

Zielgerichtete Evolution Matrix Metalloprotease- aktivierbarer Retroviren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

von
Richard Schneider
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2004
(DF1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz. D. Osiewacz
Gutachter: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz
PD Dr. Christian J. Buchholz

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle tumorassoziierter Proteasen (TAP) bei der Tumorprogression	1
1.1.1 Matrix Metalloproteasen (MMP)	2
1.1.1.1 Funktion und Regulation	2
1.1.1.2 MMPs als Zielmoleküle in der Tumorthherapie	3
1.2 Retroviren und retrovirale Vektoren	5
1.2.1 Retroviren	5
1.2.1.1 Klassifizierung	5
1.2.1.2 Aufbau und Infektionszyklus	5
1.2.1.3 Tropismus	8
1.2.2 Retrovirale Vektoren	8
1.3 Modifikation des retroviralen Tropismus	9
1.3.1 „Targeting“ von Retroviren	9
1.3.2 Protease-aktivierbare Retroviren	10
1.4 Molekulare Evolution zur Charakterisierung von Protease-Substraten	12
1.4.1 Molekulare Evolution	12
1.4.2 Phagen-„Display“-Bibliotheken	13
1.4.3 Retrovirale „Display“-Bibliotheken	14
1.5 Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	17
2.1.2 Enzyme, rekombinante Proteine und Inhibitoren	17
2.1.3 Antiseren und Antikörper	18
2.1.4 Plasmide	18
2.1.5 Oligonukleotide	18
2.1.6 Zelllinien	19
2.1.7 Bakterienstämme	19
2.1.8 Geräte	20
2.2 Methoden der Molekularbiologie	21
2.2.1 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation	21
2.2.2 Photometrische Messung der DNA-Konzentration	21
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	22
2.2.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren	22
2.2.4.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22

2.2.4.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels <i>PCR-Purification Kit</i>	23
2.2.4.3	Phenolextraktion	23
2.2.4.4	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	23
2.2.5	Arbeiten mit Bakterien	24
2.2.5.1	Kultivierung von Bakterien	24
2.2.5.2	Herstellung kompetenter Bakterien	24
2.2.5.3	Transformation von Bakterien	25
2.2.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	26
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.2.7	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	27
2.2.8	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	28
2.2.9	DNA-Sequenzierung	29
2.2.9.1	Sequenzierreaktion	29
2.3	Methoden der Proteinbiochemie	30
2.3.1	Herstellung von Zellextrakten	30
2.3.2	Deglykosylierung von Proteinen durch PNGase F	30
2.3.3	Photometrische Messung der Proteinkonzentration	30
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.5	Western Blot	32
2.4	Methoden der Zellbiologie	33
2.4.1	Kultivierung von Zellen	33
2.4.2	Transfektion von Säugerzellen durch Lipofektion	34
2.4.3	Nachweis modifizierter viraler Oberflächenproteine auf eukaryotischen Zellen durch analytische Durchflußzytometrie (FACS)	35
2.5	Methoden der Virologie	35
2.5.1	Herstellung und Konzentrierung von Viruspartikeln	35
2.5.2	Infektion von Zellen und Titration von Viren	36
2.5.3	Isolierung viraler RNA	37
2.5.4	Reverse Transkriptase Aktivitäts-Test (RT-Test)	37
2.5.5	Immunperoxidase-Test (IPA)	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Herstellung und Selektion der retroviralen E-X3-A- und E-X3rev-A-Bibliothek	39
3.1.1	Entwurf der E-X3-A-Bibliothek	39
3.1.2	Herstellung und Charakterisierung der E-X3-A-Bibliothek auf Plasmid-Ebene	40
3.1.3	Selektion der E-X3-A-Bibliothek auf der Tumorzelllinie HT1080	43
3.1.4	Charakterisierung der Viruspopulation nach Selektion	45
3.1.5	Sequenzanalyse der selektierten Substratlinker	47
3.1.6	Herstellung und Charakterisierung der E-X3rev-A-Bibliothek	51

3.1.7	Selektion und Analyse der E-X3rev-A-Bibliothek auf der Tumorzelllinie HT1080	52
3.2	Selektion von Stopkodonmutanten und deren Charakterisierung	55
3.3	Charakterisierung der selektionierten Viren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	58
3.3.1	Rekonstitution der selektionierten Virusvarianten und Herstellung viraler Env- Expressionsplasmide	59
3.3.2	Analyse der selektionierten Virusvarianten nach Produktion in HEK-293T- und HT1080- Zellen	60
3.3.2.1	Analyse in HEK-293T-Zellen	60
3.3.2.2	Analyse in HT1080-Zellen	63
3.3.3	Das Replikationsverhalten der selektionierten Viren in HT1080-Zellen	65
3.3.4	MMP-abhängige Virusausbreitung, Zelleintritt und Partikelfreisetzung selektionierter Viren	69
3.3.4.1	MMP-abhängige Virusausbreitung	70
3.3.4.2	Zelleintritt	71
3.3.4.3	Partikelfreisetzung	72
3.3.5	Spaltung selektionierter Substratlinker durch Matrix Metalloproteasen <i>in vitro</i>	74
3.3.5.1	Spaltung selektionierter Hüllproteine durch MMP-2	74
3.3.5.2	Kinetik der MMP-2 Spaltung selektionierter Hüllproteine	77
3.3.5.3	Spaltung selektionierter Hüllproteine durch weitere MMPs <i>in vitro</i>	78
3.3.6	Infektion „MMP-negativer“ Zellen	79
4.	<i>Diskussion</i>	82
4.1	Herstellung und Etablierung des Selektionssystems	82
4.2	Die treibende Kraft der Selektion	85
4.3	Der Aktivierungsmechanismus MMP-aktivierbarer Retroviren	87
4.4	Selektionierte Substrate und ihre Anwendbarkeit in der Tumorthherapie	91
5.	<i>Zusammenfassung</i>	94
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	96
7.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	106
8.	<i>Anhang</i>	109
9.	<i>Danksagung</i>	111
10.	<i>Lebenslauf</i>	112

1. Einleitung

Krebs gehört mit steigender Lebenserwartung immer mehr zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern. Seine Ursachen sind vielfältig und individuell. Obwohl die konventionellen Therapien wie Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung in den letzten Jahren teilweise beachtliche Erfolge erzielten, sind sie nach wie vor nicht in der Lage, Tumore in allen Progressionsstadien, insbesondere nach Metastasierung, zu heilen. Aus diesem Grund werden in der medizinischen Biotechnologie molekulare Werkzeuge zur Charakterisierung spezifischer Eigenschaften von Tumorzellen entwickelt, um die daraus gewonnenen Erkenntnisse mit neuen therapeutischen Ansätzen zu verknüpfen.

1.1 Die Rolle tumorassoziierter Proteasen (TAP) bei der Tumorprogression

Proteolytische Enzyme, die Proteasen, spielen in zahlreichen zellulären und extrazellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Innerhalb der Zellen steuern sie beispielsweise den programmierten Zelltod oder sorgen für die richtige posttranslationale Prozessierung vieler Proteine. Außerhalb der Zellen tragen sie unter anderem zum wirksamen Schutz gegen Pathogene bei oder sind für die gewebsspezifische Gestaltung und Regulierung der extrazellulären Matrix (ECM) verantwortlich. Normalerweise wird ihre proteolytische Aktivität durch spezifische Inhibitoren hochgradig reguliert. Im Verlauf bestimmter Erkrankungen kommt es jedoch zur Dysregulation von Proteasen und Inhibitoren. Eine wesentliche Rolle spielen dysregulierte Proteasen bei Krebs, indem sie zur Tumorprogression beitragen.

In vielen Tumortypen korreliert eine unkontrollierte proteolytische Aktivität verschiedener Proteasen mit dem Übergang vom soliden zum metastasierenden Stadium. Solche Proteasen, zu denen einige Matrix Metalloproteasen (MMP), das uPA-System (*urokinase Plasminogen Activator system*) oder verschiedene Cathepsine zählen, werden unter dem Begriff tumorassoziierte Proteasen (TAP) zu-

sammengefasst. Unter diesen sind die bedeutendsten die Matrix Metalloproteasen.

1.1.1 Matrix Metalloproteasen (MMP)

Die humanen Matrix Metalloproteasen (MMP) gehören zur Klasse der Endopeptidasen, die ein breites Spektrum extrazellulärer Proteine an charakteristischen Aminosäuresequenzen, ihren Substraten, hydrolysieren. Die MMPs bilden eine Proteinfamilie aus löslichen und membrangebundenen Formen (MT-MMPs, *membrane type matrix metalloproteinases*) von derzeit 28 bekannten Mitgliedern. Die meisten von ihnen sind aufgrund ihrer Substratspezifität und Struktur- bzw. Sequenzhomologie in vier Subklassen eingeteilt. So bilden drei die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), fünf die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-7 und MMP-26), zwei die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und sechs die membrangebundenen MMPs (MT1-MMP bis MT6-MMP). Die Übrigen bilden eigene Subklassen aufgrund struktureller Unterschiede (Woessner und Nagase, 2000; Vu und Werb, 2000; Overall, 2002; Rao, 2003). Allen MMPs ist die Koordination von Zn^{2+} in der katalytischen Domäne gemeinsam, weshalb sie als Metalloproteasen bezeichnet werden (Nagase *et al.*, 1992).

1.1.1.1 Funktion und Regulation

In einer Reihe physiologischer Prozesse, u.a. der Embryogenese, Wundheilung und Angiogenese, besteht die natürliche Funktion von MMPs darin, die Basallamina und die extrazelluläre Matrix (ECM) zu degradieren (Nagase und Woessner, 1999; Vu und Werb, 2000; Foda und Zucker, 2001). Diese beiden Strukturen bestehen aus zahlreichen lokal sezernierten Proteinen, die ein organisiertes dynamisches Geflecht in engem Kontakt mit den Zellen bilden. Die ECM ist Hauptbestandteil physiko-mechanisch wichtiger Strukturen, wie beispielsweise Bindegewebe, Sehnen oder Knochen. Für den dynamischen Wandel der ECM und zur zellulären Fortbewegung innerhalb der ECM aktivieren dafür spezialisierte Zellen, wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen oder Makrophagen, MMPs. Die Matrixproteine, u.a. Kollagene, Fibronectin und Laminin, sind deren natürliche Zielmoleküle.

In vitro hydrolysieren die einzelnen MMPs diese Proteine an bevorzugten Substraten. Zum Teil überschneiden sich die Substrate einzelner MMPs, wobei unterschiedliche Kinetiken der Spaltung vorliegen (Woessner und Nagase, 2000). Daraus ist zu entnehmen, dass einzelne MMPs die Funktion anderer *in vivo* übernehmen könnten (Overall, 2002).

Die MMPs werden auf verschiedenen Ebenen reguliert. Die Expression der MMP-Gene ist durch verschiedene Onkogene, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone gesteuert (Westermarck und Kahari, 1999; Curran und Murray, 2000). Synthetisierte MMPs sind in ihrer löslichen oder membrangebunden Form inaktive Enzyme (Zymogene), die erst nach Proteolyse eines Propeptids durch andere Proteasen (u.a. Furin, MMPs und Plasmin) in ihre katalytisch aktive Form überführt werden (Sato *et al.*, 1994; Baramova *et al.*, 1997; Curran und Murray, 1999; Woessner und Nagase, 2000; Yana und Weiss, 2000). Aktivierte MMPs werden wiederum durch gewebsspezifische Inhibitoren, die TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*), gebunden, und der daraus resultierende MMP/TIMP-Komplex ist inaktiv. TIMPs sind aber auch an der Aktivierung einiger MMPs beteiligt. Zum Beispiel bindet MMP-2 zunächst an TIMP-2 und erst die Bindung des Komplexes durch MT1-MMP führt zur Aktivierung von MMP-2 (Strongin *et al.*, 1995; Emmert-Buck *et al.*, 1995; Curran und Murray, 1999).

1.1.1.2 MMPs als Zielmoleküle in der Tumorthherapie

Bei der Progression vieler Tumortypen kommt es zum Abbau der ECM, zur Versorgung mit neugebildeten Blutgefäßen (Vaskularisierung) und zur Invasion von Tumorzellen in das Gewebe (Metastasierung). Diese Prozesse stehen im engen Zusammenhang mit der Aktivität verschiedener MMPs, u.a. MMP-1 (Kollagenase 1), MMP-7 (Matrylisin), MMP-2 (Gelatinase A), MMP-9 (Gelatinase B) und den membrangebundenen MT-MMPs (Curran und Murray, 1999; Nagase und Woessner, 1999; Foda und Zucker, 2001). Hohe MMP-Konzentrationen sind vor allem an den Zellmembranen und besonders an der invasiven Front des wachsenden Tumors zu finden (Curran und Murray, 1999).

Aus den oben genannten Gründen stellen die MMPs attraktive Zielmoleküle für die Krebstherapie dar, und mittlerweile sind einige Möglichkeiten zur Unterdrückung ihrer Aktivität beschrieben worden. Beispielsweise führt die Inhibition der MMP-9-

Synthese durch *antisense* cDNA in Glioblastomzellen zur verminderten Invasivität *in vitro* und zur unterdrückten Tumorbildung im Mausmodell (Kondraganti *et al.*, 2000; Lakka *et al.*, 2002). Ein direkterer Weg, die enzymatische Aktivität zu blockieren, ist der Einsatz von spezifischen natürlichen oder synthetischen Inhibitoren. Die erhöhte Expression der natürlichen Inhibitoren, der TIMPs, förderte jedoch in einigen Tumormodellen die Tumorprogression (Valente *et al.*, 1998; Yoshiji *et al.*, 1998). Die ersten synthetischen MMP-Inhibitoren erzielten dagegen bessere Erfolge gegen das Wachstum und die Invasivität verschiedener Tumortypen im Zellkultur- und Tiermodell. So wurden viele Struktur-ähnliche synthetische Inhibitoren entwickelt, die zum Teil sehr schnell bis in die klinische Phase III gelangten. Jedoch erzielten sie dort bisher weder alleine noch in Kombination mit anderen Substanzen eine Tumorreduktion (Coussens *et al.*, 2002).

Erst hier zeigte sich, dass genauere molekulare und präklinische Studien nötig sind, um die Funktion einzelner MMPs in Bezug auf den Tumortyp und das Tumorstadium zu untersuchen. Hierfür sind vor allem neue Tiermodelle und minimal invasive Technologien erforderlich, die die klinische Situation besser reflektieren und die Spezifität der Substanzen sowie deren Wirksamkeit im Tumorgewebe genauer evaluieren (Bremer *et al.*, 2001; Coussens *et al.*, 2002). Nur so können spezifischere synthetische Inhibitoren entwickelt und in der Therapie eingesetzt werden, um die pathologische MMP-Aktivität zum richtigen Zeitpunkt wirksam auszuschalten (Coussens *et al.*, 2002; Rao, 2003).

Ein neuer Ansatz dagegen basiert darauf, die enzymatische Aktivität der MMPs im Tumorgewebe für eine Therapie auszunutzen. So sind kürzlich die ersten Fusionsproteine hergestellt worden, deren therapeutische Zytokin- oder Toxin-Anteile über ein MMP-Standardsubstrat mit einer Schutz- oder Inaktivierungsdomäne fusioniert sind. Das MMP-Standardsubstrat dient hier der proteolytischen Freisetzung des therapeutischen Proteins durch MMPs. In der Tat konnte die selektive Aktivierung der Therapeutika durch MMP-exprimierende Tumorzellen oder synoviale Flüssigkeit von Rheumapatienten gezeigt werden (Liu *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003). Um diesen Ansatz MMP-aktivierbarer Therapeutika vielversprechend weiterzuentwickeln, bilden die Identifizierung der MMP-Spektren unterschiedlicher Tumortypen und die detaillierte Charakterisierung ihrer Substrate wichtige Voraussetzungen. Eine Möglichkeit hierfür besteht darin, mit geeigneten Substrat-Bibliothe-

ken und entsprechenden Selektionsverfahren die Substrate einzelner MMPs *in vitro* oder direkt auf MMP-exprimierenden Tumorzellen zu charakterisieren. Erst vor kurzem wurde eine neue Technologie auf Basis von Retroviren entwickelt, mit deren Hilfe Protease-Substrate in lebenden Zellen selektioniert werden konnten (Buchholz *et al.*, 1998).

1.2 Retroviren und retrovirale Vektoren

1.2.1 Retroviren

1.2.1.1 Klassifizierung

Die Retroviren bilden eine große und diverse Familie membranumhüllter RNA-Viren, die *Retroviridae*. Charakteristisch für Retroviren ist der innerhalb ihrer Vermehrungsstrategie essentielle Schritt der reversen Transkription. Dieser Prozess besteht im Umschreiben der viralen RNA in doppelsträngige DNA gefolgt von der stabilen Integration in das Genom der Wirtszelle. Die Klassifizierung der Retroviren erfolgt nach gemeinsamen Eigenschaften, die ihre Struktur, ihre Zusammensetzung und ihre Vermehrung betreffen. Die *Retroviridae* sind in die drei Unterfamilien Onko-, Lenti- und Spumaviren eingeteilt (Coffin *et al.*, 1997). Bekannte Vertreter aus allen drei Unterfamilien sind das murine Leukämie Virus (MLV, ein C-Typ Onkovirus), das humane Immundefizienz Virus (HIV, ein Lentivirus) und das humane Foamy Virus (HFV, ein Spumavirus). Weiterhin wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden. Erstere besitzen alle genetischen Informationen in ihren Genomen, um einen Infektionszyklus mit Freisetzung infektiöser Partikel zu durchlaufen. Letztere sind replikationsunfähig gewordene Genome, die in das Wirtsgenom aller Zellen integriert sind und nur über die Keimbahnzellen auf andere Individuen übertragen werden (Boeke und Stoye, 1997).

1.2.1.2 Aufbau und Infektionszyklus

Die infektiösen Partikel, die Virionen, besitzen einen Durchmesser zwischen 80 - 100 nm. Die äußere Hülle ist eine von der Wirtszelle abgeschnürte Lipidmembran, in der die viralen Hüllproteine inkorporiert sind. Sie umgibt das virale Kapsid, in

dem sich das virale Genom befindet (Abb. 1). Das virale Genom ist diploid und besteht aus zwei identischen zwischen 7 - 12 kb großen RNA-Molekülen, die einzelsträngig, nicht segmentiert und in positiver Polarität vorliegen (Vogt, 1997).

Alle Retroviren kodieren die drei Hauptproteine Gag (*group specific antigens*), Pol (*polymerase*) und Env (*envelope*). Einige kodieren noch zusätzlich regulatorische und akzessorische Proteine. Deshalb werden die Retroviren auch in einfache (Onkoviren) und komplexe Retroviren (Onko-, Lenti- und Spumaviren) eingeteilt (Coffin *et al.*, 1997).

Gag kodiert die Proteine der inneren Strukturen, wie Matrix- (MA), Kapsid- (CA) und Nukleokapsidproteine (NC). Pol kodiert die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR), die für die Reifung und Replikation zuständig sind. Env kodiert das Hüllprotein, das aus einer Transmembrandomäne (TM) und einem Oberflächenglykoprotein (SU) besteht (Abb. 1). Die Hüllproteine bilden einen heterotrimeren Glykoproteinkomplex, der für den Zelleintritt der Virionen verantwortlich ist (Coffin *et al.*, 1997).

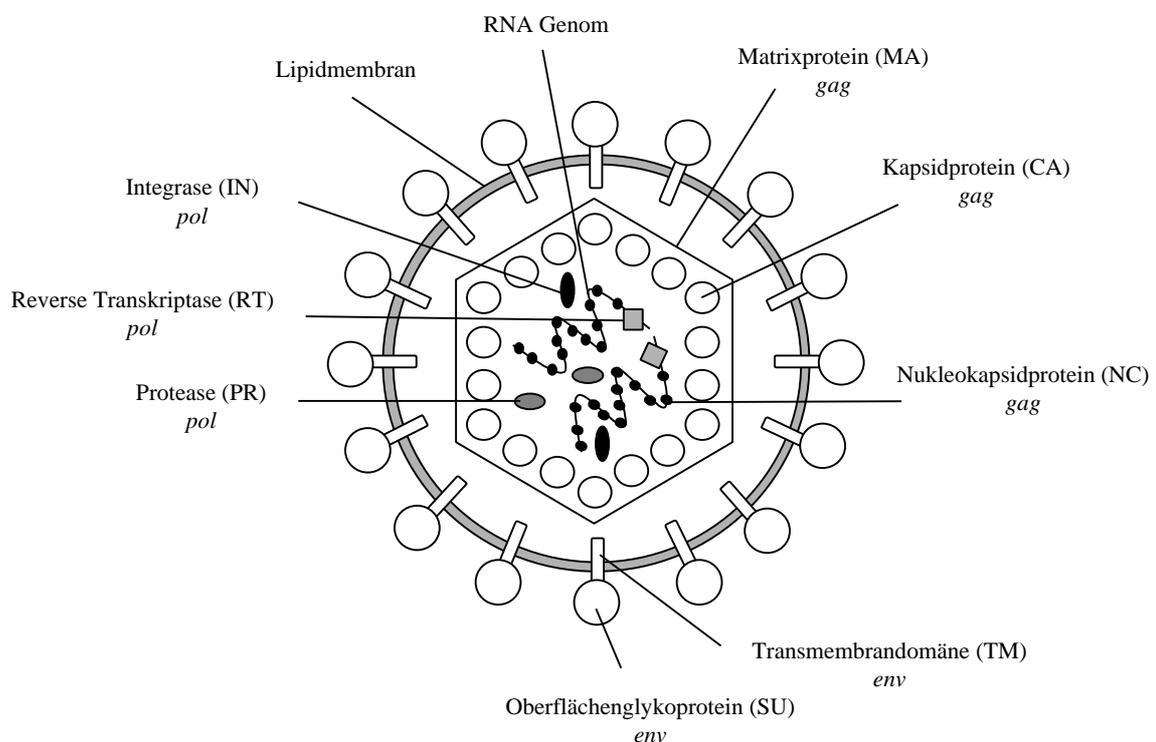


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus

Erläuterung s. Text

Alle integrierten viralen Genome, die Proviren, werden am 5'- und 3'-Ende von einer identischen regulatorischen Kontrollsequenz, der LTR (*long terminal repeat*), flankiert. Die LTR besteht aus den Wiederholungseinheiten U3, R und U5 und ist wichtig für die Reverse Transkription, Integration und Genexpression (Varmus, 1982).

Der Infektionszyklus von Retroviren lässt sich in eine frühe und in eine späte Phase einteilen (Varmus und Swanström, 1982). In der frühen Phase bindet das Virus über SU an den zellulären Rezeptor der Wirtszelle. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung und ein N-terminales hydrophobes Peptid von TM inseriert in die Zellmembran. Die beiden Membranen verschmelzen miteinander und das Kapsid tritt in das Zytoplasma ein (Hughson, 1997; Lavillette *et al.*, 1998; Wyatt und Sodroski, 1998). Hier wird die virale RNA revers transkribiert. Die entstandene lineare DNA, die Integrase und Kapsidproteine bilden den Nukleoproteinkomplex, der entweder aktiv durch Transport (HIV) oder passiv durch Auflösung der Kernmembran (MLV) in den Zellkern gelangt (Bowerman *et al.*, 1989; Roe *et al.*, 1993; Gallay *et al.*, 1995; Fouchier und Malim, 1999). Dort wird die virale DNA durch die Integrase in das Genom eingebaut (Brown *et al.*, 1989).

Die späte Phase führt zur Freisetzung infektiöser Partikel. Zunächst erfolgt die Transkription der proviralen DNA durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie. Die entstandene RNA wird partiell gespleißt, und besitzt die für mRNA charakteristische Cap-Struktur und den Poly(A)-Schwanz. Nach der Translokation in das Zytoplasma werden die gespleißten RNA-Produkte translatiert, und es entstehen Gag/Pol- und Env-Vorläuferproteine. Diese werden, beginnend in der Zelle und abschließend im Virion, zu reifen Proteinen prozessiert. Zwei ungespleißte miteinander assoziierte RNA-Moleküle dienen als genomische RNA, die durch ein im 5'-Bereich liegendes Verpackungssignal (Ψ) in ein entstehendes Virion eingebaut werden (Prats *et al.*, 1990). Die Env-Vorläuferproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat zu reifen Hüllproteinen prozessiert und sekretorisch zur Zellmembran transportiert (Hunter und Swanström, 1990). Dort assoziieren die Hüllproteine mit Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteinen, wodurch die Ausknospung eines unreifen Virions eingeleitet wird. Die endgültige Reifung des freigesetzten Virions zum infektiösen Partikel erfolgt abschließend durch die virale Protease (Coffin *et al.*, 1997).

1.2.1.3 Tropismus

Jeder Vertreter der *Retroviridae* besitzt ein bestimmtes Wirtszellspektrum, den sogenannten Tropismus. Er kann durch die Interaktion des viralen Oberflächenglykoproteins (SU) mit einem spezifischen zellulären Oberflächenrezeptor determiniert werden (Battini *et al.*, 1992). Innerhalb einer Virusgruppe, wie zum Beispiel MLV, können unterschiedliche Tropismen vorliegen. Das ecotrope Virus vom Typ Moloney (MoMLV) infiziert ausschließlich murine Zellen (Albritton *et al.*, 1993; Kavanaugh *et al.*, 1994), da es den murinen Aminosäuretransporter Rec-1 benutzt (Kim *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Die amphotrope MLV-Variante 4070A (aMLV) hingegen besitzt einen breiteren spezieübergreifenden Tropismus. Es infiziert murine und humane Zellen, die den Phosphat-Transporter Ram-1 exprimieren (Miller *et al.*, 1994; van Zeijl *et al.*, 1994). Die Änderung des Tropismus einiger Retroviren, insbesondere von MLV, für deren Einsatz in der Gentherapie ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

1.2.2 Retrovirale Vektoren

Verschiedene Vertreter der *Retroviridae* sind in den letzten Jahren als Gentransfersysteme zum Einschleusen therapeutischer Gene in erkrankte Zellen beschrieben worden. Diese Gentransfersysteme werden auch als retrovirale Vektoren bezeichnet. Die ersten Vertreter wurden auf Basis des MLV konstruiert. Die Vektoren werden in replikationsinkompetente und replikationskompetente Vektoren, die RCRs (*replication competent retroviruses*), eingeteilt.

Replikationsinkompetente Vektoren sind infektiöse vermehrungsunfähige Viruspartikel, die ausschließlich einen retroviralen Expressionsvektor in Säugerzellen übertragen. Der Expressionsvektor enthält neben dem therapeutischen Gen das Verpackungssignal (Ψ) und die flankierenden LTRs. Zum Herstellen dieser Vektoren werden „Verpackungszellen“ benötigt, die neben dem verpackbaren Expressionsvektor alle viralen Proteine (Gag, Pol und Env) zur Verfügung stellen (Markowitz *et al.*, 1988a; b). Üblicherweise werden diese Vektoren in der *ex vivo*-Gentherapie monogenetischer Erbkrankheiten eingesetzt. Für eine *in vivo*-Gentherapie, zum Beispiel gegen Tumorzellen, haben sie sich bisher als ineffizient

herausgestellt, da der Gentransfer auf den Bereich der Injektionsstelle beschränkt blieb (Puumalainen *et al.*, 1998; Harsh *et al.*, 2000).

