonierung von pdsACMVGFP

Zur Herstellung von pdsACMVGFP wurde das Plasmid pGFP mittels Sall geschnitten und mit Klenow-Reaktion der 5'-Überhang aufgefüllt.

Das Plasmid pSUB201(+) wurde mit den Restriktionsenzymen SnaBI und XhoI geschnitten, das *wt*-AAV codierende Fragment verworfen und der ITR-tragende Backbone zur Verhinderung einer Religation mit einer Phosphatase-Reaktion dephosphoryliert.

Das GFP tragende, mit 2037 bp kleinere Fragment aus pGFP wurde in diesen Backbone eingebaut.

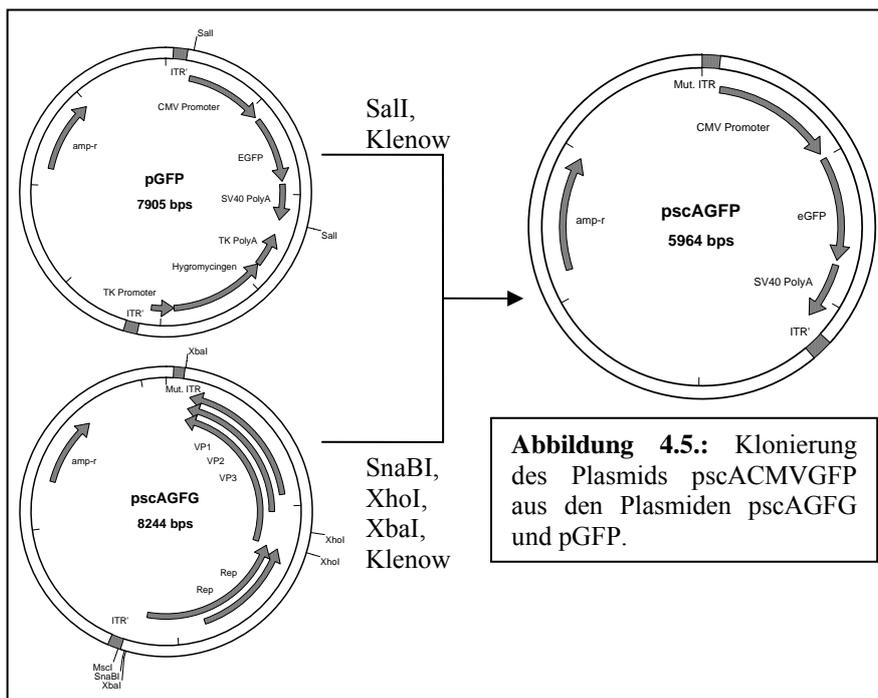


Bei dem neu entstandenen Plasmid pdsACMVGFP (siehe Abbildung 4.4.) handelt es sich um eine verkürzte Form des ursprünglichen pGFP-Plasmids. Durch eine Gesamtlänge der Sequenz zwischen den ITR von weniger als der Hälfte des *wt*-Genoms können zu einem gewissen Prozentsatz selbstkomplementäre

Vektoren bzw. Vektoren, die sowohl + und – Strang in einem Kapsid tragen, entstehen. Dieses Plasmid wurde sowohl anhand des Bandenmusters nach Verdau mit Restriktionsenzymen als auch durch Sequenzierung überprüft.

4.1.3.3. Klonierung von pscAVMVGFP

Zur Herstellung von pscACMVGFP wurde ebenfalls die Expressionskassette des pGFP-Plasmids



verwendet. Mittels SalI-Restriktionsverdau und anschließender 5'-Überhangsmodifikation mittels Klenow-Reaktion (analog zur pdsACMVGFP Klonierung) wurde ein 2037 bp großes Fragment aus dem pGFP-Plasmid isoliert. Aus dem Plasmid pscAGFG wurde mittels SnaBI-, XbaI- und XhoI-Restriktionsverdau ein

Backbone ausgeschnitten, welches eine intakte und eine mutierte ITR trug. Die 5'-Überhänge wurden mittels Klenow-Reaktion modifiziert. Die Ligation beider Fragmente führte zu dem als pscACMVGF₂ bezeichneten Plasmid (siehe Abbildung 4.5.). Dieses sollte durch eine deletierte *trs* zur Bildung von selbstkomplementären Viren führen.

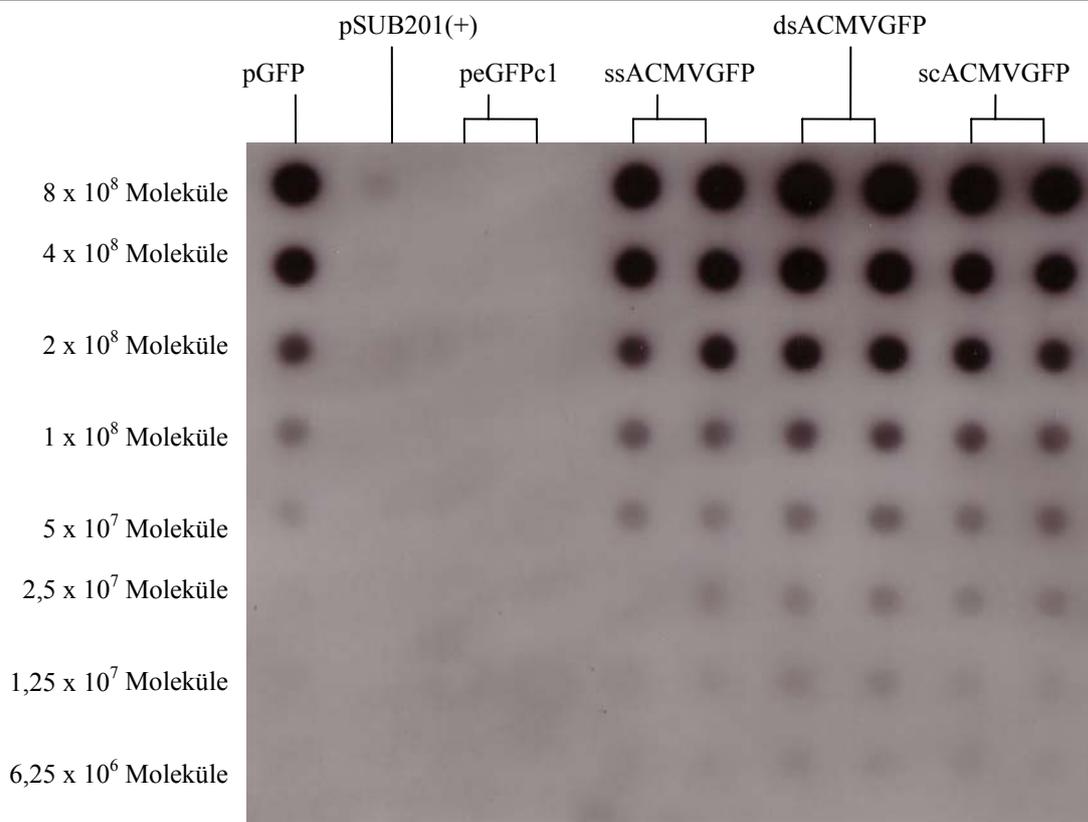
Dieses Plasmid wurde sowohl anhand des Bandenmusters nach Verdau mit Restriktionsenzymen als auch durch Sequenzierung überprüft.

4.1.4. Virusproduktion von ssACMVGF₂, dsACMVGF₂ und scACMVGF₂

Nach der Plasmidanalyse wurde die DNA vermehrt (siehe 3.2.3.). Dann erfolgte die Viruspräparation (siehe 3.6.). Um eine Abschätzung der Konzentration viraler Partikel zu erreichen und um die einzelnen Präparationen untereinander vergleichbar zu machen, wurde eine Dot-Blot-Analyse durchgeführt (siehe 3.6.6.).

Abbildung 4.6.: Dot-Blot-Analyse der Virenpräparation von ssACMVGF₂, dsACMVGF₂ und scACMVGF₂ sowie peGFPc1.

Bei peGFPc1 handelt es sich um ein GFP tragendes Plasmid, welches keine ITR enthält. Aufgrund der fehlenden ITR wird es nicht verpackt und dient als Präparationskontrolle. Lediglich in Kapsiden verpackte DNA übersteht den Präparationsvorgang (peGFPc1 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. J. Enssle zur Verfügung gestellt).



Alle Viren wurden in ausreichender Konzentration präpariert. Es wurde je 160 µl Viruspräparat zur Analyse eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung ergab sich wie folgt: Dot Größe/Stärke verglichen mit Standard geteilt durch die Anzahl an eingesetzten µl (160). Bei scACMVGFP wurde aufgrund der Dimeren-Struktur und des somit pro Molekül zweimaligen Vorkommens einer GFP-Sequenz zusätzlich durch 2 dividiert.

$8 \times 10^8 : 160 =$ ssACMVGFP Konzentration von 5×10^6 Partikeln/µl

$16 \times 10^8 : 160 =$ dsACMVGFP Konzentration von 10×10^6 Partikeln/µl

$8 \times 10^8 : 160 : 2 =$ scACMVGFP Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Partikeln/µl

4.1.5. Analyse der viralen DNA-Struktur von ss, ds und scAGFP

Nach 4.1.1 unterscheiden sich ss-, ds- und sc-AAV-Vektoren sowohl hinsichtlich ihres dreidimensionalen Aufbaus als auch in ihrer individuellen Genomlänge. So ist bei einem ssAAV-Vektor mit einer homogenen Vektorpopulation zu rechnen. Bei allen viralen Genompartikeln liegt die gleiche DNA-Länge vor, die der auf dem Ausgangsplasmid klonierten DNA entspricht.

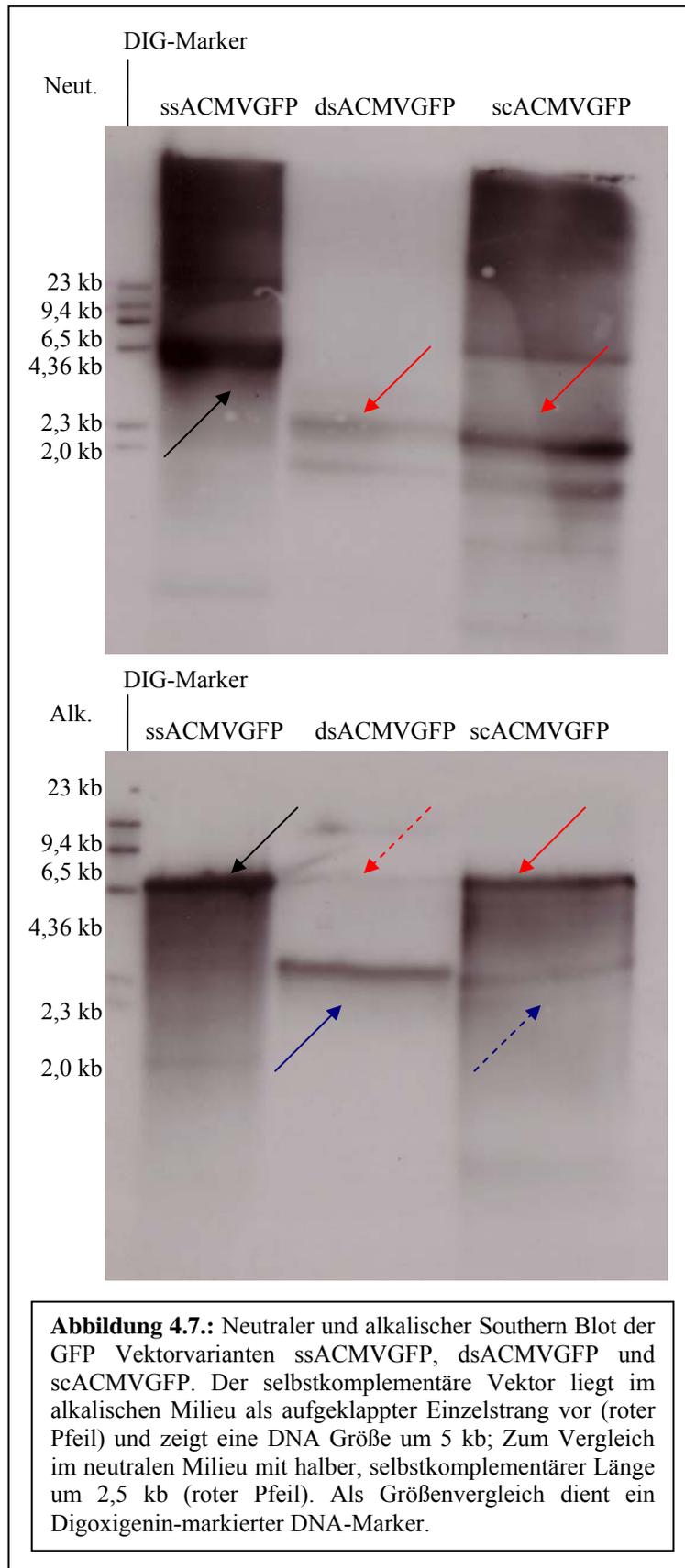
Bei einem scAAV-Vektor kommt es aufgrund der mutierten *trs* zu einer verpackten Sequenz, die annähernd der doppelten auf dem Ausgangsplasmid klonierten, zwischen den ITR liegenden Sequenz entspricht. Zudem werden zu einem geringen Prozentsatz trotz *trs*-Mutation geschnittene (einzelnsträngige) Vektorvarianten verpackt (siehe Abbildung 4.1.). Ähnlich verhält es sich bei den dsAAV-Vektoren, nur dass hier das Verhältnis von einzel- und doppelsträngigen AAV-Varianten im Vergleich zu scAAV-Vektoren umgekehrt ist.

Da die scAAV-Sequenz als doppelsträngige DNA vorliegt, ist ihr Laufverhalten im Agarosegel nicht mit dem Laufverhalten einzelsträngiger DNA (ssAAV-Sequenz) zu vergleichen (J.Sambrook 1989). Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde ein Agarosegel unter alkalischen Bedingungen (denaturierend) durchgeführt und mit einem neutralen Agarosegel verglichen. Aufgrund der geringen DNA-Konzentrationen wurden die Gele mittels Southern Blot visualisiert (siehe Abbildung 4.7.).

Im neutralen Gel laufen die selbstkomplementäre Form von AAV und die doppelsträngige Form auf gleicher Höhe (rote Pfeile), da sie, abgesehen von der *trs* Mutation, eine vollkommen identische DNA-Länge besitzen (halbes *wt*-Genom). Der konventionelle AAV-Vektor (ssAAV-Form) läuft auf der doppelten Höhe, da er *wt*-Genomlänge besitzt (schwarzer Pfeil Abb. 4.7.).

Im alkalischen Blot liegt doppelsträngige DNA nun aufgrund der denaturierenden Bedingungen in einzelsträngiger Form vor.

Die scAAV-Form klappt auf und läuft (siehe rote Pfeile) entsprechend ihrer Größe über der lediglich verkürzten dsAAV-Variante (siehe blaue Pfeile).



lediglich verkürzten dsAAV-Variante (siehe blaue Pfeile).

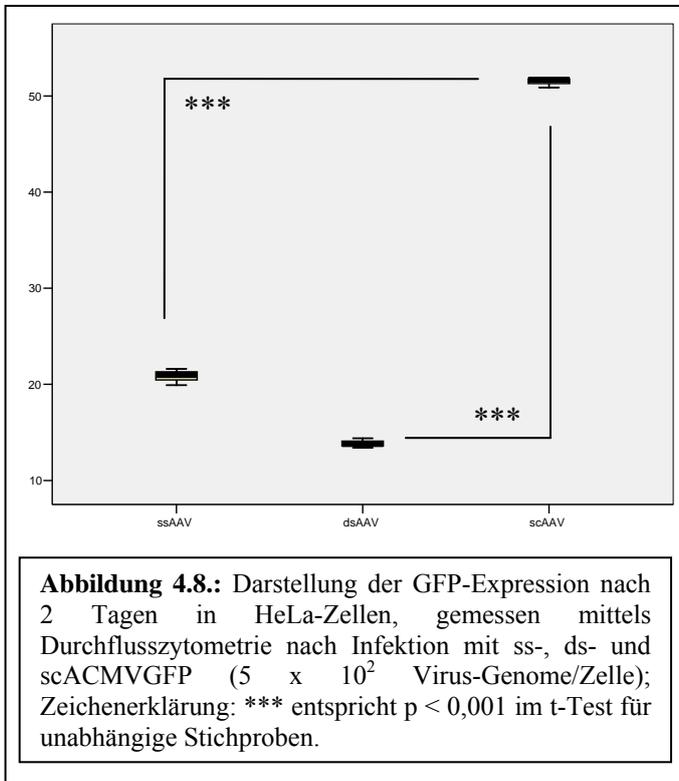
Die konventionelle ssAAV-Variante zeigt ein Laufverhalten analog dem neutralen Gel, da es sich bei ihr grundsätzlich um die einzelsträngige AAV-Form handelt und somit die denaturierenden Bedingungen bei dieser Variante zu keinen Veränderungen führen.

Der Schneidevorgang der Rep-Proteine geschieht nicht mit 100%iger Effektivität, ebenso kann er durch die *trs*-Mutation nicht vollständig unterbunden werden. Die gestrichelten Pfeile markieren diese nicht geschnittene (dsAAV) bzw. trotz Mutation in der *trs* geschnittenen scAAV-Varianten.

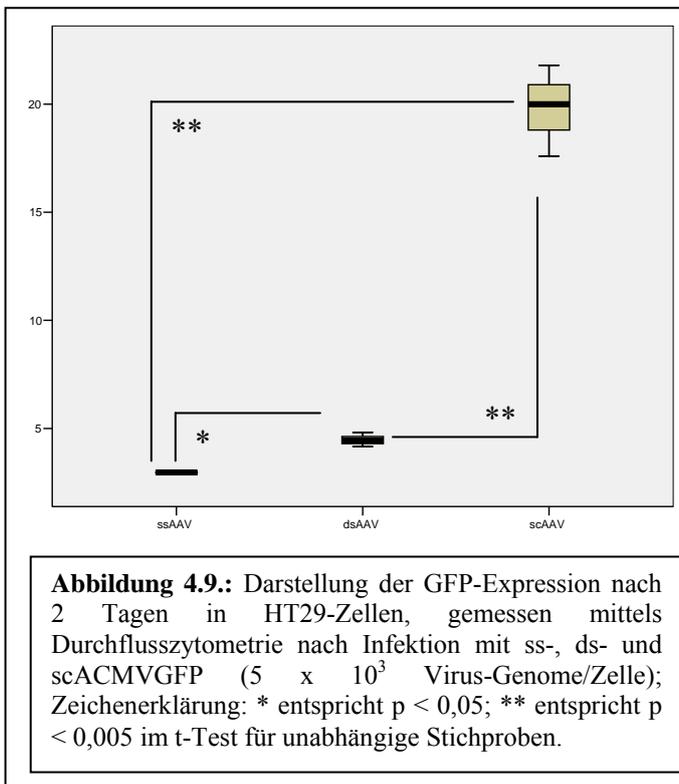
Die Gele demonstrieren die in Abbildung 4.1 gezeigte Vektorverteilung. Vor allem das neutrale Gel zeigt zahlreiche Banden, die als Artefakte zu interpretieren sind. Auf diesen Punkt wird im Folgenden noch genauer eingegangen (siehe Diskussion 5.2.3.3.).

4.1.6. Vergleich der GFP-Vektoren *in vitro*

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Sandra Lutz zur Verfügung gestellt und sind Teile Ihrer Dissertationsarbeit.



Um die funktionellen Eigenschaften der produzierten Vektoren zu testen, wurden Infektions-Expressions-Experimente durchgeführt. Zelllinien, hier dargestellt HeLa und HT29, wurden mit einheitlicher *multiplicity of infection* (MOI) infiziert. Nach zwei Tagen wurde die Stärke der GFP-Expression mittels *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) gemessen. Es zeigte sich, dass der Expressionsunterschied zwischen ss- und dsAAV-Vektoren inkonsistent ist. Der Anteil an selbstkomplementären Vektoren beträgt bei der dsAAV-Population knapp 5% (siehe Abbildung 4.1. und 4.7.).