Die RCRs sind weitgehend intakte Retroviren, die ein zusätzliches therapeutisches Gen in ihrem Genom tragen, welches z.B. über eine IRES (*internal ribosomal entry site*) als erweiterter Leserahmen eines viralen Gens eingebaut wird (Logg *et al.*, 2001a). Das Gen kann durch Replikation der RCRs in weitere Zellen übertragen werden. Dadurch sind sie prinzipiell für eine *in vivo*-Gentherapie gegen Tumorzellen besser geeignet, weil beispielsweise eine Ausbreitung von der Injektionsstelle aus erfolgen kann. Ihre Anwendung ist allerdings mit erheblich mehr Risiko im Vergleich zu replikationsinkompetenten Vektoren verbunden, da diese Ausbreitung unkontrolliert erfolgt. Derzeit werden RCRs, die auf MLV basieren, in Maus-Tumor-Modellen getestet, um detaillierte Erkenntnisse über Effizienz und Pathogenität zu erhalten (Logg *et al.*, 2001b; Solly *et al.*, 2003). RCRs hätten bereits dann ein höheres Sicherheitsprofil, wenn es gelänge, sie mit einer strengen Zielzellspezifität auszustatten.

1.3 Modifikation des retroviralen Tropismus

1.3.1 „*Targeting*“ von Retroviren

Für die Krebstherapie sind spezielle retrovirale Vektoren erforderlich, die das therapeutische Gen gezielt in Tumorzellen oder angiogenetische Zellen einschleusen. Das erfordert die Entwicklung Zielzell-spezifischer Vektoren, damit der Transfer z.B. tödlicher Gene wie die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus auf diesen Zelltyp begrenzt bleibt.

Für das sogenannte „*Targeting*“ von Retroviren sind in den letzten Jahren verschiedene Möglichkeiten erprobt worden, den Tropismus von Retroviren zu verändern (Buchholz *et al.*, 1999; Sandrin *et al.*, 2003). Dies hat sich allerdings als eine sehr komplexe Aufgabe herausgestellt, und eines der wenigen erfolgreichen Beispiele gelang durch den Austausch viraler Hüllproteine (Pseudotypisierung). Hier wurden lentivirale Hüllproteine in MLV-Partikel inkorporiert, wodurch ein selektiver Gentransfer in CD4-positive Zellen erreicht wurde (Schnierle *et al.*, 1997; Stitz *et al.*, 2000). Generell ist die Pseudotypisierung stark durch den Mangel viraler Hüll-

proteine mit sehr eingeschränktem Zelltyp-spezifischen Tropismus limitiert. Aus diesem Grund wurden schon früh Wege beschritten, den Tropismus einiger Retroviren, insbesondere von eco- und amphotropem MLV, durch Modifikation der Hüllproteine (*envelope engineering*) zu verändern. So können virale Hüllproteine mit zusätzlichen Polypeptiden wie Chemokinen, Wachstumsfaktoren oder rekombinanten Antikörpern ausgestattet werden, um die Vektoren dadurch Zielzell-spezifisch zu adressieren. So wurden zum Beispiel Proteindomänen des Erythropoetins, des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) oder des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1) an den N-Terminus von SU fusioniert. Alle modifizierten Hüllproteine zeigten den Einbau in die Partikel und deren Anbindung an die entsprechenden Rezeptoren auf den Zielzellen. Jedoch blieb eine effiziente Infektion der Zellen aus (Kasahara *et al.*, 1994; Cosset *et al.*, 1995; Chadwick *et al.*, 1999). Ähnliches gilt auch für die Fusion von einkettigen Antikörperfragmenten, sogenannten scFv (*single chain fragment variable*). Auch hier erfolgte eine erfolgreiche Bindung des spezifischen Oberflächen-Antigens, jedoch ohne die Zelle zu infizieren (Russell *et al.*, 1993; Ager *et al.*, 1996; Marin *et al.*, 1996; Benedict *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999).

1.3.2 Protease-aktivierbare Retroviren

Aus diesen eher enttäuschenden Beobachtungen ließen sich allerdings neue Erkenntnisse für alternative Strategien ableiten. So wurde durch die Fusion von EGF mit SU des ecotropen bzw. amphotropen MLV beobachtet, dass die resultierenden EGF-präsentierenden Partikel Zellen mit einer niedrigen EGF-Rezeptordichte effizient infizierten. Zellen mit einer hohen EGF-Rezeptordichte wurden dagegen nicht infiziert. Diese Beobachtung ließ sich damit erklären, dass eine starke Bindung von EGF an dessen Rezeptor die nötige Interaktion von SU mit seinem natürlichen Rezeptor verhindert. In der Tat akkumulierten EGF-präsentierende Partikel an der Oberfläche von Zellen mit hoher EGF-Rezeptordichte (Cosset *et al.*, 1995).

Das EGF-Protein kann hier als „Blockierungsdomäne“ der Infektion betrachtet werden. Beruhend auf diesen Eigenschaften wurde das Konzept des „*Two Step Targeting*“ etabliert. Dieses Prinzip beinhaltet, die Blockierungsdomäne EGF

N-terminal über einen Substratlinker, der als spezifische Protease-Spaltstelle funktioniert, mit SU zu verbinden. Die so modifizierten Hüllproteine binden das Partikel zunächst an den EGF-Rezeptor auf der Zielzelloberfläche. Die anschließende Zugabe der Protease, gezeigt für Faktor Xa, führt zur Abspaltung von EGF. Dadurch wird die natürliche Interaktion zwischen SU und dem viralen zellulären Rezeptor wiederhergestellt und die Zelle infiziert (Abb. 2) (Nilson *et al.*, 1996). Auf diese Weise konnte zum ersten Mal die Möglichkeit eines zielgerichteten Gentransfers durch Protease-aktivierbare Retroviren beschrieben werden.

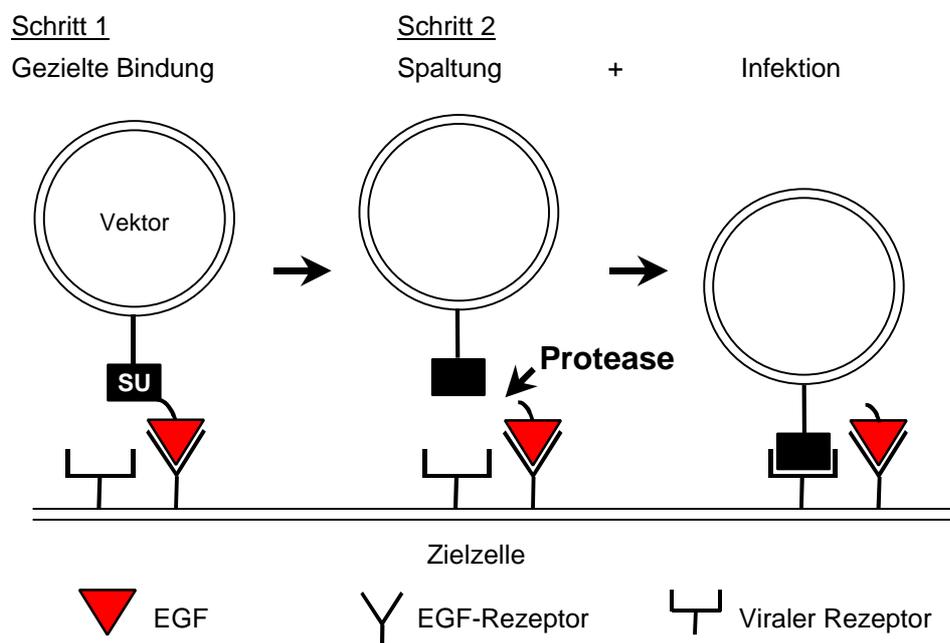


Abb. 2: Schematische Darstellung des „Two Step Targeting“ retroviraler Vektoren (nach Nilson *et al.*, 1996).

Schritt 1: Anbindung des retroviralen Vektors über EGF an den EGF-Rezeptor, wodurch die Infektion verhindert wird. Schritt 2: Proteolytische Abspaltung von EGF durch eine Protease und die anschließende Infektion der Zielzelle durch natürliche Interaktion von SU mit dem viralen Rezeptor.

Da die Adressierung der Protease durch den Substratlinker erfolgt, kann dieser prinzipiell gegen jedes beliebige Protease-Substrat ausgetauscht werden. In weiterführenden Arbeiten wurden entsprechend Plasmin- und MMP-aktivierbare Vektoren für das „Targeting“ von Tumorzellen hergestellt (Peng *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998). Für die MMP-aktivierbaren Vektoren wurde das MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A benutzt, das von verschiedenen MMPs (u.a. MT1-MMP und MMP-2)

gespalten wird (Woessner und Nagase, 2000). Diese Vektoren wurden auf den humanen Tumorzelllinien HT1080, einer Fibrosarkomzelllinie, und A431, einer epithelialen Karzinomzelllinie, auf ihre Selektivität getestet. Beide Zelllinien besitzen eine hohe EGF-Rezeptordichte, aber unterschiedliche MMP-Aktivität. Entsprechend wurden HT1080-Zellen, die MT1-MMP und MMP-2 stark exprimieren, von den MMP-aktivierbaren Vektoren transduziert, während A431-Zellen, die die zuvor genannten MMPs nur schwach exprimieren, geschützt blieben (Peng *et al.*, 1997). Zur erfolgreichen Weiterentwicklung Protease-aktivierbarer Retroviren, wie auch für MMP-aktivierbare Therapeutika (s. 1.1.1.2), bedarf es der Kenntnis der Protease-Spektren individueller Tumore und der Charakterisierung ihrer bevorzugten Substrate *in vivo*. Für einen effizienten Gentransfer ist darüber hinaus das optimale Substrat für eine gegebene Tumorzelle zu identifizieren. Dazu sind retrovirale Protease-Substrat-Bibliotheken entwickelt worden, mit denen nach dem Prinzip der „molekularen Evolution“ tumorspezifische Protease-Substrate gefunden werden sollen (Buchholz *et al.*, 1998).

1.4 Molekulare Evolution zur Charakterisierung von Protease-Substraten

1.4.1 Molekulare Evolution

Mit der molekularen Evolution wird im Allgemeinen nach Molekülen gesucht, die ihren natürlichen Vertretern z.B. in Stabilität, Bindungsaffinität oder spezifischen Funktionen wie Ligandenbindung sowie katalytischer Funktion überlegen sind. Hierfür werden leistungsfähige Methoden entwickelt und angewendet, die auf Grundprinzipien der Evolution, nämlich der Bereitstellung einer replizierenden Diversität mit gekoppeltem Geno- und Phänotyp und der Ausübung eines Selektionsdruckes, basieren. Die Umsetzungen dieser Prinzipien sind im Einzelnen vielschichtig und können auf unterschiedliche Weise kombiniert werden. So sind neben selbst replizierenden viralen, bakteriellen und eukaryotischen Systemen auch solche in der Anwendung, die eine „technische“ Replikation über PCR oder *in vitro* Translation erfordern. Die Diversität wird unter anderem durch *de novo*-Synthese, Subklonierung, *Shuffling* (Stemmer, 1994) oder Randomisierung (Virnekäs *et al.*,

1994) von Nukleinsäuren generiert. Ein Selektionsdruck wird erzeugt, indem z.B. Ligandenbindung, Degradation oder katalytische Aktivität mit einem Vorteil für den jeweiligen Phänotyp verbunden ist (Griffiths und Tawfik, 2000; Amstutz *et al.*, 2001).

1.4.2 Phagen-„Display“-Bibliotheken

Sehr bedeutende Werkzeuge, die auf molekularer Evolution basieren, sind beispielsweise Phagen-„Display“-Bibliotheken. Das sind Bibliotheken, die diversifizierte Polypeptide oder Proteine auf der Oberfläche replikationsfähiger Phagen präsentieren. Mit deren Hilfe gelang es z.B. kurze Peptidliganden oder rekombinante Antikörper zu selektionieren, Antikörper-Epitope zu kartieren und Substrate von Proteasen zu identifizieren (Beispiele in Marks *et al.*, 1991; Matthews und Wells, 1993; Griffiths *et al.*, 1993; Winter *et al.*, 1994; O'Neil und Hoess, 1995). So konnte zum Beispiel die Substratspezifität vieler gereinigter Proteasen, u.a. Furin, Faktor Xa, MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9, *in vitro* charakterisiert werden (Matthews und Wells, 1993; Matthews *et al.*, 1994; Kridel *et al.*, 2001; Ohkubo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

Um prinzipiell mit dem Phagen-System nach den Substraten von Proteasen zu suchen, wird eine Bindungsdomäne über eine zufällige Peptidsequenz an das pIII-Protein filamentöser Bakteriophagen fusioniert. Alle resultierenden Phagen unterscheiden sich nur hinsichtlich der zufälligen Peptidsequenz. Sie bilden die Phagen-Bibliothek. Für die Selektion werden die Phagen über die Bindungsdomäne immobilisiert. Die gebundenen Phagen werden anschließend mit der entsprechenden Protease inkubiert. Die Phagen, die durch die Spaltung der Peptidsequenz wieder mobilisiert wurden, werden eluiert und in *E.coli* vermehrt. Die mehrfache Wiederholung dieser Selektionsprozedur führt schließlich zur Anreicherung Substrat-spezifischer Phagen, deren Peptidsequenzen das Substratspektrum der Protease *in vitro* darstellen. Allerdings können mit diesem System nicht die Substrate unter *in vivo*-Bedingungen charakterisiert werden. Daher wäre eine Selektion in einem eukaryotischen System vorteilhafter, weil hier die Proteasen, insbesondere tumorassoziierte Proteasen, in Wechselwirkung mit ihren Aktivatoren und Inhibitoren stehen (s. 1.1.1).

1.4.3 Retrovirale „Display“-Bibliotheken

Als erstmalig fremde Proteindomänen mit dem Hüllprotein des ecotropen MLV fusioniert werden konnten (Russell *et al.*, 1993), wurden auch Retroviren für die Präsentation diversifizierter Peptide bzw. Proteine auf ihrer Oberfläche vorgeschlagen. Hiermit stünde ein eukaryotisches Selektionssystem in Analogie zum Phagen-System zur Verfügung. Diese Idee der retroviralen „Display“-Bibliotheken konnten erstmalig Buchholz *et al.* (1998) für die Selektion von Protease-Substraten verwirklichen. Diese sogenannte retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek basierte auf dem Ansatz Protease-aktivierbarer Retroviren (s. 1.3.2). In dieser Bibliothek wurden auf genomischer Ebene komplett diversifizierte Heptapeptide als Substratlinker zwischen die Blockierungsdomäne EGF und dem Oberflächenglykoprotein SU von ecotropem MLV eingefügt. Die Selektion der retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek konnte hier anders als im Phagen-System direkt in lebenden eukaryotischen Zellen erfolgen. Das angenommene Selektionsprinzip bestand darin, dass eine oder mehrere zelluläre Proteasen ihre bevorzugten Substratlinker in der Virusbibliothek spalten. Dadurch verlieren die entsprechenden Virusvarianten ihre Blockierung, infizieren die Zellen und können sich vermehren. Auf diese Weise werden diese Virusvarianten nach einigen Zellpassagen, verbunden mit dem Mischen nicht infizierter Zellen, aus der ursprünglichen Virus-Bibliothek herauswachsen, und ihre Substratlinker stellen die potentiellen Substrate dieser zellulären Proteasen dar (Abb. 3).

In der Tat wurde nach der Selektion der oben genannten Virus-Bibliothek auf HT1080-abgeleiteten Zellen, die den ecotropen murinen viralen Rezeptor Rec-1 exprimierten, eine Akkumulation Arginin-reicher Sequenzen (-R-X-X-R-) in den Substratlinkern festgestellt. Diese Sequenzen werden vor allem von Furin und Furin-ähnlichen Proteasen gespalten. Hiermit konnte zum ersten Mal eine retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek erfolgreich erzeugt und selektioniert werden (Buchholz *et al.*, 1998).

Furin und Furin-ähnliche Proteasen gehören zur Familie der Proprotein-Konvertasen. Sie sind ubiquitär exprimiert und prozessieren im Endoplasmatischen Retikulum sowie im Golgi-Apparat viele Vorläuferproteine, u.a. Hormone, Wachst-

tumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und auch virale Hüllproteine (Nakayama, 1997; Seidah und Chretien, 1997; Moulard *et al.*, 1999). Die Selektion ließ sich also damit erklären, dass die selektionierten Viren ihre Blockierungsdomäne intrazellulär durch Furin-Spaltung des Substratlinkers verloren und sich folglich schneller innerhalb der Zellpopulation ausbreiten konnten.

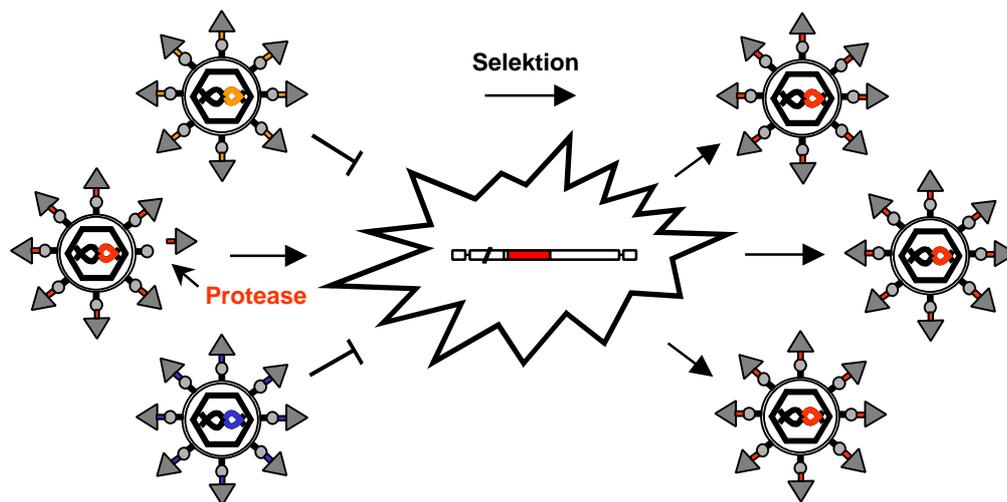


Abb. 3: Schematische Darstellung der Selektion retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken auf Tumorzellen.

Die Bibliothek besteht aus replizierenden Viren, die auf ihrer Oberfläche einen individuellen diversifizierten Substratlinker (farbig) zwischen der Blockierungsdomäne (Dreiecke) und dem Oberflächen-glykoprotein SU (Kreise) präsentieren. Ein Virus, dessen Substratlinker von einer zellulären Protease gespalten wird, infiziert die Zelle und breitet sich aus (rot).

Die beschriebene Bibliothek weist allerdings zwei Einschränkungen auf. Einerseits würde eine Selektion komplett diversifizierter Substratlinker ohne Ausschluss von Arginin sehr wahrscheinlich zu Substraten von Proprotein-Konvertasen führen. Andererseits könnten ecotrope MLV-Bibliotheken nicht auf humanen Zellen, insbesondere Tumorzellen, zur Identifizierung Tumor-spezifischer Protease-Substrate eingesetzt werden. Deshalb wurde in einer weiterführenden Arbeit eine Protease-Substrat-Bibliothek hergestellt, die auf amphotropem MLV basierte und einen an sechs Positionen diversifizierten Substratlinker unter Ausschluss von Arginin und Lysin trug. Eine Selektion dieser Virus-Bibliothek auf HT1080-Zellen blieb jedoch erfolglos. Vielmehr wurden hier Viren selektioniert, die durch Deletion der Blockierungsdomäne EGF zum Wildtyp revertierten. Es wurde vermutet, dass

die hohe Diversität von ca. 10^6 und der gleichzeitige Ausschluss von Arginin und Lysin einen hohen Selektionsdruck auf die Viruspopulation ausübte, der die Reversion zum Wildtyp begünstigte (Wittmann, 2000).

1.5 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollte erstmalig gezeigt werden, dass die Substrate von tumorassoziierten Proteasen (TAPs) mit retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken in lebenden Zellen selektioniert werden können. Das System sollte hierfür in Anlehnung an vorangegangene Studien so optimiert werden, dass eine Selektion von MMP-Substraten erreicht wird.

Zunächst war eine entsprechende retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek, basierend auf amphotropen murinen Leukämie Viren, zu entwerfen und herzustellen. Hierbei sollte, abgeleitet von dem MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A, ein an drei Positionen diversifizierter Substratlinker zwischen die Blockierungsdomäne EGF und das Oberflächenglykoprotein SU eingefügt werden. Eine Spaltung des diversifizierten Substratlinkers durch Proprotein-Konvertasen war zu vermeiden, indem die Kodons für Arginin ausgeschlossen werden sollten. Die Selektion der Bibliothek sollte auf der Tumorzelllinie HT1080 durchgeführt werden, wozu das erforderliche Selektionsprotokoll etabliert werden musste. Im Anschluss an die Selektion galt es, die Substratlinker auf eine Anreicherung spezifischer Aminosäuren zu analysieren.

Um die optimalen Aminosäuren für alle sechs Positionen des Substrates zu identifizieren, sollte nach obigem Vorbild eine zweite reverse Bibliothek hergestellt und selektioniert werden. Hierbei sollten die zuvor konstanten Aminosäurepositionen diversifiziert werden, während die zuvor variierten Positionen auf Grundlage der ersten Selektion zu fixieren waren.

Selektionierte Virusvarianten und die dazugehörigen Protease-Substrate sollten schließlich auf ihre biologischen und biochemischen Eigenschaften untersucht werden. Dazu gehörte die Infektiosität und die Eintrittskinetik der Viren wie auch die Analyse der Substratlinker auf ihre MMP-Spezifität. Aus beiden Selektionsprozessen sollte das Potential retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken für die Verbesserung von bestehenden Gentransfersystemen herausgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Roth, Fluka und Serva bezogen. Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur und Molekularbiologie wurden von den Firmen Greiner und Eppendorf bezogen.

2.1.2 Enzyme, rekombinante Proteine und Inhibitoren

Enzyme

Restriktionsendonukleasen
 Alkalische Phosphatase CIP
 T4-DNA-Ligase
 Reverse Transkriptase Superscript II™ RNase H⁻
 Taq-Polymerase AmpliTaq®
 DNase I RQ1

Bezugsquelle

New England Biolabs
 New England Biolabs
 New England Biolabs
 Invitrogen
 Applied Biosystems
 Promega

Rekombinante Proteine

Matrix Metalloprotease 1 (Proenzym)
 Matrix Metalloprotease 2 (aktiviertes Enzym)
 Matrix Metalloprotease 3 (katalytische Domäne)
 Matrix Metalloprotease 8 (Proenzym)
 Matrix Metalloprotease 9 (aktiviertes Enzym)
 Matrix Metalloprotease 14 (katalytische Domäne)

Calbiochem
 Calbiochem
 Calbiochem
 Calbiochem
 Calbiochem
 H. Tschesche (Universität Bielefeld)

Inhibitoren

Ribonuklease-Inhibitor RNasin®
 MMP-Inhibitor GM6001
 GM6001 Negativkontrolle
 AZT (3'-Azido-3'-Desoxythymidin)
 Protease-Inhibitoren-Cocktail Complete™

Promega
 Chemicon
 Chemicon
 Sigma
 Roche

2.1.3 Antiseren und Antikörper

Name	Anwendung	Bezugsquelle
Ziegenserum Anti-RLV-p30	1:50000 (WB) 1:1000 (IPA)	Quality Biotech
Ziegenserum Anti-RLV-gp70	1:5000 (WB)	Quality Biotech
Kaninchen-Immunglobulin Anti-Ziege- Meerrettich (HRP)-Peroxidase konjugiert	1:10000 (WB) 1:1000 (IPA)	Dako
Maus-Immunglobulin Anti-humanes EGF monoklonal	1:100 (FACS)	Sigma
Ziegen-Immunglobulin Anti-Maus-R- Phycoerythrin konjugiert	1:100 (FACS)	Sigma

2.1.4 Plasmide

Name	Bezugsquelle
pE-A	C.J. Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pE-Mo	C.J. Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pE-MMP-A	D. Wittmann (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pFBEASALF	F.-L. Cosset (INSERM U412, Lyon, Frankreich)
pC-A	C.J. Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pC-MMP-A	C.J. Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pC-26-A	Irene Hartl (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pM91MS	M. Schweizer (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pUC18	Invitrogen
pCR-3.1 Topo [®]	Invitrogen
pEGFP-N1	Clontech
pMFGnlsLacZ	F.-L. Cosset (INSERM U412, Lyon, Frankreich)

2.1.5 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech und Sigma-ARK synthetisiert.

Name	5'-3' Sequenz
CB6(+)	CCCCTAATCCCCTTAATTCTTC
EASeq1(-)	TATAATTTTGGGAAGGCATCTTG
YM5(-)	CGAAGCTGCGGCCGCTDENVNMCAGTCCTDNCGGGCTGC-TAGCCAGTTCCCACCACTTCAGGTC
YM6(-)	CGAAGCTGCGGCCGCTGGTARDNVNMCTGNDNGCTGC TAGCCAGTTCCCACCACTTCAGGTC
YM7(-)	CGAAGCTGCGGCCGCGGCGTARDNVNMCTGNDNGCTGC TAGCCAGTTCCCACCACTTCAGGTC

2.1.6 Zelllinien

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
HEK-293T	HEK-293 abgeleitete, mit SV40- <i>large T</i> -Antigen stabil transformierte, humane embryonale Nierenepithelzelllinie (ursprünglich zitiert als 293tsA1609neo)	DuBridge <i>et al.</i> , 1987
HT1080	Humane Fibrosarkomzelllinie	ATCC CLL-121
A431	Humane epidermoide Karzinomzelllinie	ATCC CRL-1555

2.1.7 Bakterienstämme

Alle nachfolgend beschriebenen Bakterienstämme gehören zur Gattung *Escherichia coli*.

Name	Genotyp	Bezugsquelle
Top10	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
Top10F'	F'[<i>lac</i> ^f , Tn10(Tet ^R)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i></i>	Invitrogen

2.1.8 Geräte

Name	Bezugsquelle
Bakterieninkubatoren Innova 4000 und 4230	New Brunswick Scientific
Blotting-Apparatur Fastblot B33 / B34	Biometra
Durchflußzytometer Dako Galaxy	Dako
Elektroporationsgerät E.coli Pulser	Bio-Rad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Gelelektrophoresekammern (horizontal und vertikal)	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschränke:	
Herafreeze (-80°C)	Heraeus
Liebherr Premium (-20°C und 4°C)	Liebherr
Magnetrührer Variomag	Monotherm
Mikroskope:	Zeiss
Axiovert 25 (Durchlicht)	
Axiovert 200 (Fluoreszenz)	
Mikrowellengerät	Bosch
Multifunktions-Reader Multiskan RC	Thermolabsystems
Netzgeräte:	
Savant PS250	Savant
Powerpac 200 und 300	Bio-Rad
pH-Meter pHlevel1	Inolab
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
Photodokumentation	Intas
Spektralphotometer GeneQuantPro	Amersham Bioscience
Sterilarbeitsbank Sterilgard Advance	The Baker Company
Stickstofftank Chronos	Messer
Taumler Biometra WT12	Biometra
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Wasserbad Typ 1800	GFL
Zellinkubator Cytoperm BDD6220	Heraeus
Zentrifugen:	
Biofuge fresco	Heraeus
Multifuge 3	Kendro
Sorvall R26Plus	Sorvall
Ultrazentrifuge Optima L-70K	Beckmann

2.2 Methoden der Molekularbiologie

2.2.1 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation

Für Klonierungen wurden die Restriktionen doppelsträngiger DNA mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Religation einfach geschnittener Vektor-DNA zu verringern, wurde die DNA mit 10 U alkalischer Phosphatase CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) für eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert und anschließend aufgereinigt (s. 2.2.4). Die Ligation von Restriktionsfragmenten mit geschnittener Vektor-DNA erfolgte im molaren Verhältnis von 3:1 durch 100 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 16°C über Nacht.

2.2.2 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde mit Ultraviolettabsorptionsspektroskopie gemessen. Dazu wurde die Absorption in H₂O verdünnter DNA-Lösungen bei 260 nm (A_{260}) im Spektralphotometer gegen das Lösungsmittel gemessen und die DNA-Konzentration berechnet:

DNA-Konzentration (µg/ml) = $A_{260} \times 50 \times V$ (V = Verdünnungsfaktor, 50 = spezifischer Koeffizient)

Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Über die Absorption konnte auch die Reinheit der DNA-Lösung überprüft werden. In einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,8 und 1,9. Niedrigere Werte weisen auf die Anwesenheit von Proteinen hin, und höhere Werte können ein Hinweis auf vorhandene RNA oder denaturierte DNA sein.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 0,2 und 20 kb Größe erfolgte für analytische und präparative Zwecke elektrophoretisch in 0,8 bis 2 %igen Agarosegelen in horizontalen Gelelektrophoresekammern (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 bis 2 % (w/v) Agarose (PeqLab) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8,3) durch Aufkochen im Mikrowellengerät gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 50 ng/ml) und in einem Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde für die Elektrophorese in der Kammer mit TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben beladen, die mit $\frac{1}{6}$ Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerin) versetzt wurden. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Feldstärke von 5 - 10 V/cm. Als DNA-Größenstandard wurde je nach Bedarf eine 1 kb-, 100 bp-, oder 2-log-DNA-Leiter (New England Biolabs) verwendet. Die aufgetrennte DNA wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Für eine Klonierung wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 2.2.4.1).

2.2.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, wie PCR-Produkte oder geschnittene Plasmid-DNA, wurden für Klonierungen aus dem Agarosegel aufgereinigt. Dazu wurde die ausgeschnittene Gelmatrix mit den darin enthaltenen DNA-Fragmenten mittels „Jetsorp Gel Extraction Kit“ (Genomed) nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Das Prinzip dieser Aufreinigung basiert auf der Bindung der DNA-Fragmente an eine Silica-Suspension („Glasmilch“) in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Die DNA-Fragmente können, nach dem Waschen mit einer Salz-Ethanol-Lösung, von dem Silica-Material mit H₂O eluiert werden.

2.2.4.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels *PCR-Purification Kit*

DNA-Fragmente in Restriktions- und PCR-Ansätzen wurden mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Prinzip dieser Aufreinigungsmethode ist, die DNA-Fragmente an eine Silica-Gel-Membran zu binden, zu waschen und in H₂O zu eluieren (wie 2.2.4.1).

2.2.4.3 Phenolextraktion

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen Nukleinsäurelösungen (DNA- oder RNA-Lösungen) durch Phenolextraktion entfernt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Nukleinsäurelösung wurde auf 200 µl mit H₂O aufgefüllt, um Verluste an der Phasengrenze gering zu halten. Die Nukleinsäurelösung wurde mit 200 µl TE-gesättigtem Phenol gut gemischt und mit 13000 rpm (Biofuge, Heraeus) 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase mit 200 µl Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die Nukleinsäuren durch Ethanol-fällung aufkonzentriert (s. 2.2.4.4).

2.2.4.4 Ethanol-fällung von Nukleinsäuren

Die Aufkonzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren erfolgte durch Fällung in Gegenwart von Salz und Alkohol (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA wurde durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und des 2 $\frac{1}{2}$ fachen Volumen Ethanol absolut (-20°C) für eine Stunde bei -80°C gefällt. Für die Fällung von RNA wurde statt Natriumacetat 8 M Lithiumchlorid verwendet. Die gefällten Nukleinsäuren wurde mit 13000 rpm (Biofuge, Heraeus) bei 4°C 30 min pelletiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei RTemp getrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen.

2.2.5 Arbeiten mit Bakterien

2.2.5.1 Kultivierung von Bakterien

Das Wachstum der Bakterien erfolgte entweder als Suspension mit 200 rpm in LB-Medium (Lauri Bertani: 10 g/l Peptone 140, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,0 mit NaOH eingestellt und autoklaviert [Paul-Ehrlich-Institut]) oder als Kolonien nach dem Ausstreichen auf LB-Agarplatten (2 % [w/v] Agar in LB-Medium, autoklaviert) bei 37°C oder 30°C im Bakterieninkubator. Für die Selektion transformierter Bakterien waren Antibiotika (50 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin [Boehringer Mannheim]) entsprechend der verwendeten Plasmid-DNA im LB-Medium bzw. in LB-Agarplatten vorhanden. Für eine Blau/Weiß-Selektion enthielten die LB-Agarplatten zusätzlich 50 µg/ml X-Gal und 10 µg/ml IPTG. Die dauerhafte Lagerung von Bakterien erfolgte bei -80°C. Dazu wurde ein geeignetes Aliquot einer Bakteriensuspension mit 25 % (v/v) Glycerin versetzt.

2.2.5.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien des *E.coli*-Stammes Top10F' wurden für die chemische Transformation und Elektroporation mit Plasmid-DNA kompetent gemacht (Hanahan und Meselson, 1983; Hanahan *et al.*, 1991). Für die chemische Transformation wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer 5 ml üN-Bakterienkultur angeimpft und mit 200 rpm bei 37°C im Bakterieninkubator bis zu einer Wachstumsdichte (OD₆₀₀) von 0,5 kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 5 min auf Eis gekühlt und mit 4000 x g bei 4°C 15 min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml TFB1 Puffer (30 mM KAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin; pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation bei 4°C und 4000 x g wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin; pH 6,5 mit KOH eingestellt und sterilfiltriert) aufgenommen, zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

Für die Elektroporation wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer 50 ml üN-Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C mit 200 rpm im Bakterieninkubator bis zu

einer Wachstumsdichte (OD_{600}) von 0,8 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde für 5 min auf Eis gekühlt, mit $4000 \times g$ bei 4°C 15 min pelletiert und in 100 ml 1 mM HEPES (pH 7) resuspendiert. Die Suspension wurde auf 400 ml mit 1 mM HEPES aufgefüllt, erneut pelletiert und in 250 ml 1 mM HEPES resuspendiert. Die Suspension wurde wiederum pelletiert und in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin in 1 mM HEPES resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit $4000 \times g$ bei 4°C 10 min pelletiert, in 1 ml 15 %igem Glycerin resuspendiert und zu je 40 μl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 Transformation von Bakterien

Die Transformation von kompetenten Bakterien erfolgte für Klonierungen chemisch oder zur Herstellung der Bakterien-Bibliotheken durch Elektroporation (Hanahan und Meselson, 1983; Hanahan *et al.*, 1991).

Für die chemische Transformation wurde ein Aliquot (100 μl) chemisch kompetenter Bakterien (s. 2.2.5.2) ca. 10 min auf Eis aufgetaut, die zu transformierende Plasmid-DNA (1 ng pUC18 zur Kontrolle der Transformationseffizienz oder 10 μl eines Ligationsansatzes [s. 2.2.1]) dazugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Temperaturschock des Bakterien-DNA-Gemisches von 42°C für 60 sec und eine Abkühlung von 2 min auf Eis. Die Bakterien wurden mit 400 μl SOC-Medium (Invitrogen) versetzt und 60 min bei 37°C bzw. 30°C (bei Transformation viruskodierender Plasmid-DNA) mit 200 rpm im Bakterieninkubator inkubiert. Anschließend wurde entweder eine Verdünnungsreihe des Ansatzes zur Bestimmung der Transformationseffizienz (erwartet: ca. 10^6 - 10^7 Transformanten pro μg DNA) oder der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten, die mit dem geeigneten Antibiotikum supplementiert waren, ausplattiert und bis zum sichtbaren Kolonienwachstum meist $\bar{u}N$ bei 37°C bzw. 30°C inkubiert.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot (40 μl) elektrokompetenter Bakterien (s. 2.2.5.2) auf Eis aufgetaut, die zu transformierende Plasmid-DNA (10 pg pUC18 zur Kontrolle der Transformationseffizienz oder 1-2 μl eines aufgereinigten Ligationsansatzes [s. 2.2.1 und 2.2.4.3]) dazugegeben und direkt in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Schichtdicke: 0,1 cm) überführt. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde in einem Elektroporationsgerät einem elektrischen Puls von

1,7 kV, 25 μ F und 200 Ω ausgesetzt, mit 960 μ l SOC-Medium aufgefüllt und in einem Reaktionsgefäß für 60 min bei 37°C bzw. 30°C (bei Transformation viruskodierender Plasmid-DNA) mit 200 rpm im Bakterieninkubator inkubiert. Anschließend wurde entweder eine Verdünnungsreihe des Ansatzes zur Bestimmung der Transformationseffizienz (ca. 10^8 - 10^9 Transformanten pro μ g DNA) oder der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten, die mit dem geeigneten Antibiotikum supplementiert waren, ausplattiert und bis zum sichtbaren Kolonienwachstum bei 37°C bzw. 30°C inkubiert.

2.2.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Plasmidpräparations-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Aufreinigung wird die Plasmid-DNA in einem Bakterienlysat an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, anschließend gewaschen und in einem geeigneten Lösungsmittel, beispielsweise H₂O, eluiert.

Für eine Schnellpräparation (Mini-Präparation) von Plasmid-DNA zur Restriktionsanalyse wurden 3 ml Bakterienkultur einer 5 ml üN-Kultur mittels eines „QIAprep Spin Miniprep Kits“ nach Protokoll des Herstellers verarbeitet. Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) mit hohem Reinheitsgrad wurden 200 ml Bakterienkultur mittels eines „QIAGEN Plasmid Maxi Kits“ ebenfalls nach Protokoll des Herstellers verarbeitet.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifizierung von spezifischen DNA-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem komplexen Gemisch von DNA-Molekülen (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987). Die amplifizierte DNA-Fragmente konnten im Anschluss in weiteren molekularbiologischen Arbeitstechniken eingesetzt werden.

Die Synthese der DNA erfolgte durch den Einsatz der hitzestabilen Taq-Polymerase, einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*, deren optimale katalytische Aktivität bei

72°C liegt. Unter geeigneten Pufferbedingungen, der Bereitstellung von Desoxynukleotiden (dNTP) und zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (s. 2.1.5), sogenannten Primern, wurden die gewünschten DNA-Fragmente in zyklischen Wiederholungen amplifiziert. Eine PCR-Standardreaktion von 50 µl enthielt:

- 1x PCR-Puffer (10mM Tris/HCl [pH 8,8], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % Gelatine)
- 1 - 2 µM je Primer
- 0,2 mM je dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 2 - 3 U Taq-Polymerase
- 0,1 µg Plasmid-DNA

Die Reaktion wurde unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt, wobei die Hybridisierungstemperatur von der Schmelztemperatur ($T_m = 2^\circ\text{C} \times [A + T] + 4^\circ\text{C} \times [C + G]$) der eingesetzten Primer abhing. Die PCR erfolgte in 25 Zyklen im Thermocycler:

5 min	94°C	Denaturierung	
1 min	94°C	Denaturierung	25 Zyklen
45 sec	X °C	Hybridisierung	
1 min	72°C	Synthese (1 min / 1000 bp)	
10 min	72°C	Beenden der Synthese	

Für die Klonierung der retroviralen Bibliotheken E-X3-A und E-X3rev-A wurde die Zyklenzahl zur Herstellung der DNA-Fragmente auf 20 begrenzt, um die Anreicherung von Mutationen zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.3).

2.2.7 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zur Herstellung von DNA-Fragmenten aus RNA, hier aus viraler genomischer RNA, wurde die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei werden RNA-Moleküle in einzelsträngige komplementäre DNA-Moleküle (ss cDNA) mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers unter geeigneten Pufferbedingungen und der Bereitstellung von Desoxynukleotiden durch die Reverse Transkriptase

umgeschrieben. Die ss cDNA wird anschließend als Matrize in eine PCR eingesetzt (2.2.6), wobei erst doppelsträngige cDNA (ds cDNA) entsteht, die dann amplifiziert wird.

Für die RT-PCR von viraler genomischer RNA wurde diese zunächst aus Zellkulturüberständen isoliert (s. 2.5.3) und anschließend in ss cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 2 µl virale RNA, 1 µl 10 pmol/µl Primer EASeq1(-) und 7 µl H₂O gemischt, für 10 min bei 70°C inkubiert und 5 min auf Eis abgekühlt, um die RNA zu linearisieren und die Primer zu hybridisieren. Zu diesem Ansatz wurden 10 µl Reaktions-Mix gegeben, der die Reverse Transkriptase und einen Ribonuklease-Inhibitor enthielt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden zwischen 5 und 10 µl des gesamten Ansatzes in die PCR eingesetzt (s. 2.2.6).

Reaktions-Mix

- 4 µl Reaktionspuffer Superscript (5 x)
- 1 µl dNTP (20 mM)
- 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor RNasin® (40 U/µl)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1,5 µl H₂O
- 1 µl RT Superscript II™ (200 U/µl)

2.2.8 T/A-Klonierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte von viraler RNA wurden für die Sequenzierung mit dem „Topo TA Cloning® Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers kloniert. Dabei wurden die mit Taq-Polymerase generierten DNA-Fragmente über die endständig angehängten Adenosin-Reste mit endständigen Thymidin-Resten des linearisierten Vektors pCR-3.1 Topo® durch die an den Vektorenden gebundene Topoisomerase I ligiert (Shuman, 1994). Anschließend wurde die Ligation in die mitgelieferten Bakterien (Top10) chemisch transformiert und die Bakterien auf LB-amp-Agarplatten Blau/Weiß-selektioniert (s. 2.2.5.1).

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden für die Bestimmung der Diversitäten und für die Analyse der Substratlinker der nicht selektionierten und selektionierten retroviralen E-X3-A und E-X3rev-A-Bibliotheken von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. DNA-Sequenzierungen zur Überprüfung einzelner Klonierungen wurden im Paul-Ehrlich-Institut durch Herrn Dipl.-Ing. M. Selbert durchgeführt. Hierfür wurden die DNA-Proben mit der nachfolgenden Methode vorbereitet.

2.2.9.1 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktionen erfolgten mit dem „Dye-Desoxy-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit“ (Applied Biosystems). Hierbei werden unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zufällig während der DNA-Synthese eingebaut, die zum Abbruch der Synthese führen, da eine freie 3'-Hydroxygruppe zur Knüpfung der Phosphodiesterbindung fehlt. Die so entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge werden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Ablesen der Nukleotidsequenz werden die endständigen Fluoreszenzfarbstoffe mittels eines Argonlasers angeregt und ihre Emission gemessen.

Pro 8 µl Reaktionsansatz wurden 2 µl Premix, 0,5 µg DNA und 1 µl 10 µM Primer eingesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: 96°C, 15 sec; 50°C, 15 sec; 60°C, 4 min; 30 Zyklen. Anschließend wurden die DNA-Proben, zur Entfernung überschüssiger Dye-Terminatoren mit dem „DyeEX 2.0 Spin Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, getrocknet, in 2 µl Probenpuffer (0,5 µl Formamid, 0,5 µl Ladepuffer, 25 mM EDTA [pH 8]) aufgenommen, 2 min bei 90°C denaturiert und auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit einem automatischen DNA-Sequenziergerät.

2.3 Methoden der Proteinbiochemie

2.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Für den Nachweis viraler Proteine in transfizierten oder infizierten eukaryotischen Zellen wurden Zellextrakte in SDS-haltigem Lysispuffer hergestellt. Dazu wurden ca. 5×10^6 Zellen einer T75-Zellkulturflasche entnommen (s. 2.4.1), mit $400 \times g$ 5 min bei 4°C pelletiert und in 250 μl Lysispuffer resuspendiert (50 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl_2 , 1 % NP-40, 0,1 % SDS, 1x Protease-Inhibitoren-Cocktail). Die Zelltrümmer wurden mit 9000 rpm (Biofuge, Heraeus) bei 4°C 5 min zentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.3.4) bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine im Zellextrakt erfolgte mittels Absorptionsspektroskopie (s. 2.3.3).

2.3.2 Deglykosylierung von Proteinen durch PNGase F

Für die verbesserte Auftrennung viraler Glykoproteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.3.4) wurden die N-glykosidischen Oligosaccharid-Komplexe mit PNGase F, einer N-Glykosidase aus *Flavobacterium meningosepticum*, abgespalten. Dazu wurden die viralen Partikel, nachdem sie durch Ultrazentrifugation aus Zellkulturüberständen aufgereinigt wurden (s. 2.5.1), in 1x Denaturierungspuffer (0,5 % SDS, 1 % β -Mercaptoethanol) bei 95°C für 10 min denaturiert und je 1/10 Volumen G7 Puffer (0,5 M NaH_2PO_4 [pH 7,5]) und 10 % NP-40 dazugegeben. Die Deglykosylierung erfolgte nach Zugabe von 50 U PNGase F für eine Stunde bei 37°C .

2.3.3 Photometrische Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit Absorptionsspektroskopie gemessen (Bradford, 1976). Das Prinzip basiert auf Verschiebung des Absorpti-

onsmaximum von Coomassie-Brillantblau (G250) von 465 nm zu 595 nm in Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu. Für die Messung wurden 5 µl Zellextrakt mit 200 µl Reagenz („Bio-Rad Protein Assay“, Bio-Rad) und 800 µl H₂O versetzt und in eine Meßküvette überführt. Nach 15 min Äquilibrierung wurde die Absorption im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA-Lösung (0,2-1,4 µg/µl Probenvolumen) ermittelten Standardkurve bestimmt.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden die Proteine eines Proteingemisches nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dazu werden die Proteine zuvor in Anwesenheit von SDS und β-Mercaptoethanol bei 95°C denaturiert. β-Mercaptoethanol spaltet hierbei die Disulfidbrücken und SDS denaturiert die Proteine. Gleichzeitig unterbindet SDS Proteinwechselwirkungen und sorgt für ein konstantes Ladungs- zu Masse-Verhältnis der Proteine.

Es wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit 5 %igem Sammelgel und 10 %igem Trenngel mit Hilfe eines Gel-Systems nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) hergestellt.

Sammelgel 5 %		Trenngel 10 %	
1,65 ml	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	10 ml	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid
1,25 ml	1 M Tris-HCl pH 6,8	11,2 ml	1 M Tris-HCl pH 8,8
0,1 ml	10 % SDS	0,3 ml	10 % SDS
7 ml	H ₂ O	8,4 ml	H ₂ O
50 µl	20 % APS	100 µl	20 % APS
10 µl	TEMED	20 µl	TEMED

Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit einem Volumen 2-fachem Proteinprobenpuffer (100 mM Tris-HCl [pH 6,8], 200 mM DTT, 10 % SDS, 20 % Glycerin, 10 % β-Mercaptoethanol [frisch zugesetzt], 0,2 % Bromphenolblau) gemischt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel in einer mit Laufpuffer (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3) gefüllten

Elektrophoresekammer geladen und bei 100 V aufgetrennt. Die Bestimmung der relativen elektrophoretischen Mobilität erfolgte durch Vergleich mit einem Protein-Molekulargewichtsmarker (BenchmarkTM, Invitrogen). Anschließend wurden die Polyacrylamidgele mit den aufgetrennten Proteinen im Western Blot weiterverarbeitet (s. 2.3.5).

2.3.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein immunologisches Nachweisverfahren immobilisierter Proteine. Dazu werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. 2.3.4) im elektrischen Feld auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Mit Hilfe spezifischer Antisera und einem gegen den Fc-Teil dieser Antikörper gerichteten, enzymgekoppelten Sekundärantikörper können die Proteine nachgewiesen werden (Towbin *et al.*, 1979).

Der Transfer aufgetrennter Proteine erfolgte im „Semidry“-Verfahren. Dabei wurde das Gel auf die Membran (HybondECL, Amersham Pharmacia) und beide gemeinsam zwischen jeweils vierlagige Schichten Filterpapier (3M, Whatman) gelegt. Alle Komponenten wurden vorher in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,0375 % SDS) getaucht. In einer „Blotting“-Apparatur wurden die Proteine anschließend 1 ¼ h im elektrischen Feld bei 2 mA/cm² Gel-Fläche unter Kühlung auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran für den immunologischen Nachweis der Proteine in Blockpuffer (20 % Pferdeserum [Lifetechnologies] in TBST [10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20]) unter leichtem Schütteln 1 h bei RTemp inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Im Anschluss wurden spezifische Antisera entsprechend in TBST mit 5 % Pferdeserum verdünnt (s. 2.1.3) auf die Membran gegeben und 1 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 3maligem (je 10 min) Waschen mit TBST wurde ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper, 1:10000 verdünnt in TBST mit 5 % Pferdeserum, der Membran zugegeben und unter leichtem Schütteln 1 h bei RTemp inkubiert. Danach wurde die Membran viermal mit TBST gewaschen. Die Detektion der Antikörper-markierten Proteinbanden erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Detektionsverfahren (Pierce). Hierbei oxidiert die Peroxidase unter alkalischen Bedingungen

ein zyklisches Diacylhydrazid, wobei Licht (Chemilumineszenz) emittiert wird. Die Membran wurde 5 min in die Detektionslösung getaucht und anschließend für verschiedene Zeitintervalle mit Röntgenfilmen inkubiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer Entwicklermaschine (Agfa).

2.4 Methoden der Zellbiologie

2.4.1 Kultivierung von Zellen

Die adhärennten Zelllinien HEK-293T, HT1080 und A431 wurden in Medium (10 % fötalem Kälberserum [FKS, Lifetechnologies], 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, in DMEM) kultiviert. Das FKS wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen in einem Zellinkubator bei 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Bei Konfluenz wurden die Zellen 1:10 umgesetzt. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH₂PO₄, 1,4 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit 1 ml Trypsinlösung (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA, PBS) bei 37°C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM aufgenommen und ein Zehntel in eine neue T75-Zellkulturflasche überführt. Anschließend wurden die Zellen mit ausreichend Medium versorgt.

Wenn eine bestimmte Anzahl an Zellen für Transfektionen, Infektionen oder analytische Methoden erforderlich war, wurden die abgelösten Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend weiterverarbeitet.

Die dauerhafte Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei –196°C. Dazu wurde eine subkonfluente Zellpopulation einer T75-Zellkulturflasche abgelöst, in 10 ml DMEM resuspendiert und mit 400 x g 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml 10 % DMSO in FKS aufgenommen und in Cryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert. Die Zellen wurden in einer Gefrierbox (Qualilab) üN auf –80°C abgekühlt und anschließend in einen Stickstofftank überführt.

2.4.2 Transfektion von Säugerzellen durch Lipofektion

Die Transfektion von HEK-293T- und HT1080-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Lipofektion. Hierbei wird die Plasmid-DNA mit Liposomen komplexiert, die anschließend von den Zellen aufgenommen werden. Die Transfektion wurde mit Lipofectamine PlusTM (Invitrogen, Karlsruhe) in 6-Loch-Zellkulturplatten, T75- und T175-Zellkulturflaschen durchgeführt. Dazu wurden 4×10^5 (6-Loch), 3×10^6 (T75) oder 7×10^6 (T175) Zellen eingesät (s. 2.4.1) und im Zellinkubator üN inkubiert, so dass sie zur Transfektion ca. 50 % konfluent waren. Die entsprechenden eingesetzten Mengen DNA, Plus-Reagenz und Lipofectamine je Transfektionsansatz sind nachfolgend aufgeführt.

Gefäß	Gesamt-DNA (μg)	Plus Reagenz (μl)	Lipofectamine (μl)
6-Loch	3	10	5
T75	18	60	30
T175	36	120	60

Je Transfektionsansatz wurde die DNA in vorgewärmten DMEM mit Plus-Reagenz gemischt (Endvolumen: 100 μl , 600 μl oder 1200 μl) und 15 min bei RTemp inkubiert. Anschließend wurde Lipofectamine in DMEM (Endvolumen: 100 μl , 600 μl oder 1200 μl) dazugegeben und 15 min bei RTemp inkubiert. Zuletzt wurde der Reaktionsansatz mit DMEM aufgefüllt (Endvolumen: 1 ml, 5 ml oder 10 ml). Nach dem Waschen der Zellen mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4) wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und 4 h bei 37°C im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit ausreichend Medium (10 % fötalem Kälberserum [FKS, Lifetechnologies], 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, in DMEM) versorgt. Einen Tag nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.4.3 Nachweis modifizierter viraler Oberflächenproteine auf eukaryotischen Zellen durch analytische Durchflußzytometrie (FACS)

Im Allgemeinen können einzelne Zellen einer Zellsuspension mit Hilfe der analytischen Durchflußzytometrie (FACS) auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften in einem Durchflußzytometer untersucht werden. So kann zum Beispiel die Oberflächenexpression eines bestimmten Proteins mit Hilfe eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers im FACS charakterisiert werden.

Hier wurde das Verfahren benutzt, um hEGF-modifizierte virale Hüllproteine an der Oberfläche von Zellen nachzuweisen. Zum Nachweis der viralen Hüllproteine wurden 4×10^5 transfizierte Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden von der Zellkulturflasche oder Zellkulturplatte abgelöst, pelletiert (s. 2.4.1) und in 500 µl FACS-Puffer (2 % BSA, 0,01 % NaN_3 in PBS [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4]) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 3000 rpm (Biofuge, Heraeus) 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Antikörperlösung (Maus-Immunglobulin, Anti-humanes EGF, 1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert, 30 min bei 4°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach zweimaligen Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen in 200 µl einer zweiten Antikörperlösung (Ziegen-Immunglobulin, Anti-Maus-R-Phycoerythrin-konjugiert, 1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert, 30 min bei 4°C inkubiert und zentrifugiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen der Zellen wurden sie in 250 µl Fixierpuffer (1 % Paraformaldehyd in PBS) aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert.