Im Gegensatz hierzu ist der Expressionsunterschied zu scAAV-Vektoren hochsignifikant ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,005$). Hier liegt der Anteil an selbstkomplementären Vektoren bei knapp 95% (siehe Abbildung 4.1. und 4.7.).

4.2. *Angiostatin*

4.2.1. Ziele der Arbeiten mit Angiostatin

Das antiangiogen wirkende Protein Angiostatin zeigte in Zellkultur und Tumormodellen eine viel versprechende Hemmwirkung auf das Voranschreiten des Tumorwachstums (siehe Einleitung). Durch die geringe Größe der Angiostatin cDNA (1151 bp) bietet sich dieses Protein als guter Kandidat einer auf AAV-Vektoren basierten Gentherapie an.

Ziele dieses Projektes waren es,

- Angiostatin kodierende AAV-Vektoren sowohl in der konventionellen (einzelnsträngigen) Form als auch in der selbstkomplementären Version zu klonieren und diese in Hinblick auf ihr Expressionsvermögen zu vergleichen.
- in den klonierten Vektoren das Transgen unter die Kontrolle von zweierlei Promotoren, CMV / EF-1 α /HTLV (*hybrid promotor*, InvivoGen), zu setzen und diese in Hinblick auf ihr Expressionsvermögen zu vergleichen.
- die Struktur der klonierten Vektoren zu testen und Angiostatin-Proteinexpression *in vitro* nachzuweisen (Western Blot) sowie funktionell die Wirksamkeit des exprimierten Angiostatins in einem Zellkultur-basierten Angiogenese-Assay zu zeigen.
- bei Erfolg dieser Schritte die Vektoren im Tumormausmodell einer *in vivo*-Testung zu unterziehen.

Die Vorarbeiten erforderten die Etablierung eines Angiogenese-Assay sowie die Etablierung eines Verfahrens um Proteinexpression mittels Western Blot nachzuweisen.

Analog zu diesem Projekt wurde in einem parallelen Ansatz durch Herrn dipl. chem. Franz Gerner das Protein Endostatin bearbeitet. Die Klonierungsschritte basieren zum Teil auf Plasmiden, die im Rahmen dieser Versuche generiert wurden und Teil der Dissertation von Herrn Gerner sind.

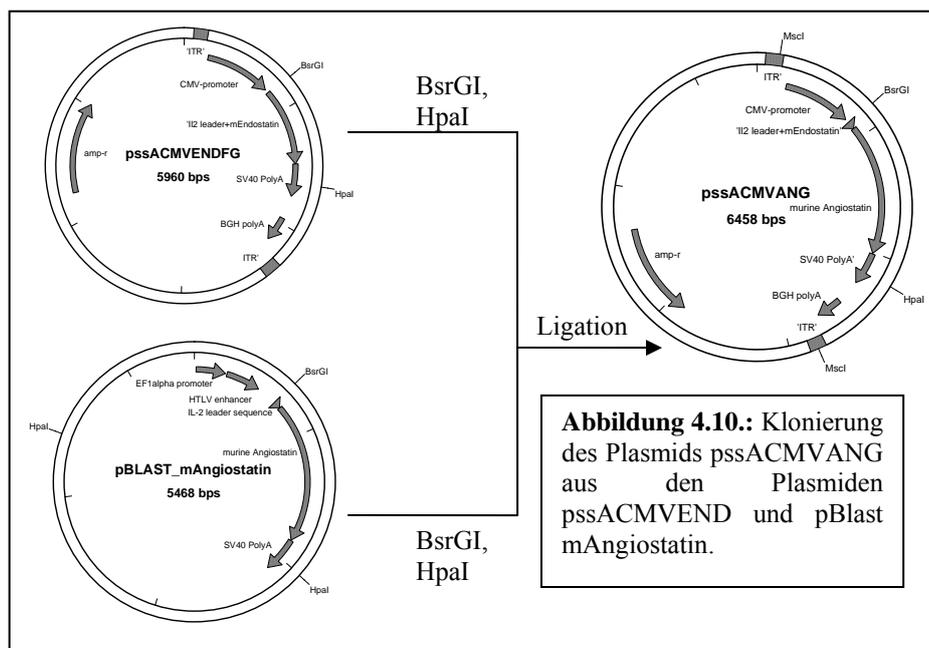
4.2.2. Vektor-Klonierungen

Es wurden insgesamt 4 Angiostatin kodierende AAV-Vektoren generiert, jeweils in ss und sc Form und mit den Promotoren CMV und EF-1 α /HTLV.

Die Angiostatin-cDNA wurde von der Firma InvivoGen, San Diego, U.S.A bezogen. Das Plasmid pBLAST-mAngiostatin beinhaltet ein murines Angiostatin-Fusionsprotein (Kringel 1-4), das mit der sekretorischen Signalsequenz von humanem Interleukin-2 (hIL2) modifiziert wurde. Am Ende des Fusionsgens schließt sich eine SV40polyA-Sequenz an (Carswell and Alwine 1989). Der EF-1 α /HTLV-hybrid-Promotor wurde ebenfalls von InvivoGen bezogen. Er stellt eine Fusion des *human Elongation Factor-1 α* (EF-1 α) (Kim, Uetsuki et al. 1990) mit dem R-U5' Abschnitt des *Human T-Cell Leukemia Virus* (HTLV) (Takebe, Seiki et al. 1988) dar. Der CMV-Promotor entspricht dem in der Arbeitsgruppe gebräuchlichen Promotor (Girod, Ried et al. 1999).

4.2.2.1. Klonierung von pssACMVANG

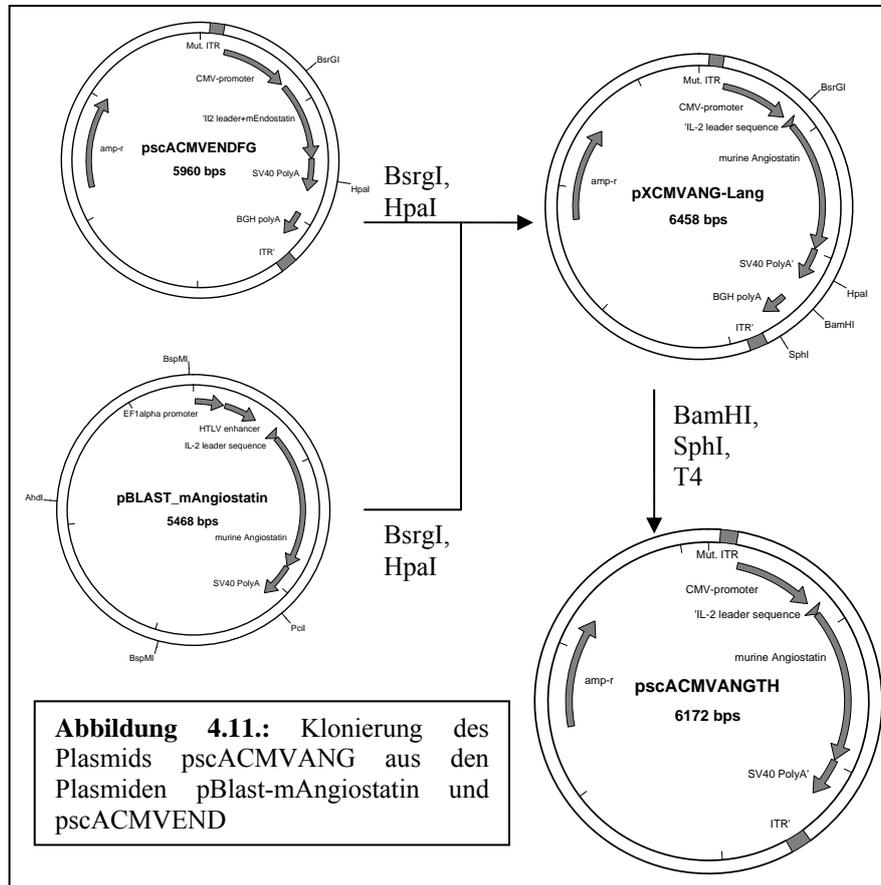
Aus dem Plasmid pssACMVENDFG wurde die Endostatinsequenz mittels BsrGI und HpaI geschnitten. Das Backbone wurde isoliert. Der Vektor pBlast-mAngiostatin wurde analog mittels



BsrGI und HpaI geschnitten und das Angiostatin tragende Insert mit dem zuvor isolierten Backbone ligiert. Das neu entstandene Plasmid wurde als pssACMVANG bezeichnet.

4.2.2.2. Klonierung von *pScACMVANG*

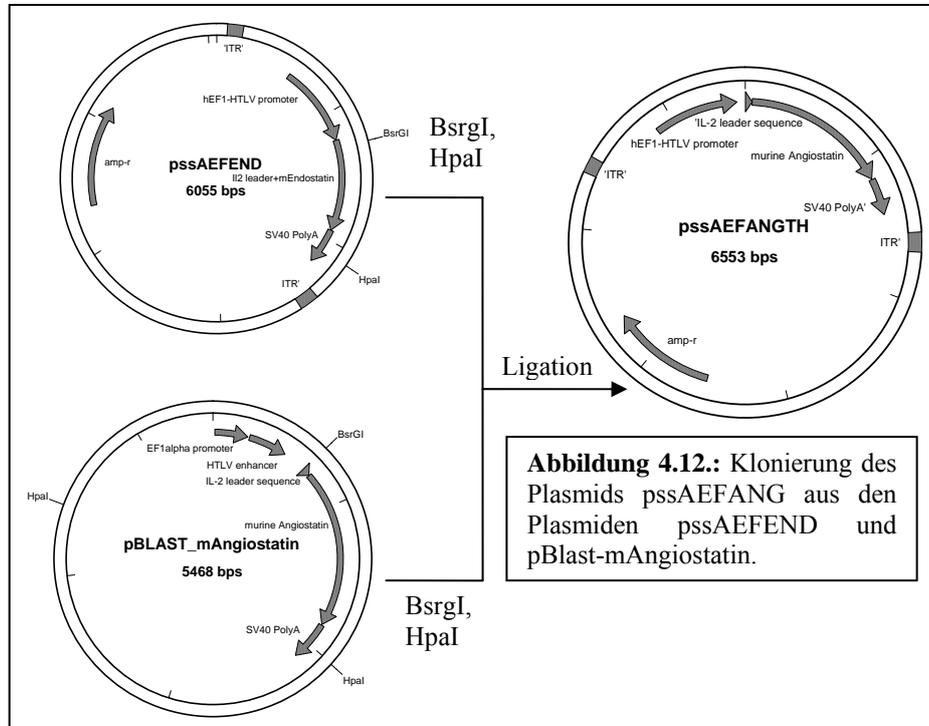
Der Vektor *pScACMVENDFG* wurde mittels *BsrGI* und *HpaI* geschnitten und das Backbone isoliert. Das Plasmid *pBLAST-mAngiostatin* wurde analog mittels *BsrGI* und *HpaI* geschnitten und das Angiostatin tragende Insert mit dem zuvor isolierten Backbone ligiert. Der entstandene Vektor



wurde als *pXCMVANG* bezeichnet. Dieser Vektor besitzt zwar eine mutierte ITR, da jedoch die inserierte Sequenz länger als 2400 bp ist, sollte es nicht möglich sein, sc-AAV zu gewinnen. Mittels Verdau mit *BamHI* und *SphI* und Abtrennen der 3'-überhängenden Enden mit T4-Polymerase sowie Religation der Enden wurde die inserierte Sequenz verkürzt. Der entstandene Vektor wurde als *pScACMVANG* bezeichnet.

4.2.2.3. Klonierung von *pssAEFANG*

Das Plasmid *pssAEFENDFG* wurde mittels *BsrGI* und *HpaI* geschnitten. Das Backbone wurde isoliert. Das Plasmid *pBlast-mAngiostatin* wurde analog mittels *BsrGI* und *HpaI* geschnitten und



das Angiostatin tragende Insert mit dem zuvor isolierten Backbone ligiert (siehe Abbildung 4.12.). Der neu entstandene Vektor wurde als *pssAEFANG* bezeichnet.

Abbildung 4.12.: Klonierung des Plasmids *pssAEFANG* aus den Plasmiden *pssAEFEND* und *pBlast-mAngiostatin*.

4.2.2.4. Klonierung von *pscAEFANG*

Das erworbene Plasmid *pBlast-mAngiostatin* wurde mittels *BspMI*, *PciI* und *AhdI* geschnitten und das Angiostatin tragende Fragment isoliert und mittels Klenow-Reaktion modifiziert. Das sc-Basisplasmid *pscAGFG* wurde mittels *XbaI*, *XhoI* und

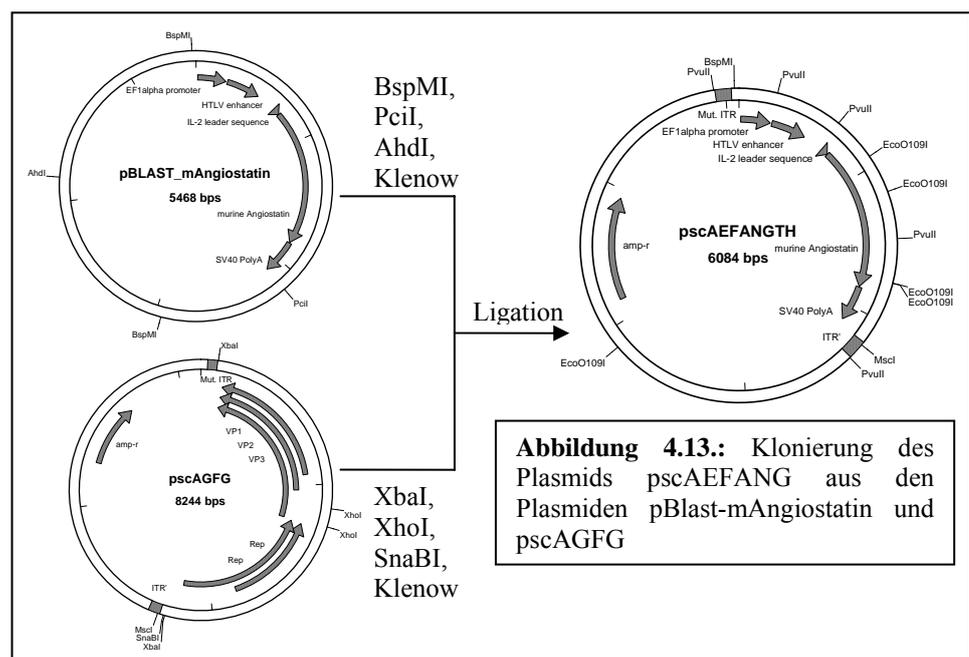
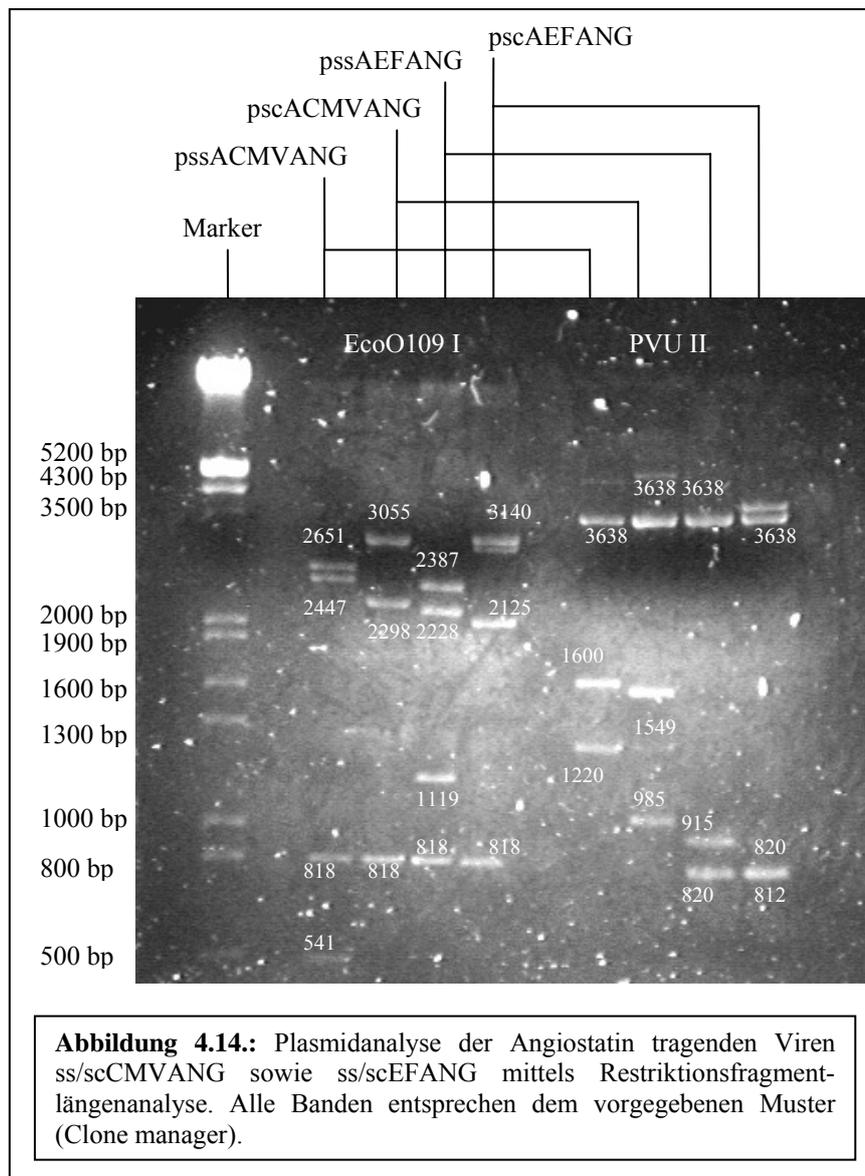


Abbildung 4.13.: Klonierung des Plasmids *pscAEFANG* aus den Plasmiden *pBlast-mAngiostatin* und *pscAGFG*

SnaBI geschnitten, das isolierte Backbone mittels Klenow-Reaktion modifiziert und mit dem im Schritt zuvor gewonnen Angiotensin-Insert ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als pscAEFANG bezeichnet.