2.5 Methoden der Virologie

2.5.1 Herstellung und Konzentrierung von Viruspartikeln

Zur Herstellung von Viruspartikeln wurden HEK-293T-Zellen und HT1080-Zellen mit viruskodierenden Plasmiden transfiziert (s. 2.4.2). Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die virusproduzierenden Zellen mit serumfreiem Medium

(2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, in DMEM) \bar{u} N im Zellinkubator inkubiert. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden filtriert (45 μ m-Filter, Nunc), aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentrierung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen erfolgte durch Ultrazentrifugation. Dazu wurden die Partikel direkt aus 9 – 11 ml Zellkulturüberstand mit 30000 rpm (SW 41 Rotor, Beckman) bei 4°C 1 $\frac{1}{2}$ h pelletiert und anschließend in einem beliebigen kleineren Volumen serumfreien DMEM oder PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4) resuspendiert. Für weitere Analysen wurden die Viruspartikel aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für Western Blot-Analysen (s. 2.3.5) wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände durch 1,5 ml 20 %iger Saccharose in TNE-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA) mit 25000 rpm (SW 41 Rotor, Beckman) bei 4°C 2 $\frac{1}{2}$ h zentrifugiert. Die pelletierten Viruspartikel wurden in 100 - 200 μ l PBS resuspendiert und zu je 20 μ l aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.5.2 Infektion von Zellen und Titration von Viren

Für die Infektion mit Retroviren wurden je Infektionsansatz 1×10^5 HT1080-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit einer bestimmten RT-Aktivität oder MOI (*multiplicity of infection*) in einem Endvolumen von 250 μ l DMEM-Lösung. Die MOI wurde zuvor durch Titration virushaltiger Zellkulturüberstände auf HT1080-Zellen ermittelt (s.u.). Der Infektionsansatz wurde nach 2 h Inkubation entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH_2PO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Medium kultiviert. Für den Nachweis infizierter Zellen mittels Immunperoxidase-Test wurden sie 30 h später mit Methanol fixiert (s. 2.5.5).

Die Bestimmung der Infektiosität von virushaltigen Zellkulturüberständen erfolgte auf einer suszeptiblen Zelllinie. Hierzu wurden die Zellen mit Verdünnungsstufen in 10er-Schritten des virushaltigen Zellkulturüberstands, wie zuvor beschrieben, infiziert. Der Titer wurde anschließend mittels Immunperoxidase-Test ermittelt (s. 2.5.5).

2.5.3 Isolierung viraler RNA

Die Isolierung retroviraler RNA aus Viruspartikeln in Zellkulturüberständen erfolgte mit dem „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Hierbei wird die virale RNA nach Lyse der viralen Partikel unter denaturierenden Bedingungen zur Inaktivierung von RNasen an einer Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und in einem RNase-freien Puffer eluiert. Das RNA-Eluat wurde anschließend mit DNase I (Promega) behandelt, um eine DNA-Kontamination nach Transfektion mit viruskodierender Plasmid-DNA zu entfernen (s. 2.5.1). Dazu wurden zu je 8 µl Eluat 1 µl 10x RQ1 Reaktionspuffer und 1 µl RQ1 RNase-freie DNase I gegeben und bei 37°C 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde zu je 10 µl durch Zugabe von 1 µl 20 mM EGTA (pH 8) inhibiert und die RNA durch Phenolextraktion (s. 2.2.4.3) aufgereinigt.

2.5.4 Reverse Transkriptase Aktivitäts-Test (RT-Test)

Mit dem RT-Test „C-type-RTTM Activity Assay“ (Cavidi Tech) wurden nach Angaben des Herstellers MLV-abgeleitete Retroviren qualitativ und quantitativ in Zellkulturüberständen nachgewiesen. Bei diesem Verfahren synthetisiert die Reverse Transkriptase (RT) entlang einer immobilisierten Matrize einen DNA-Strang, währenddessen Bromo-Desoxyuridin (BrdUTP) eingebaut wird. Nach der Synthese und dem Waschen wird ein spezifischer mit alkalische Phosphatase-konjugierter Antikörper dazugegeben, der an BrdUTP bindet. Das anschließend dazugegebene para-Nitrophenolphosphat wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Die Absorption des Produktes para-Nitrophenol wird als Maß der Enzymaktivität bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist proportional zur eingesetzten RT-Aktivität. Die Messung der Absorption einer unbekannt Probe und eines mitgeführten Standards (MoMLV-RT) erfolgte mit einem Multifunktions-Reader. Die RT-Aktivität der Probe konnte anhand der ermittelten Standardkurve von MoMLV-RT (0,083 - 624 mU/ml) bestimmt werden.

2.5.5 Immunperoxidase-Test (IPA)

Mit Hilfe des Immunperoxidase-Tests (IPA) wurden infizierte Zellen nachgewiesen. Bei diesem Verfahren werden in fixierten Zellen p30-Proteine von MLV immunologisch detektiert und anschließend durch eine Antikörper-gekoppelte enzymatische Umsetzung eines Chromogens gefärbt.

Dazu wurde eine adhärente Zellpopulation nach einmaligem Waschen in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH₂PO₄, 1,4 mM KH₂PO₄) mit eiskaltem Methanol für mindestens 30 min bei -20°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit Blockierungspuffer (2 % BSA in PBS) 30 min bei RTemp blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Danach wurden die Zellen mit einem p30-spezifischen Antiserum (s. 2.1.3), verdünnt in Blockierungspuffer, für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (s. 2.1.3), verdünnt in Blockierungspuffer, für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit filtrierter Substratlösung (45µm-Filter, Nunc) gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Substratlösung

- 5 % (v/v) 20 mM 3-Amino-9-ethylcarbazol gelöst in Dimethylformamid
- 5 % (v/v) 1 M Natriumacetat, pH 5
- 0,1 % (v/v) 30 %iges H₂O₂

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung und Selektion der retroviralen E-X3-A- und E-X3rev-A-Bibliothek

Die retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken basieren auf replikationskompetenten MLVs, deren Infektiosität durch die Fusion von EGF (E) N-terminal mit amphotropen SU (A) blockiert ist. Zwischen EGF und SU wurde ein diversifizierter Substratlinker (X) eingefügt, der als Protease-Substrat fungiert. Dementsprechend werden die Bibliotheken im allgemeinen mit E-X-A abgekürzt.

3.1.1 Entwurf der E-X3-A-Bibliothek

Für die Selektion von MMP-Substraten sollte eine entsprechende Bibliothek, die sogenannte E-X3-A-Bibliothek, entworfen und hergestellt werden. Als geeignetes Ausgangssubstrat für den diversifizierten Substratlinker in dieser Bibliothek diente die Aminosäuresequenz P-L-G-L-W-A. Dieses Hexapeptid ist ein MMP-Standardsubstrat, dessen effiziente Spaltung unter anderem durch MT1-MMP und MMP-2 gezeigt werden konnte (Stack und Gray, 1989; Peng *et al.*, 1997; Woessner und Nagase, 2000). Die Hydrolyse der Peptidbindung im MMP-Standardsubstrat durch MMPs erfolgt zwischen Glycin und Leucin (Stack und Gray, 1989).

Die Aminosäuresequenz des Substratlinkers sollte an den drei Positionen P2, P2' und P3' (gemäß der Nomenklatur von Enzymen nach NC-IUBMB) zu P-X-G-L-X-X diversifiziert werden. Hierbei sollte die Aminosäure Arginin ausgeschlossen werden, um eine Spaltung durch Proprotein-Konvertasen zu vermeiden. Die für viele MMP-Substrate charakteristischen Aminosäuren Prolin an P3, Glycin an P1 und Leucin an P1' (Konsensusmotiv) wurden zunächst konstant gehalten (Tab. 1). Mit dieser Wahl der Diversifizierung an diesen drei Positionen wurde zum einen das Furin-ähnliche Konsensusmotiv R-X-X-R vermieden und zudem die Bibliothek auf eine technisch leicht einsetzbare Größe eingeschränkt.

Die Diversifizierung der Aminosäuren im Substratlinker der E-X3-A-Bibliothek erfolgte auf genetischer Ebene durch die Verwendung degenerierter Oligonukleotide. Um die Kodons der Aminosäure Arginin auszuschließen, wurden nicht alle Aminosäuren in der E-X3-A-Bibliothek eingesetzt.

Weiterhin wurden die degenerierten Kodons so gewählt, dass auch das MMP-Standardsubstrat vertreten war, damit es selektioniert werden konnte. Die entsprechende Auswahl degenerierter Kodons ergab 3546 Kombinationen, die schließlich 1452 Kombinationen auf Protein-Ebene repräsentierten (Tab. 1).

Tab. 1: Entwurf des diversifizierten E-X3-A-Substratlinkers

Position	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
MMP-Standard	P	L	G	L	W	A
Diversifizierung	P	X	G	L	X	X
Kodon ¹	CCG	NHA	GGA	CTG	KNB	NHA
Anzahl je Position ²	1	12	1	1	24	12
Aminosäuren	P	A, E, I, K, L, P, S, T, Q, V, Stop	G	L	A, C, D, E, F, G, L, S, V, W, Y, Stop	A, E, I, K, L, P, S, T, Q, V, Stop
Anzahl je Position ³	1	11	1	1	12	11

¹ Einzelbuchstabenkodierung: N = A,T,G,C H = A,T,C B = T,G,C K = T,G

² Kombinationen auf Kodon-Ebene: $12 \times 24 \times 12 = 3456$

³ Kombinationen auf Protein-Ebene: $11 \times 12 \times 11 = 1452$

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung der E-X3-A-Bibliothek auf Plasmid-Ebene

Die retrovirale E-X3-A-Bibliothek basiert auf viruskodierenden Plasmiden, die nach ihrer Transfektion in geeignete Zellen zur Freisetzung von Viruspartikeln führen (Buchholz *et al.*, 1998). Als Ausgangsplasmid zur Herstellung der Plasmid-Bibliothek diente pE-A. Dieses Plasmid kodiert für das ecotrope MLV-Genom (MoMLV), dessen *env*-Leserahmen gegen die genetisch modifizierte amphotrope

Variante 4070A ausgetauscht wurde. Weiterhin wurde hier die Blockierungsdomäne humanes EGF N-terminal mit SU fusioniert (Buchholz *et al.*, 1998) (Abb. 4). Zunächst wurden unter Verwendung des universellen Primers CB6(+) und des degenerierten Primers YM5(-) die diversifizierte Substratlinker mittels PCR an die Blockierungsdomäne EGF fusioniert. Als Matrize diente das Plasmid pE-Mo (Buchholz *et al.*, 1998). Der Primer CB6(+) hybridisiert im Signalpeptid von *env* und generiert die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease SfiI. Der Primer YM5(-) hybridisiert im C-Terminus von *egf* und liefert neben den degenerierten Kodons flankierend die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen NheI und NotI (Abb. 4).

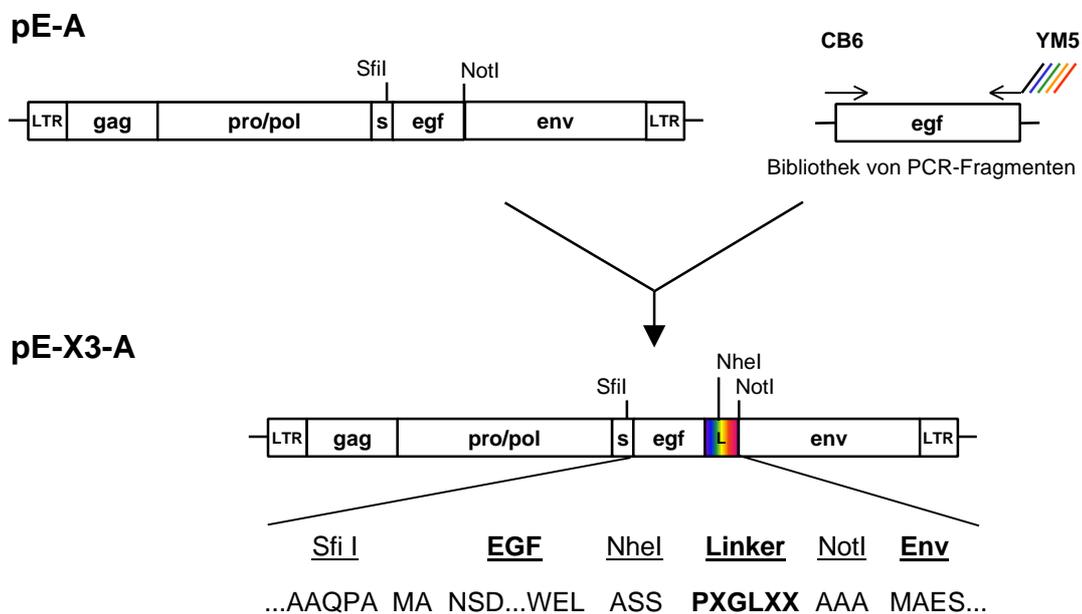


Abb. 4: Klonierungsschema der E-X3-A-Plasmidbibliothek

Zur Herstellung der E-X3-A-Bibliothek diente pE-A als Ausgangsplasmid. Es kodiert für das amphotrope MLV-Genom, welches die Blockierungsdomäne EGF (*egf*) zwischen dem Signalpeptid (*s*) und dem SU-Protein des Hüllproteins (*env*) trägt. Mittels PCR wurden unter Verwendung der Primer CB6(+) und YM5(-) die diversifizierte Substratlinker C-terminal an *egf* fusioniert und über die Schnittstellen SfiI und NotI in pE-A kloniert. Die resultierende Plasmid-Bibliothek pE-X3-A kodiert EGF-blockierte amphotrope Virusvarianten, die sich in ihrer Linkersequenz (L) zwischen EGF und Env unterscheiden. Die farbige Darstellung der Box für den Linker in pE-X3-A und des Primers YM5(-) verweist auf die Diversifizierung der entsprechenden Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenz. Die Aminosäuresequenz im Ausschnitt von pE-X3-A zeigt die wesentlichen Elemente im Bereich des eingefügten Substratlinkers.

Insgesamt wurden 10 PCR-Reaktionen zur Herstellung der DNA-Fragmente durchgeführt. Die aufgereinigten Fragmente wurden anschließend mit SfiI und NotI geschnitten und in das bereits durch SfiI und NotI geschnittene Plasmid pE-A ligiert. Daraus resultierte die Plasmid-Bibliothek, die im Folgenden als pE-X3-A bezeichnet wird.

Die Ligationsansätze wurden in elektrokompetente *E.coli* Bakterien (Top10F') transformiert. Um alle Transformanten zu erhalten, wurden die Bakterien in LB-amp-Medium kultiviert und daraus die Plasmid-Bibliothek anschließend isoliert. Die Quantifizierung der primären Transformanten erfolgte, indem ein Aliquot der Bakteriensuspension vor Kultivierung in einer Verdünnungsreihe auf LB-amp-Platten ausplattiert wurde. Die Auszählung der gewachsenen Kolonien ergab $1,7 \times 10^7$ primäre Transformanten (nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der Anzahl der rekombinanten Plasmide in der Bibliothek wurde die Plasmid-DNA von 23 Einzelklonen durch Restriktion mit NheI analysiert. Durch die über den Primer YM5(-) eingefügte dritte NheI-Schnittstelle wurden drei Restriktionsfragmente für ein rekombinantes Plasmid erwartet. Als Kontrollen wurde die Plasmid-DNA von pE-A (Negativkontrolle), pE-MMP-A (Wittmann, 2000) und der Plasmid-Bibliothek pE-X3-A (beides Positivkontrollen) mit NheI geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im DNA-Agarosegel analysiert (Abb. 5).

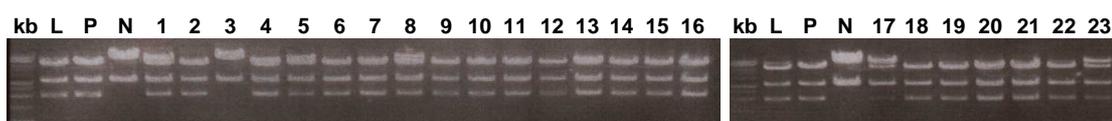


Abb. 5: Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmide der E-X3-A-Bibliothek

Analytisches 1%iges-DNA-Agarosegel der NheI-geschnittenen Plasmid-DNA von 23 Einzelklonen von pE-X3-A (1-23). Die NheI-geschnittenen Plasmide pE-A (N, Negativkontrolle), pE-MMP-A (P, Positivkontrolle) und pE-X3-A (L, Plasmidbibliothek) dienten als Kontrollen.

Von 23 verdauten Plasmiden waren 22 positiv (Abb. 5). Das entsprach ca. 95 % rekombinanter Plasmide in der E-X3-A-Plasmidbibliothek. Somit wurden die diversifizierte Substratlinker erfolgreich eingefügt. In ca. $1,6 \times 10^7$ rekombinanten Plasmiden waren damit die 3456 Kombinationen auf Kodon-Ebene (3.1.1) um ein

Vielfaches vertreten. Die Herstellung der Bibliothek war somit erfolgreich und konnte nun zur Selektion auf lebenden Tumorzellen eingesetzt werden.

3.1.3 Selektion der E-X3-A-Bibliothek auf der Tumorzelllinie HT1080

Die Selektion von MMP-Substraten mit Hilfe der retroviralen E-X3-A-Bibliothek sollte auf der Fibrosarkomzelllinie HT1080 durchgeführt werden. Für diese Tumorzelllinie konnte die selektive Transduktion und Infektion durch MMP-aktivierbare Viruspartikel gezeigt werden, die das MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A als Substratlinker trugen (Peng *et al.*, 1997; Wittmann, 2000). Demnach waren die HT1080-Zellen eine geeignete Modellzelllinie für die Selektion der Bibliothek.

Die Selektion der E-X3-A-Bibliothek erfolgte durch Transfektion und Passagieren der Tumorzellen. Nach Transfektion der Zellen mit p-E-X3-A werden zunächst alle Virusvarianten produziert. In den anschließenden Zellpassagen sollten sich nur die Virusvarianten auf HT1080-Zellen ausbreiten, die durch proteolytische Spaltung ihres Substratlinkers die Blockierungsdomäne EGF verlieren (Abb. 6, links).

Es wurden 5×10^5 HT1080-Zellen mit der Plasmid-Bibliothek pE-X3-A transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde durch eine separate Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-N1 (eGFP, *enhanced green fluorescence protein*) ermittelt (Abb. 6, rechts). Die mikroskopische Auszählung ergab 5 - 10 % eGFP-positive Zellen (nicht gezeigt). Extrapoliert auf die Gesamtzellzahl sollten somit etwa $2,5 - 5 \times 10^4$ Zellen transfiziert worden sein. Damit waren alle Kodon-Kombinationen bzw. Virusvarianten zu Beginn der Selektion 10-fach höher repräsentiert.

Nach Transfektion wurden die virusproduzierenden HT1080-Zellen expandiert, um die Selektion zu starten. Nach zwei Tagen wurde virushaltiger Überstand zur Charakterisierung der Selektion entnommen und die Zellen in T75-Zellkulturflaschen überführt. Jeweils 4 und 6 Tage nach der Transfektion erreichten die Zellen die Konfluenz. Hier erfolgte die erste bzw. zweite Passage, wobei jeweils 20 % der Zellen in eine neue T75-Zellkulturflasche umgesetzt und expandiert wurden. Am Tag 10 nach der Transfektion wurden die Zellen in die dritte und letzte Passage überführt. Dazu wurden 10 % der Zellen mit gleicher Menge nicht infizierter Zellen gemischt. Die Selektion der E-X3-A-Bibliothek endete am Tag 14 nach der Trans-

fektion. Zu den Zeitpunkten Tag 6, 10 und 14 wurden weitere virushaltige Überstände zur Charakterisierung der Selektion entnommen (Abb. 6, rechts).

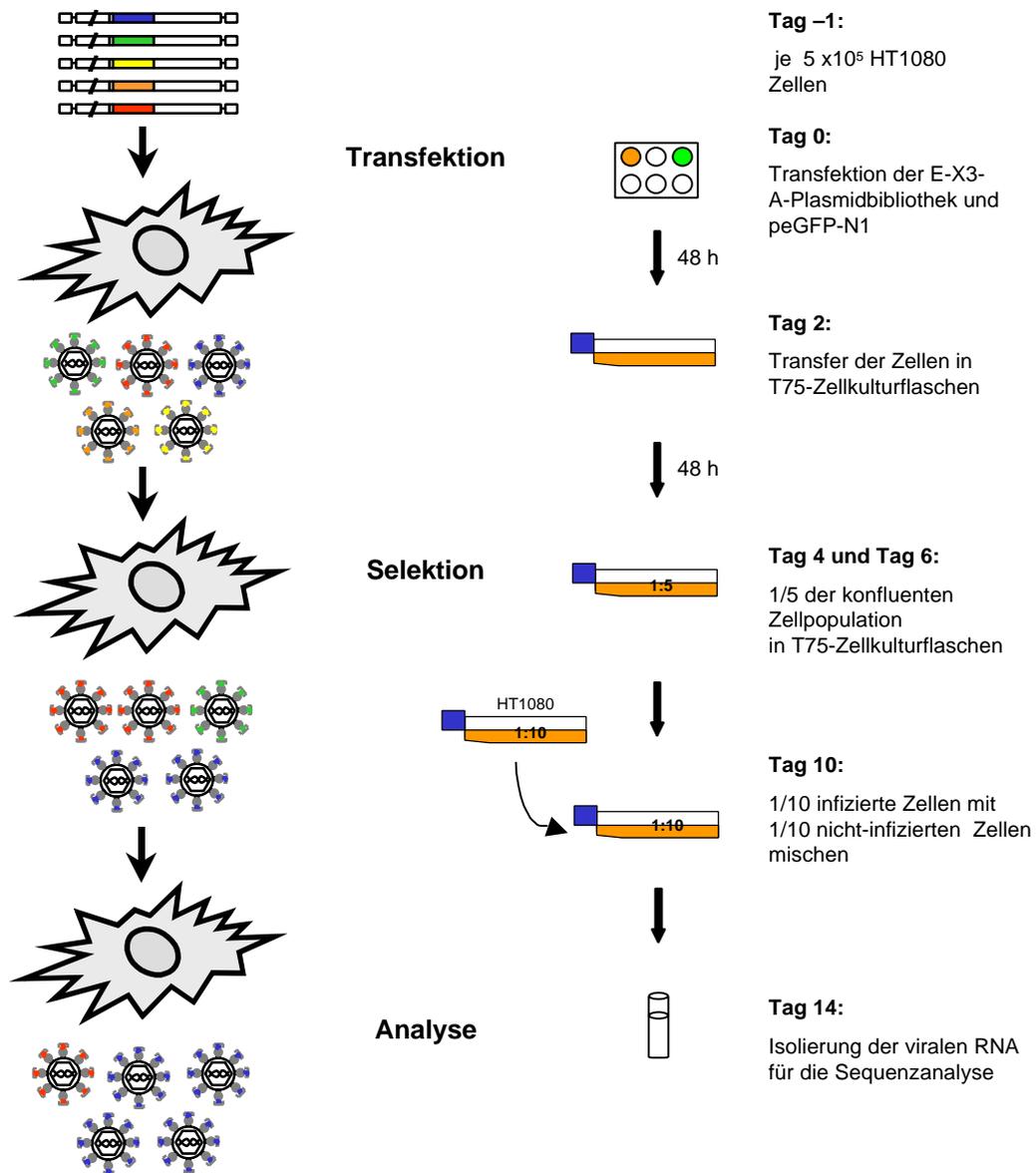


Abb. 6: Schematische Darstellung des Selektionsverfahrens der retroviralen E-X3-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen

Die von den HT1080-Zellen produzierten EGF-blockierten Virusvarianten der Plasmid-Bibliothek E-X3-A breiten sich nach Transfektion selektiv aus. Die selektive Ausbreitung ist auf die proteolytische Spaltung des individuellen Substratlinkers zurückzuführen (links). Das Selektionsprotokoll beinhaltet die Transfektion von HT1080-Zellen mit der Plasmid-Bibliothek E-X3-A gefolgt von mehrfachen Zellpassagen, um die Virusreplikation zu ermöglichen. Während des Passagierens werden infizierte mit nicht infizierten Zellen gemischt (Tag 10). Nach 2, 6, 10 und 14 Tagen werden virushaltige Überstände entnommen und analysiert (rechts).

3.1.4 Charakterisierung der Viruspopulation nach Selektion

Die Selektion der retroviralen E-X3-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen setzte die Replikation der entsprechenden Virusvarianten in den passagierten Zellen voraus. Nur so konnten sich spaltbare Virusvarianten gegenüber nicht spaltbaren Virusvarianten ausbreiten. Deshalb sollte die Virusreplikation während der Selektion nachgewiesen werden.

Der Nachweis erfolgte durch Messung der RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 6, 10 und 14 mittels RT-Test (s. 2.5.4). Je Zeitpunkt wurden zwei Messungen mit jeweils 10 µl Zellkulturüberstand durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand nicht infizierter HT1080-Zellen eingesetzt. Die gemessenen Extinktionen sind in der nachfolgenden Abbildung graphisch dargestellt.

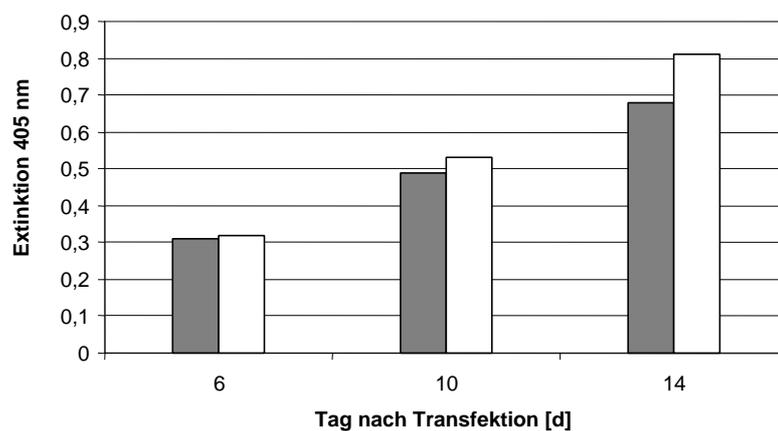


Abb. 7: Nachweis der Virusreplikation während der E-X3-A-Selektion

Die RT-Aktivität wurde in 10 µl Zellkulturüberstand passagierter HT1080-Zellen von Tag 6, 10 und 14 nach der Transfektion mittels RT-Test nachgewiesen. Je Zeitpunkt wurden zwei Messungen durchgeführt (weiße und graue Balken). Die Extinktion bei 405 nm ist graphisch dargestellt.

Zu allen Zeitpunkten der Selektion konnte RT-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 7). Im Überstand nicht infizierter Zellen, dessen Extinktion im Hintergrund des RT-Tests lag, konnte keine RT-Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Demnach replizierten die Viren, während die HT1080-Zellen passagiert wurden.

Allerdings war die nachgewiesene Virusreplikation kein eindeutiger Hinweis auf die Ausbreitung von spaltbaren Virusvarianten. Denkbar wäre auch eine Deletion

der Blockierungsdomäne EGF gewesen, die für den Selektionsdruck wichtig ist. Die Deletion würde zur Reversion zum Wildtyp-Virus innerhalb der Viruspopulation führen. Die Wildtyp-Viren wären schließlich nicht mehr an die proteolytische Aktivierung gekoppelt und würden sich ungehindert sehr schnell ausbreiten (Wittmann, 2000). Um eine Deletion auszuschließen, wurden die selektionierten Virusgenome in den Zellkulturüberständen von Tag 6, 10 und 14 hinsichtlich einer intakten Blockierungsdomäne per RT-PCR untersucht.

Hierfür wurden die Viren mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt und die virale RNA isoliert (s. 2.5.3). Diese RNA wurde unter Verwendung des *env*-spezifischen Primers EASeq1(-) in cDNA umgeschrieben. In der anschließenden PCR-Reaktion erfolgte mit Hilfe der Primer CB6(+) und EASeq1(-) die Amplifizierung über den gesamten Bereich von EGF hinweg (s. 2.2.7). Als Kontrolle wurde die Plasmid-Bibliothek pE-X3-A eingesetzt. Die erwartete Größe der DNA-Fragmente für pE-X3-A lag bei 347 bp. EGF-deletierte Virusvarianten sollten Fragmente geringerer Größe liefern. Die Analyse erfolgte durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 8).

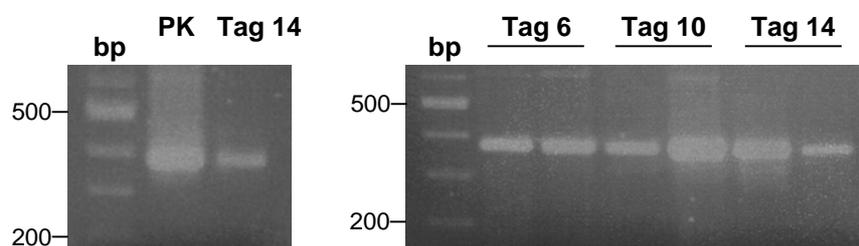


Abb. 8: RT-PCR-Analyse der selektionierten Viruspopulationen

Die virale RNA wurde aus Zellkulturüberständen von Tag 6, 10 und 14 der E-X3-A-Selektion (Querstriche über dem Bild) isoliert und mittels RT-PCR unter Verwendung der sequenzspezifischen Primer CB6(+) und EASeq1(-) analysiert. Als Kontrolle wurde die Plasmid-DNA von pE-X3-A in der PCR-Reaktion eingesetzt (PK, Positivkontrolle). Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem 1%igen DNA-Agarosegel aufgetrennt.

Die DNA-Fragmente von Tag 6, 10 und 14 zeigten im analytischen Gel die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die Positivkontrolle pE-X3-A (Abb. 8). Somit lagen keine Anzeichen für die Anwesenheit nicht blockierter Viren in der selektionierten

Viruspopulation vor. Die selektierten Viren mussten sich folglich durch proteolytische Aktivierung ausgebreitet haben.

3.1.5 Sequenzanalyse der selektierten Substratlinker

Die Entwicklung der Viruspopulation während des Selektionsverlaufs sollte in Bezug auf die Substratlinker auf molekularer Ebene betrachtet werden. Zu erwarten war, dass eine Anreicherung bestimmter Aminosäuren an den diversifizierten Positionen im Substratlinker (P-X-G-L-X-X) stattgefunden hat. Dies könnte auf identische Aminosäuresequenzen, d.h. die Selektion einer bestimmten Virusvariante, oder unterschiedliche Aminosäuresequenzen, d.h. die Selektion von Virusvarianten mit zum Teil identischen Aminosäuren für eine diversifizierte Position, zurückzuführen sein. Schließlich sollten die Substratlinker hinsichtlich selektierter Konsensusmotive analysiert werden. Für diese Analysen wurden die Substratlinker der Viruspopulation von Tag 2, 6 und 14 sequenziert und ausgewertet.

Die virale RNA wurde, wie bereits zuvor beschrieben, für Tag 2, 6 und 14 aus den Überständen isoliert und mittels RT-PCR amplifiziert. Für die Sequenzierung der Substratlinker wurden die PCR-Fragmente mittels T/A-Klonierung (s. 2.2.8) in das Plasmid pCR-3.1 Topo[®] ligiert. Für Tag 2, 6 und 14 wurden jeweils 20 bis 30 bakterielle Klone sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des sequenzspezifischen reversen Primers EASeq1(-). Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Sequenzanalysesoftware BioEdit 2.0 ausgewertet. In dem nachfolgenden Diagramm (Abb. 9) ist die relative Häufigkeit jeder möglichen Aminosäure an den jeweiligen diversifizierten Positionen P2, P2' und P3' im Substratlinker zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

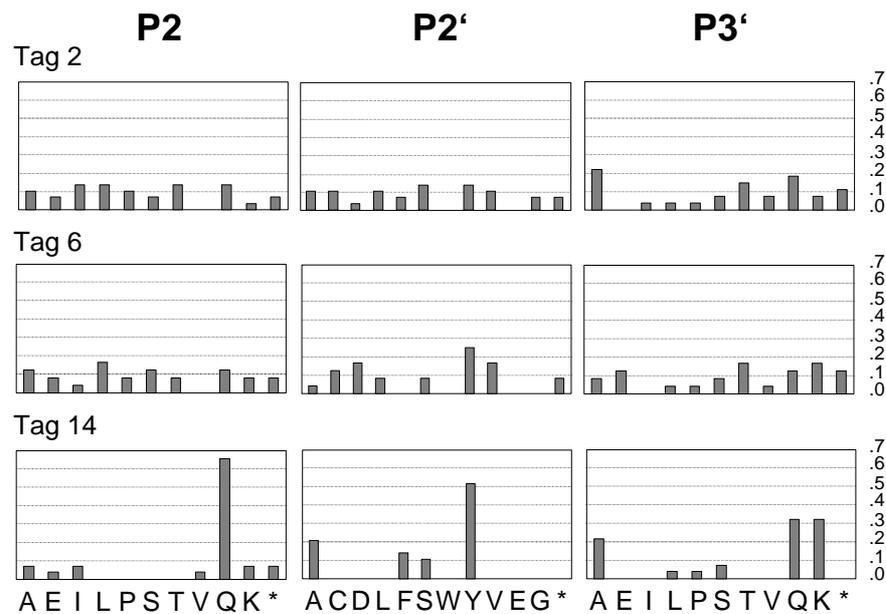


Abb. 9: Relative Häufigkeit der Aminosäuren an den diversifizierten Positionen während der Selektion der E-X3-A-Bibliothek

Je Zeitpunkt (Tag 2, 6 und 14) wurde die virale RNA isoliert und nach RT-PCR kloniert. Die Substratlinker von 20 bis 30 bakteriellen Klonen wurden je Zeitpunkt sequenziert.

Zu Beginn der Selektion (Tag 2) lag eine zufällige Verteilung aller möglichen Aminosäuren je Position vor. Das bedeutete, dass vor der Selektion keine Aminosäure an einer diversifizierten Position in den Substratlinkern der Viruspopulation bereits bevorzugt wurde. Während des Selektionsverlaufs (Tag 6) lag ebenso eine zufällige Verteilung aller Aminosäuren vor, wenngleich die Aminosäure Tyrosin (Y) an Position P2' leicht überrepräsentiert zu sein schien. Am Ende der Selektion (Tag 14) lag keine zufällige Verteilung mehr vor, sondern es waren spezifische Aminosäuren an den einzelnen Positionen selektiert worden. So setzte sich Tyrosin mit einer Häufigkeit von 50 % an der Position P2' durch. Gleichfalls konnten an den Positionen P2 und P3' klare Präferenzen für weitere spezifische Aminosäuren nachgewiesen werden. So tauchte die Aminosäure Glutamin (Q) an Position P2 zu 70 % in allen Substratlinkern auf. Die Position P3' schien dagegen weniger kritisch für die Selektion zu sein. Hier wurden die Aminosäuren Glutamin (Q) und Lysin (K) am häufigsten mit 30 % und Alanin (A) etwas weniger häufig mit 20 % in der Viruspopulation selektiert. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Anreicherung spezifischer Aminosäuren in den Substratlinkern während der Selektion der E-X3-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen stattgefunden hat.

Um die Reproduzierbarkeit der Selektion spezifischer Substratlinker mit Hilfe der E-X3-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen zu bestätigen, wurde die Selektion der Bibliothek nach dem zuvor beschriebenen Protokoll wiederholt und die selektierten Substratlinker anschließend sequenziert.

Für die Identifizierung selektierter Konsensusmotive wurden die Substratlinker aus den zwei unabhängigen Selektionen zusammen analysiert (Übersicht aller einzelnen Klone s. Anhang). Hierfür wurden die Sequenzen der Substratlinker nach identischen Aminosäuresequenzen (Virusklone) und identischer biochemischer Eigenschaften der Aminosäuren an den diversifizierten Positionen gruppiert. Die relativen Häufigkeiten des Auftretens aus zwei unabhängigen Selektionen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2) aufgelistet.

Tab. 2: Selektierte Substratlinker aus der E-X3-A-Bibliothek

Substratlinker*							
P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	1. Sel.	2. Sel.
P	(Q/K)	G	L	(Y/F)	(K/Q)	7/20	18/35
P	Q	G	L	Y	(A/S)	3/20	4/35
P	(Q/K)	G	L	(A/S)	(K/Q)	4/20	2/35
P	Q	G	L	W	Q	0/20	3/35
P	Q	G	L	V	Q	0/20	1/35
P	A	G	L	(Y/F)	(K/Q)	2/20	1/35
P	I	G	L	Y	S	1/20	0/35
P	L	G	L	Y	K	0/20	2/35
P	L	G	L	Y	A	0/20	1/35
P	L	G	L	V	P	0/20	1/35
P	Q	G	L	S	L	0/20	1/35
P	K	G	L	S	I	0/20	1/35
P	I	G	L	S	K	1/20	0/35
P	V	G	L	S	P	1/20	0/35
P	E	G	L	Y	S	1/20	0/35

* Die diversifizierten Positionen sind hervorgehoben. Verschiedene Aminosäuren an einer Position sind in der Reihenfolge ihrer Frequenz aufgelistet.

Mehr als die Hälfte aller Virusvarianten der Viruspopulation kodierten nach beiden Selektionen im Substratlinker das Konsensusmotiv P-[Q/K]-G-L-[Y/F]-[K/Q] (Tab. 2). Am häufigsten wurden hier Glutamin (Q) und weniger häufig Lysin (K) an Position P2 selektioniert. In dieser Gruppe wurde an Position P2' am häufigsten Tyrosin (Y) und weniger häufig Phenylalanin (F) gefunden. Außerdem kodierten die meisten Substratlinker Lysin (K) und Glutamin (Q) an Position P3'. Die zweite Gruppe mit fast gleichen Aminosäuresequenzen trug das Konsensusmotiv P-Q-G-L-Y-[A/S], in dem an Position P3' Alanin (A) und Serin (S) vertreten waren, jedoch weniger häufig als K und Q aus Gruppe 1. In einer weiteren Gruppe mit signifikanter Häufigkeit waren Sequenzmotive mit kleinen Aminosäuren wie Alanin und Serin an Position P2' anstelle der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. So konnte hier P-[Q/K]-G-L-[A/S]-[K/Q] als Konsensusmotiv festgestellt werden. Neben diesen prominenten Sequenzmotiven waren mehr als 10 weitere Varianten vertreten, deren Häufigkeit unter 10 % lag, so dass diese wahrscheinlich einen geringeren Vorteil für die Ausbreitung der entsprechenden Virusvarianten boten.

Abschließend konnten deshalb die Sequenzmotive P-Q-G-L-Y-[K/Q] und P-Q-G-L-Y-[A/S] als die am häufigsten selektionierten Konsensusmotive aus der E-X3-A-Bibliothek notiert werden. Das MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A wurde überraschenderweise nicht selektioniert.

Neben der Bestimmung der Substratlinker wurden die N- und C-terminal liegenden Sequenzen auf Sequenzabweichungen überprüft. Dabei wurde eine einzelne Basenpaarmutation festgestellt, die zu einer Transition von G zu A am 3'-Ende der EGF-kodierenden Sequenz führte. Die Mutation resultierte in einem Stopkodon und verhinderte die Translation des Hüllproteins. Die entsprechenden Virusvarianten, als Stopkodonmutanten bezeichnet, traten signifikant in beiden Selektionen mit einer Häufigkeit von 7,9 % und 21,8 % auf. Die Aminosäuren im Substratlinker der Stopkodonmutanten waren divers (nicht gezeigt). Detaillierte Sequenzanalysen und molekularbiologische Untersuchungen zur Stopkodonmutante sind unter 3.2 beschrieben.

3.1.6 Herstellung und Charakterisierung der E-X3rev-A-Bibliothek

Die Selektionen der retroviralen E-X3-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen führte zur Anreicherung spezifischer Aminosäuren an den diversifizierten Positionen, welche die Konsensusmotive P-Q-G-L-Y-[Q/K] oder P-Q-G-L-Y-[A/S] bildeten. Als nächstes sollte mit Hilfe einer weiteren Bibliothek untersucht werden, ob die zuvor fixierten Positionen mit den Aminosäuren Prolin an P3, Glycin an P1 und Leucin an P1' die optimalen Aminosäuren in den selektionierten Sequenzmotiven darstellten. Für diese retrovirale E-X3rev-A-Bibliothek wurden im Substratlinker die zuvor fixierten Positionen diversifiziert und die selektionierten Positionen fixiert, woraus sich das Motiv X-Q-X-X-Y-[A/Q] ergab (Tab. 3). Die Aminosäuren Glutamin (Q) und Alanin (A) wurden für die Position P3' ausgewählt, weil sie am häufigsten in den selektionierten Substratlinkern aus der E-X3-A-Bibliothek zusammen mit den Aminosäuren Glutamin (Q) an Position P2 und Tyrosin (Y) an P2' im Konsensusmotiv auftauchten.

In den Substratlinkern der E-X3rev-A-Bibliothek wurden erneut die Kodons für Arginin an den diversifizierten Positionen ausgeschlossen, um die Spaltung durch Proprotein-Konvertasen zu vermeiden. Im Unterschied zur E-X3-A-Bibliothek wurden hier durch die Auswahl der degenerierten Kodons mehr Aminosäuren zugelassen, wodurch sich die kombinatorische Vielfalt erhöhte. Daraus resultierten 54144 Kombinationen auf Kodon-Ebene, die schließlich 4896 Kombinationen auf Protein-Ebene repräsentierten (Tab. 3). Die genetische Diversität war damit mehr als 10 mal höher gegenüber der zuvor selektionierten E-X3-A-Bibliothek (vgl. 3.1.1).

Die E-X3rev-A-Bibliothek wurde wie bereits unter 3.1.2 beschrieben hergestellt. Die diversifizierten Substratlinker wurden per PCR unter der Verwendung des universellen Primers CB6(+) und äquimolarer Mengen der degenerierten Primer YM6(-) und YM7(-) an die Blockierungsdomäne EGF fusioniert. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden in das Plasmid pE-A über die Restriktionsschnittstellen SfiI und NotI ligiert. Die Zahl der primären Transformanten nach Elektroporation in *E. coli* (TopF10F') lag bei $1,64 \times 10^6$. Nach Restriktionsanalyse mit NheI waren von 16 Klonen 15 positiv. Das entsprach ca. $1,54 \times 10^6$ rekombinanten Plasmiden.

Somit waren die 54144 Kombinationen auf Kodon-Ebene in der Plasmid-Bibliothek pE-X3rev-A um ein Vielfaches vertreten.

Tab. 3: Entwurf des diversifizierten E-X3rev-A-Substratlinkers

Position	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
E-X3-A-Konsensus	P	Q	G	L	Y	[Q/K] / [A/S]
Diversifizierung	X	Q	X	X	Y	A/Q
Kodons ¹	NHN	CAG	KNB	NHY	TAC	CAG/ GCC
Anzahl je Position ²	47	1	24	24	1	2
Aminosäuren	A, N, D, Q, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V, Stop	Q	A, C, D, L, F, S, W, Y, V, E, G, Stop	A, N, D, H, I, L, F, P, S, T, Y, V	Y	Q/A
Anzahl je Position ³	17	1	12	12	1	2

¹ Einzelbuchstabenkodierung: N = A,T,G,C H = A,T,C B = T,G,C K = T,G Y = C,T

² Kombinationen auf Kodon-Ebene: $47 \times 24 \times 24 \times 2 = 54144$

³ Kombinationen auf Protein-Ebene $17 \times 12 \times 12 \times 2 = 4896$

3.1.7 Selektion und Analyse der E-X3rev-A-Bibliothek auf der Tumorzelllinie HT1080

Die Selektion der Substratlinker aus der E-X3rev-A-Bibliothek erfolgte nach dem zuvor etablierten Selektionsprotokoll (vgl. 3.1.3) auf HT1080-Zellen und wurde gleichfalls am Tag 14 nach Transfektion beendet. Sowohl die gemessene RT-Aktivität während der Selektion als auch die RT-PCR (s. 2.2.7) zu Beginn und am Ende der Selektion bestätigten, dass Virusvarianten der Bibliothek replizierten und zu keinem Zeitpunkt eine Deletion der Blockierungsdomäne vorlag (nicht gezeigt). Nach Abschluss der Selektion auf HT1080-Zellen wurden die Substratlinker von Tag 2 und Tag 14 der Selektion analysiert (vgl. 3.1.5 und s. Anhang).

Zunächst wurde die Entwicklung der Viruspopulation während des Selektionsverlaufs auf HT1080-Zellen analog zur E-X3-A-Selektion betrachtet, um eine Anreicherung spezifischer Aminosäuren im Substratlinker (X-Q-X-X-Y-[A/Q]) nachzuweisen.

Im nachfolgenden Diagramm (Abb. 10) ist die relative Häufigkeit jeder möglichen Aminosäure an den jeweiligen diversifizierten Positionen P3, P1 und P1' dargestellt. Vor der Selektion (Tag 2) war eine zufällige Verteilung aller möglichen Aminosäuren je Position in der Viruspopulation gegeben. Zu diesem Zeitpunkt wurde keine der Aminosäuren an einer diversifizierten Position im Substratlinker bevorzugt. Am Ende der Selektion (Tag 14) ließen sich dagegen klare Präferenzen für spezifische Aminosäuren an den Positionen feststellen. So wurde Prolin mit fast 60 % als die häufigste Aminosäure an Position P3, Glycin mit über 50 % an Position P1 und Leucin aber auch Isoleucin mit 50 % bzw. 20 % an Position P1' selektioniert. Offensichtlich wurden die für das MMP-Standardsubstrat charakteristischen Aminosäuren mit der E-X3rev-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen selektioniert.

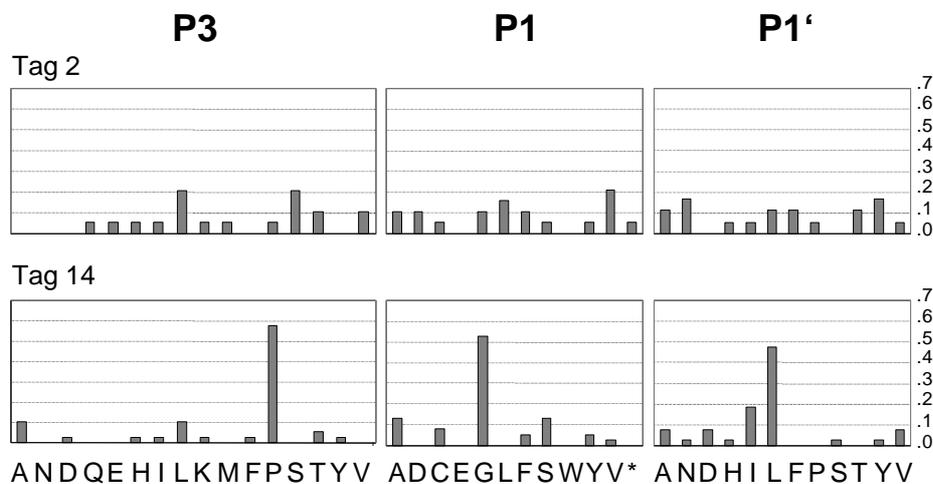


Abb. 10: Relative Häufigkeit der Aminosäuren an den diversifizierten Positionen während der Selektion der E-X3rev-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen

Je Zeitpunkt wurde die virale RNA isoliert und nach RT-PCR in Bakterien kloniert. Es wurden 19 (Tag 2) und 38 (Tag 14) bakterielle Klone sequenziert.

Für die Identifizierung der selektionierten Konsensusmotive wurden alle sequenzierten Substratlinker analog zur E-X3-A-Selektion ausgewertet und in Gruppen zusammengefasst. Auch hier erfolgte die Gruppierung nach identischen bzw.

homologen Aminosäuresequenzen (Virusklone) und identischen biochemischen Eigenschaften der Aminosäuren an den diversifizierten Positionen (Tab. 4).

Tab. 4: Selektionierte Substratlinker aus der E-X3rev-A-Bibliothek

Substratlinker ¹						
P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Sel.
P	Q	G	(L/I/V)	Y	(A/Q)	16/38
Hy²	Q	(G/A/S/T)	(L/I/F)	Y	(A/Q)	10/38
P	Q	V	A	Y	A	1/38
P	Q	S	A	Y	A	1/38
D	Q	C	A	Y	A	1/38
K	Q	C	Y	Y	Q	1/38
P	Q	C	V	Y	A	1/38
P	Q	F	V	Y	A	1/38
Y	Q	G	D	Y	A	1/38
P	Q	Y	D	Y	A	1/38
T	Q	S	D	Y	A	1/38
L	Q	F	N	Y	A	1/38
T	Q	Y	S	Y	A	1/38
H	Q	S	H	Y	A	1/38

¹ Die diversifizierten Positionen sind hervorgehoben. Verschiedene Aminosäuren an einer Position sind in der Reihenfolge ihrer Frequenz aufgelistet. ² Hy steht für die Aminosäuren Pro, Phe, Leu, Ala und Ile.

In mehr als der Hälfte aller Sequenzen wurde die Aminosäure Prolin an Position P3 und Glycin an Position P1 selektiert. In dieser Gruppe wurden an Position P1' am häufigsten die Aminosäuren Leucin und die Homologen Isoleucin bzw. Valin gefunden. Somit konnte P-Q-G-[L/I/V]-Y-[A/Q] als das prominenteste Konsensusmotiv festgestellt werden. In einer zweiten Gruppe mit ca. 25 % aller Sequenzen erschienen identische oder homologe Aminosäuren an den Positionen P1 und P1', während hier an Position P3 hydrophobe Aminosäuren anstelle von Prolin auftauchten. Daraus resultierte das zweithäufigste Konsensusmotiv [Hy]-Q-[G/A/S/T]-[L/I/F]-Y-[A/Q]. Die übrigen Substratlinker erschienen nur einmal und waren in ihrer Aminosäuresequenz heterogen. Allerdings wurden auch hier, wie zuvor nach Selektion der E-X3-A-Bibliothek, Stopkodonmutanten selektiert. Sie traten signifikant mit einer Häufigkeit von 20 % auf. Detaillierte Sequenzanalysen

und molekularbiologische Untersuchungen zur Stopkodonmutante sind unter 3.2 beschrieben.

Insgesamt wurden mit der E-X3rev-A-Bibliothek 70 % homologe oder identische Sequenzen zu denen aus der E-X3-A-Bibliothek selektioniert. Somit wurden die zuvor selektionierten Substratlinker mit der Selektion der E-X3rev-A-Bibliothek bestätigt. Außerdem lag durch die Rückgewinnung der charakteristischen Aminosäuren Prolin an P3, Glycin an P1 und Leucin bzw. Isoleucin an P1' des MMP-Standardsubstrates ein deutlicher Hinweis auf eine Spaltung der selektionierten Substrate durch MMPs vor.

3.2 Selektion von Stopkodonmutanten und deren Charakterisierung

Wie bereits unter 3.1.5 und 3.1.7 erwähnt, wurden überraschenderweise die sogenannten Stopkodonmutanten aus der E-X3-A- und der E-X3rev-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen selektioniert. Diese waren auf die beobachtete charakteristische Basenpaarmutation, eine Transition von G zu A am 3'-Ende der EGF-kodierenden Sequenz, oder auf Stopkodons innerhalb des Substratlinkers zurückzuführen. Dadurch können nur das virale Signalpeptid und der *egf*-Leserahmen translatiert werden. Folglich sollten sich diese Virusvarianten aufgrund einer fehlenden Translation des viralen Hüllproteins nicht ausbreiten können. Die folgende Tabelle (Tab. 5) zeigt die beobachteten Häufigkeiten für die beiden Stopkodonvarianten nach Selektion der E-X3-A- und E-X3rev-A-Bibliotheken.

Tab. 5: Relative Häufigkeiten der Stopkodonvarianten nach Selektion der E-X3-A- und der E-X3rev-A-Bibliothek

	E-X3-A		E-X3rev-A
Vor Selektion (Tag 2)			
Häufigkeit Stop EGF	0 (0/15)		10,5 (2/19)
Häufigkeit Stop Linker	0 (0/15)		5,2 (1/19)
Häufigkeit gesamt (%)	0		15,7
Nach Selektion (Tag 14)			
	1. Sel.	2. Sel.	
Häufigkeit Stop EGF	21,4 (6/26)	7,9 (3/38)	20 (11/55)
Häufigkeit Stop Linker	7,1 (2/26)	0 (0/38)	7,2 (4/55)
Häufigkeit gesamt (%)	28,5	7,9	27,2

Der Vergleich der relativen Häufigkeit vor (Tag 2) und nach Selektion (Tag 14) beider Stopkodonvarianten verdeutlicht, dass eine signifikante Anreicherung stattgefunden hat (Tab. 5). Obwohl die Relevanz der Stopkodons unklar ist, suggeriert die hohe relative Häufigkeit des Auftretens einen Vorteil für die gesamte Viruspopulation während der Selektionen. Diese Annahme sollte untersucht werden, indem die Ausbreitung des schwach replizierenden Virus E-MMP-A in HT1080-Zellen (Erläuterung s.u. 3.3.3) in An- und Abwesenheit einer Stopkodonmutante über die Quantifizierung der RT-Aktivität verfolgt wurde (Erläuterung s.u. 3.3.3). Zunächst wurde hierfür die Stopkodonmutante, die im *egf*-Leserahmen das Stopkodon kodierte, rekonstituiert (s.u. 3.3.1) und als pE-24stop-A bezeichnet (Abb. 11, A). Die fehlende Translation des Hüllproteins wurde anschließend in transfizierten HEK-293T-Zellen mittels Western Blot bestätigt (nicht gezeigt). Schließlich wurden 4×10^5 HT1080-Zellen mit dem viruskodierenden Plasmid pE-MMP-A allein oder in Kombination mit pE-24stop-A transfiziert. Die eingesetzte Menge des pE-MMP-A wurde hierbei konstant gehalten, um möglichst eine ähnliche Anzahl von Zellen zu transfizieren. Das gleiche Experiment wurde mit der nicht spaltbaren Virusvariante E-A durchgeführt. Als Kontrolle für die Replikation wurde das Virus E-26-A eingesetzt. Nach Transfektion wurden die Zellen je Ansatz sechs Tage kultiviert, währenddessen pro Tag eine Probe des Zellkulturüberstands für die Messung der RT-Aktivität entnommen wurde (Abb. 11, B).