4.2.3. Plasmidanalyse der Klonierungen von pss/psc CMV/EF Angiotensin

Um die oben dargestellten Klonierungen zu kontrollieren, wurden die Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse verglichen. Alle

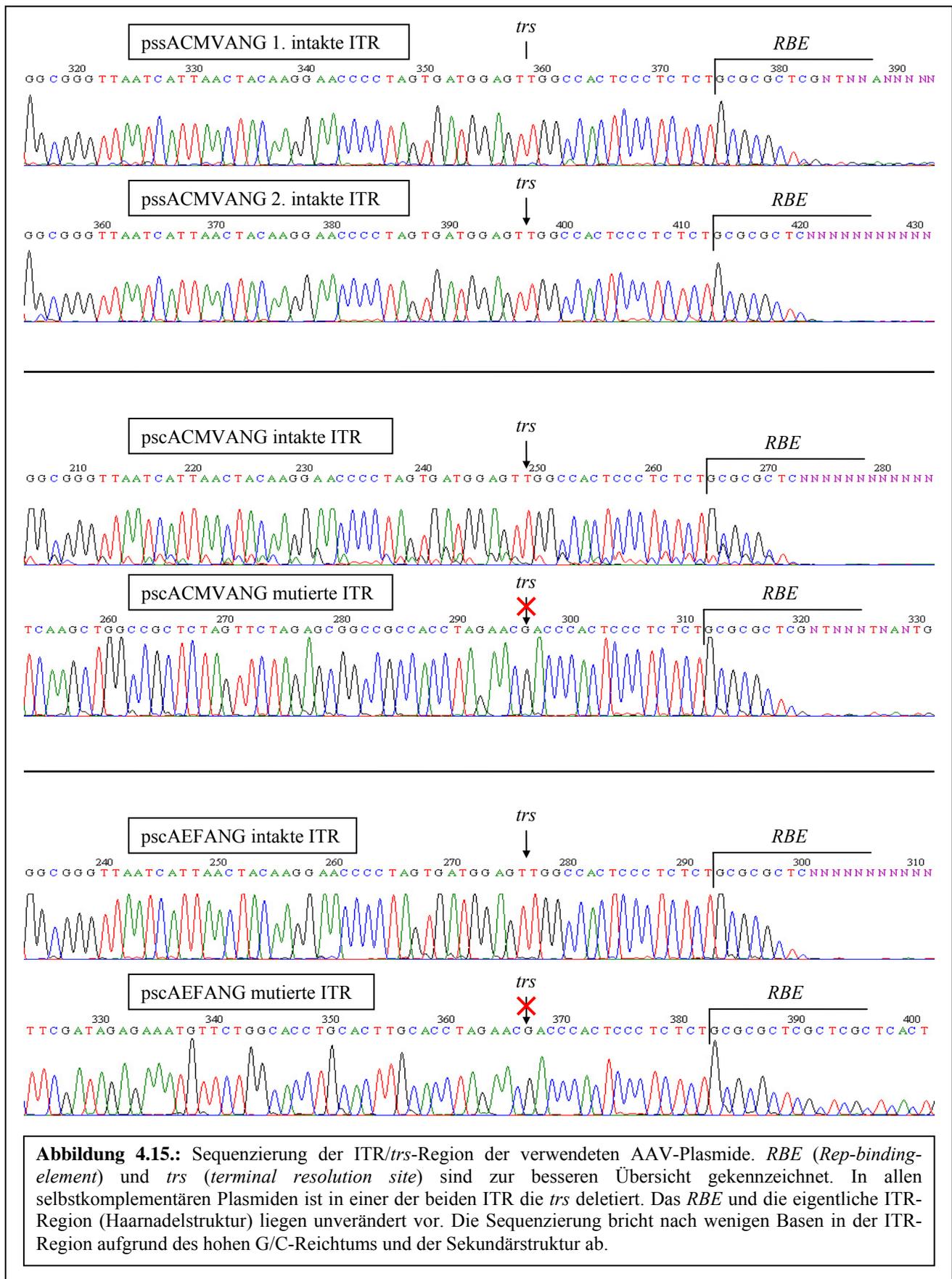


Fragmente zeigen das zuvor mittels Clone Manager ermittelte Laufverhalten.

Bei EcoO109I handelt es sich um ein methylierungs-sensitives Restriktionsenzym (Dcm Methylierung). Eine Methylierung der bakteriellen DNA, die in allen vier Plasmiden vorkommt, verhindert eine Spaltung des 818 bp großen Fragments.

Zudem wurde mittels DNA-Sequenzierung das komplette, für den späteren Vektor relevante Genom sequenziert. Es zeigten sich lediglich in irrelevanten Bereichen einige Basenaustausche. Die Deletion der trs-Region wurde gesondert kontrolliert und ist im Folgenden

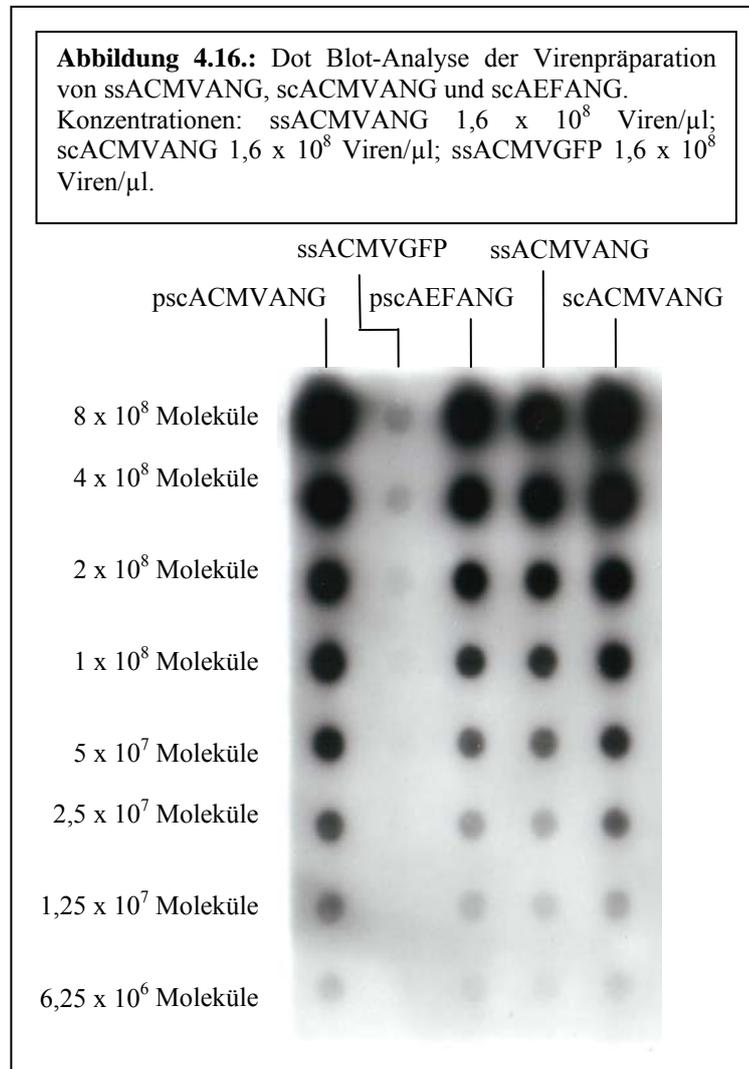
dargestellt.



4.2.4. Virusproduktion

Analog zur Vektorproduktion von GFP kodierenden AAV-Vektoren wurden Angiostatin kodierende Vektoren aus den Plasmiden pss/pscCMVANG sowie pscEFANG produziert.

Um eine Abschätzung der Konzentration viraler Partikel zu erreichen und um die einzelnen



Präparationen untereinander vergleichbar zu machen, wurden Dot Blot-Analysen durchgeführt.

Da EFANG kodierende Vektoren nicht mittels in der Arbeitsgruppe verfügbaren DNA-Sonden analysiert werden konnten, war es notwendig, eine Angiostatin detektierende Digoxigenin-markierte DNA-Sonde zu generieren. Die mit dieser Sonde gewonnenen Ergebnisse konnten so mit den in der Arbeitsgruppe verwendeten Viren und insbesondere auch mit den CMVGF kodierenden Vektoren verglichen werden.

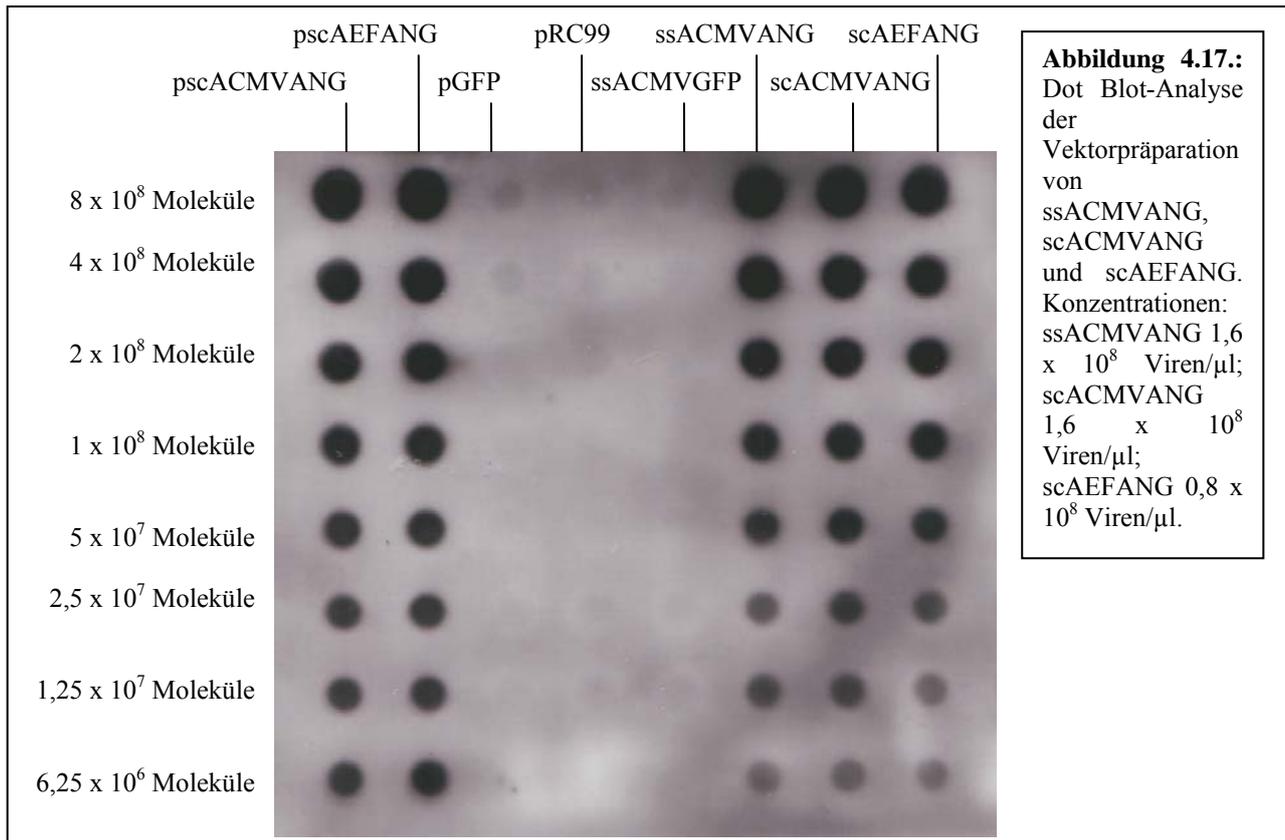
Alle Viren wurden in ausreichender Konzentration präpariert. Es wurde je $10 \mu\text{l}$ Viruspräparat zur Analyse eingesetzt. Die

Konzentrationsbestimmung ergab sich wie folgt: Dot Größe/Stärke verglichen mit Standard geteilt durch die Anzahl an eingesetzten μl (10). Bei scACMVANG und scAEFANG wurde zusätzlich aufgrund der Dimeren-Struktur und des somit pro Molekül zweimaligen Vorkommens einer GFP-Sequenz durch 2 dividiert.

$$8 \times 10^8 : 5 = \text{ssACMVANG Konzentration von } 1,6 \times 10^8 \text{ Partikeln}/\mu\text{l}$$

$$8 \times 10^8 : 5 : 2 = \text{scACMVANG Konzentration von } 1,6 \times 10^8 \text{ Partikeln}/\mu\text{l}$$

$$8 \times 10^8 : 5 : 2 = \text{scAEFANG Konzentration von } 0,8 \times 10^8 \text{ Partikeln}/\mu\text{l}$$

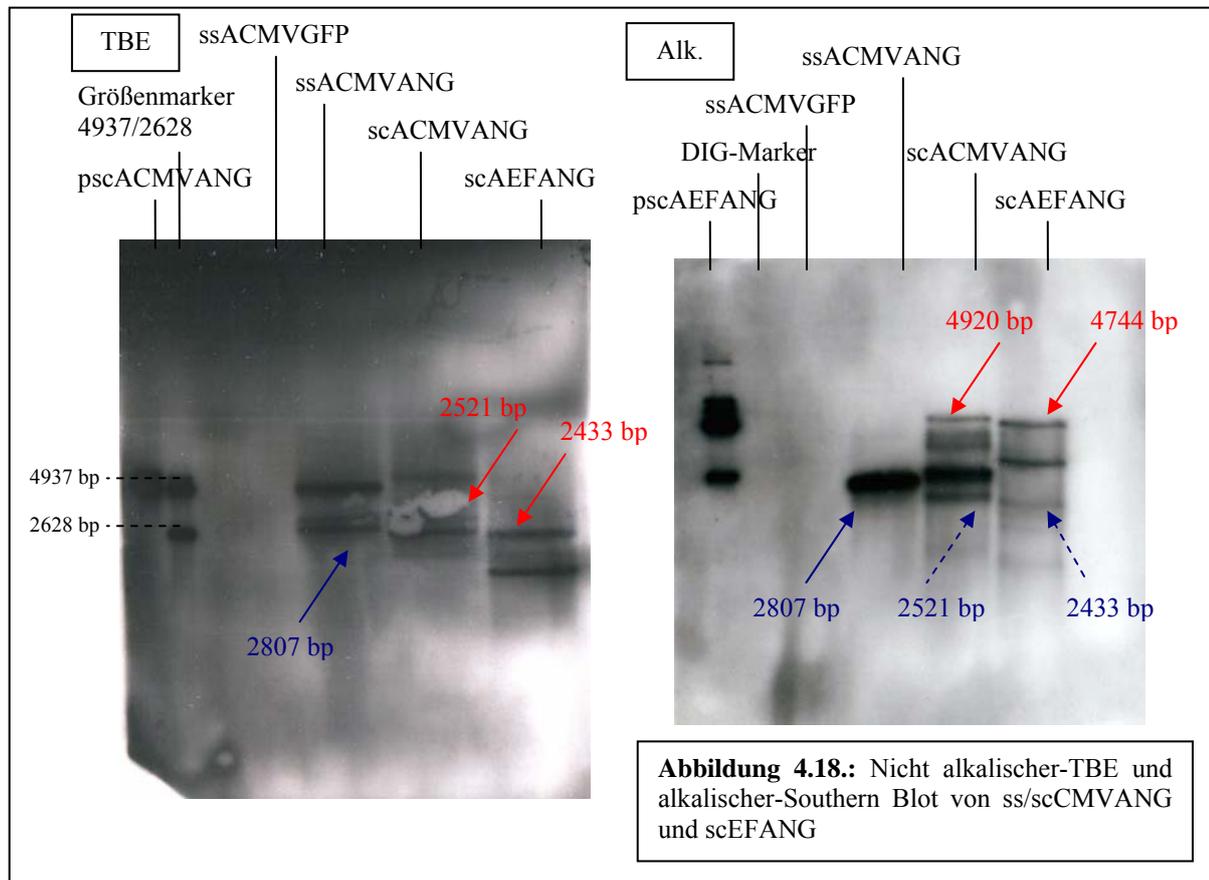


4.2.5. Southern Blot

Um zu zeigen, dass die generierten Angiostatin-Vektoren tatsächlich in einzelsträngiger bzw. selbstkomplementärer Form vorlagen, wurde analog zur Darstellung von ss-, ds- und sc-GFP ein Southern Blot durchgeführt. Es wurde ein Gel mit denaturierenden Bedingungen mit einem nativen TBE-Gel verglichen (siehe 4.18.).

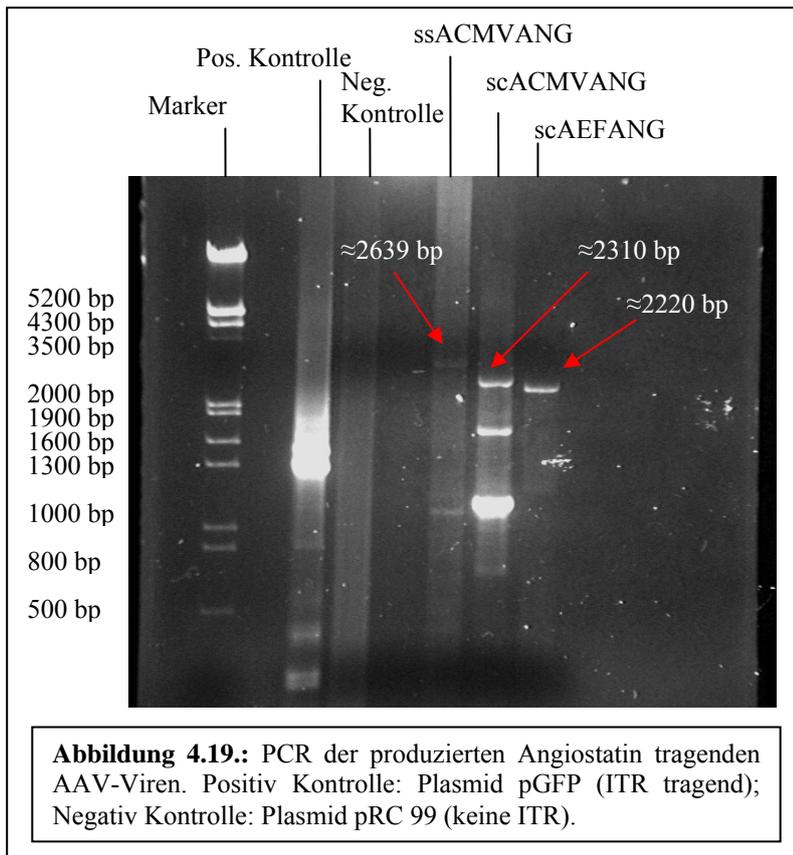
Im TBE-Blot zeigen beide scAAV-Vektoren ihr auf etwa halbe *wt*-Länge reduziertes Laufverhalten (siehe rote Pfeile Abb. 4.18.). Der ssAAV-Vektor läuft bei 2807 bp (siehe blauer Pfeil Abb. 4.18.). Im alkalischen Gel klappt der selbstkomplementäre Vektor auf und zeigt seine einzelsträngige Form (siehe rote Pfeile Abb. 4.18.). Die konventionelle AAV-Variante zeigt ein Laufverhalten analog dem TBE-Gel, da es sich bei ihr grundsätzlich um die einzelsträngige AAV-Form handelt (siehe blauer Pfeil Abb. 4.18.). Der Schneidevorgang der Rep-Proteine geschieht nicht mit 100%iger Effektivität, ebenso kann er durch die *trs*-Mutation nicht vollständig unterbunden werden. Die gestrichelten blauen Pfeile entsprechen diesen dennoch geschnittenen AAV-Varianten. Trotz mehrfacher Wiederholungen des Blots und Variation der Versuchsbedingungen war es nicht möglich, die zahlreichen zusätzlichen Banden zu reduzieren. Mittels einer PCR der verwendeten

Viren wurde diesem Problem weiter nachgegangen. Es zeigte sich, dass es sich zumindest bei einem Teil der Banden nicht um Artefakte handelte (siehe Diskussion 5.2.3.3.).



4.2.6. PCR

Aufgrund der Auffälligkeiten, die sich im denaturierenden Southern Blot der produzierten Viren zeigten, wurde eine PCR-Untersuchung durchgeführt. Als Primer wurden Sequenzen gewählt, die am Beginn einer intakten / mutierten ITR binden können (FW mit Mut. 5'-GGA GTG GGT CGT TCT AG-3', Rev ohne Mut 5'-CCA ACT CCA TCA CTA GG-3'). Das PCR-Produkt entspricht dabei jeweils der DNA-Region, die zwischen den ITRs liegt. Für einzelsträngige Viren wäre in einem PCR Zyklus das komplette Transgen in einer Kopie zu erwarten. Für selbstkomplementäre Viren sind ebenfalls lediglich zwei einheitliche Genprodukte zu erwarten, da trotz dreier vorhandener ITR-Strukturen der Bereich zwischen diesen absolut komplementär in Sequenz und identisch in Länge sein müsste.



(siehe Diskussion 5.2.3.3.).