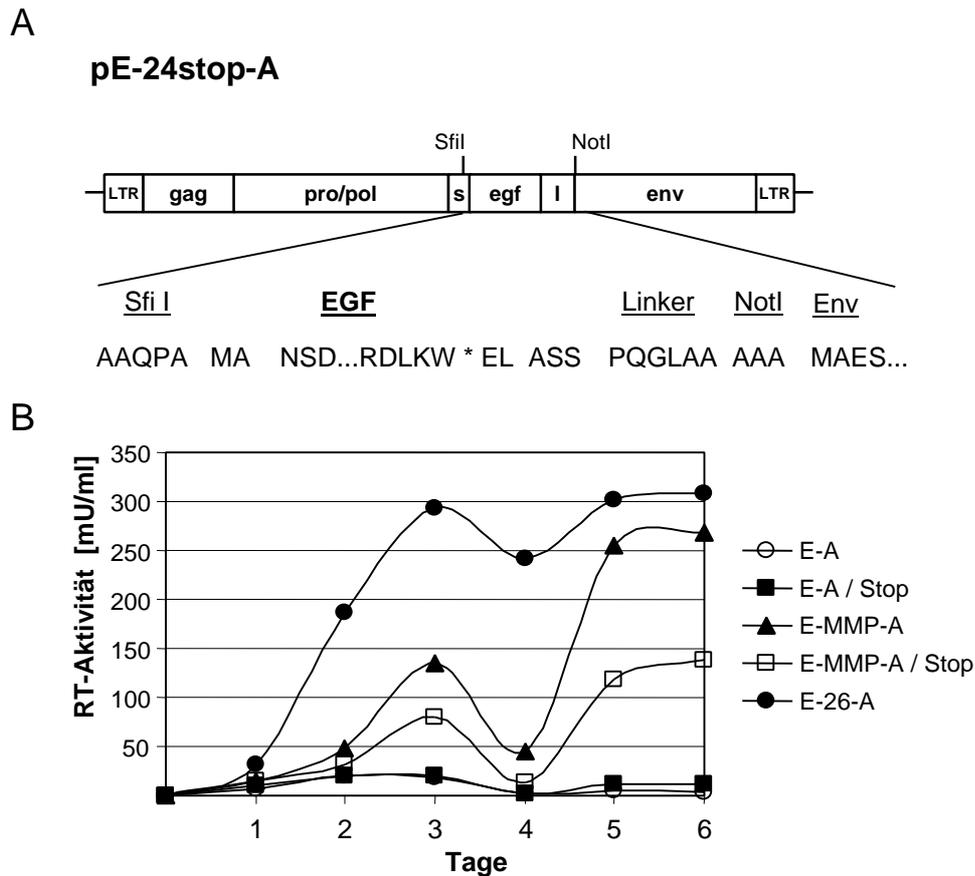


Abb. 11: Rekonstituierte Stopkodonmutante und deren Auswirkung auf die Replikation MMP-aktivierbarer Viren in HT1080-Zellen

A) Schematische Darstellung des Plasmids pE-24stop-A, welches die rekonstituierte Stopkodonmutation kodiert. B) 4×10^5 HT1080-Zellen wurden mit den viruskodierenden Plasmiden E-A, E-A mit E-24stop-A, E-MMP-A bzw. E-MMP-A mit E-24stop-A transfiziert. Als Kontrolle wurde das Virus E-26-A eingesetzt. Nach Transfektion wurden die Zellen 6 Tage kultiviert, wobei jeden Tag Proben zur Messung der RT-Aktivität aus den Zellkulturüberständen entnommen wurden.

Der Verlauf der RT-Aktivitäten bestätigte die angenommene verbesserte Ausbreitung des Virus E-MMP-A in Gegenwart der Stopkodonmutante nicht. Die Ausbreitung war verglichen mit der des Virus E-MMP-A ohne Stopmutante eher verlangsamt (Abb. 11, B, vgl. E-MMP-A mit E-MMP-A/Stop). Das nicht spaltbare Virus E-A breitete sich weder in An- noch in Abwesenheit der Stopkodonmutante in HT1080-Zellen aus (Abb. 11, B, vgl. E-A mit E-A/Stop), während sich die Kontrolle E-26-A erwartungsgemäß ausbreitete (Erläuterung s.u. 3.3.3). Der kurzzeitige Rückgang der RT-Aktivität am vierten Tag war auf das Umsetzen der Zellen zurückzuführen.

Demzufolge ließ sich hiermit nicht klären, welchen Einfluss die Stopkodonmutante auf die Viruspopulation hatte. Einen positiven Effekt auf die Ausbreitung einer schwach replizierenden Variante, hier gezeigt für E-MMP-A, war im gewählten experimentellen Ansatz nicht nachweisbar.

3.3 Charakterisierung der selektionierten Viren *in vitro* und *in vivo*

Die Selektionen der beiden Bibliotheken E-X3-A und E-X3rev-A auf HT1080-Zellen führte zur Selektion von Substratlinkern, welche die Konsensusmotive P-Q-G-L-Y-[Q/K] und P-Q-G-L-Y-[A/S] bildeten und wahrscheinlich durch MMPs gespalten wurden. In den folgenden Experimenten sollten die Eigenschaften von selektionierten Virusvarianten, deren Substratlinker diese Konsensusmotive repräsentierten, mit Hilfe biologischer und biochemischer Methoden genauer analysiert werden. So sollte festgestellt werden, ob die selektionierten Virusvarianten durch eine effizientere Replikation in HT1080-Zellen selektioniert wurden, und ob die Replikation bzw. Infektion von der MMP-Aktivität in HT1080-Zellen abhing. In diesem Zusammenhang sollte die Spaltung selektionierter Substratlinker durch HT1080-Zellen nachgewiesen werden. Schließlich sollte untersucht werden, welche MMPs möglicherweise für die proteolytische Aktivierung der selektionierten Virusvarianten in Frage kamen.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden stellvertretend die selektionierten Viren E-21-A und E-26-A bzw. deren Substratlinker P-Q-G-L-Y-A und P-Q-G-L-Y-Q untersucht. In den nachfolgenden Analysen wurden sie mit den Viren E-MMP-A und E-A verglichen (Abb. 12). Das Virus E-MMP-A trägt als Substratlinker das MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A (Wittmann, 2000). Es wird im Folgenden als das parentale Virus bezeichnet. Im Virus E-A ist dagegen EGF direkt N-terminal mit SU fusioniert und sollte daher nicht gespalten werden. Es wird im Folgenden als nicht spaltbares Virus bezeichnet.

3.3.1 Rekonstitution der selektionierten Virusvarianten und Herstellung viraler Env-Expressionsplasmide

Zunächst wurden die selektionierten Viren E-21-A und E-26-A rekonstituiert. Als Ausgangskonstrukt dienten die über T/A-Klonierung entstandenen Plasmide zur Analyse der Substratlinker. Diese klonierten DNA-Fragmente lieferten bereits die notwendigen Restriktionsschnittstellen SfiI und NotI, da sie durch Verwendung der Primer CB6(+) und EASeq1(-) generiert worden waren (s. 3.1.5). Als Zielplasmid diente pE-A, das auch zur Herstellung der Bibliotheken verwendet wurde (Abb. 12). Nach dem Einfügen der entsprechenden EGF-Env-Fragmente in das SfiI/NotI-geschnittene Plasmid pE-A wurden die rekonstituierten viruskodierenden Plasmide pE-21-A und pE-26-A analytisch verdaut und sequenziert (nicht gezeigt).

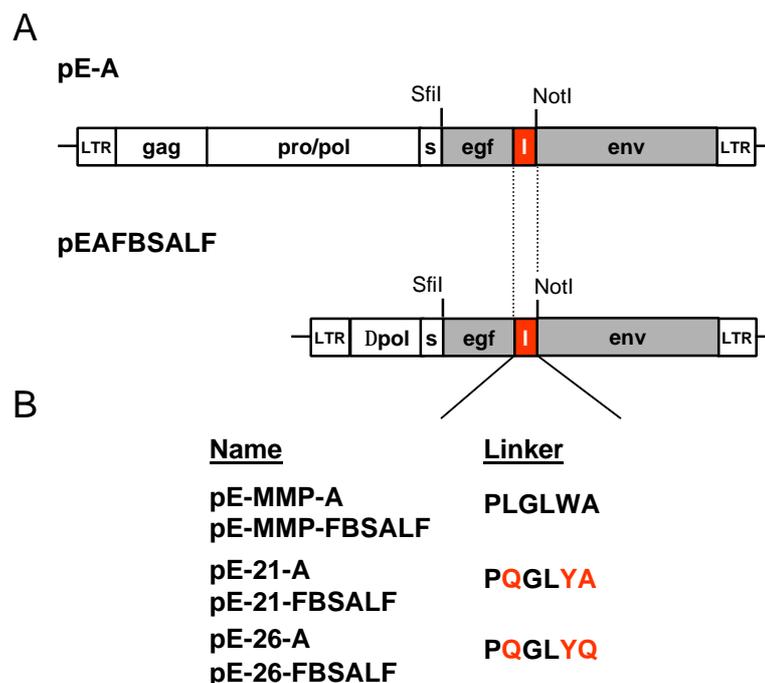


Abb. 12: Schematische Darstellung der rekonstituierten Viren

Die selektionierten Substratlinker E-21-A und E-26-A wurden über die Restriktionsschnittstellen SfiI und NotI in das MLV-kodierende Plasmid pE-A ligiert (A), woraus pE-21-A und pE-26-A resultierten (B). Mit SfiI und NotI geschnittene DNA-Fragmente des parentalen und der selektionierten Hüllproteine wurden analog in das Plasmid pEAFBSALF ligiert (A), woraus pE-MMP-FBSALF, pE-21-FBSALF und pE-26-FBSALF resultierten (B). Die selektionierten Aminosäuren im Substratlinker sind rot markiert.

Für bestimmte Fragestellungen (s. 3.3.2.1) sollten sowohl das parentale Hüllprotein als auch die selektionierten Hüllproteine ohne viralen Kontext in Zellen exprimiert und analysiert werden. Hierzu wurden die zuvor verwendeten DNA-Fragmente der selektionierten Substratlinker über die Restriktionsschnittstellen SfiI und NotI in das Expressionsplasmid pEAFBSALF (Cosset *et al.*, 1995) kloniert, woraus die Plasmide pE-21-FBSALF und pE-26-FBSALF entstanden. Zur Herstellung von pE-MMP-FBSALF wurde die SfiI/NotI-Kassette von pE-MMP-A in pEAFBSALF kloniert (Abb. 12).

3.3.2 Analyse der selektionierten Viren nach Produktion in HEK-293T- und HT1080-Zellen

3.3.2.1 Analyse in HEK-293T-Zellen

Für die Charakterisierung der selektionierten Substratlinker, bzw. der entsprechenden Viren, sollten Viruspartikel in HEK-293T-Zellen hergestellt und mittels Western Blot (s. 2.3.5) analysiert werden. HEK-293T-Zellen, humane Nierenepithelzellen, eignen sich für die Produktion EGF-blockierter MMP-spaltbarer Viren, da sie zwei wichtige Kriterien erfüllen. Einerseits besitzen die Zellen eine geringe EGF-Rezeptordichte, die zu einer effizienten Freisetzung der Viruspartikel in den Überstand führen sollte. Andererseits zeigen die Zellen eine geringe MMP-Aktivität, nachgewiesen für MMP-2 und MMP-9 (Hartl *et al.*, 2004), wodurch die freigesetzten Viruspartikel ungespalten vorliegen sollten. Außerdem begünstigt die gute Transfektionseffizienz der HEK-293T-Zellen (Pear *et al.*, 1993) eine hohe transiente Virusproduktion.

Zur Herstellung von Zellextrakten und Viruspartikeln der selektionierten Viren E-21-A und E-26-A sowie der Kontrollviren E-MMP-A, E-A und WT (M91MS) wurden 4×10^5 HEK-293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden 48 h vor der Ernte und Lyse transfiziert. Das Virus WT (M91MS) ist ein ecotropes MLV, dessen Env-Protein gegen die amphotrope Variante von 4070A ausgetauscht wurde (M. Schweizer, nicht publiziert) und hier als Kontrolle für nicht modifiziertes SU diente. Als weitere Kontrolle wurde das Plasmid pUC18 transfiziert. Durch die separate Transfektion von pGFP-N1 konnte indirekt für die anderen Plasmide eine Transfektionseffizienz von mehr als 50 % ermittelt werden (nicht gezeigt).

Die Ernte der Viruspartikel erfolgte in serumfreiem Medium, um den störenden Einfluss von fötalem Kälberserum auf die elektrophoretische Auftrennung zu vermeiden. Die Viruspartikel wurden konzentriert und anschließend mit PNGase F behandelt. Durch diesen Deglykosylierungsschritt der viralen Hüllproteine wurde eine bessere Auftrennung zwischen EGF-SU und SU erreicht (Unterschied nur ca. 5 kD). Nach der Elektrophorese und dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurden die viralen SU-Proteine (gp70) und Kapsidproteine (p30) mit entsprechenden polyklonalen Ziegenseren (s. 2.1.3) detektiert (Abb. 13).

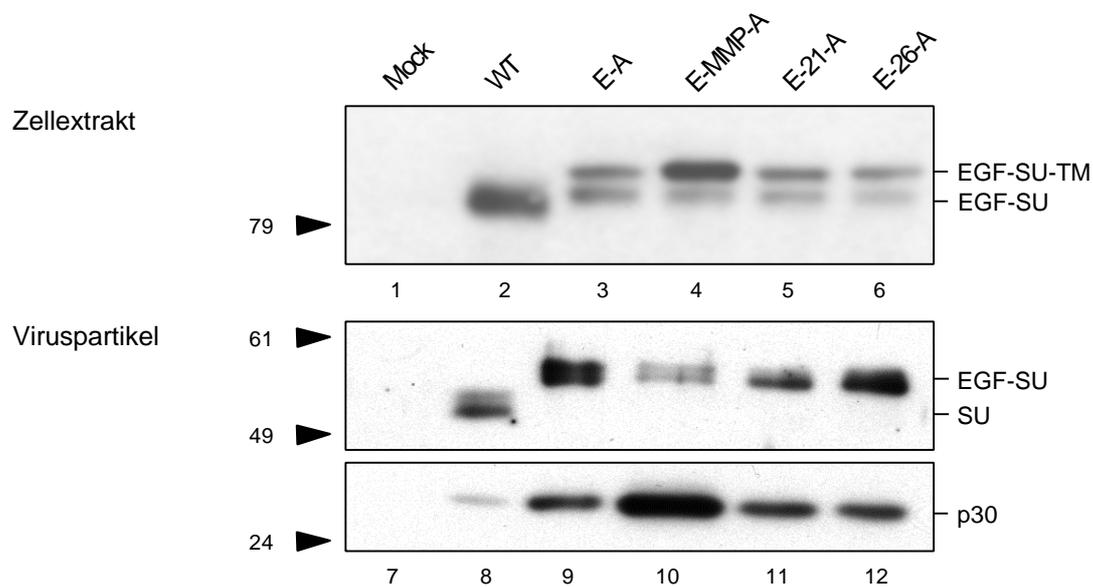


Abb. 13: Western Blot-Analyse rekonstituierter Viren produziert in HEK-293T-Zellen

HEK-293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pUC18 (1, 7), pM91MS (2, 8), pE-A (3, 9), pE-MMP-A (4, 10), pE-21-A (5, 11) und pE-26-A (6, 12) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die viralen Hüllproteine in Zellextrakten (1-6) und von deglykosylierten Viruspartikeln (7-12) nach Auftrennung in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf Nitrozellulosemembranen mit Hilfe spezifischer Antiseren gegen SU und p30 detektiert.

In den Zellextrakten wurden für alle EGF-modifizierten Virusvarianten zwei charakteristische Banden nachgewiesen. Die obere Bande korrespondierte mit den modifizierten Env-Vorläuferproteinen EGF-SU-TM und die untere mit den EGF-SU-Proteinen. Die EGF-SU-Proteine liefen leicht oberhalb der SU-Proteine des WTs (Abb. 13, obere Reihe), aufgrund der zusätzlichen EGF-Domäne. Interessanterweise war die Menge prozessierter EGF-SU-Proteine relativ zu den Vorläuferpro-

teinen EGF-SU-TM reproduzierbar höher in den Zellen, die eine selektionierte Virusvariante (E-21-A und E-26-A) produzierten, als in den Zellen, die das parentale Virus E-MMP-A produzierten (Abb. 13, vgl. Spuren 5, 6 mit 4).

Die Analyse der aufgetrennten Viruspartikel zeigte, dass die EGF-SU-Proteine aller modifizierten Viren mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität im SDS-Gel aufgetrennt wurden (Abb. 13, mittlere Reihe, Spuren 9-12). Sie liefen deutlich oberhalb der SU-Proteine des WTs (vgl. Spur 8). Aufgrund dessen lag keine proteolytische Aktivierung durch Spaltung der Substratlinker EGF-blockierter Viren in HEK-293T-Zellen vor. Damit konnte auch eine Spaltung durch Proprotein-Konvertasen wie Furin ausgeschlossen werden. Folglich waren HEK-293T-Zellen für die Herstellung EGF-blockierter Viren geeignet.

Erstaunlicherweise waren durch den Vergleich der Signalintensitäten der p30-Banden mit den korrespondierenden EGF-SU-Banden unterschiedliche Inkorporationseffizienzen der Hüllproteine zwischen den selektionierten Virusvarianten und dem parentalen Virus anzunehmen (Abb. 13, mittlere Reihe und untere Reihe, Spuren 8-12).

Um diese Inkorporationsunterschiede der selektionierten Virusvarianten gegenüber dem parentalen Virus zu quantifizieren, wurde der Western Blot mit p30-normalisierten Partikelmengen von allen zuvor eingesetzten Viren wiederholt und densitometrisch analysiert. Anschließend wurde die Inkorporationsrate aus dem Verhältnis der Signalintensität von SU zu p30 ermittelt. Je Virus wurden drei Proben gemessen und die mittlere Inkorporationsrate auf die des parentalen Virus E-MMP-A ($\cong 1$) bezogen (Abb. 14).

Für alle analysierten Viren wurden so höhere Inkorporationsraten für die Hüllproteine gegenüber dem parentalen Virus E-MMP-A festgestellt. Im Einzelnen zeigten die selektionierten Viren E-21-A und E-26-A eine 5-fach bzw. 9-fach höhere Inkorporationsrate und die Viren E-A und WT eine 7-fach bzw. 20-fach höhere Inkorporationsrate (Abb. 14).

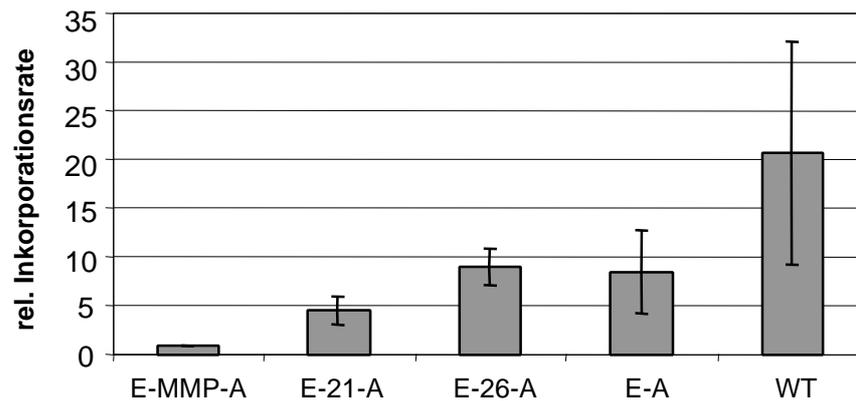


Abb. 14: Graphische Darstellung der Inkorporation viraler Hüllproteine

Die relativen Inkorporationsraten der selektierten Hüllproteine E-21-A und E26-A wurden in Bezug auf das parentale Virus durch die densitometrische Analyse der SU- und p30-Signale bestimmt. Als weitere Viren wurden E-A und WT analysiert.

Die erhöhten Inkorporationsraten könnten auf eine höhere Dichte der Hüllproteine selektierter Viren auf der Zelloberfläche von HEK-293T-Zellen zurückzuführen sein. Deshalb wurden HEK-293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden pE-MMP-FBSALF, pE-21-FBSALF und pE-26-FBSALF, die nur die blockierten Hüllproteine kodieren, transfiziert und 48 Stunden später durch FACS (s. 2.4.3) analysiert. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pMFGnlsLacZ, welches das Reporterogen Beta-Galaktosidase (LacZ) kodiert, kotransfiziert. Die Detektion der Hüllproteine erfolgte durch einen monoklonalen hEGF-Antikörper. Als Kontrolle der basalen EGF-Rezeptordichte wurden Zellen im FACS gemessen, die nur mit pMFGnlsLacZ transfiziert waren. Die mittlere Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen wurde auf die Anzahl LacZ-positiver Zellen bezogen.

Für die Hüllproteine von E-21-A und E-26-A konnten eine 2-fach bzw. 2,2-fach höhere Oberflächenexpression gegenüber dem parentalen Hüllprotein E-MMP-A nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Damit korrelierten die höheren Inkorporationsraten der Hüllproteine selektierter Viren mit einer höheren Oberflächenexpression.

3.3.2.2 Analyse in HT1080-Zellen

Die Selektion der Virusvarianten E-21-A und E-26-A sollte auf eine proteolytische Spaltung ihrer Substratlinker in HT1080-Zellen zurückzuführen sein. Um dies fest-

zustellen, sollte die Prozessierung der selektionierten Hüllproteine in HT1080-Zellen mit Hilfe des Western Blots verfolgt werden.

Zur Herstellung von Zellextrakten und Viruspartikeln der selektionierten Viren E-21-A und E-26-A sowie der Kontrollviren E-MMP-A, E-A und WT wurden 4×10^5 HT1080-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden 48 h vor Ernte und Lyse transfiziert. Im Gegensatz zur erzielten Transfektionseffizienz von 50 % in HEK-293T-Zellen wurden hier nur 5 % der HT1080-Zellen transfiziert (Anzahl GFP-positiver Zellen, nicht gezeigt). Dadurch konnten sich die Viren innerhalb der Zellpopulation ausbreiten. Die jeweiligen Zellextrakte und Viruspartikel wurden nach Herstellung und Ernte elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferriert. Der Nachweis der Hüllproteine (SU) erfolgte auch hier durch den Einsatz des polyklonalen Anti-gp70-Ziegenserums (Abb. 15).

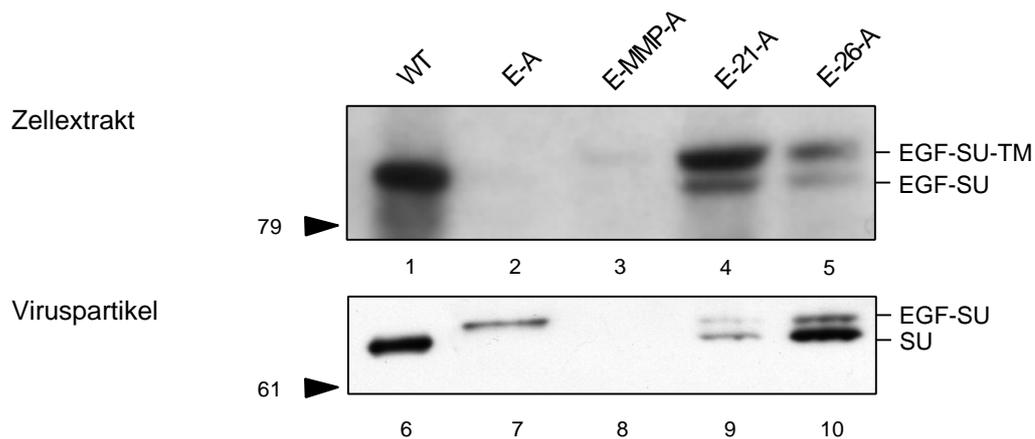


Abb. 15: Western Blot-Analyse rekonstituierter Viren produziert in HT1080-Zellen

HT1080-Zellen wurden mit den Plasmiden pM91MS (WT; 1, 6), pE-A (2), pE-MMP-A (3, 8), pE-21-A (4, 9) und pE-26-A (5, 10) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die viralen Hüllproteine in Zellextrakten (1-5) und von Viruspartikeln (6, 8-12) nach Auftrennung in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel und Transfer auf Nitrozellulosemembranen immunologisch detektiert. Als Kontrolle der elektrophoretischen Mobilität ungespaltener Viruspartikel wurde E-A von HEK-293T-Zellen eingesetzt (7).

In den Zellextrakten konnten die Hüllproteine EGF-SU-TM und EGF-SU der selektionierten Viren E-21-A und E-26-A detektiert werden (Abb. 15, obere Reihe, Spur 4 und 5). Die Hüllproteine des nicht spaltbaren Virus E-A und des parental Virus E-MMP-A wurden dagegen nicht oder kaum detektiert (Spur 2 und 3). Hierfür war

möglicherweise eine fehlende bzw. zu geringe Ausbreitung der Viren aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz von 5 % der HT1080-Zellen verantwortlich.

Die Analyse der freigesetzten Viruspartikel zeigte für die selektionierten Viren E-21-A und E-26-A jeweils zwei Banden für die Hüllproteine. Die obere Bande entsprach den EGF-SU-Proteinen und die untere den SU-Proteinen (Abb. 15, untere Reihe, Spur 9 und 10). Die Intensität des SU-Signals relativ zum EGF-SU-Signal zeigte, dass mehr als zwei Drittel der Hüllproteine gespalten vorlagen. Im Western Blot der freigesetzten Viruspartikel von HEK-293T-Zellen wurden dagegen nur die ungespaltenen EGF-SU-Proteine detektiert (vgl. 3.3.2.1). Als Kontrollen für die Proteingrößen dienten hier WT und HEK-293T-produzierte Viruspartikel von E-A, die entweder nur SU bzw. EGF-SU aufweisen (Spur 6 und 7). Für das parentale Virus E-MMP-A konnte kein Signal detektiert werden (Spur 8).

Demnach musste die Freisetzung gespaltenener selektionierter Viruspartikel auf eine oder mehrere aktive Proteasen in HT1080-Zellen zurückzuführen sein, die möglicherweise auch ihre Ausbreitung begünstigten. Somit lag ein erster Hinweis vor, dass die Selektion der Virusvarianten aus den Bibliotheken aufgrund proteolytischer Aktivierung stattgefunden hat.