Zwei Primer binden ITR nah an entgegengesetzten Orientierungen. Die PCR amplifiziert ein Fragment über das komplette Virusgenom hinweg und bricht im Bereich der ITR aufgrund der zu starken Bindungskräfte (G/C-Reichtum) ab. Da das AAV-Genom bei sc-Vektoren zwar in Plus- und Minusform vorliegt, jedoch vollständig komplementär ist, entstehen in der Länge identische DNA-Fragmente. Die verschiedenen Banden bei scACMVANG deuten auf eine verunreinigte Vektorpopulation hin

4.2.7. Angiogenese-Assays

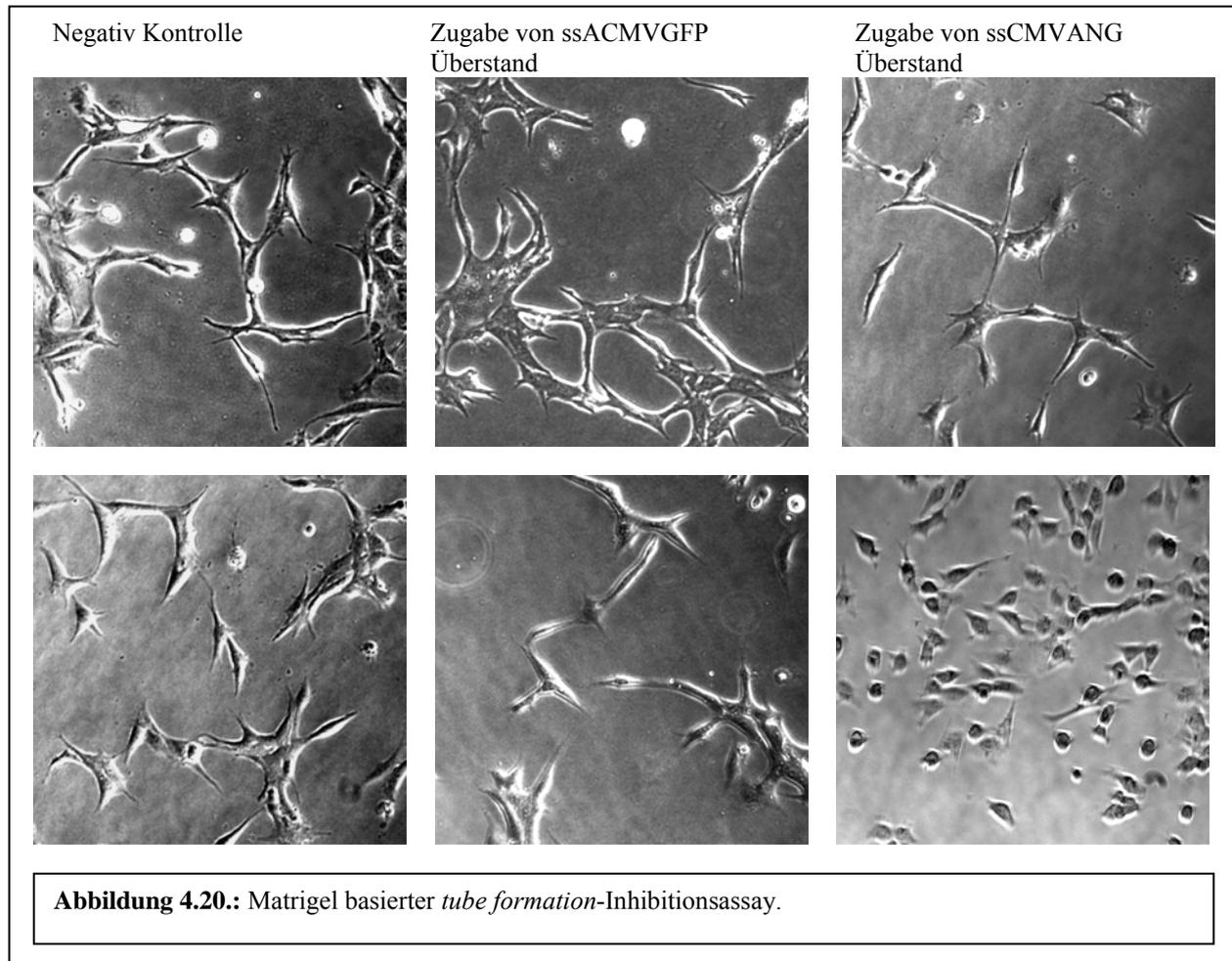
Um Angiostatin funktionell nachweisen zu können, wurden Experimente mit *in vitro* Angiogenese-Assays durchgeführt.

4.2.7.1. Matrigel-Assays

Auf mit Matrigel™ beschichteten Platten bilden Endothelzellen ein Netz aus. Diese so genannte *tube formation* ist eine Eigenschaft endothelialer Zellen. Diese *tube formation* kann durch verschiedene Stoffe gehemmt werden (Auerbach, Lewis et al. 2003). Eine Hemmung ist unter anderem durch Angiostatin möglich (Trojanovsky, Levchenko et al. 2001).

Auf mit Matrigel™ beschichteten 24 Well-Platten wurden je 5×10^4 HUVEC ausgesät (siehe Material u. Methoden). Nach 4 Stunden erfolgte der Zusatz von HeLa-Überstand (HeLa 2 Tage nach Infektion mit ssACMVGFp oder ssACMVANG)). 24 Stunden später erfolgten diese Aufnahmen. Die dargestellten Bilder entsprechen exemplarischen, repräsentativen Bildern des

entsprechenden Wells. Die Versuche mit diesem Testsystem wurden aufgrund der großen Störanfälligkeit und der mangelnden Möglichkeit einer statistischen Auswertbarkeit eingestellt.



Auf eine weitere Testung mittels Matrigel-Assay wurde verzichtet, so dass die hier gezeigten Bilder lediglich Einzelexperimenten entsprechen und lediglich als Anhaltspunkt dienen können. Dieses Testverfahren erwies sich als sehr anfällig für Störungen. Zudem stand die für eine statistische Auswertung nötige Ausrüstung mit Bilderkennungssystem und Software nicht zur Verfügung.

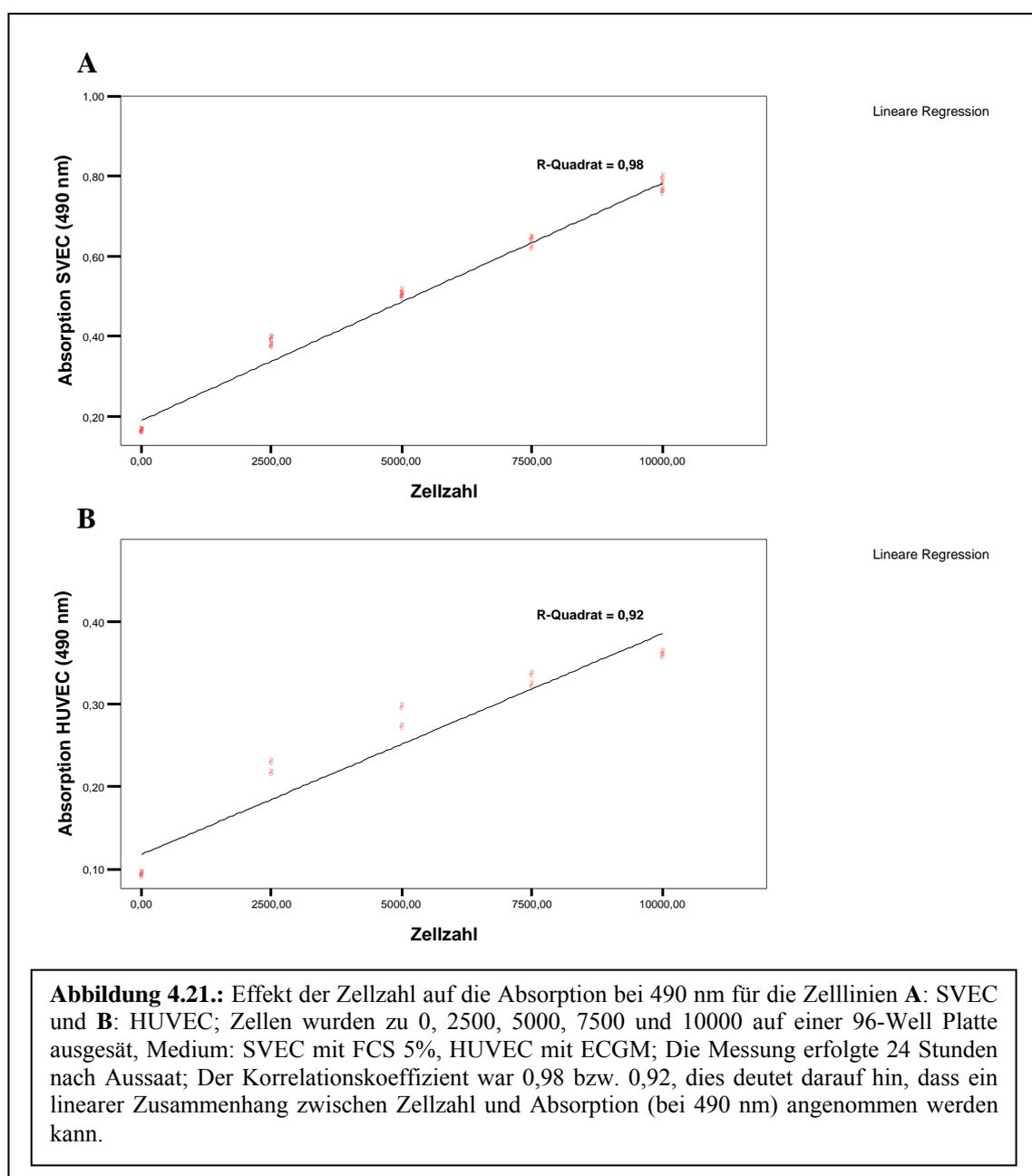
4.2.7.2. Proliferationshemmung

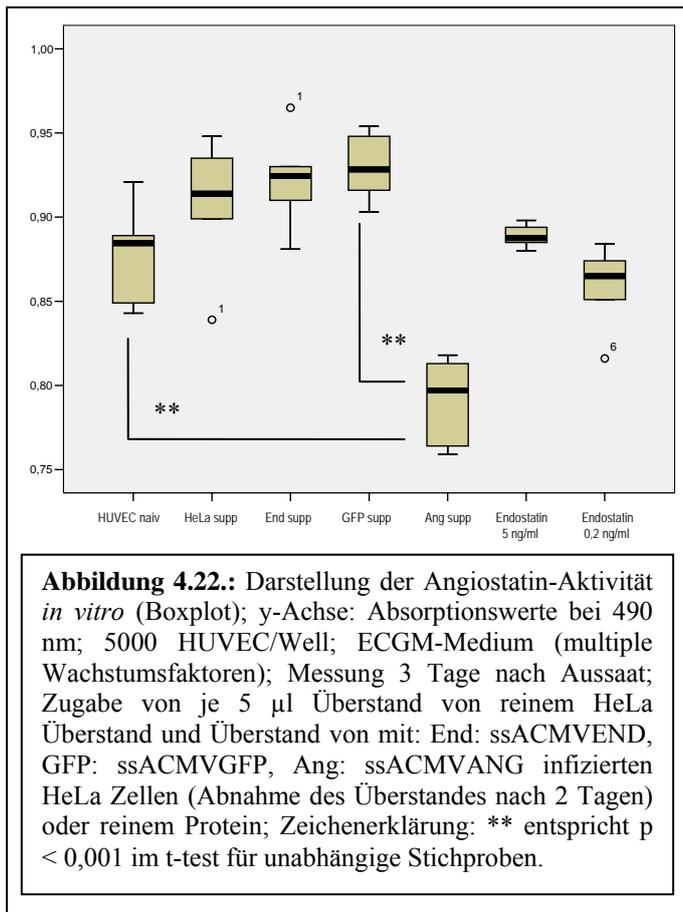
Angiostatin hemmt selektiv durch Wachstumsfaktoren hervorgerufene Proliferation. So ist es möglich HGF (Wajih and Sane 2003) und bFGF (O'Reilly, Holmgren et al. 1996; Wu, O'Reilly et al. 1997) bedingte Endothelzell-Proliferation zu hemmen, solche die durch VEGF hervorgerufen wird jedoch nicht (Wajih and Sane 2003).

Auf dieser Hemmung basiert der im Folgenden beschriebene Endothelzellproliferations-Assay. Es handelt sich um eine modifizierte Variante der in der Literatur beschriebenen Assays (Auerbach, Lewis et al. 2003) (siehe Material und Methoden).

Die mit diesem Testsystem gewonnenen Ergebnisse ließen sich besser reproduzieren und effizienter statistisch auswerten als dies bei Matrigel-Assays der Fall war. Es wurden sowohl Experimente durchgeführt, bei denen der Überstand von infizierten Zellen zur Proliferationshemmung führte, als auch die direkte Infektion der Testzelllinie.

Zur Validierung der Meßmethode mittels AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation-Kit wurden für die verwendeten Zelllinien Korrelationskoeffizienten bestimmt (siehe Abbildung 4.21.).





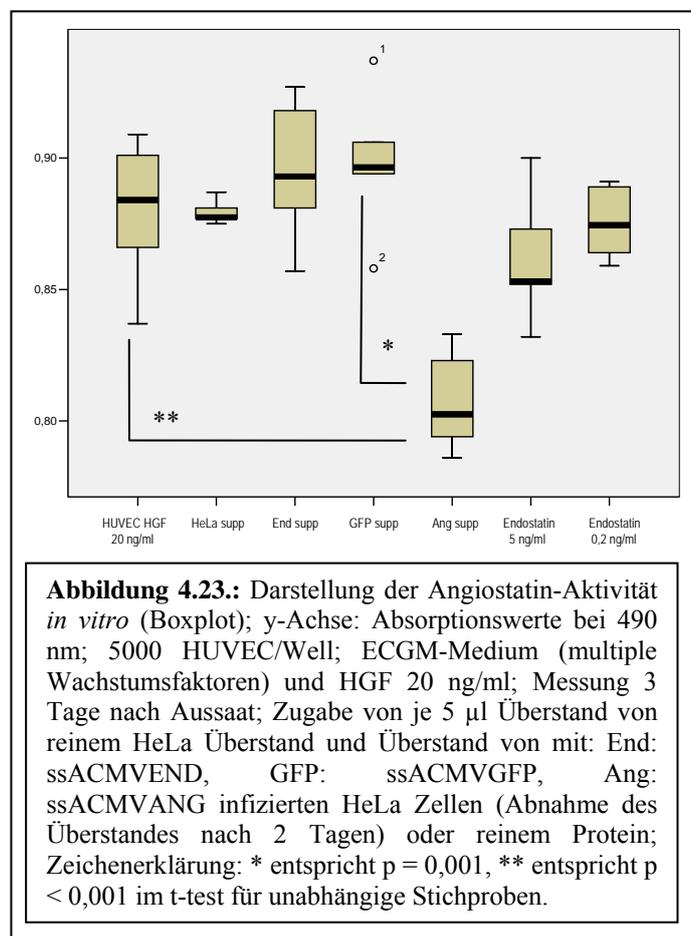
Es zeigt sich, dass sowohl für SVEC (R-Quadrat = 0,98) als auch für HUVEC (R-Quadrat = 0,92) ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption bei 490 nm und Zellzahl angenommen werden kann.

Die mit HUVEC durchgeführten Experimente beinhalteten zum einen eine Hemmung der Proliferation in ECGM Medium (inkorrekt als „naiv“ bezeichnet, da ECGM Medium neben anderen Wachstumsfaktoren auch bFGF enthält) als auch eine Hemmung der Proliferation bei zusätzlicher Stimulation mit HGF.

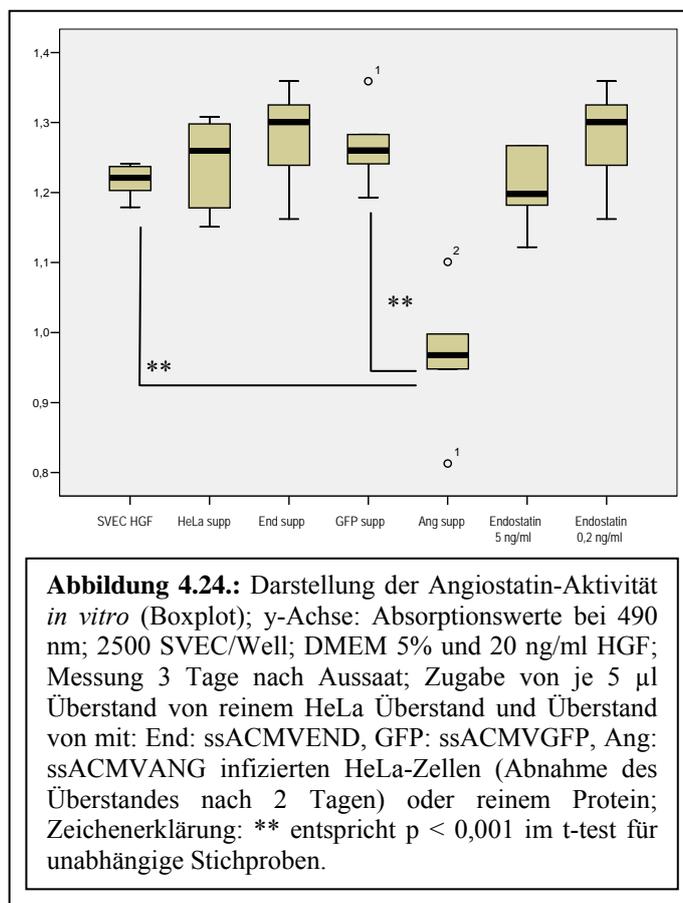
Die Versuche wurden jeweils 6-fach wiederholt.

Wie Abbildung 4.22. zeigt, führt eine Zugabe von mit ssCMVGFP infizierten HeLa-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferation. Ebenso kann ein Überstand von mit ssCMVEND infizierten HeLa-Zellen keine signifikante Änderung der Proliferation bewirken. Ein mit ssCMVANG infizierter HeLa-Überstand hingegen führt zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation ($p < 0,001$).

Dieser Effekt bleibt auch dann erhalten, wenn, wie in Abbildung 4.23. gezeigt, eine zusätzliche Stimulation mit HGF erfolgt ($p = 0,001$).



Mit SVEC-Zellen stand eine weitere endotheliale Zelllinie zur Verfügung, die gegenüber HUVEC-Zellen einige Vorteile bot. Als immortalisierte Tumorzelllinie sind die Ansprüche an Kultivierungsbedingungen wesentlich geringer als dies bei HUVEC der Fall ist. Zudem muss keine aufwendige Präparation der Zellen erfolgen. Dies führt zu einer nicht unerheblichen Kosten- und Zeitersparnis. Als nachteilig stellt sich in diesen Versuchen das schnelle Wachstum der SVEC-Zellen heraus, was jedoch durch Reduzierung der zu Beginn ausgesäten Zellzahl zu beherrschen ist. Der in Abbildung 4.24. dargestellte Versuch entspricht in seinem Aufbau der Proliferationshemmung von HUVEC (siehe vergleichend Abbildung 4.23.). Wie zuvor führt die Zugabe von Überstand von mit ssCMVANG infizierten HeLa-Zellen zu einer signifikanten



Hemmung der Zellproliferation ($p < 0,001$).

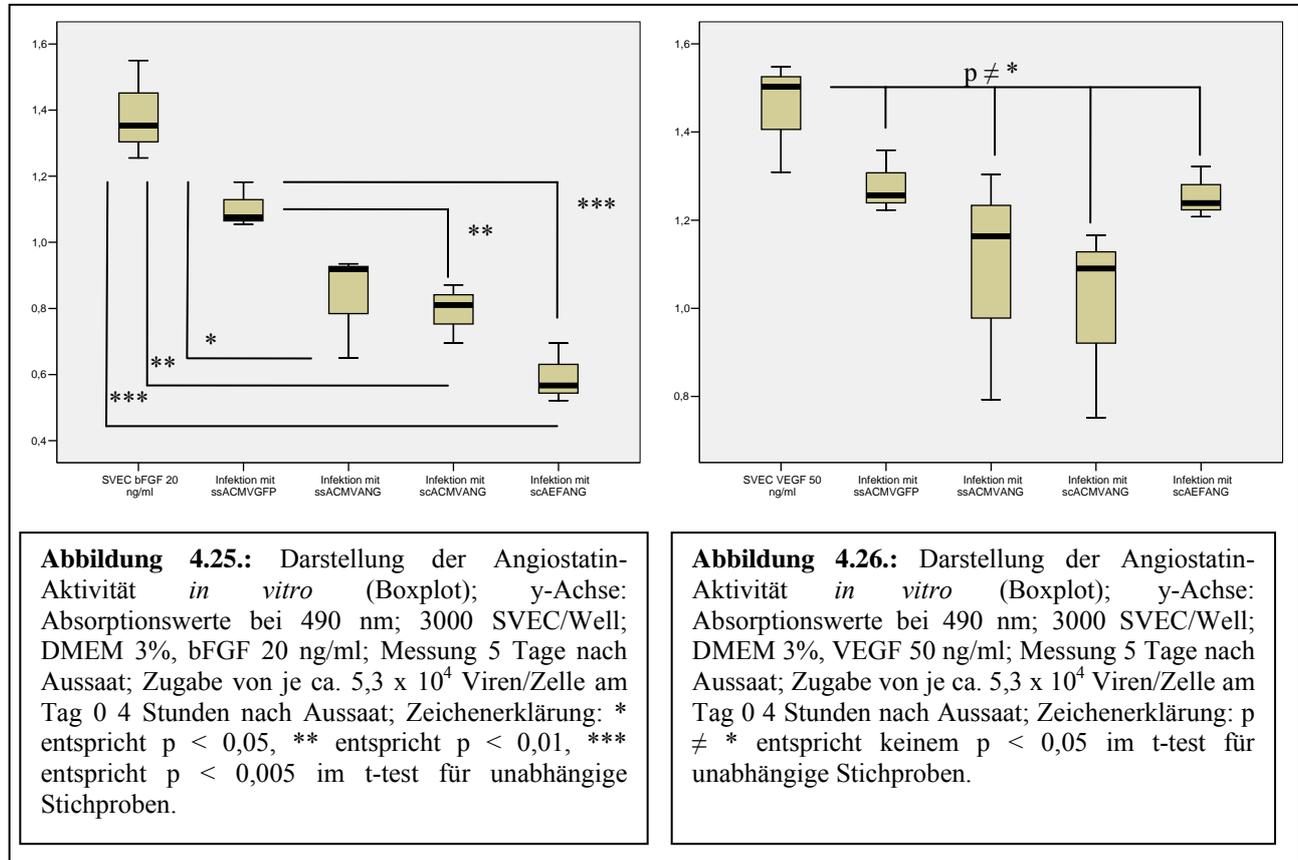
Die mitgeführten Kontrollen zeigen keinen signifikanten Effekt.

Mit SVEC-Zellen wurden zusätzlich (aufgrund der höheren Transduzierbarkeit mittels AAV2 als HUVEC) Versuche zur Proliferationshemmung durchgeführt in dem eine direkte Infektion mit entsprechenden Viren erfolgte. Es wurden hierbei genomische Titer von ca. 5×10^4 Viruspartikeln/Zelle verwendet. Die Stimulation erfolgte mittels bFGF (siehe Abbildung 4.25.). Als weitere Kontrolle wurde in einem weiteren Versuch eine VEGF-Stimulation verwendet, die nach Wajih et al. keine Proliferationshemmung durch Angiostatin zulassen sollte.

Bei diesen Versuchen zeigten die durch ssCMVGFP infizierten Zellen, eine tendentiell geringere Proliferation als die nicht infizierte Kontrolle. Diese Proliferationshemmung blieb jedoch unter der Signifikanzgrenze ($p \neq < 0,05$). Dieser Effekt beruht möglicherweise auf einer direkt zytotoxischen Wirkung von AAV2 auf Tumorzellen. Als Indiz für diesen Effekt kann das analoge Verhalten der Vektoren in Abbildung 4.26. angesehen werden (näheres siehe Diskussion).

Die Vektoren scACMVANG und scaEFANG bewirken eine signifikante Wachstumshemmung der Endothelzellen ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,005$).

Durch VEGF-Stimulation hervorgerufene Proliferation kann von keinem der Vektoren signifikant inhibiert werden (siehe Abbildung 4.26.). Dies entspricht einer Bestätigung der Ergebnisse von Wajih et al..



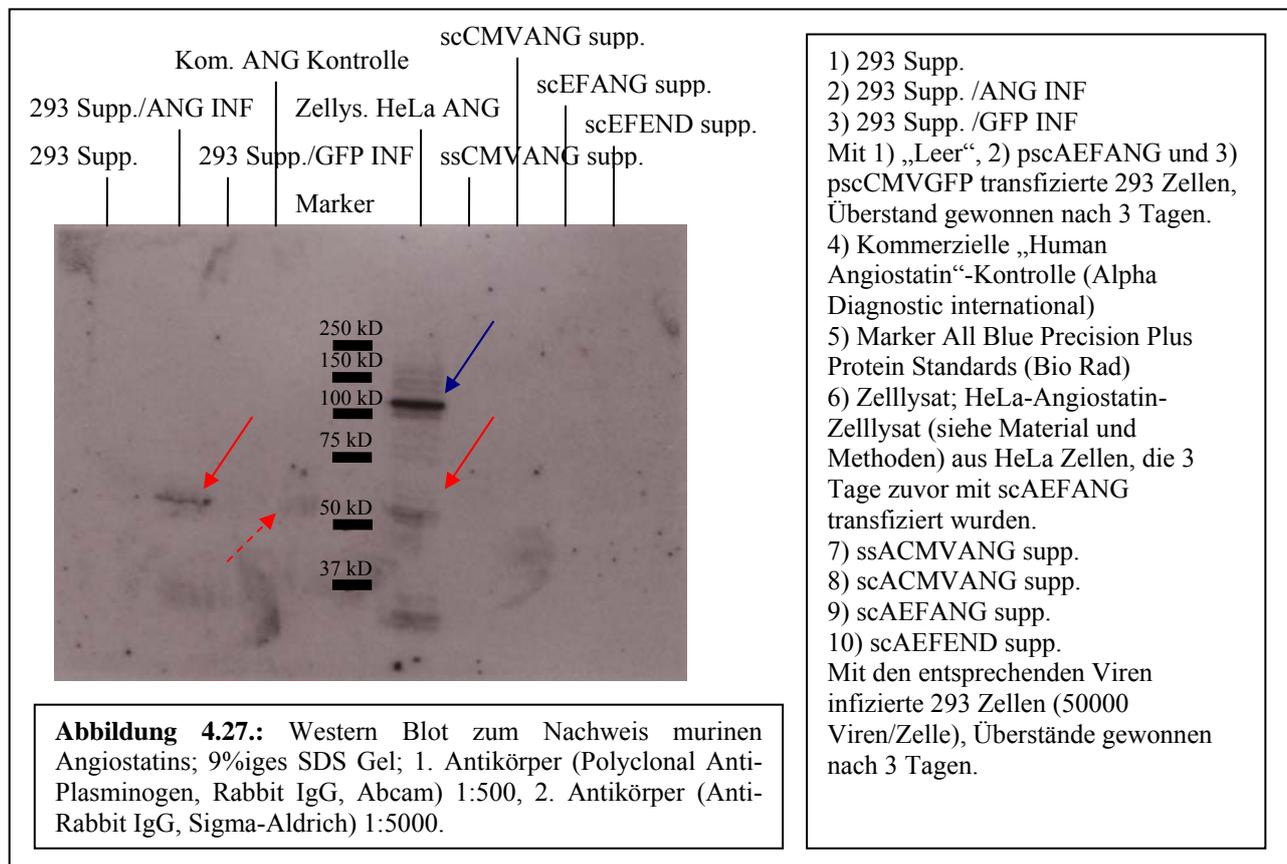
4.2.8. Western Blot

In diesem Experiment sollte murines Angiostatin nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Experimente wurden lediglich zwei oligoklonale Antikörper angeboten, bei denen in der Produktbeschreibung eine Kreuzreaktion mit murinem Angiostatin beschrieben war. Die mit der Zeit entwickelten monoklonalen Antikörper reagieren ausschließlich mit humanem Angiostatin und zeigen ausdrücklich keine Kreuzreaktion mit murinem Angiostatin.

Die erworbene Angiostatin-Positiv-Kontrolle zeigte nur eine schwache Antikörperreaktion. Dieses Problem konnte nicht behoben werden. Es war nicht möglich, mit dem von der Firma Alpha Diagnostic International erworbenen Antikörper einen positive Proteinnachweis zu etablieren. Der Hinweis von Alpha Diagnostic international in der Produktbeschreibung ihres Antikörpers auf eine

Kreuzreaktion mit murinem Angiostatin wurde inzwischen entfernt. Die Probe wurde freundlicherweise von Alpha Diagnostic International zurückgenommen.

Mit dem Antikörper der Firma Abcam (Polyklonal Anti-Plasminogen) konnte kein Western Blot etabliert werden, der kleinste murine Angiostatinkonzentrationen nach Virusinfektion nachweisen konnte. Wie sich im Verlauf der Experimente herausstellte, war es möglich, eine weitere Positiv-Kontrolle herzustellen. Es zeigte sich jedoch auch, dass, um eine Reaktion der Antikörper zu erreichen, Konzentrationen von Angiostatin nötig waren, die unter normalen experimentellen Bedingungen (virale Genexpression) nie erreicht werden. So gelang lediglich der Nachweis der Produktion von Angiostatin durch das Angiostatin tragende Plasmid. Auf diesen Punkt wird noch ausführlicher in der Diskussion eingegangen.



Exemplarisch dargestellt ist in Abbildung 4.27. ein Western Blot, bei dem der Nachweis der Angiostatin-Produktion durch das Plasmid pscAEFANG gelang. Die roten Pfeile markieren ein Protein bei 50 kD (Bande 2), der gestrichelte Pfeil das entsprechende Protein mit schwacher Reaktion (kommerzielle Kontrolle Bande 4). Hierbei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um Angiostatin. Bei dem mit dem blauen Pfeil markierten Protein, bei etwa

110 kD, könnte es sich um humanes Plasminogen (HeLa Lysat) oder um bovines Plasminogen, welches im fetalen Rinderserum enthalten ist handeln.

Eine weitere Optimierung der Bedingungen (z.B. Proteinanreicherung) war nicht erfolgreich, da bei FCS-haltigem Medium ab einer gewissen Konzentration bovine Immunglobuline auf der Höhe des murinen Angiostatins liegen und durch Kreuzreaktionen eine sichere Visualisierung von Angiostatin erschweren.

5. Teil - Diskussion

5.1. *Modifikation von Adeno-assoziierten Virus-Vektoren*

Adeno-assoziierte Viren sind viel versprechende Kandidaten für eine auf viralen Vektoren basierende Gentherapie (Buning, Braun-Falco et al. 2004; Rolling 2004; Goncalves 2005; Hacker, Wingefeld et al. 2005; Merten, Geny-Fiamma et al. 2005). Neben ihrer fehlenden Humanpathogenität sind vor allem ihre Fähigkeiten zur dauerhaften Genexpression und die Fähigkeit zur gezielten Genomintegration zunehmend in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Buning, Braun-Falco et al. 2004; Vasileva and Jessberger 2005).

Probleme bereiten hierbei vor allem eine im Vergleich mit anderen Vektoren zu geringe Genexpression (Zhong, Li et al. 2004). Limitierender Schritt hierbei ist das Vorliegen von AAV-DNA in der infizierten Zelle als Einzelstrang. Um eine Genexpression zu erreichen, ist eine Zweitstrangsynthese erforderlich (Zhong, Li et al. 2004).

Durch die im Rahmen dieser Arbeit an AAV durchgeführten Modifikationen sollte durch Umgehung dieses Schrittes die Genexpression gesteigert werden.

5.1.1. Generierung und Testung von GFP-AAV-Vektoren

5.1.1.1. *Klonierung und Modifikation von GFP-AAV-Vektoren*

Es wurden insgesamt drei GFP-AAV-Vektoren kloniert. Die Vektoren unterschieden sich in der Länge ihres Genoms (*wt* oder $\frac{1}{2}$ *wt*) und einer Mutation an einer ITR-Region (*trs*).

Um auf die ITR-Modifikation zurückgreifen zu können, wurde das scAAV-Basis Plasmid pscAGFG verwendet (siehe Ergebnisse 4.1.2.). Die Plasmide wurden als pssACMVGFP (*wt*-Länge, keine Mutation), pdsACMVGFP ($\frac{1}{2}$ *wt*-Länge, keine *trs* Mutation) und pscACMVGFP ($\frac{1}{2}$ *wt*-Länge, mit *trs*-Deletion) bezeichnet.

Alle Klonierungen wurden mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse und Sequenzierung kontrolliert.

5.1.1.2. *Produktion der GFP-AAV-Vektoren*

Die Virusproduktion gestaltete sich problemlos. Es zeigt sich in den Produktionstitern keine Unterschiede zu den in der Arbeitsgruppe verwendeten Vektoren. Auch zeigt sich, dass die ITR-Modifikation keinen Einfluss auf die Menge der generierten Viren hatte (siehe hierzu Abbildung 4.6.).

5.1.1.3. *Analyse der AAV-Modifikation*

Um die veränderte (selbstkomplementäre) AAV-Struktur nachzuweisen, wurden native und alkalische Southern Blots durchgeführt. Die erwarteten Strukturen ließen sich darstellen (siehe Ergebnisse 4.7.).

Es zeigt sich eine Verteilung von ss-Vektor-Form zu sc-Vektor-Form bei dsACMVGFP von etwa 5/95 und bei scACMVGFP von 95/5. Der Vektor ssACMVGFP liegt in einzelsträngiger Form vor. Im nativen Agarosegel zeigen sich zahlreiche zusätzliche Banden. Diese lösen sich im alkalischen Blot zu den erwarteten Banden auf. Mit größter Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um Artefakte durch Hybridisierungen der AAV-DNA (z.B. *tail to tail* oder komplette Hybridisierungen).

5.1.1.4. *Testung von GFP-AAV-Vektoren in vitro*

Die klonierten Vektoren wurden auf ihre Expressionsfähigkeit getestet (siehe Kapitel 4.1.6.). Für sc-AAV ergab sich in allen getesteten Zelllinien ein hochsignifikanter Vorteil gegenüber herkömmlichen AAV-Vektoren (siehe Abbildung 4.8. und 4.9.).

5.1.2. *Double-stranded-AAV*

Durch die Verkleinerung des viralen AAV-Genoms auf etwa $\frac{1}{2}$ *wt*-Genomgröße ist es möglich, mehrere AAV-DNA-Stränge in ein Kapsid zu verpacken. Gelangen Plus und Minusstrang in ein und dasselbe, Kapsid können diese hybridisieren und in einer Zelle als doppelsträngige DNA eine sofortige Genexpression starten. Ähnliches geschieht, wenn aufgrund des ineffektiven Schneidevorganges von REP eine selbstkomplementäre Variante von AAV verpackt wird. Diese Variante liegt jedoch nur in einem sehr niedrigen Prozentsatz vor. Erst durch einen aufwändigen

Reinigungsprozess kann diese Variante in einer höheren Reinheit verwendet werden (McCarty, Monahan et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plasmid dsACMVGFP verwendet. Hierbei handelt es sich, wie Abbildung 4.1 zeigt, um eine heterogene Viruspopulation, bei der doppelsträngige AAV-Varianten lediglich einen kleinen Teil (etwa 5%) der Viruspopulation ausmachen. Der mit diesem Virus durchgeführte Southern Blot verdeutlicht dies (siehe Abbildung 4.7.).

Die mit diesem Virus gemessene GFP-Expression ist verglichen mit der homogenen ssACMVGFP Population inkonsistent (siehe Abbildung 4.8. und 4.9.). Ein sicherer signifikanter Vorteil der heterogenen Viruspopulation kann bei Infektionsexperimenten mit HeLa und HT29 nicht gesichert werden (siehe Abbildung 4.8. und 4.9.).

Um einen höheren Anteil an selbstkomplementären AAV zu erreichen, wäre entweder eine Aufkonzentration des selbstkomplementären AAV-Anteils oder eine diese Struktur bevorzugt hervorbringende Veränderung nötig.

5.1.3. Self-complementary-AAV

Durch Mutation einer viralen ITR (Deletion der *trs*) wird die Produktion von selbstkomplementären AAV dramatisch gesteigert (McCarty, Fu et al. 2003). Wie Abbildung 4.7. zeigt, liegt bei scACMVGFP analog zu dsACMVGFP eine heterogene Vektorpopulation vor, doch ist hier eine deutliche Verschiebung des Verhältnisses ssAAV/scAAV hin zu scAAV zu erkennen. Der Anteil der selbstkomplementären AAV-Variante beträgt etwa 95%. Dieser hohe Anteil an selbstkomplementären Viren führt dazu, dass verglichen mit ssACMVGFP eine um ein Vielfaches höhere Genexpression erreicht wird. Wie Abbildung 4.8. und 4.9. zeigen, besteht ein hochsignifikanter Unterschied zwischen ss/dsACMVGFP und scACMVGFP Genexpression. In der Zellkultur wird eine etwa 2-10 fache Steigerung der viralen Genexpression erreicht, was einer Bestätigung der Ergebnisse von McCarty et al. entspricht.

5.1.4. Beurteilung und Ausblick

Aus verschiedenen Gründen zählt AAV zu den expressionsschwachen Genfähren (Liu, Mingozi et al. 2004). *In vivo* kommt es durch die verzögerte Zweitstrangsynthese zu einem Expressionsleak von etwa 2 Wochen. Diese Verzögerung, bedingt durch die Zweitstrangsynthese, stellt einen

wichtigen Grund für die im Vergleich mit anderen Vektoren geringe Genexpression dar (Nakai, Storm et al. 2000).

Um eine verstärkte Transgenexpression zu erhalten, sind verschiedene Modifikationen Erfolg versprechend. So kann ein stärkerer Promotor, der auch einer eventuellen Abschaltung durch die infizierte Zelle entgeht, eine deutliche Steigerung der Genexpression hervorrufen (Liu, Mingozzi et al. 2004). Ein modifiziertes Intron kann ebenfalls in der Lage sein, eine Steigerung der Transgenexpression zu erreichen (Xu, Sun et al. 2003). Diese Modifikationen steigern jedoch nicht die Transduktionseffizienz von AAV. Ebenso können sie ein Expressionsleak nicht verhindern. Hier ist eine Veränderung der Vektorstruktur das einzig Erfolg versprechende Vorgehen. Ein selbstkomplementärer Vektor entgeht in einem höheren Prozentsatz einer Elimination und führt womöglich allein aus diesem Grund zu einer stärkeren Genexpression (Nakai, Storm et al. 2000; McCarty, Fu et al. 2003). Durch eine Kombination mit starken Promotoren und eventuellen weiteren Modifikationen wird durch selbstkomplementäre AAV-Vektoren eine ernstzunehmende Option geboten, diesen Vektor auch zur Expression von Genen einzusetzen, die sehr hohe Plasma-Konzentrationen erreichen müssen.

Ob scAAV ein ähnlich viel versprechendes Langzeitexpressionsprofil wie ssAAV- Vektoren besitzen bleibt abzuwarten und bedarf der Klärung. Ebenso unbekannt ist bisher, wie ein selbstkomplementärer *wt*-Vektor mit der Zelle interagiert und ob eine Integration in das Wirtszellgenom noch möglich ist.

Die Generierung von selbstkomplementären Vektoren hat ohne Zweifel zum Verständnis der AAV-Biologie beigetragen, ihr Stellenwert in einer zukünftigen Gentherapie muss geprüft werden.

5.2. Angiostatin-basierte antiangiogene Gentherapie

5.2.1. Allgemein

Die Titelseite der New York Times am 3.Mai 1998 bereitete Angiostatin und Endostatin einen furiosen Auftritt. Kein geringerer als der Entdecker der DNA-Doppelhelix, der Nobelpreisträger James Watson wurde mit den Worten zitiert „Judah is going to cure cancer in two years“.