3.3.3 Das Replikationsverhalten der selektionierten Viren in HT1080-Zellen

Die Virusvarianten E-21-A und E-26-A mussten aufgrund der Spaltung ihrer Substratlinker einen Replikationsvorteil gegenüber anderen Varianten in den Bibliotheken gehabt haben. Einen Hinweis hierfür lieferte bereits die Western Blot-Analyse freigesetzter Viruspartikel von transfizierten HT1080-Zellen. Um diesen Replikationsvorteil detaillierter zu untersuchen, wurden HT1080-Zellen mit den Virusvarianten E-21-A und E-26-A sowie dem parentalen Virus E-MMP-A infiziert und miteinander verglichen. Als Kontrolle wurde das nicht spaltbare Virus E-A eingesetzt. Die Replikation der Viren wurde durch immunzytologische Färbung infizierter Zellen und durch Messung der RT-Aktivität in Zellkulturüberständen verfolgt.

Zunächst wurde die Replikation der Viren durch immunzytologische Färbung infizierter Zellen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion untersucht.

Dazu wurden die Viren in HEK-293T-Zellen hergestellt und anschließend auf HT1080-Zellen titriert (s. 2.5.2), um zu Beginn der folgenden Replikationsstudie gleich viele Zellen mit den jeweiligen Viren zu infizieren. Je Virus wurden 1×10^5 HT1080-Zellen mit einer niedrigen MOI (*multiplicity of infection*) von 0,01 infiziert und 48 h (nicht gezeigt) bzw. 72 h kultiviert. Infizierte Zellen wurden anschließend mittels Immunperoxidase-Test (s. 2.5.5) detektiert (Abb. 16).

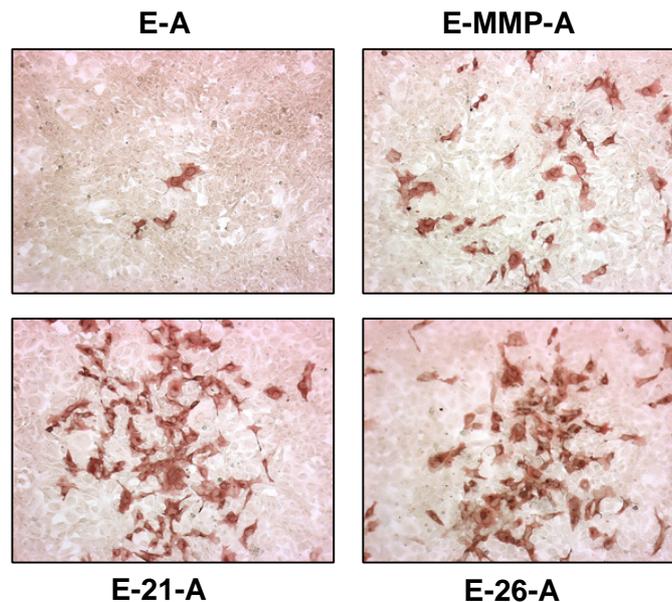


Abb. 16: Nachweis der Replikation verschiedener Viren in HT1080-Zellen

Die Replikation der selektierten Viren E-21-A und E-26-A im Vergleich zum parentalen Virus E-MMP-A wurde mittels Immunperoxidase-Test 72 h nach Infektion (MOI = 0,01) nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde nicht spaltbares Virus E-A eingesetzt.

Die Färbung infizierter Zellen 72 h nach Infektion zeigte die Ausbreitung der Viren E-MMP-A, E-21-A und E-26-A. Das nicht spaltbare Virus E-A zeigte dagegen, wie erwartet, kaum infizierte Zellen. Die Ausbreitung der Viren ist durch die Bildung der Foci charakterisiert (Abb. 16). Interessanterweise unterscheidet sich die Morphologie der Foci der selektierten Viren E-21-A und E-26-A von denen des parentalen Virus E-MMP-A. Die selektierten Viren formten dichte, kompakte Foci, die sogar makroskopisch zu sehen waren (Abb. 16, untere Reihe). Dagegen waren die Foci des Virus E-MMP-A weniger dicht, und die infizierten Zellen waren weiter voneinander entfernt (Abb. 16, rechts oben). Gleichfalls waren im gegebenen Zeitraum nur halb so viele Zellen innerhalb eines E-MMP-A-Foci Virus-po-

sitiv (vgl. rechte Felder miteinander). Demnach breiteten sich die selektionierten Viren E-21-A und E-26-A schneller von primär infizierten Zellen aus als die parentalen Viren E-MMP-A. Dies deutete auf einen Replikationsvorteil der selektionierten Viren in HT1080-Zellen hin, der an ihrer Selektion aus den Bibliotheken beteiligt war.

Um die Ausbreitung der selektionierten Viren über einen längeren Zeitraum in HT1080-Zellen zu verfolgen, wurden die RT-Aktivitäten in Zellkulturüberständen gemessen und mit dem parentalen Virus verglichen.

Dazu wurden 4×10^5 HT1080-Zellen, wie zuvor beschrieben, mit den Viren E-MMP-A, E-21-A und E-26-A (MOI 0,01) infiziert und anschließend vier Tage kultiviert. Innerhalb der vier Tage wurden je Virus zehn Proben des Zellkulturüberstands entnommen und die RT-Aktivität mittels RT-Test gemessen. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 17) sind von zwei unabhängigen Infektionen die über den gesamten Zeitraum gemessenen RT-Aktivitäten je Virus graphisch dargestellt.

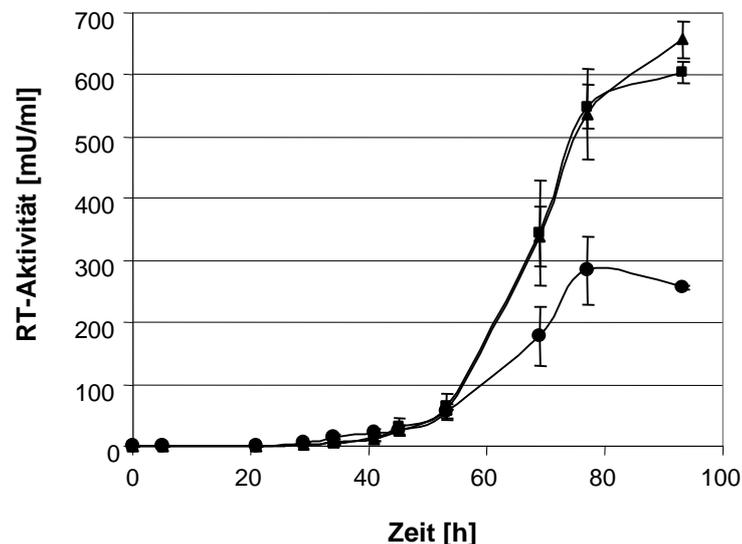


Abb. 17: Ausbreitung selektionierter Viren in HT1080-Zellen

Die RT-Aktivität in Zellkulturüberständen zu den angegebenen Zeitpunkten wurden sowohl von den selektionierten Viren E-21-A (Quadrate) und E-26-A (Dreiecke) als auch von dem parentalen Virus E-MMP-A (Kreise) gemessen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Infektionen.

Während der ersten 50 h nach der Infektion war der Anstieg der RT-Aktivitäten für alle Viren in den Zellkulturüberständen gleich. Jedoch ab diesem Zeitpunkt nahmen die RT-Aktivitäten der selektionierten Viren E-21-A und E-26-A deutlich schneller zu, bis sie zum Ende der Messreihe (96 h p.i.) eine zweifach höhere Aktivität im Vergleich zum parentalen Virus E-MMP-A erreichten (Abb. 17). Diese Beobachtung bestätigte die schnellere Ausbreitung der selektionierten Viren aus der zuvor beschriebenen immunzytologischen Färbung infizierter Zellen.

Im Gegensatz zum parentalen Virus E-MMP-A schienen die RT-Aktivitäten der selektionierten Viren am Tag 4 noch nicht ihren Sättigungsbereich erreicht zu haben. Deshalb wurde die Kultivierung dieser Zellen fortgesetzt, um den Zeitpunkt einer vollständigen Infektion der HT1080-Zellpopulation und die Infektiosität der Viren festzustellen.

Dazu wurden am vierten Tag nach Infektion die Zellen in T75-Zellkulturflaschen umgesetzt. Ein Aliquot der Zellen wurde in 24-Loch-Zellkulturplatten überführt und die virushaltigen Zellkulturüberstände auf nicht infizierten HT1080-Zellen ausstitriert. Die Anzahl infizierter Zellen und die Infektiosität der Überstände wurde mittels Immunperoxidase-Test ermittelt. Das gleiche wurde am neunten Tag nach Infektion wiederholt. Die Ergebnisse der Immunperoxidase-Tests sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 6: Der relative Anteil infizierter HT1080-Zellen nach Viruspassage und die Infektiosität der Zellkulturüberstände

	Tag 5		Tag 9	
	% inf. Zellen	i.U. / ml	% inf. Zellen	i.U. / ml
E-MMP-A	12,5	2×10^2	10	9×10^3
E-21-A	21,5	1×10^3	90	3×10^6
E-26-A	43	7×10^3	90	1×10^7

Am Tag 5 hatte keines der Viren die HT1080-Zellpopulation vollständig infiziert. Dennoch waren durch die selektionierten Viren mehr Zellen infiziert worden (21,5 und 43 %) als durch das parentale Virus (12,5 %). Die Infektiositäten von E-21-A und E-26-A waren zu diesem Zeitpunkt etwa 10-fach höher als die von E-MMP-A. Am Tag 9 hatten beide selektionierten Viren etwa 90 % der Zellpopulation infiziert. Das Virus E-MMP-A hatte sich dagegen nicht weiter in der Zellpopulation ausgebreitet (10 %). Die Infektiositäten der selektionierten Viren waren zu diesem Zeitpunkt etwa 1000-fach höher als von E-MMP-A. Diese hohen Titer der selektionierten Viren waren nicht auf eine Deletion der Blockierungsdomäne EGF zurückzuführen, was durch RT-PCR überprüft wurde (nicht gezeigt).

Im Gegensatz zum parentalen Virus waren die selektionierten Viren E-21-A und E-26-A somit in der Lage, aufgrund ihres Replikationsvorteils, der sich durch das Infektionsexperiment andeutete und durch die RT-Aktivitäten bestätigt wurde, nach neun Tagen die HT1080-Zellpopulation fast vollständig zu infizieren. Außerdem erreichten die selektionierten Viren zu diesem Zeitpunkt bis zu 1000-fach höhere Infektiositäten auf HT1080-Zellen.

3.3.4 MMP-abhängige Virusausbreitung, Zelleintritt und Partikelfreisetzung selektionierter Viren

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die stärkere Ausbreitung der selektionierten Viren in HT1080-Zellen auf einer erhöhten Sensitivität gegenüber MMP-Aktivität beruhte. Weiterhin sollte untersucht werden, ob möglicherweise ein schnellerer Zelleintritt der selektionierten Viren vorliegt und vermehrt Viruspartikel von HT1080-Zellen freigesetzt werden. Da bisher kein Unterschied zwischen den beiden selektionierten Viren E-21-A und E-26-A sowohl in den Western Blot-Analysen als auch in den Replikationsstudien in HT1080-Zellen festzustellen gewesen war, wurden die folgenden Untersuchungen nur mit dem Virus E-26-A durchgeführt.

3.3.4.1 MMP-abhängige Virusausbreitung

Um eine MMP-abhängige Ausbreitung der selektionierten Viren auf HT1080-Zellen zu zeigen, wurde deren Infektiosität in An- und Abwesenheit eines synthetischen MMP-Breitbandinhibitors ermittelt und mit der des parentalen Virus E-MMP-A verglichen. GM6001 ist ein solcher Breitbandinhibitor, der MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 und MMP-9 inhibiert (Galardy *et al.*, 1994).

Damit ein unspezifischer Einfluss der synthetischen Substanz GM6001 auf die Infektiosität ausgeschlossen werden konnte, wurde in die Ansätze ohne Inhibitor die Kontrollsubstanz „GM6001 Negativkontrolle“ hinzugegeben. Als weitere Kontrolle wurde das Wildtyp-Virus (WT) mitgeführt.

Zunächst wurden die infektiösen Titer HEK-293T-produzierter Viren E-MMP-A, E-26-A und WT auf HT1080-Zellen ermittelt (nicht gezeigt). Anschließend wurden in drei unabhängigen Experimenten je Virus 1×10^5 HT1080-Zellen mit einer MOI von 0,5 in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ GM6001 bzw. „GM6001 Negativkontrolle“ 4 h infiziert. Vor und nach Infektion wurden die Zellen in Medium kultiviert, welches die jeweilige Substanz enthielt. Die Anzahl der infizierten Zellen wurde schließlich mittels Immunperoxidase-Test 30 h nach Infektion ermittelt (Abb. 18).

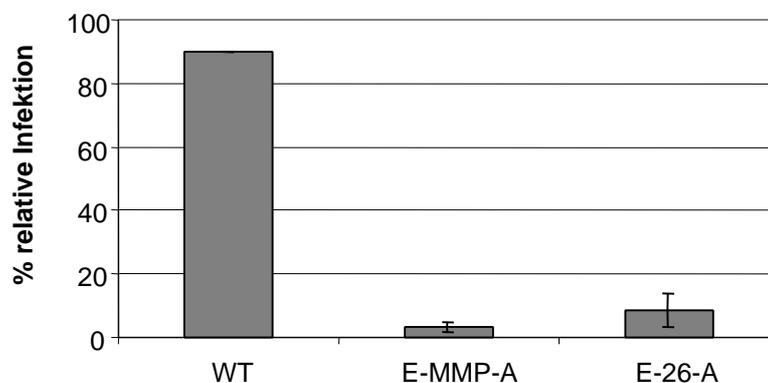


Abb. 18: Einfluss des spezifischen MMP-Inhibitors GM6001 auf den viralen Zelleintritt des selektionierten Virus E-26-A.

Mit den Viren WT, E-MMP-A und E-26-A (MOI 0,5) wurden 1×10^5 HT1080-Zellen in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ GM6001 bzw. Kontrollsubstanz 4 h infiziert. Die Anzahl der infizierten Zellen wurde 30 h nach Infektion mittels Immunperoxidase-Test ermittelt. Die mittlere relative Infektiosität aus drei unabhängigen Experimenten ist graphisch dargestellt.

Die relative Infektiosität der Viren E-MMP-A und E-26-A auf HT1080-Zellen in Anwesenheit des MMP-Inhibitors GM6001 lag unter 10 % (3,17 und 8,61 %). Die Infektiosität des Wildtypvirus (WT) wurde mit 90 % kaum beeinflusst (Abb. 18).

Beide Viren, E-MMP-A und E-26-A, zeigten eine in etwa gleichstarke MMP-abhängige Infektiosität auf HT1080-Zellen. Dies deutete erneut auf eine Aktivierung der selektionierten Viren durch MMPs hin.

3.3.4.2 Zelleintritt

Die beobachtete verstärkte Ausbreitung der selektionierten Viren E-21-A und E-26-A und die Spaltung ihrer Hüllproteine in HT1080-Zellen ließ die Vermutung eines schnelleren Zelleintritts als beim parentalen Virus zu. Dieser sollte durch eine Zelleintrittskinetik von Virus E-26-A verglichen mit einer des parentalen Virus E-MMP-A auf HT1080-Zellen nachgewiesen werden.

Zunächst wurden die RT-Aktivitäten von HEK-293T-produzierten Viren E-MMP-A und E-26-A gemessen, um äquivalente Mengen RT-Aktivität je Virus, d.h. gleiche Partikelmengen, für das Zelleintrittsexperiment einzusetzen. Anschließend wurden je Virus und Zeitpunkt 1×10^5 HT1080-Zellen mit gleichen Mengen RT-Aktivität (140 mU) infiziert. Je Virus wurde die Infektion der Zellen nach 1, 3, 10 und 30 Minuten durch Zugabe des MMP-Inhibitors GM6001 (10 μ M) gestoppt. Anschließend wurden die infizierten Zellen in GM6001-haltigem Medium kultiviert, damit die proteolytische Aktivität der MMPs inhibiert blieb. Vier Stunden nach Infektion wurde der Reverse Transkriptase-Inhibitor AZT (10 μ M) hinzugegeben, um sekundäre Infektionen zu blockieren. Die primär infizierten Zellen wurden 20 Stunden nach Infektion mittels Immunperoxidase-Test detektiert. Die mittlere Anzahl der Zelleintritte je Virus und Zeitpunkt von drei unabhängigen Experimenten ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 19) graphisch dargestellt.

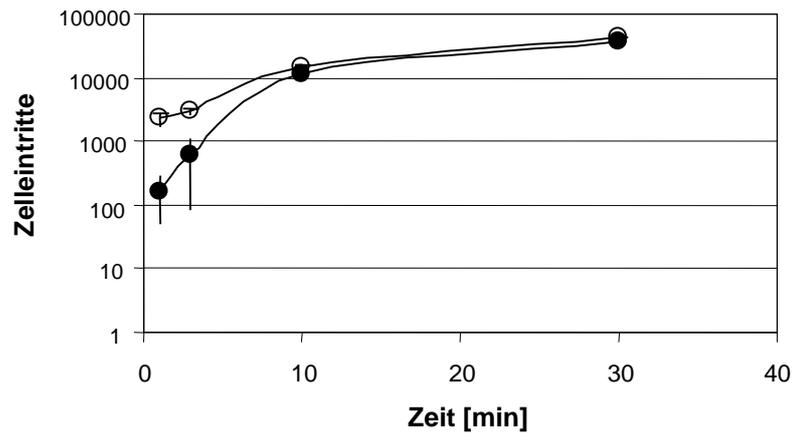


Abb. 19: Zelleintrittskinetik des parentalen und selektionierten Virus

Je Zeitpunkt wurden 1×10^5 HT1080-Zellen mit 140 mU RT-Aktivität der Viren E-MMP-A (offene Kreise) und E-26-A (geschlossene Kreise) infiziert. Jede Virusvariante hatte für 1, 3, 10 und 30 min Zeit in die Zellen einzutreten, bevor weitere Zelleintritte durch Zugabe des MMP-Inhibitors GM6001 (10 μ M) blockiert wurden. Die Replikation der Viren wurde durch die spätere Zugabe (4 h p.i.) des RT-Inhibitors AZT (10 μ M) unterbunden. Die Anzahl infizierter Zellen wurde mittels Immunperoxidase-Test ermittelt. Die mittlere Anzahl der Zelleintritte (logarithmische Skalierung) je Zeitpunkt aus drei unabhängigen Experimenten ist graphisch dargestellt.

Die Anzahl der Zelleintritte war für beide Viren nach 10 Minuten gleich. Dagegen waren deutliche Unterschiede zu sehen, wenn weniger Zeit für den Zelleintritt gegeben wurde. So war die Anzahl der Zelleintritte des selektionierten Virus E-26-A innerhalb der ersten Minute 10-fach und innerhalb von drei Minuten 6-fach höher im Vergleich zum parentalen Virus E-MMP-A (Abb. 19). Die verstärkte Ausbreitung selektionierter Viren kann also auf eine beschleunigte Zelleintrittskinetik zurückgeführt werden, welche auf eine effizientere MMP-Spaltung des selektionierten Substratlinkers zurückzuführen sein könnte.

3.3.4.3 Partikelfreisetzung

Im Zuge der Freisetzung von EGF-blockierten Viruspartikeln aus infizierten Zellen ist eine Bindung solcher Viren an den auf den Zellmembranen exponierten EGF-Rezeptor vorstellbar. Entsprechend könnte ein effizienter spaltbarer Substratlinker nicht nur zu einem beschleunigten Zelleintritt, sondern auch zu einer vermehrten Freisetzung von Viruspartikeln führen. Um dies zu untersuchen, sollten vollständig mit den Viren E-MMP-A und E-26-A infizierte HT1080-Zellpopulationen hergestellt

werden, damit eine konstante Partikelfreisetzung in den Zellkulturüberstand erfolgen konnte. Anschließend sollte diese durch Messung der RT-Aktivität über einen Zeitraum von sieben Stunden in An- und Abwesenheit des MMP-Inhibitors GM6001 verfolgt werden.

Zur Herstellung vollständig infizierter HT1080-Zellpopulationen wurden die Zellen in 96-Loch-Zellkulturplatten mit den Viren E-MMP-A und E-26-A infiziert (MOI 10) und innerhalb von 14 Tagen auf 6-Loch-Zellkulturplatten expandiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen zur Messung der RT-Aktivitäten und zur Überprüfung der vollständigen Infektion mittels Immunperoxidase-Test in 24-Loch Zellkulturplatten überführt. Hierbei zeigte sich, dass die E-26-A-infizierten Zellen zu mehr als 95 % infiziert waren, während die mit E-MMP-A-inkubierten Zellen nur zu 50 - 60 % infiziert wurden (nicht gezeigt). Für die Kinetik der Partikelfreisetzung wurden die Zellen in An- und Abwesenheit des MMP-Inhibitors GM6001 (10 µM) kultiviert. Die Entnahme der jeweiligen Proben erfolgte nach 0, 2, 4 und 7 h.

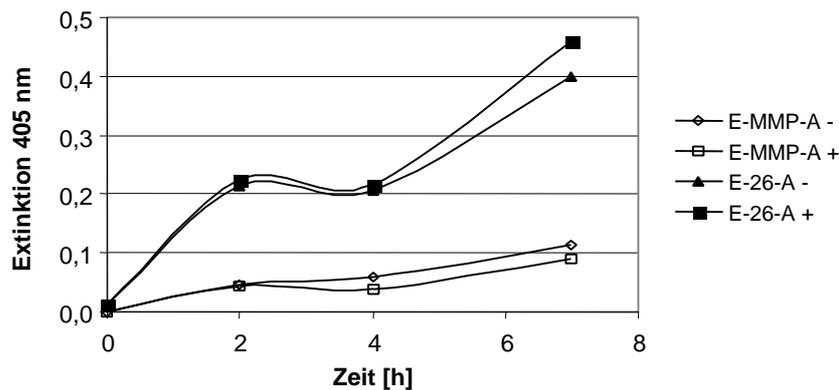


Abb. 20: Kinetik der Partikelfreisetzung des parentalen und selektionierten Virus

Die Partikelfreisetzung E-MMP-A- und E-26-A-infizierter HT1080-Zellen in An- (+) und Abwesenheit (-) des MMP-Inhibitors GM6001 (10 µM) über einen Zeitraum von sieben Stunden. Je Zeitpunkt (0, 2, 4 und 7 h) wurde die RT-Aktivität (Extinktion 405 nm) in 10 µl virushaltigem Zellkulturüberstand mittels RT-Test gemessen.

Die Analyse der gemessenen RT-Aktivitäten zeigte, dass die E-26-A-infizierten Zellen ca. 3,5- bis 4-fach mehr Partikel freisetzen als die E-MMP-A-infizierten Zellen (Abb. 20). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Anteile infizierter Zellen in beiden Zellpopulationen ergab sich also kein nennenswerter Unterschied in der Partikelfreisetzung. Unabhängig davon wurde kein Einfluss des MMP-

Inhibitors GM6001 auf die Partikelfreisetzung sowohl für das parentale (Abb. 20, vgl. E-MMP-A - mit E-MMP-A +) als auch für das selektionierte Virus (Abb. 20, vgl. E-26-A - mit E-26-A +) festgestellt. Somit schien die MMP-Aktivität, im Gegensatz zur Zelleintrittskinetik, keinen Einfluss auf die Partikelfreisetzung beider Virusvarianten zu haben.

3.3.5 Spaltung selektionierter Substratlinker durch Matrix Metalloproteasen *in vitro*

In den Zellkulturüberständen transfizierter HT1080-Zellen konnte bereits die Spaltung der Hüllproteine selektionierter Virusvarianten nachgewiesen werden (s. 3.3.2.2). Des Weiteren wurde die MMP-abhängige Infektiosität auf HT1080-Zellen gezeigt (s. 3.3.4.1). In den folgenden Experimenten sollte deshalb *in vitro* die Spaltung der Substratlinker durch MMPs und damit die MMP-Aktivierung der selektionierten Virusvarianten nachgewiesen werden.

3.3.5.1 Spaltung selektionierter Hüllproteine durch MMP-2

HT1080-Zellen exprimieren hohe Mengen an MMP-2 (Peng *et al.*, 1997; Miyamori *et al.*, 2001; Hartl *et al.*, 2004). Deshalb lag es nahe, die Spaltung der Hüllproteine über den Substratlinker selektionierter Virusvarianten durch MMP-2 *in vitro* zu untersuchen.

Hierfür wurden HEK-293T-produzierte Viruspartikel von E-A, E-MMP-A und E-26-A mit MMP-2 (20 µg/ml) für 40 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle nicht gespaltener Hüllproteine wurden die eingesetzten Viruspartikel nur mit Reaktionspuffer inkubiert. Die Analyse der MMP-2-Spaltung erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden die Viruspartikel deglykosyliert und als Kontrolle gespaltener Hüllproteine dienten deglykosylierte Wildtyp-Viruspartikel (WT) (Abb. 21).

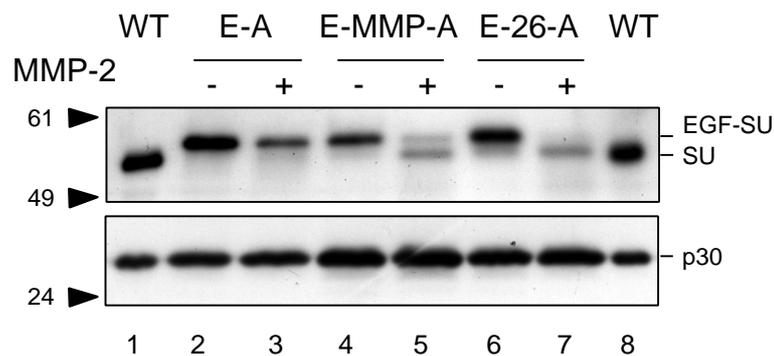


Abb. 21: MMP-2 Spaltung der Hüllproteine selektionierter Viren

Gleiche Mengen HEK-293T-produzierter Viruspartikel je Virusvariante wurden mit MMP-2 (20 µg/ml) (+) oder mit Puffer (-) für 40 min bei 37°C inkubiert und mit PNGase F deglykosyliert. Anschließend wurden im Western Blot die Hüllproteine (SU) und Kapsidproteine (p30) mittels spezifischer Antisera nachgewiesen. Die ungespaltenen (EGF-SU) und gespaltenen (SU) Proteine sind gekennzeichnet. Als Kontrolle für SU wurden deglykosylierte Wildtyp-Viruspartikel eingesetzt (WT).