Im Labor von Judah Folkman waren einige Jahre zuvor Angiostatin (O'Reilly, Holmgren et al. 1994) und Endostatin (O'Reilly, Boehm et al. 1997) entdeckt worden. Beide zeigten in Tierexperimenten eine überragende Wirkung in der Therapie von induzierten Tumoren. Ein wahrer

Goldrausch brach aus. Binnen kürzester Zeit wurde eine ganze Reihe von antiangiogenen Wirkstoffen gefunden. Welcher würde als erster seinen Weg in die Klinik finden?

Der Fall war tief, als die ersten Substanzen in klinischen Tests versagten. Man begann schon mit der Beerdigung der antiangiogenen Krebstherapie, als 2004 die ersten Erfolg versprechenden Ergebnisse erschienen (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004). Heute sind eine ganze Reihe von antiangiogenen Medikamenten in der klinischen Anwendung und sehen sich einer immer breiteren Anwendung bei verschiedenen Krebsformen gegenüber (Lindsey 2006, Kurup, Lin et al. 2006). Eine neue Medikamentengeneration ist entstanden: Die Angiogeneseinhibitoren.

5.2.2. Die Rolle der antiangiogenen Gentherapie

Versuche an Mäusen zeigten, dass eine antiangiogene Krebstherapie auf einen stetigen und konstanten Level von antiangiogenen Wirkstoffen angewiesen ist (Folkman 1995). Vor allem Metastasen werden durch antiangiogene Substanzen lediglich in einen Zustand der Ruhe (*dormancy*) versetzt (Folkman 1995). Fällt der Spiegel der das Gefäßwachstum hemmenden Substanzen ab, kann Tumorwachstum erneut beginnen. Gentherapie stellt eine Möglichkeit dar, Proteine in Organismen zu exprimieren. Vor allem AAV ist für seine Fähigkeit zu lang anhaltender Genexpression bekannt. Eine Kombination beider Technologien ist demnach nahe liegend (Ma, Guo et al. 2002; Ma, Lin et al. 2002; Lalani, Chang et al. 2004).

5.2.3. Generierung und Testung antiangiogener AAV-Vektoren

5.2.3.1. Klonierung und Modifikation von Angiostatin-AAV-Vektoren

Es wurden insgesamt vier Angiostatin-AAV-Vektoren kloniert. Die Vektoren unterschieden sich in ihren Promotoren (CMV/EF) und ihrer viralen Struktur (einzelsträngiges/selbstkomplementäres Genom). Um auf die ITR-Modifikation zurückgreifen zu können, wurde das sc-Basis-Plasmid pscAGFG verwendet (siehe auch Ergebnisse 4.1.2.).

Alle Klonierungen wurden mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse (siehe 4.14.) und Sequenzierung (siehe 4.15.) kontrolliert. Bei der Restriktionsfragmentlängenanalyse (EcoO109I-Verdau) fällt ein 818 bp großes, zuvor nicht vorhergesehenes DNA Fragment auf. Bei diesem handelt es sich um eine methylierte Restriktionsschnittstelle. EcoO109I ist ein methylierungssensitives Restriktionsenzym (Dcm Methylierung). Eine Methylierung der

bakteriellen DNA, die in allen vier klonierten Plasmiden vorkommt, verhindert eine Spaltung des 818 bp großen Fragments.

In Abbildung 4.15. erkennt man sehr deutlich die Deletion der *trs*-Bindungsstelle an einer der beiden ITR (AGTTGG). In den nicht modifizierten ss-AAV Vektoren ist die *trs*-Bindungsstelle in beiden ITR-Sequenzen intakt.

Abgesehen von einzelnen Basenaustauschen in nicht relevanten DNA-Abschnitten entsprachen die klonierten Sequenzen den vorhandenen Plasmidkarten.

5.2.3.2. *Produktion der AAV-Angiostatin-Vektoren*

Da in der Arbeitsgruppe bisher vor allem CMV-Promotoren verwendet wurden, sollten in Vorversuchen diese Vektoren auf ihre Funktionalität getestet werden (ss- und scACMVANG). Um einen Vergleich für die bisher noch nicht verwendete selbstkomplementäre AAV-Variante mitzuführen, wurde der Vektor scAEFANG als Vergleich verwendet.

Die Virusproduktion gestaltete sich problemlos. Es zeigten sich in den Produktionstitern keine Unterschiede zu den in der Arbeitsgruppe verwendeten GFP-Vektoren. Auch zeigte sich, dass die ITR-Modifikation keinen Einfluss auf die Menge der generierten Viren hatte (siehe hierzu Abbildung 4.16. und 4.17.).

5.2.3.3. *Analyse der AAV-Modifikation*

Um die veränderte (selbstkomplementäre) AAV-Struktur nachzuweisen, wurden native und alkalische Southern Blots durchgeführt. Die erwarteten Strukturen ließen sich darstellen (siehe Ergebnisse 4.2.5. bzw. Abbildung 4.18.).

Zusätzlich fanden sich einige nicht erwartete Banden. Die Versuche wurden mehrmals wiederholt. Es zeigten sich bei allen Versuchen identische Banden.

Der Versuch einer Erklärung gestaltet sich schwierig. Bei der bei ssACMVANG sichtbaren starken oberen Bande im nativen Gel handelt es sich mit großer Sicherheit um ein Laufartefakt. Im alkalischen Gel ist diese verschwunden und es liegt lediglich die zu erwartende (einfache) Bande vor. Was führt nun zu den multipeln Banden im nativen Gel? Möglicherweise bilden sich zwischen Plus- und Minusstrang des Angiostatin-AAV-Vektors stabile Hybridisierungen aus, die zu einem veränderten Laufverhalten führen und die durch ein alkalisches Milieu gelöst werden können. Für dieses Argument spricht auch die Existenz von überschüssigen Banden im nativen GFP-Southern Blot (siehe hierzu Diskussion 5.1.1.3.). Ein weiteres Indiz hierfür ist der Nachweis einer

homogenen AAV-Population für ssACMVANG in der PCR (siehe Abbildung 4.19.). Es liegt somit für ssACMVANG mit großer Sicherheit eine einheitliche Vektorpopulation aus Plus und Minusstrang vor.

Schwieriger gestaltet sich die Erklärung bei scAEFANG und vor allem scACMVANG. Hier liegen zusätzliche Banden nicht nur im nativen Gel vor, sondern auch im alkalischen Gel. Bei scAEFANG liegt eine zusätzliche Bande von etwa 3200 bp Länge vor, bei scACMVANG mindestens drei mit einer Länge zwischen 2800 und 4500 bp. Da diese Ergebnisse stabil waren, sich also reproduzieren ließen, wurde eine PCR des Angiostatin-AAV-Virusgenoms durchgeführt (siehe Ergebnisse 4.2.6. und Abbildung 4.19.). Hierzu wurden Primer gewählt, die an den Enden des viralen Genoms in der Nähe der ITR-Region binden und ein Transkript produzieren, das dem kompletten transgenen Bereich entspricht mit Ausnahme der ITR-Region. Hier ist eine PCR technisch nicht möglich, da der Transkriptionsvorgang aufgrund der besonderen ITR-Struktur abbricht. Da eine ITR-Region der selbstkomplementären Vektoren mutiert ist, wurde hierfür zusätzlich ein Primer gewählt, der in dieser Region bindet.

Zu erwarten ist für alle Vektoren jeweils eine Bande, da die Länge des transgenen Bereichs auch bei selbstkomplementären Vektoren gleich ist.

Für scAEFANG zeigte sich analog zu ssACMVANG eine einfache Bande der entsprechenden Höhe. Bei diesen Vektorpopulationen ergibt sich also kein Hinweis auf eine inhomogene, veränderte Vektorpopulation. Die zusätzliche Bande im Southern Blot stellt mit größter Sicherheit ein Artefakt dar.

Bei scACMVANG zeigten sich in der PCR multiple Banden, auch auf der erwarteten Höhe, jedoch ebenfalls bei etwa 1900 bp. Somit liegt bei scACMVANG mit größter Sicherheit eine inhomogene Vektorpopulation vor. Woher diese Veränderung kommt ist unklar. Möglich wäre eine Veränderung bzw. Rearrangierung der viralen ITR. Es handelt es sich bei dem Vektor scACMVANG um den klonierten Vektor, der die längste DNA Sequenz trägt (sc-Fragment entspricht etwa 4920 bp). Möglicherweise ist bei dieser Genomlänge die Verpackungsmaschinerie des Virus überfordert und produziert ein unvollständiges Angiostatin-Genom. Da auch DNA-Abschnitte mit nur einer ITR verpackt werden, sind zahlreiche Varianten denkbar. Abschließend ist jedoch festzustellen, dass die selbstkomplementäre Variante auch bei diesem Vektor produziert wird. Ein Teil von scACMVANG liegt also in der gewünschten sc-Form vor und dies zu einem wesentlich höheren Prozentsatz als dies bei ds-Vektoren bisher der Fall war.

5.2.3.4. Analyse der funktionellen Angiostatin Expression

Für Angiostatin konnte gezeigt werden, dass es das Wachstum von Endothelzellen *in vitro* inhibieren kann (O'Reilly, Holmgren et al. 1994). Es existieren in der Literatur zahlreiche Beispiele für den Nachweis der funktionellen Angiostatin-Wirkung, die auf diesem Prinzip beruhen. Andere Testsysteme versuchen ein durch Angiostatin verändertes „Verhalten“ der Endothelzellen nachzuweisen, so etwa das mit Angiostatin behandelte Endothelzellen langsamer wandern oder weniger Quervernetzungen ausbilden (Auerbach, Lewis et al. 2003).

In dieser Arbeit wurde zu Beginn mit Matrigel™ basierten *tube formation*-Assays experimentiert. Bei Matrigel™ (BD Bioscience) handelt es sich um flüssiges Basalmembran-Extrakt, produziert von der EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) Maus-Sarkom-Zelllinie (Grant, Lelkes et al. 1991). Diese Tumorzelllinie produziert eine Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen. Eine Hauptkomponente ist Laminin, gefolgt von Kollagen IV und Heparinsulfatproteoglykan. Dieses Gemisch polymerisiert, um ein Netz ähnlich der Basalmembran zu bilden. Endothelzellen, kultiviert auf dieser Matrix, bilden so genannte Tubes aus. Diese *tube formation* kann durch verschiedene Stoffe gehemmt werden (Auerbach, Lewis et al. 2003). Eine Hemmung ist unter anderem durch Angiostatin möglich (Trojanovsky, Levchenko et al. 2001).

Abbildung 4.20. zeigt diese *tube formation*. Eine Auswertung dieser Experimente erfordert eine Bilderkennungssoftware, die Kreuzungspunkte der *tubes* erkennt und zählt. Diese Ausrüstung stand nicht zur Verfügung und war auch wegen der weniger störanfälligen und mit weniger technischem Aufwand gewonnenen Ergebnisse der Endothelzellproliferationsassays nicht weiter erforderlich. Die in Abbildung 4.20 gezeigten Bilder entsprechen Einzelbildern. Visuell ist eine Tendenz zu weniger *tubes* bei mit Angiostatin behandelten Kulturen erkennbar. Die Bilder entsprechen jedoch lediglich Teilausschnitten einer Kultur und sind lediglich zur Demonstration der Technik eingefügt. Eine statistische Auswertung fand nicht statt.

Endothelzellen benötigen für ihre Proliferation Wachstumsstimulantien. Besonders deutlich erkennbar ist dies an der primären Endothelzelllinie HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), die ohne die im ECGM-Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren, wie unter anderem bFGF, nicht kultivierbar ist (Jaffe, Nachman et al. 1973). Gleiches gilt in gewissem Masse für die immortalisierte Zelllinie SVEC, für die sowohl bFGF, HGF und VEGF als Wachstumsstimulantien notwendig sind.

Angiostatin hemmt selektiv durch Wachstumsfaktoren hervorgerufene Proliferation. So ist es z.B. möglich, HGF (Wajih and Sane 2003) und bFGF (O'Reilly, Holmgren et al. 1996; Wu, O'Reilly et

al. 1997) bedingte Proliferation zu hemmen, solche die durch VEGF hervorgerufen wird jedoch nicht (Wajih and Sane 2003).

Mit der unter 4.2.7.2. beschriebenen Methode stand ein Endothelzellproliferationsassay zur Verfügung, der eine einfache Messung und anschließende statistische Auswertung erlaubte.

Die Abbildungen 4.22. bis 4.26. zeigen einige dieser Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Angiostatin-haltiger Überstand, als auch eine direkte Infektion der Endothelzellen mit Angiostatin-kodierenden Vektoren eine signifikante Hemmung des Endothelzellwachstums bewirkt. Für Endostatin konnte dieser Effekt nicht belegt werden. Sowohl reines Endostatin-Protein als auch Endostatin-haltiger Überstand von mit Endostatin-kodierenden Vektoren infizierten Zellen konnte in diesem Assay keine Proliferationshemmung hervorrufen. Eine mögliche Erklärung könnten neuere Erkenntnisse über Endostatin bieten. Schmidt et al. zeigten ein unterschiedliches Ansprechen von endothelialen Zellen auf Endostatin. Während sie bei HUVEC eine leichte Wachstumshemmung feststellten, förderte Endostatin das Wachstum von embryonalen endothelialen Zellen (Schmidt, Addicks et al. 2004). Endostatin scheint durch einen anderen Mechanismus Endothelzellen zu beeinflussen als dies bei Angiostatin der Fall ist. Zudem verwendeten O'Reilly et al. bei ihren Experimenten zum Nachweis von Endostatin ein auf BCEC (Bovine capillary endothelial cells) basierendes System und kein HUVEC- oder SVEC-Zell basiertes Testsystem wie in diesen Versuchen (O'Reilly, Boehm et al. 1997). Ein weiterer Grund könnte eine dosisabhängige Wirkung von Endostatin sein. Tjin Tham Sjin et al. 2006 und Celik et al. 2005 konnten zeigen, dass die Endostatin-Wirkung einer U-förmigen Dosis-Wirkungs-Beziehung folgt. Möglicherweise lag die in den *in vitro* Experimenten verwendete Dosis ausserhalb des optimalen Wirkungsspektrums.

Im Vergleichstest der Vektoren untereinander konnte eine Tendenz zu stärkerer Hemmwirkung durch selbstkomplementäre AAV-Angiostatin-Vektoren gezeigt werden (Werte verfehlen die Signifikanz-Grenze von $p \leq 0,05$). Ob dieser Effekt durch eine verstärkte Angiostatin-Produktion zustande kam, ließ sich in Ermangelung eines quantitativen Angiostatin-Nachweises nicht belegen. Auch zeigte der Vektor scAEFANG eine dem Vektor scACMVANG überlegene Hemmwirkung (Werte verfehlen ebenfalls die Signifikanz-Grenze von $p \leq 0,05$). Ob dieser Effekt aufgrund der Unterschiede im Promotor oder aufgrund der in Kapitel 4.2.6 gezeigten Unreinheit des scACMVANG-Vektors entsteht, konnte nicht belegt werden.

Um die Spezifität der Angiostatin-Hemmwirkung zu belegen, wurden Vergleichstests mit VEGF stimulierten Zellen durchgeführt. Hier lag keine Angiostatin-verursachte Hemmwirkung vor. Dies entspricht einer teilweisen Bestätigung der Experimente von Wajih et al. (Wajih and Sane 2003). Angiostatin hemmt demzufolge selektiv HGF und bFGF induzierte Proliferation, eine VEGF induzierte Hemmung ist jedoch nicht möglich.

In diesem (Abbildung 4.26.) wie auch in den vorherigen Infektionsexperimenten (Abbildung 4.25.) zeigten die mit Viren infizierten Zellen tendentiell eine verminderte Proliferation verglichen mit der nicht infizierten Kontrollen. Diese Proliferationshemmung bleibt jedoch unter der Signifikanzgrenze ($p \neq \leq 0,05$). Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer direkt zytotoxischen Wirkung von AAV2 auf Tumorzellen (Testzelllinie SVEC, SV40 transformierte murine Endothelzelllinie) (Raj, Ogston et al. 2001).

Die primäre Zelllinie HUVEC wurde nicht direkt mit AAV infiziert. Hier ist die Transduktionseffektivität von AAV sehr gering.

Zusammenfassend zeigten alle Angiostatin-kodierenden Vektoren eine deutliche Hemmwirkung der Endothelzellproliferation. Der Effekt war am deutlichsten bei den selbstkomplementären Vektoren scACMVANG und scAEFANG. Dieses Ergebnis entspricht den mit scACMVGFP gezeigten Ergebnissen (5.1.3).

5.2.3.5. *Analyse der Genexpression mittels Western Blot*

Neben der funktionellen Wirkung von Angiostatin sollte ein spezifischer Proteinnachweis erfolgen. Die Experimente wurden mit murinem Angiostatin durchgeführt. Das murine Protein wurde gewählt, da in späteren Versuchen ein immunkompetentes Mausmodell zur Testung der antiangiogenen Wirkung herangezogen werden sollte und befürchtet wurde, dass durch ein humanes Protein eine störende Immunreaktion hervorgerufen werden könnte.

Zum Zeitpunkt der Experimente wurden zwei polyklonale Anti-Angiostatin-Antikörper angeboten, bei denen in der Produktbeschreibung eine Kreuzreaktion mit murinem Angiostatin beschrieben wurde. Ein monoklonaler Antikörper gegen murines Angiostatin stand nicht zur Verfügung (siehe 4.2.8.).

Weder mit dem Antikörper der Fima Alpha Diagnostic International noch mit dem Antikörper der Firma Abcam (Polyklonal Anti-Plasminogen) konnte ein Western Blot etabliert werden, der kleinste murine Angiostatin-Konzentrationen nach Virusinfektion nachweisen konnte.

Im Verlauf wurde eine eigene Angiostatin-Positiv-Kontrolle hergestellt. Es zeigte sich jedoch, dass um eine Reaktion der Antikörper zu erreichen, Konzentrationen von Angiostatin nötig waren, die unter normalen experimentellen Bedingungen (virale Genexpression) nie erreicht wurden. Es gelang lediglich der Nachweis der Produktion von Angiostatin durch das Angiostatin tragende virale Plasmid (siehe Abbildung 4.27.). Der Versuch, durch eine Proteinanreicherung doch noch einen Nachweis der viralen Genexpression zu erreichen, war nicht erfolgreich, da bei FCS-haltigem Medium ab einer gewissen Konzentration bovine Immunglobuline auf der Höhe murinen Angiostatins liegen (50 kD), die durch Kreuzreaktionen eine sichere Visualisierung von Angiostatin unmöglich machen. Die Umstellung der zur Genexpression verwendeten 293 Zellen auf FCS-freies Medium wurde durch negative Ergebnisse im Mausmodell unterbrochen.

Zusammenfassend gelang der Nachweis einer Angiostatin-Produktion durch ein kloniertes und transfiziertes virales Angiostatin kodierendes Plasmid. Der Nachweis einer viralen Genexpression gelang nicht, wobei die positiven Daten des Endothelzellproliferationsassays auf eine Genexpression deutlich hinweisen. Die biologische Aktivität konnte eindeutig demonstriert werden. Die Sensitivität des verwendeten Western Blots reicht nicht aus, um kleinste Angiostatin-Konzentrationen nachzuweisen, wie sie in *in vitro*-Infektionsexperimenten erreicht werden.

5.2.3.6. *Testung von Angiostatin-AAV-Vektoren im Mausmodell*

Dieses Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. chem. Franz Gerner durchgeführt, dessen analoges Projekt die Klonierung und Testung eines auf murinem Endostatin basierten Vektors vorsah. Wie in Herrn Geners Dissertation beschrieben mißlang der Versuch, eine Genexpression in der Maus zu etablieren. Zwar konnte transgene mRNA nachgewiesen werden, eine Proteinexpression jedoch nicht (sowohl für ss- als auch für sc-Vektoren). Für murines Endostatin stand ein kommerzielles ELISA-Testsystem zur quantitativen Endostatin-Bestimmung zur Verfügung. Aufgrund der wie in 5.2.3.5. beschriebenen Probleme eines Proteinnachweises mit Angiostatin und der negativen Daten mit Endostatin im Mausmodell wurde von einer Testung der Angiostatin-AAV-Vektoren *in vivo* abgesehen.

Eine mögliche Erklärung für den Fehlschlag der viralen Genexpression liegt möglicherweise in dem verwendeten Kapsid AAV2 begründet. Nachfolgende Experimente der Arbeitsgruppe mit AAV8 konnten hier eine Verbesserung zeigen (Daten nicht gezeigt). Sarkar et al. 2004 und Erger et al. 2007 konnten nachweisen, dass die Transduktionseffizienz von AAV8 um ein Vielfaches über

der von AAV2 liegt. Konnten bisher mittels des AAV2-Serotyps lediglich ca. 5% der Hepatozyten infiziert werden, so liegt die Effizienz bei AAV8 bei bis zu 40%.

Da eine Verwendung der klonierten Plasmide auch mit diesem Kapsid möglich ist, kann eine Produktion von AAV8-Angiostatin/Endostatin-Vektoren möglicherweise diese Probleme umgehen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit sind die in dem Experiment von Herrn Gerner verwendeten Virustiter, die im Vergleich mit anderen Arbeiten niedrig gewählt waren. Möglicherweise war diese Dosierung nicht ausreichend um eine stabile Genexpression auszubilden.

5.2.4. Beurteilung und Ausblick

Diese Arbeit stellt die erste Klonierung und Testung eines selbstkomplementären Angiostatin tragenden AAV-Vektors dar. Zumindest einer der klonierten Vektoren, scAEFANG, zeigte eine hohe Reinheit an selbstkomplementären AAV und konnte eine deutliche *in vitro* Endothelzellproliferationshemmung vermitteln.

Die Auswahl von murinem Angiostatin ohne „Tag“-Markierung erwies sich als ungünstig. Die fehlende Verfügbarkeit von Antikörpern gegen murines Angiostatin erschwerte den Proteinnachweis. Die Wahl murinen Angiostatins erfolgte aufgrund der Gefahr einer Immunreaktion im immunkompetenten Mausmodell. Möglicherweise ist diese Gefahr jedoch aufgrund hoher Sequenzhomologie zwischen murinem und humanem Angiostatin zu vernachlässigen.

Der Nachweis einer Wirkung im Tumormausmodell konnte aufgrund fehlender Genexpression nicht erbracht werden (siehe Kapitel 5.2.3.6.). Dieser Nachweis ist inzwischen zahlreichen Arbeitsgruppen gelungen (Ma, Guo et al. 2002; Ma, Lin et al. 2002; Xu, Sun et al. 2003; Lalani, Chang et al. 2004; Ponnazhagan, Mahendra et al. 2004; Sun, Krissansen et al. 2005). Für die fehlende Genexpression im Mausmodell kommen mehrere Erklärungen in Frage. Möglicherweise würde ein Wechsel auf einen anderen viralen Serotyp (siehe Kapitel 1.1.3.) dieses Problem beheben. Dies ist ohne weitere Veränderungen möglich.

Diese Experimente stellen den ersten Nachweis der Funktion eines selbstkomplementären Angiostatin kodierenden Vektors dar.

Die Veränderungen der viralen ITR, die letztendlich zur Produktion von selbstkomplementären (*self complementary*) scAAV führt, stellt eine viel versprechende Neuerung in der AAV-Vektor-Technologie dar und ist ein weiterer Schritt zu einer erfolgreichen viralen Gentherapie (Wang, Ma et al. 2003; Nathwani, Gray et al. 2005).

Angiostatin konnte *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit zeigen. Eine Phase I-Studie bei Nichtkleinzelligem-Bronchialcarcinom konnte erfolgreich beendet werden (Kurup, Lin et al. 2006). Trotzdem ist die Zukunft dieser Substanz fraglich. Die Rechte an Angiostatin wurden von der Firma EntreMed an Children's Medical Center Corporation (CMCC) und Alchemgen Therapeutics verkauft. Es wird sich zeigen, ob weitere klinische Studien folgen.

Angiogenese-Inhibitoren halten zunehmend Einzug in den klinischen Alltag. Diese Entwicklung hat sich rasant vollzogen. Ihr Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil scheinen günstig und so ist eine neue Substanzklasse auf dem besten Weg, eine Standardtherapie zu werden.

6. Teil - Zusammenfassung

Die Tumorangiogenese stellt einen Vorgang dar, bei dem über die Ausbildung neuer Gefäße die Versorgung von Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen aufrechterhalten wird, wenn deren Größe 1-2 mm³ überschreitet und eine Versorgung über Diffusion nicht mehr möglich ist. Vermittelt und reguliert wird dieser Prozess durch eine Reihe von angiogen- und anti-angiogen-wirksamen Faktoren, die zum Teil von den Tumorzellen selbst gebildet werden (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) oder aus dem Tumorstroma stammen (z.B. Endostatin oder Angiostatin).

Bei der Tumorangiogenese ist die Balance zwischen den pro- und antiangiogenen Faktoren zu Gunsten der proangiogenen Faktoren hin verschoben. Therapeutisch lässt sich die Tumorangiogenese durch eine Hemmung proangiogener Faktoren wie VEGF auch im klinischen Setting wirksam beeinflussen. Der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab ist für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen worden.

In präklinischen Modellen ließ sich zeigen, dass auch durch Gabe von physiologisch vorkommenden antiangiogenen Faktoren wie Endostatin und Angiostatin das Wachstum experimenteller Tumoren signifikant gehemmt werden konnte. Angiostatin besteht aus den ersten Kringel-Domänen des Plasminogens und wird bei einer Reihe von physiologischen Prozessen im Körper durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Es inhibiert primäres und metastatisches Tumorwachstum durch Hemmung der Tumorneoangiogenese. Da diese löslichen Faktoren eine sehr kurze Halbwertszeit aufweisen, ist eine Gabe als Protein wenig erfolgversprechend und erste klinische Daten zur Applikation von Endostatin als Protein in klinischen Studien waren enttäuschend.

Ein effizienter alternativer Applikationsweg für diese Faktoren stellt zweifellos eine gentherapeutisch vermittelte systemische Überexpression dar, wie sie beispielsweise bei Gerinnungsfaktoren bereits in ersten klinischen Studien angewendet worden ist. Sowohl die Leber als auch die Muskulatur können dabei als Orte der Überexpression nach Gentransfer genutzt werden. Der Wahl und Optimierung des Vektorsystems kommt bei einer solchen Strategie ein zentraler Stellenwert zu. In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein Vektorsystem basierend auf Adeno-assoziierten Viren (AAV) für die antiangiogene Gentherapie entwickelt und optimiert.

AAV gehört zur Familie der Parvoviren, die durch eine fehlende Humanpathogenität und einem breiten Tropismus für unterschiedliche Gewebe charakterisiert sind. Rekombinantes AAV (rAAV) enthält weniger als 4% des viralen Genoms von Wildtyp AAV. Konventionelle AAV-Vektoren basieren auf einem einzelsträngigen DNA Genom, welches von infizierten Zellen zuerst in ein

doppelsträngiges Genom umgewandelt werden muss, um eine Genexpression zu ermöglichen. Dieser Schritt ist limitierend auf dem Weg zur Transgenexpression.

In dieser Arbeit wurde ein sogenannter „self complementary“ AAV-Vektor (scAAV) hergestellt und charakterisiert, der in der Zielzelle primär eine doppelsträngige DNA zur Verfügung stellt. Die Strategie beruhte dabei auf Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Samulski, Capel Hill, USA. Es wurde auf dieser Basis ein AAV-Konstrukt zur Expression des Green-Fluorescent Protein (GFP) als Markergen und ein weiteres Konstrukt zur Expression von Angiostatin kloniert und in einem AAV-Serotyp 2 verpackt.

Das scAAV-Vektorsystem zeigte *in vitro* eine um eine log-Stufe stärkere Genexpression (GFP) als konventionelle AAV-Vektoren. Damit wurden die Daten der amerikanischen Arbeitsgruppe bestätigt. In funktionellen *in-vitro*-Experimenten zeigten sich die scAAV/Angiostatin-Vektoren den konventionellen AAV/Angiostatin-Vektoren signifikant überlegen bei der Hemmung der Proliferation von Endothelzellen. Der Nachweis von Angiostatin auf Proteinebene gelang aus Überständen von Zellen, die mit dem AAV-Expressionsplasmid transduziert worden waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde bekannt, dass AAV-Vektoren auf der Basis des Serotyps 2, wie sie im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden sind, unter *in-vivo*-Bedingungen in der Maus nur bei Verwendung sehr hoher Vektor-Dosen einen effizienten Gentransfer in Hepatozyten ermöglichen. Der Serotyp 8 hat sich in dieser Hinsicht als deutlich überlegen herausgestellt. Aus zeitlichen Gründen war es im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, die Konstrukte in AAV Serotyp 8 zu verpacken und in Tieren zu testen.

In der Zusammenfassung konnte im Rahmen dieser Arbeit der Grundstein gelegt werden für die Anwendung von scAAV zur Expression von Angiostatin im Rahmen der Gentherapie von Tumoren. Mittlerweile konnte im Labor ein effizienter *in-vivo*-Gentransfer unter Verwendung von scAAV-Vektoren auf der Basis des Serotyps 8 in Hepatozyten gezeigt werden. Damit steht der *in-vivo*-Anwendung der hier generierten Konstrukte aktuell nichts mehr entgegen.

7. Teil - Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-------|------------------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| Ω | Ohm |
| AAV | Adeno-assoziiertes Virus |
| AAVS1 | Integrationsstelle des AAV im humanen Genom |
| Ang | Angiostatin |
| AP | alkalische Phosphatase |
| AS | Ammoniumsulfat |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| Basen | |
| A | Adenin |
| C | Cytosin |
| G | Guanin |
| T | Thymin |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| CIP | Calf Intestinal Phosphatase |
| cm | Zentimeter |
| CMV | Cytomegalievirus |
| d | Tag (day) |
| D | Diffusionskonstante |
| DIG | Digoxigenin |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| dNTP | Desoxynucleotid |
| dsAAV | doppelsträngiges AAV |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eGFP | enhanced GFP |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay |
| Endo | Endostatin |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| g | Gramm |
| G | Gravitationskonstante |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| h | Stunde |
| hCMV | humanes Cytomegalievirus |
| HEPES | <i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure |

| | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| hFGFR1 | humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 |
| hHGFR | humanen Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| HSPG | Heparansulfatproteoglykan |
| Ig | Immunglobulin |
| ITR | invertierte terminale Wiederholung |
| kb | Kilobasen |
| kbp | Kilobasenpaar |
| kDa | Kilodalton |
| Kl | Klenow-Reaktion |
| l | Liter |
| LB-Medium | Lauria-Bertani-Medium |
| μ F | Mikrofarad |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ m | Mikrometer |
| μ M | Mikromolar |
| M | Molar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| moi | multiplicity of infection |
| MOPS | Morpholinpropansulfonsäure |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| o.g. | oben genannt |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | Offener Leserahmen |
| Ⓟ | Phosphatase-Reaktion |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PBS-MK | Magnesium- und Kalium-haltiges PBS |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration |
| PolyA | Polyadenylierungssignal |
| rAAV | rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus |
| rbs | Rep-Bindungsstelle |
| Rep | Regulatorisches Protein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| scAAV | selbstkomplementäres AAV |

| | |
|-------|------------------------------|
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| ssAAV | einzelsträngiges AAV |
| SSC | Saline sodium citrat |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| SV | Simian Virus |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| trs | terminale Schnittstelle |
| U | Einheit (Unit) |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VP | Kapsidprotein |
| z.B. | zum Beispiel |

8. Teil - Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Hallek für die Annahme als Doktoranden und die Bereitstellung des Themas. Sowie für Hilfe, als Hilfe am notwendigsten wurde.

Ich danke der Leitung des Genzentrums und all seinen Mitarbeitern. Es wird schwer sein, je wieder in einem solch hervorragenden Labor zu arbeiten.

Herrn PD Dr. Ulrich Hacker für das stets offene Ohr und die gute Betreuung, sowie die Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. Büning für Ihre Geduld, Ihren Rat, Ihre Hilfe und Ihre Unterstützung.

Herrn Dr. Franz Gerner für die Stunden der Planung, für Rat und Tat, für das Ertragen der Fehlschläge und den Jubel bei Erfolgen. Franz, danke für deine Hilfe. Viel Glück und Erfolg in den USA!

Herrn Dr. Perabo für das kritische Hinterfragen und einen unvergesslichen Akzent.

Herrn Dr. Ensle für Ideen und die Lehre wie ein wirklicher wissenschaftlicher Versuch mit echten Kontrollen aussehen sollte.

Frau Daniela Goldnau für Ihre Hilfsbereitschaft und die aufmunternden Worte.

Frau Kerstin Lux und Herrn Jan Endell sowie Herrn Bernhard Kaess und Herrn Andreas Riederer für das angenehme Klima, Hilfe und jede Menge Lachen.

Frau Kerstin Leike für Hilfe, Wissen und das Erlernen einer sauberen Arbeitsweise.

Herrn Dr. Nico Görlitz dessen Wege sich schon am ersten (Uni-) Tag mit meinen kreuzten und dem ich in diese Arbeitsgruppe gefolgt bin.

Sigrun für das SDS im Puffer.

Frau Dr. Feldmann für die vielen Gespräche und die „Vorlesungen“ über Molekularbiologie.

Verena Schott für die Korrektur dieser Arbeit, Geduld und Zeit.

Meiner Mutter für Ihre grenzenlose Unterstützung.

9. Teil - Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Abad, M. C., R. K. Arni, et al. (2002). "The X-ray crystallographic structure of the angiogenesis inhibitor angiostatin." *J Mol Biol* **318**(4): 1009-17.
- Algire, G. H., H. W. Chalkley, et al. (1950). "Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. III. Vascular reactions' of mice to fibroblasts treated in vitro with methylcholanthrene." *J Natl Cancer Inst* **11**(3): 555-580.
- Algire, G. H., H. W. Chalkley, et al. (1945). "Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions' of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants." *J Natl Cancer Inst* **6**: 73-85.
- Arruda, V. R., H. H. Stedman, et al. (2004). "Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model." *Blood*.
- Atchison, R. W., B. C. Casto, et al. (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." *Science* **149**: 754-6.
- Atchison, R. W., B. C. Casto, et al. (1966). "Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures." *Virology* **29**(2): 353-7.
- Auerbach, R., R. Lewis, et al. (2003). "Angiogenesis assays: a critical overview." *Clin Chem* **49**(1): 32-40.
- Auerswald, G., M. von Depka Prondzinski, et al. (2004). "Treatment patterns and cost-of-illness of severe haemophilia in patients with inhibitors in Germany." *Haemophilia* **10**(5): 499-508.
- Bantel-Schaal, U. and H. zur Hausen (1984). "Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site." *Virology* **134**(1): 52-63.
- Bartlett, J. S., R. Wilcher, et al. (2000). "Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors." *J Virol* **74**(6): 2777-85.
- Becerra, S. P., F. Koczot, et al. (1988). "Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript." *J Virol* **62**(8): 2745-54.
- Berns, K. I. (1990). "Parvovirus replication." *Microbiol Rev* **54**(3): 316-29.
- Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, et al. (1967). "Isolation of adenovirus-associated viruses from man." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(4): 1410-5.
- Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, et al. (1968). "Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses." *J Natl Cancer Inst* **40**(2): 319-27.
- Boehm, T., J. Folkman, et al. (1997). "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance." *Nature* **390**(6658): 404-7.
- Bonnet, C. S. and D. A. Walsh (2005). "Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation." *Rheumatology (Oxford)* **44**(1): 7-16.
- Botquin, V., A. Cid-Arregui, et al. (1994). "Adeno-associated virus type 2 interferes with early development of mouse embryos." *J Gen Virol* **75** (Pt 10): 2655-62.
- Brister, J. R. and N. Muzyczka (1999). "Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification." *J Virol* **73**(11): 9325-36.
- Brister, J. R. and N. Muzyczka (2000). "Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking." *J Virol* **74**(17): 7762-71.
- Brockhaus *Der Brockhaus Naturwissenschaft und Technik*, Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus AG.
- Büchen-Osmond, C. (2003). "Adeno-associated virus 2." *ICTVdB - The Universal Virus Database*.

- Buller, R. M., J. E. Janik, et al. (1981). "Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication." *J Virol* **40**(1): 241-7.
- Buning, H., M. Braun-Falco, et al. (2004). "Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy." *Cells Tissues Organs* **177**(3): 139-50.
- Buning, H., M. U. Ried, et al. (2003). "Receptor targeting of adeno-associated virus vectors." *Gene Ther* **10**(14): 1142-51.
- Cao, R., H. L. Wu, et al. (1999). "Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5728-33.
- Cao, Y., R. Cao, et al. (2002). "Kringle structures and antiangiogenesis." *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **2**(6): 667-81.
- Cao, Y., A. Chen, et al. (1997). "Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth." *J Biol Chem* **272**(36): 22924-8.
- Cao, Y., R. W. Ji, et al. (1996). "Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells." *J Biol Chem* **271**(46): 29461-7.
- Cao, Y. and L. Xue (2004). "Angiostatin." *Semin Thromb Hemost* **30**(1): 83-93.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-57.
- Carswell, S. and J. C. Alwine (1989). "Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences." *Mol Cell Biol* **9**(10): 4248-58.
- Cassinotti, P., M. Weitz, et al. (1988). "Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1." *Virology* **167**(1): 176-84.
- Casto, A. R., Hammon WM. (1967). "Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus." *Virology*.
- Celik, I., O. Surucu et al. (2005). "Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve." *Cancer Res* 2005 Dec 1;65(23):11044-50.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-52.
- Collaco, R. F., V. Kalman-Maltese, et al. (2003). "A biochemical characterization of the adeno-associated virus Rep40 helicase." *J Biol Chem* **278**(36): 34011-7.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1 Spec No): 33-8.
- Davis, M. D., J. Wu, et al. (2000). "Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates." *J Virol* **74**(6): 2936-42.
- Ding, W., L. Zhang, et al. (2005). "Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors." *Gene Ther*.
- Dong, Z., R. Kumar, et al. (1997). "Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma." *Cell* **88**(6): 801-10.
- Dutheil, N., F. Shi, et al. (2000). "Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4862-6.
- Ehrmann, R. L. and M. Knoth (1968). "Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy." *J Natl Cancer Inst* **41**(6): 1329-41.
- Emanuelli, C. and P. Madeddu (2004). "Angiogenesis therapy with human tissue kallikrein for the treatment of ischemic diseases." *Arch Mal Coeur Vaiss* **97**(6): 679-87.
- Erger, K. E., T. J. Conlon et al. (2007). "In vivo expression of human ATP:cob(I)alamin adenosyltransferase (ATR) using recombinant adeno-associated virus (rAAV) serotypes 2 and 8." *J Gene Med* 2007 May 1

- Erles, K., P. Sebokova, et al. (1999). "Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV)." *J Med Virol* **59**(3): 406-11.
- Fairley, C. K., J. S. Smoleniec, et al. (1995). "Observational study of effect of intrauterine transfusions on outcome of fetal hydrops after parvovirus B19 infection." *Lancet* **346**(8986): 1335-7.
- Falcone, D. J., K. M. Khan, et al. (1998). "Macrophage formation of angiostatin during inflammation. A byproduct of the activation of plasminogen." *J Biol Chem* **273**(47): 31480-5.
- Ferrara, N. (2002). "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 795-803.
- Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." *Endocr Rev* **25**(4): 581-611.
- Ferrari, F. K., T. Samulski, et al. (1996). "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors." *J Virol* **70**(5): 3227-34.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* **285**(21): 1182-6.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nat Med* **1**(1): 27-31.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis inhibitors generated by tumors." *Mol Med* **1**(2): 120-2.
- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Angiogenic factors." *Science* **235**(4787): 442-7.
- Folkman, J., E. Merler, et al. (1971). "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis." *J Exp Med* **133**(2): 275-88.
- Frater-Schroder, M., W. Risau, et al. (1987). "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(15): 5277-81.
- Fu, H., J. Muenzer, et al. (2003). "Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain." *Mol Ther* **8**(6): 911-7.
- Gao, G. P., M. R. Alvira, et al. (2002). "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11854-9.
- Gately, S., P. Twardowski, et al. (1997). "The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10868-72.
- Georg-Fries, B., S. Biederlack, et al. (1984). "Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus." *Virology* **134**(1): 64-71.
- Girod, A., M. Ried, et al. (1999). "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2." *Nat Med* **5**(9): 1052-6.
- Gnatenko, D., T. E. Arnold, et al. (1997). "Characterization of recombinant adeno-associated virus-2 as a vehicle for gene delivery and expression into vascular cells." *J Investig Med* **45**(2): 87-98.
- Goncalves, M. A. (2005). "Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector." *Virol J* **2**: 43.
- Goncalves, M. A., G. P. van Nierop, et al. (2005). "Transfer of the full-length dystrophin-coding sequence into muscle cells by a dual high-capacity hybrid viral vector with site-specific integration ability." *J Virol* **79**(5): 3146-62.
- Gospodarowicz, D., K. D. Brown, et al. (1978). "Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin." *J Cell Biol* **77**(3): 774-88.

- Grant, D. S., P. I. Lelkes, et al. (1991). "Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro." In Vitro Cell Dev Biol **27A**(4): 327-36.
- Greenblatt, M. and P. Shubi (1968). "Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique." J Natl Cancer Inst **41**(1): 111-24.
- GrisCELLI, F., H. Li, et al. (1998). "Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6367-72.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Hacker, U. T., L. Wingenfeld, et al. (2005). "Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency." J Gene Med.
- Hamilton, H., J. Gomos, et al. (2004). "Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption." J Virol **78**(15): 7874-82.
- Harach, HR., KO. Franssila, et al. (1985). "Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study." Cancer 1985 Aug 1;56(3):531-8.
- Harding, T. C., K. E. Koprivnikar, et al. (2004). "Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B." Gene Ther **11**(2): 204-13.
- Hari, D., M. A. Beckett, et al. (2000). "Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells." Mol Cell Biol Res Commun **3**(5): 277-82.
- Harrison, T. R. (2003). Harrisons Innere Medizin, ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft mbH.
- Hartley, J. W. and W. P. Rowe (1960). "A new mouse virus apparently related to the adenovirus group." Virology **11**: 645-7.
- Heidmann, H. H., D. M. Nettelbeck, et al. (1999). "Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen." Br J Cancer **81**(8): 1269-73.
- Heim, R., A. B. Cubitt, et al. (1995). "Improved green fluorescence." Nature **373**(6516): 663-4.
- Hofmann, A., B. Kessler, et al. (2003). "Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors." EMBO Rep **4**(11): 1054-60.
- Hoggan, M. D., N. R. Blacklow, et al. (1966). "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A **55**(6): 1467-74.
- Hoggan MD, B. N., and Rowe WP (1966). "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **350**(23): 2335-42.
- Huttner, N. A., A. Girod, et al. (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**(26): 2139-47.
- Ide, Baker, et al. (1939). "Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber." Am. J. Roentgenol. **42**: 891-899.
- Im, D. S. and N. Muzyczka (1992). "Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization." J Virol **66**(2): 1119-28.
- J.Sambrook, E. F. F. a. T. M. (1989). "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Edition." **Vol.1-3**.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, et al. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-56.
- Jamison, R. M. and H. D. Mayor (1965). "Acridine orange staining of purified rat virus strain X14." J Bacteriol **90**(5): 1486-8.

- Kaplitt, M. G., P. Leone, et al. (1994). "Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain." *Nat Genet* **8**(2): 148-54.
- Kashiwakura, Y., K. Tamayose, et al. (2005). "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection." *J Virol* **79**(1): 609-14.
- Kassam, G., M. Kwon, et al. (2001). "Purification and characterization of A61. An angiostatin-like plasminogen fragment produced by plasmin autodigestion in the absence of sulfhydryl donors." *J Biol Chem* **276**(12): 8924-33.
- Kim, D. W., T. Uetsuki, et al. (1990). "Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system." *Gene* **91**(2): 217-23.
- Kotin, R. M., J. C. Menninger, et al. (1991). "Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter." *Genomics* **10**(3): 831-4.
- Kronenberg, S., J. A. Kleinschmidt, et al. (2001). "Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids." *EMBO Rep* **2**(11): 997-1002.
- Kurup, A., C. W. Lin, et al. (2006). "Recombinant human angiostatin (rhAngiostatin) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study from Indiana University." *Ann Oncol* **17**(1): 97-103.
- Kwon, M., C. S. Yoon, et al. (2001). "p22 is a novel plasminogen fragment with antiangiogenic activity." *Biochemistry* **40**(44): 13246-53.
- Lalani, A. S., B. Chang, et al. (2004). "Anti-tumor efficacy of human angiostatin using liver-mediated adeno-associated virus gene therapy." *Mol Ther* **9**(1): 56-66.
- Le Bec, C. and A. M. Douar (2006). "Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors." *Gene Ther* **13**(10): 805-13.
- Lerch, P. G., E. E. Rickli, et al. (1980). "Localization of individual lysine-binding regions in human plasminogen and investigations on their complex-forming properties." *Eur J Biochem* **107**(1): 7-13.
- Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science* **246**(4935): 1306-9.
- Levchenko, T., K. Aase, et al. (2003). "Loss of responsiveness to chemotactic factors by deletion of the C-terminal protein interaction site of angiomin." *J Cell Sci* **116**(Pt 18): 3803-10.
- Li, F., J. Yang, et al. (2000). "Human glioma cell BT325 expresses a proteinase that converts human plasminogen to kringle 1-5-containing fragments." *Biochem Biophys Res Commun* **278**(3): 821-5.
- Lijnen, H. R., F. Ugwu, et al. (1998). "Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3)." *Biochemistry* **37**(14): 4699-702.
- Lijnen, H. R., B. Van Hoef, et al. (2000). "Specific proteolysis of human plasminogen by a 24 kDa endopeptidase from a novel *Chryseobacterium* Sp." *Biochemistry* **39**(2): 479-88.
- Linden, R. M., P. Ward, et al. (1996). "Site-specific integration by adeno-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11288-94.
- Linden, R. M., E. Winocour, et al. (1996). "The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7966-72.
- Lindsey, H. (2006). "Bevacizumab and erlotinib show promise for kidney cancer." *Lancet Oncol* **7**(1): 15.
- Liu, Y. L., F. Mingozzi, et al. (2004). "Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector." *Hum Gene Ther* **15**(8): 783-92.
- Lucas, R., L. Holmgren, et al. (1998). "Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells." *Blood* **92**(12): 4730-41.
- Ma, H. I., P. Guo, et al. (2002). "Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin." *Cancer Res* **62**(3): 756-63.

- Ma, H. I., S. Z. Lin, et al. (2002). "Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector." *Gene Ther* **9**(1): 2-11.
- McCarty, D. M., H. Fu, et al. (2003). "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo." *Gene Ther* **10**(26): 2112-8.
- McCarty, D. M., P. E. Monahan, et al. (2001). "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis." *Gene Ther* **8**(16): 1248-54.
- McCarty, D. M., S. M. Young, Jr., et al. (2004). "Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors." *Annu Rev Genet* **38**: 819-45.
- McCown, T. J., X. Xiao, et al. (1996). "Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector." *Brain Res* **713**(1-2): 99-107.
- McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, J. H. U., National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (2000). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- McPherson, R. A., L. J. Rosenthal, et al. (1985). "Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication." *Virology* **147**(1): 217-22.
- Mendelson, E., J. P. Trempe, et al. (1986). "Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide." *J Virol* **60**(3): 823-32.
- Merten, O. W., C. Geny-Fiamma, et al. (2005). "Current issues in adeno-associated viral vector production." *Gene Ther* **12 Suppl 1**: S51-61.
- Miao, C. H., H. Nakai, et al. (2000). "Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction." *J Virol* **74**(8): 3793-803.
- Monahan, P. E. and R. J. Samulski (2000). "Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons?" *Mol Med Today* **6**(11): 433-40.
- Morikawa, W., K. Yamamoto, et al. (2000). "Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells." *J Biol Chem* **275**(49): 38912-20.
- Moser, T. L., D. J. Kenan, et al. (2001). "Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12): 6656-61.
- Moser, T. L., M. S. Stack, et al. (1999). "Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 2811-6.
- Motta, A., R. A. Laursen, et al. (1986). "Proton magnetic resonance study of kringle 1 from human plasminogen. Insights into the domain structure." *J Biol Chem* **261**(29): 13684-92.
- Mousavi, S. A., L. Malerod, et al. (2004). "Clathrin-dependent endocytosis." *Biochem J* **377**(Pt 1): 1-16.
- Nakai, H., T. A. Storm, et al. (2000). "Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo." *J Virol* **74**(20): 9451-63.
- Nathwani, A. C., J. T. Gray, et al. (2005). "Self complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver." *Blood*.
- Novokhatny, V. V., S. A. Kudinov, et al. (1984). "Domains in human plasminogen." *J Mol Biol* **179**(2): 215-32.
- O'Reilly, M. S., T. Boehm, et al. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." *Cell* **88**(2): 277-85.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1996). "Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice." *Nat Med* **2**(6): 689-92.

- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1994). "Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 471-82.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell **79**(2): 315-28.
- O'Reilly, M. S., D. Wiederschain, et al. (1999). "Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance." J Biol Chem **274**(41): 29568-71.
- Palmer, K. A., H. A. Scheraga, et al. (1986). "A preliminary three-dimensional structure of angiogenin." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(7): 1965-9.
- Parks, W. P., M. Green, et al. (1967). "Physicochemical characterization of adeno-associated satellite virus type 4 and its nucleic acid." J Virol **1**(5): 980-7.
- Patterson, B. C. and Q. A. Sang (1997). "Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9)." J Biol Chem **272**(46): 28823-5.
- Pereira, D. J., D. M. McCarty, et al. (1997). "The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection." J Virol **71**(2): 1079-88.
- Philpott, N. J., J. Gomos, et al. (2002). "A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12381-5.
- Ponnazhagan, S., G. Mahendra, et al. (2004). "Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor." Cancer Res **64**(5): 1781-7.
- Qing, K., C. Mah, et al. (1999). "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2." Nat Med **5**(1): 71-7.
- Rabinowitz, J. E., D. E. Bowles, et al. (2004). "Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups." J Virol **78**(9): 4421-32.
- Raj, K., P. Ogston, et al. (2001). "Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity." Nature **412**(6850): 914-7.
- Recchia, A., L. Perani, et al. (2004). "Site-specific integration of functional transgenes into the human genome by adeno/AAV hybrid vectors." Mol Ther **10**(4): 660-70.
- Redemann, B. E., E. Mendelson, et al. (1989). "Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection." J Virol **63**(2): 873-82.
- Roberts, A. B., M. B. Sporn, et al. (1986). "Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(12): 4167-71.
- Rolling, F. (2004). "Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives." Gene Ther **11 Suppl 1**: S26-32.
- Rose, J. A., M. D. Hoggan, et al. (1966). "Nucleic acid from an adeno-associated virus: chemical and physical studies." Proc Natl Acad Sci U S A **56**(1): 86-92.
- Rutledge, E. A., C. L. Halbert, et al. (1998). "Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2." J Virol **72**(1): 309-19.
- Ryan, J. H., S. Zolotukhin, et al. (1996). "Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats." J Virol **70**(3): 1542-53.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samulski, R. J., X. Zhu, et al. (1991). "Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19." Embo J **10**(12): 3941-50.
- Sanchez-Chapado, M., G. Olmedilla, et al. (2003). "Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study." Prostate. 2003 Feb 15;54(3):238-47.

- Sanlioglu, S., P. K. Benson, et al. (2000). "Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation." *J Virol* **74**(19): 9184-96.
- Sarkar, R., R. Tetreault, et al. (2004). "Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype." *Blood* **103**(4): 1253-60.
- Schmidt, A., K. Addicks, et al. (2004). "Opposite effects of endostatin on different endothelial cells." *Cancer Biol Ther* **3**(11): 1162-6; discussion 1167-8.
- Seisenberger, G., M. U. Ried, et al. (2001). "Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus." *Science* **294**(5548): 1929-32.
- Shimomura, O. (2005). "The discovery of aequorin and green fluorescent protein." *J Microsc* **217**(Pt 1): 1-15.
- Siegl, G., R. C. Bates, et al. (1985). "Characteristics and taxonomy of Parvoviridae." *Intervirology* **23**(2): 61-73.
- Snyder, R. O., D. S. Im, et al. (1990). "Evidence for covalent attachment of the adeno-associated virus (AAV) rep protein to the ends of the AAV genome." *J Virol* **64**(12): 6204-13.
- Snyder, R. O., D. S. Im, et al. (1993). "Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein." *J Virol* **67**(10): 6096-104.
- Snyder, R. O., C. H. Miao, et al. (1997). "Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors." *Nat Genet* **16**(3): 270-6.
- Soos, G., I. Tsakiris, et al. (2005). "The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study." *Eur Urol*. 2005 Nov;48(5):739-44. Epub 2005 Sep 15.
- Sottrup-Jensen, L., M. Zajdel, et al. (1975). "Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(7): 2577-81.
- Srivastava, A., E. W. Lusby, et al. (1983). "Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome." *J Virol* **45**(2): 555-64.
- Stathakis, P., A. J. Lay, et al. (1999). "Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin." *J Biol Chem* **274**(13): 8910-6.
- Summerford, C., J. S. Bartlett, et al. (1999). "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection." *Nat Med* **5**(1): 78-82.
- 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**(2): 1438-45.
- Sun, X., G. W. Krissansen, et al. (2005). "Anti-angiogenic therapy subsequent to adeno-associated-virus-mediated immunotherapy eradicates lymphomas that disseminate to the liver." *Int J Cancer* **113**(4): 670-7.
- Takada, A., Y. Sugawara, et al. (1988). "Degradation of Glu- and Lys-plasminogen by elastase in the presence or absence of tranexamic acid." *Thromb Res* **50**(2): 285-94.
- Takebe, Y., M. Seiki, et al. (1988). "SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat." *Mol Cell Biol* **8**(1): 466-72.
- Tjin Tham Sjin, R.M., J. Naspinski, et al. (2006). "Endostatin therapy reveals a U-shaped curve for antitumor activity." *Cancer Gene Ther*. 2006 Jun;13(6):619-27.
- Tobiasch, E., M. Rabreau, et al. (1994). "Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion." *J Med Virol* **44**(2): 215-22.
- Troyanovsky, B., T. Levchenko, et al. (2001). "Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation." *J Cell Biol* **152**(6): 1247-54.
- Vafaie, J. and R. A. Schwartz (2004). "Parvovirus B19 infections." *Int J Dermatol* **43**(10): 747-9.
- Vali, Z. and L. Patthy (1984). "The fibrin-binding site of human plasminogen. Arginines 32 and 34 are essential for fibrin affinity of the kringle 1 domain." *J Biol Chem* **259**(22): 13690-4.

- van Wijngaarden, P., D. J. Coster, et al. (2005). "Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems." *Jama* **293**(12): 1509-13.
- Vasileva, A. and R. Jessberger (2005). "Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting." *Nat Rev Microbiol* **3**(11): 837-47.
- Wajih, N. and D. C. Sane (2003). "Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells." *Blood* **101**(5): 1857-63.
- Walters, R. W., S. M. Yi, et al. (2001). "Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer." *J Biol Chem* **276**(23): 20610-6.
- Wang, L., R. Calcedo, et al. (2005). "Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy." *Blood* **105**(8): 3079-86.
- Wang, X. S., S. Ponnazhagan, et al. (1995). "Rescue and replication signals of the adeno-associated virus 2 genome." *J Mol Biol* **250**(5): 573-80.
- Wang, Z., H. I. Ma, et al. (2003). "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo." *Gene Ther* **10**(26): 2105-11.
- Ward, P., P. Elias, et al. (2003). "Rescue of the adeno-associated virus genome from a plasmid vector: evidence for rescue by replication." *J Virol* **77**(21): 11480-90.
- Weitzman, M. D., S. R. Kyostio, et al. (1996). "Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA." *J Virol* **70**(4): 2440-8.
- Weitzman, M. D., S. R. Kyostio, et al. (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**(13): 5808-12.
- Wistuba, A., A. Kern, et al. (1997). "Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly." *J Virol* **71**(2): 1341-52.
- Wu, Z., A. Asokan, et al. (2006). "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy." *Mol Ther* **14**(3): 316-27.
- Wu, Z., M. S. O'Reilly, et al. (1997). "Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(3): 651-4.
- Xiao, W., N. Chirmule, et al. (1999). "Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1." *J Virol* **73**(5): 3994-4003.
- Xiao, W., K. H. Warrington, Jr., et al. (2002). "Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2." *J Virol* **76**(22): 11505-17.
- Xiao, X., J. Li, et al. (1998). "Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus." *J Virol* **72**(3): 2224-32.
- Xu, R., X. Sun, et al. (2003). "Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice." *Hepatology* **37**(6): 1451-60.
- Young, N. (1988). "Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection." *Semin Hematol* **25**(2): 159-72.
- Zhong, L., L. Chen, et al. (2004). "Self-complementary adeno-associated virus 2 (AAV)-T cell protein tyrosine phosphatase vectors as helper viruses to improve transduction efficiency of conventional single-stranded AAV vectors in vitro and in vivo." *Mol Ther* **10**(5): 950-7.
- Zhong, L., W. Li, et al. (2004). "Improved transduction of primary murine hepatocytes by recombinant adeno-associated virus 2 vectors in vivo." *Gene Ther* **11**(14): 1165-9.
- Zolotukhin, S., B. J. Byrne, et al. (1999). "Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield." *Gene Ther* **6**(6): 973-85.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Tobias Marcus Herold
Geburtsdatum: 22. März 1979
Geburtsort: Giessen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

ANGESTREBTE TÄTIGKEIT

Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin

AUSBILDUNG

1985 - 1989 Grundschule Biebertal
1989 - 1998 Besuch des gymnasialen Zweiges der Herderschule Giessen
1998 Abitur (Note 1,4)
1998 - 1999 Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V. Kreisverband
Giessen, Ausbildung zum Rettungssanitäter
1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
2001 Physikum (Note 1,66)
2002 I. Staatsexamen (Note 2)
2002 Beginn der Promotionsarbeit „Antiangiogene Genterapie mittels
eines modifizierten AAV-Vektors“ im Rahmen des
Förderprogramms für Forschung und Lehre „Molekulare Medizin“
bei Herrn Prof. Dr. med. Hallek
2004 II. Staatsexamen (Note 1,66)
2005 - 2006 Praktisches Jahr
2006 III. Staatsexamen (Note 1)
2006 Wissenschaftlicher Assistenzarzt der MED III Klinikum
Großhadern bei Herrn Prof. Dr. med Hiddemann

PJ-STELLEN

- Innere Medizin Klinikum Großhadern MED II/III (Prof. Beuers/Prof. Hiller)
- Neurologie Klinikum Großhadern (Prof. Pfister)
- Chirurgie Klinikum Innenstadt (Prof. Steckmeier/Prof. Mutschler)

VERÖFFENTLICHUNGEN

Journal of Gene Medicine, 2005 Jun 9, Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency. Hacker UT, Wingenfeld L, Kofler DM, Schuhmann NK, Lutz S, **Herold T**, King SB, Gerner FM, Perabo L, Rabinowitz J, McCarty DM, Samulski RJ, Hallek M, Buning H.

STIPENDIEN UND FÖRDERUNGEN

- Oskar-Karl-Forster-Stipendium
- Förderung im Rahmen des Programms zur „Förderung von Forschung und Lehre Molekulare Medizin“

München den 05.04.2007