Die Analyse der Viruspartikel zeigte, dass die Blockierungsdomäne EGF effizient von SU der Viren E-MMP-A und E-26-A durch MMP-2 abgespalten wurde (Abb. 21, obere Reihe, Spur 5 und 7). Das Hüllprotein von E-A wurde nicht gespalten (Spur 3). Während EGF vollständig von den E-26-SU-Proteinen abgespalten wurde, konnte im Fall des parentalen Virus zusätzlich ungespaltenes E-MMP-SU-Protein detektiert werden (vgl. Spur 5 und 7). Die Verwendung gleicher Mengen Viruspartikel mit und ohne MMP-2-Inkubation wurde je Virus durch das virale p30-Signal überprüft (Abb. 21, untere Reihe, Spur 2-7). Der selektierte Substratlinker P-Q-G-L-Y-Q wurde also von MMP-2 gespalten und zeigte im Vergleich zum parentalen Substratlinker P-L-G-L-W-A eine effizientere Spaltung.

Um die Spaltung des Substratlinkers durch MMP-2 in einem anderen Kontext der Blockierung zu demonstrieren, sollte EGF gegen die Blockierungsdomäne CD40L ausgetauscht werden. Die Blockierungsdomäne CD40L ist ein Teil der extrazellulären Domäne des Proteins CD40-Ligand (Morling *et al.*, 1997). Alle viruskodierenden Plasmide der eingesetzten Virusvarianten C-A, C-MMP-A und C-26-A erhielten die Blockierungsdomäne CD40L (Hartl *et al.*, 2004).

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden mit den neuen Plasmiden Viruspartikel in HEK-293T-Zellen hergestellt und anschließend mit und ohne MMP-2 inkubiert.

Darauf folgte die Analyse der deglykosylierten Viruspartikel mittels Western Blot (Abb. 22).

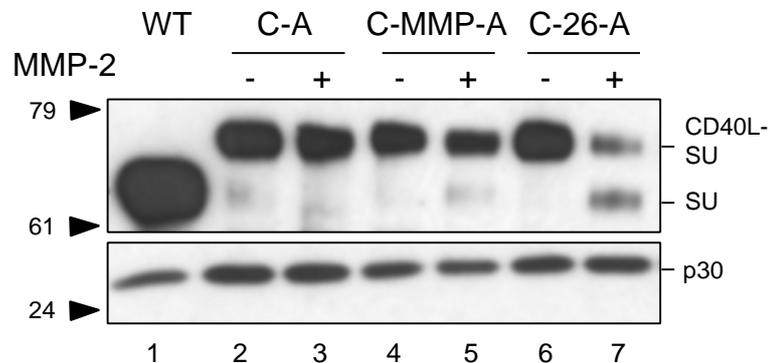


Abb. 22: MMP-2-Spaltung der Hüllproteine selektionierter Viren mit CD40L als Blockierungsdomäne

HEK-293T-produzierte CD40L-blockierte Viruspartikel C-A, C-MMP-A und C-26-A wurden mit MMP-2 (20 µg/ml) (+) oder mit Puffer (-) für 40 min bei 37°C inkubiert und mit PNGase F deglykosyliert. Anschließend wurden im Western Blot die Hüllproteine (SU) und Kapsidproteine (p30) mittels spezifischer Antisera nachgewiesen. Die ungespaltenen (CD40L-SU) und gespaltenen (SU) Proteine sind gekennzeichnet. Als Kontrolle gespaltenen Hüllproteine wurden deglykosylierte Wildtyp-Viruspartikel eingesetzt (WT).

Die Analyse der Viruspartikel zeigte, dass die Blockierungsdomäne CD40L von SU der Viren C-MMP-A und C-26-A durch MMP-2 abgespalten wurde, wenngleich auch hier die Spaltung von C-MMP-A weniger effizient war (Abb. 22, obere Reihe, Spuren 5 und 7). Mehr als die Hälfte aller Hüllproteine von C-26-A lagen gespalten vor, während nur geringe Mengen gespaltenen Hüllproteine für das Virus C-MMP-A detektiert wurden. Das Hüllprotein des C-A Virus wurde nicht gespalten (Spur 2 und 3). Die p30-Signale bestätigten gleiche eingesetzte Mengen Viruspartikel (Abb. 22, untere Reihe, Spur 2-7). Auch im Kontext einer anderen Blockierungsdomäne, fusioniert über den selektionierten Substratlinker P-Q-G-L-Y-Q, konnte also die effizientere Spaltung der Hüllproteine als beim Standardsubstrat durch MMP-2 gezeigt werden.

3.3.5.2 Kinetik der MMP-2 Spaltung selektionierter Hüllproteine

Um die Sensitivität der MMP-2-Spaltung der beiden Substratlinker P-Q-G-L-Y-Q und P-L-G-L-W-A untereinander zu vergleichen, sollte eine Spaltungskinetik der Viruspartikel E-MMP-A und E-26-A *in vitro* durchgeführt werden.

Hierfür wurden je Substratlinker gleiche Mengen HEK-293T-produzierter Viruspartikel für 0, 5, 20 und 40 min mit MMP-2 bei 37°C inkubiert, wobei die enzymatische Reaktion mit Denaturierungspuffer (PNGase F) bei 95°C gestoppt wurde. Anschließend wurden die Partikel deglykosyliert und mittels Western Blot analysiert (Abb. 23).

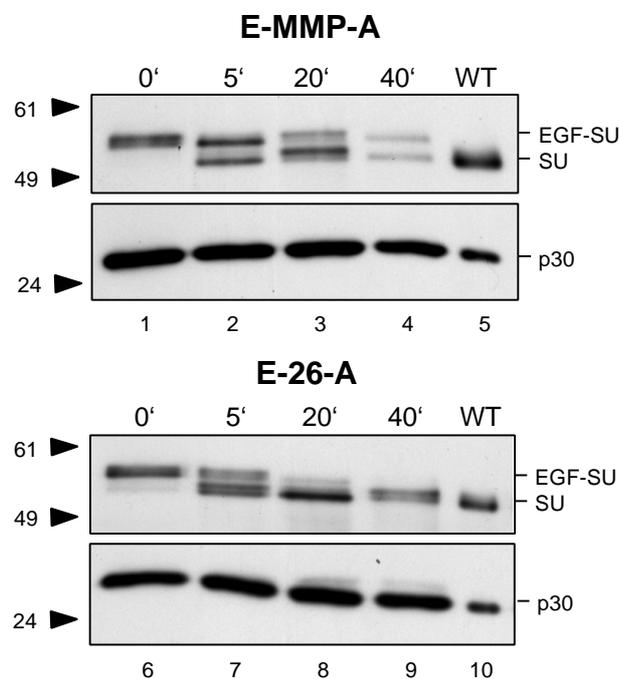


Abb. 23: Kinetik der MMP-2 Spaltung viraler Hüllproteine von E-MMP-A und E-26-A

Gleiche Mengen HEK-293T-produzierter Viruspartikel von E-MMP-A und E-26-A wurden mit MMP-2 (20 µg/ml) für 0, 5, 20 und 40 min bei 37°C inkubiert und mit PNGase F deglykosyliert. Anschließend erfolgte die Analyse durch den Western Blot.

Bereits nach 5 Minuten konnten gespaltene Hüllproteine beider Viren nachgewiesen werden (Abb. 23, Spur 2 und 7). Die densitometrische Analyse der Proteinbanden ungespaltener und gespaltener Hüllproteine zu diesem Zeitpunkt ergab, dass 65 % der Hüllproteine von Virus E-26-A und 45 % der Hüllproteine von E-MMP-A gespalten vorlagen. Nach 20 Minuten lagen 93 % der selektionierten Hüllproteine und 70 % der parentalen Hüllproteine gespalten vor (Spur 3 und 8).

Zu beiden Zeitpunkten wurden mehr selektionierte Hüllproteine gespalten. Nach 40 Minuten veränderte sich das Verhältnis von gespaltenen zu ungespaltenen Hüllproteinen nicht wesentlich (Spur 4 und 9). Zudem war die Abnahme der Signale wahrscheinlich auf eine unspezifische Degradierung der Proteine zurückzuführen. In einem weiteren Experiment wurden die eingesetzte Enzymmenge von MMP-2 halbiert, um die unterschiedlichen Umsatzraten deutlicher densitometrisch messen zu können. Hierbei wurde ein 3,5-facher Unterschied in der Spaltungseffizienz zugunsten des selektierten Substratlinkers P-Q-G-L-Y-Q ermittelt (nicht gezeigt).

Die vergleichenden Spaltungsexperimente *in vitro* zeigten die Abspaltung der Blockierungsdomäne EGF über den Substratlinker selektierter Hüllproteine durch MMP-2. Die Spaltung des selektierten Substratlinkers erfolgte effizienter als die des parentalen Substratlinkers.

3.3.5.3 Spaltung selektierter Hüllproteine durch weitere MMPs *in vitro*

MMP-2 ist wahrscheinlich nicht die einzige Matrix Metalloprotease, die den Substratlinker *in vitro* spaltet. Deshalb wurde die Spaltung der selektierten Substratlinker durch weitere MMPs *in vitro* analysiert. Hierzu wurde eine Virusvariante untersucht, deren Substratlinker P-Q-G-L-Y-K dem selektierten Konsensusmotiv P-Q-G-L-Y-[Q/K] (vgl. 3.1.5) entsprach.

Es wurden gleiche Mengen rekombinanter MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MT1-MMP) (10 µg/ml) mit HEK-293T-produzierten Viruspartikeln 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert (Abb. 24).

Alle untersuchten MMPs waren in der Lage die Blockierungsdomäne EGF von dem SU des selektierten Hüllproteins abzuspalten (Abb. 24, Spuren 1-6), wobei Unterschiede in der Spaltungseffizienz zu erkennen waren. So wurde das selektierte Hüllprotein überraschenderweise am besten von MT1-MMP gespalten (Spur 6). Weniger effizient schienen MMP-3 und dann MMP-2 zu spalten (Spuren 3 und 2) gefolgt von MMP-1 und MMP-8 (Spuren 4 und 1). Kaum gespalten wurde das Hüllprotein von MMP-9 (Spur 5). Als Kontrollen der Spaltung wurden die Viren E-A und WT (Spur 7 und 9) eingesetzt.

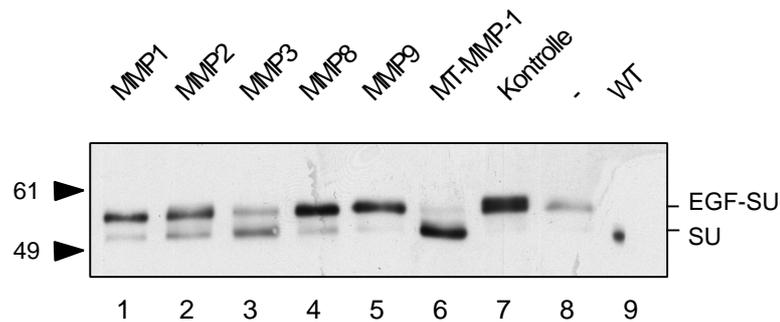


Abb. 24: Spaltung selektionierter Hüllproteine durch verschiedene MMPs *in vitro*

Gleiche Mengen HEK-293T-produzierter Viruspartikel mit dem Substratlinker P-Q-G-L-Y-K wurden mit MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 und der katalytischen Domäne von MT1-MMP (10 µg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und mit PNGase F deglykosyliert. Anschließend erfolgte die Analyse durch den Western Blot.

Zusammenfassend scheint also *in vitro* eine Spaltungseffizienz durch die hier eingesetzten MMPs in folgender Reihenfolge vorzuliegen: MT1-MMP > MMP-3 > MMP-2 > MMP-1 > MMP-8 > MMP-9.

Somit ist eine Aktivierung des blockierten Virus durch weitere MMPs außer MMP-2 in HT1080-Zellen durchaus möglich. Ob jedoch die MMPs, die *in vitro* am effizientesten spalten, auch in Zellkultur bzw. *in vivo* am stärksten an der proteolytischen Aktivierung der selektionierten Viren beteiligt sind, lässt sich aufgrund bestimmter Expressions- und Aktivierungsprofile der MMPs mit diesen Daten noch nicht eindeutig sagen.

3.3.6 Infektion „MMP-negativer“ Zellen

In einem abschließenden Experiment zur Charakterisierung selektionierter Virusvarianten sollte deren Infektiosität auf Zellen ermittelt werden, die eine hohe EGF-Rezeptordichte haben, aber kaum MMP-2 exprimieren. Mit diesen sogenannten „MMP-negativen“ Zellen sollte die Selektivität der selektionierten Virusvarianten für HT1080-Zellen, also für sogenannte „MMP-positive“ Zellen, demonstriert werden. Des weiteren sollte die Wiederherstellung der Infektiosität durch MMP-2-Spaltung des Substratlinkers auf „MMP-negativen Zellen“ gezeigt werden. Für A431-Zellen, eine humane epidermoide Karzinomzelllinie, wurden sowohl eine hohe EGF-

Rezeptordichte als auch eine geringe MMP-2 Expression gezeigt (Cosset *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 1997; Wittmann, 2000; Hartl *et al.*, 2004).

Zum Nachweis der selektiven Infektiosität für HT1080-Zellen wurden zunächst Viruspartikel von E-MMP-A und E-26-A in HEK-293T-Zellen hergestellt und deren RT-Aktivität mittels RT-Test gemessen. Mit gleichen Mengen RT-Aktivität in einer Verdünnungsreihe wurden je Virusvariante 1×10^5 HT1080- und A431-Zellen infiziert. Zum Nachweis der Aktivierbarkeit wurden Infektionsansätze vor Infektion der A431-Zellen mit MMP-2 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Anzahl infizierter Zellen (Infektiosität) wurde mittels Immunperoxidase-Test ermittelt. Die Infektiositäten der beiden Viren auf A431-Zellen mit und ohne vorherige MMP-2-Behandlung wurde mit den Infektiositäten auf HT1080-Zellen aus je drei unabhängigen Experimenten verglichen und in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 25) dargestellt.

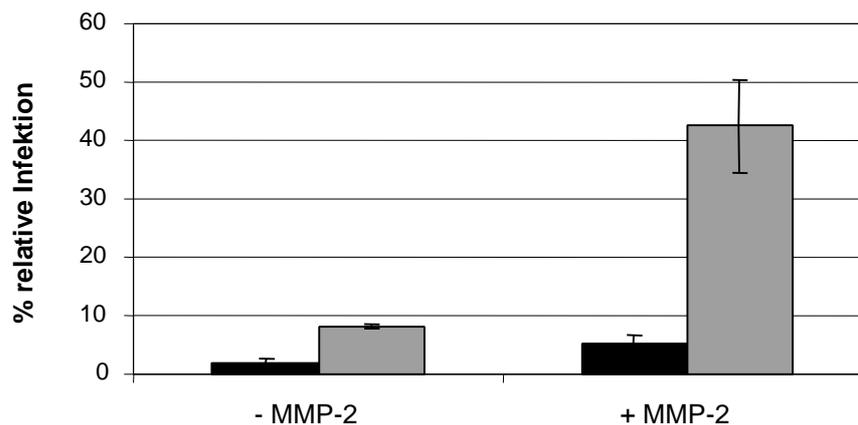


Abb. 25: Relative Infektiosität und proteolytische Aktivierung der selektionierten Viren auf A431-Zellen

Mit gleichen Mengen RT-Aktivität der Viren E-MMP-A (schwarz) und E-26-A (gestreift) wurden A431-Zellen infiziert (- MMP-2). Parallel wurden A431-Zellen mit den gleichen Mengen RT-Aktivität der beiden Viren infiziert, welche zuvor 1 h bei 37°C mit MMP-2 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert wurden (+ MMP-2). Die Anzahl infizierter Zellen wurde 20 h nach Infektion durch den Immunperoxidase-Test bestimmt. Die ermittelten Infektiositäten wurden relativ zur Infektiosität auf HT1080-Zellen bezogen, die für die eingesetzten Partikelmengen ermittelt wurden. Das Ergebnis aus je drei unabhängigen Experimenten ist graphisch dargestellt.

Die Infektiosität beider Viren, E-MMP-A und E-26-A, war auf A431-Zellen mehr als 10-fach gegenüber HT1080-Zellen reduziert. Durch die Inkubation mit MMP-2

konnten die Infektiositäten beider Viren erhöht werden. Das selektionierte Virus E-26-A erreichte nach MMP-2 Inkubation mit 40 % fast die Hälfte seiner Infektiosität auf HT1080-Zellen (Abb. 25).

Somit konnte die Selektivität der selektierten Virusvariante für HT1080-Zellen gezeigt werden und die Abhängigkeit der MMP-Aktivierung, hier durch MMP-2, bestätigt werden.

4. Diskussion

Die Identifizierung und Charakterisierung der Substrate tumorassoziierter Proteasen (TAPs) unter natürlichen Bedingungen ist für die Entwicklung und Optimierung TAP-aktivierbarer Therapeutika, einschließlich TAP-aktivierbarer Retroviren, essentiell. Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmalig die Selektion solcher Substrate in lebenden Tumorzellen mit Hilfe retroviraler Bibliotheken, die auf Protease-aktivierbaren Retroviren basieren. Hier gelang beispielhaft und richtungsweisend die Selektion von MMP-Substraten und damit verbunden die gerichtete Evolution MMP-aktivierbarer Retroviren mit verbesserten molekularen Eigenschaften.

In nur zwei Diversifizierungsschritten des parentalen MMP-Standardsubstrates P-L-G-L-W-A und der anschließenden Selektion der daraus hervorgegangenen retroviralen Bibliotheken konnten innerhalb kurzer Zeit MMP-aktivierbare Retroviren selektioniert werden, die sich verstärkt in HT1080-Zellen ausbreiteten und bis zu 1000-fach höhere Infektiositäten als das parentale Virus erreichten (vgl. 3.3.3). Dabei behielten sie die MMP-Abhängigkeit ihrer Infektion bei (vgl. 3.3.4.1) und zeigten eine verbesserte proteolytische Aktivierung ihrer Substratlinker (vgl. 3.3.5). Letztendlich waren hierfür nur zwei selektionierte Aminosäureaustausche im parentalen MMP-Substrat P-L-G-L-W-A, nämlich Glutamin (Q) an der Position P2 und Tyrosin (Y) an Position P2' (vgl. 3.1.1 und 3.1.5), verantwortlich.

4.1 Herstellung und Etablierung des Selektionssystems

Das hier diversifizierte MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A ist ein vielseitig eingesetztes Peptid, das von verschiedenen MMPs effizient zwischen Glycin und Leucin hydrolysiert wird (Woessner und Nagase, 2000). Es wird seit langem als isoliertes Peptid für biochemische Analysen einzelner MMPs (Beispiele in Stack und Gray, 1989; Zhang und Gray, 1996; Park *et al.*, 2000) und seit kurzem zur Entwicklung MMP-aktivierbarer Therapeutika für die Tumorthherapie (Liu *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003), einschließlich MMP-aktivierbarer Retroviren, eingesetzt (Peng *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999). Somit stellte das Peptid für diese Arbeit

nicht nur ein geeignetes Ausgangssubstrat zur Etablierung des retroviralen Selektionssystems dar, sondern bot gleichzeitig auch einen direkten Anwendungsbezug für die Übertragbarkeit der selektionierten Substratlinker in den Kontext MMP-aktivierbarer Therapeutika.

Die Diversifizierungen des MMP-Standardsubstrates erfolgten durch die Verwendung degenerierter Oligonukleotide, die auf genomischer Ebene zwischen die Blockierungsdomäne EGF und SU des amphotropen MLV eingefügt wurden (vgl. 3.1.2). Die degenerierten Oligonukleotide wurden hierfür durch das herkömmliche sogenannte Phosphoramidit-Verfahren hergestellt. Dabei können während der Synthese beliebig miteinander kombinierte Nukleotid-Vorläufer (gemäß IUB-Kode) je Position angeboten werden, um die diversifizierten Kodons zu generieren. Auf diese Weise konnten die Kodons für Arginin ausgeschlossen werden, wodurch eine Selektion der Substratlinker durch Proprotein-Konvertasen vermieden wurde (vgl. 3.3.2.1). Allerdings bedingte dies auch, die Kodons weiterer Aminosäuren auszuschließen. Demzufolge wurden in der E-X3-A-Bibliothek nur 1452 Kombinationen angeboten, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Selektion von MMP-Substraten zudem erhöht wurde (vgl. 3.1.1). Nach erfolgreicher Selektion wurde in der E-X3rev-A-Bibliothek die kombinatorische Vielfalt des Substratlinkers auf 4896 Kombinationen erweitert (vgl. 3.1.6).

Für zukünftige Selektionen retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken könnte es sich jedoch als vorteilhaft erweisen, die Kodons beliebiger Aminosäuren, wie hier von Arginin, exklusiv an beliebigen Positionen im Substratlinker auszuschließen. Dies kann beispielsweise durch die Synthese der Oligonukleotide unter Verwendung von Dinukleotid- oder Trinukleotidbausteinen, sogenannter Dimer- bzw. Trimer-Phosphoramidite, erreicht werden (Virnekäs *et al.*, 1994; Neuner *et al.*, 1998). Hierbei könnten sogar die vom Wirt bevorzugten Kodons generiert werden (Yang *et al.*, 1996), und zudem würden die Kombinationen auf Kodon-Ebene der kombinatorischen Vielfalt auf Protein-Ebene entsprechen (keine degenerierten Kodons je Aminosäure vorhanden). Dadurch würde sich auch die Anzahl der benötigten Transfektanten zur Erzeugung der Bibliothek auf Partikel-Ebene reduzieren lassen. Allerdings sind diese Synthese-Verfahren zur Zeit patentrechtlich geschützt. Im allgemeinen wird die kombinatorische Vielfalt eines diversifizierten Substrates durch die Anzahl der Aminosäurepositionen bestimmt. Um beispielsweise nach dem herkömmlichen Syntheseverfahren sechs komplett diversifizierte Positionen

im Substratlinker einer retroviralen Bibliothek anzubieten, müssten $2,5 \times 10^9$ Zellen transfiziert werden, damit mindestens 90 % der Kodon-Kombinationen auf Partikel-Ebene abgedeckt werden (Deperthes, 2002). In dieser Arbeit konnte die benötigte Anzahl zu transfizierender Zellen auf ein technisch leicht durchführbares Maß reduziert werden, indem zwei aufeinanderfolgende Diversifizierungen des MMP-Standardsubstrates an jeweils drei voneinander verschiedenen Positionen durchgeführt wurden. So wurden für die E-X3-A- und E-X3rev-A-Bibliothek nur 3456 bzw. 54144 (entspricht der genetischen Vielfalt) primäre Transfektanten benötigt (vgl. 3.1.1 und 3.1.6).

Für die Etablierung des Selektionssystems waren die bisherigen Erfahrungen mit der Selektion retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken noch sehr gering. Die erste erfolgreich selektionierte Bibliothek war eine ecotrope MLV-Bibliothek, die einen an sieben Positionen diversifizierten Substratlinker trug. Das dafür angewendete Selektionsprotokoll beinhaltete zunächst die Herstellung der Virus-Bibliothek in nicht suszeptiblen „*Producer*“-Zellen, um die benötigte hohe Individuenzahl auf Partikel-Ebene zu erzeugen. Anschließend erfolgte die Selektion in suszeptiblen Zielzellen durch Inkubation der Virus-Bibliothek gefolgt von mehreren Zellpassagen (Buchholz *et al.*, 1998). In einer weiterführenden Arbeit wurde die Selektion der ersten amphotropen MLV-Bibliothek (kombinatorische Vielfalt von $2,5 \times 10^6$ Kombinationen auf Protein-Ebene) durch direkte Transfektion der Zielzellen versucht. Das hierbei durchgeführte Selektionsprotokoll beinhaltete ein frühes Passagieren der Zielzellen mit dem Mischen nicht infizierter Zellen. Dies führte jedoch zur genomischen Deletion der Blockierungsdomäne EGF, welche sehr wahrscheinlich auf einen zu hoch angelegten Selektionsdruck durch das Passagierungsverfahren zurückzuführen war (Wittmann, 2000).

Basierend auf diesem Protokoll wurden in der vorliegenden Arbeit die viruskodierenden Plasmid-Bibliotheken in die Zielzellen transfiziert, wobei jede Variante beider Bibliotheken mindestens in 10-facher Kopie auf genetischer Ebene vertreten war (vgl. 3.1.3 und 3.1.7). Zudem erwies sich als vorteilhaft, die transfizierten Zellen länger zu expandieren, wobei höhere Zellmengen passagiert wurden, bevor in der letzten Passage nicht infizierte Zellen zur Erhöhung des Selektionsdrucks untergemischt wurden (vgl. 3.1.3). Diese verlängerte Expansion sorgte für eine Kopplung des Genotyps mit dem Phänotyp. Unmittelbar nach der Transfektion

können nämlich Partikel entstehen, deren virale Genome nicht den entsprechenden Substratlinker des eingebauten Hüllproteins kodieren, weil die transfizierten Zellen mehr als ein Plasmid aufgenommen hatten. Später wurde aus diesen Gründen für die erfolgreiche Selektion einer weiteren amphotropen MLV-Bibliothek mit einer höheren genetischen Vielfalt (ca. $1,6 \times 10^6$) ein Ko-Kultivierungssystem von „*Producer*“- und Zielzellen etabliert. Hierbei konnten mindestens ca. $2,5 \times 10^6$ Partikel (entsprechend der Anzahl primär transfizierter „*Producer*“-Zellen) erzeugt werden, die gleichzeitig mit den Zielzellen inkubiert wurden (Hartl *et al.*, 2004).

4.2 Die treibende Kraft der Selektion

Die Selektion retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken *in vivo* wird durch verschiedene, molekulare Parameter bestimmt. So stellt sich die Frage, welche für die Selektion der Substratlinker verantwortlich waren, und welche es den entsprechenden Virusvarianten ermöglichten, sich in der Viruspopulation durchzusetzen (*survival of the fittest*). Hier konnten zwei molekulare Parameter mit Hilfe biochemischer Analysen identifiziert werden, die sich durch die Selektion verändert hatten. Einerseits konnte die Spaltung des selektionierten Substratlinkers P-Q-G-L-Y-Q (Virus E-26-A) durch MMP-2 mit einer höheren Umsatzrate gegenüber dem parentalen Substratlinker P-L-G-L-W-A (Virus E-MMP-A) gezeigt werden (vgl. 3.3.5.2). Andererseits wurde eine verstärkte Inkorporation der selektionierten Hüllproteine in die Partikel festgestellt, die den Substratlinker P-Q-G-L-Y-A (Virus E-21-A) oder P-Q-G-L-Y-Q (Virus E-26-A) trugen (vgl. 3.3.2.1). Ein dritter Parameter, der möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf die Selektion hatte, war das Auftreten von „Stopkodonmutanten“ (vgl. 3.2).

Die verstärkte Inkorporation selektionierter Hüllproteine in die Partikel war eine unerwartete Beobachtung, die zudem mit einer erhöhten Oberflächenexpression der viralen Hüllproteine auf der Zelle korrelierte (vgl. 3.3.2.1). Dieser beobachtete Effekt der Inkorporation beruhte wahrscheinlich auf einer verbesserten Faltung bzw. Prozessierung der selektionierten Hüllproteine, was einen verbesserten Transport zur Zelloberfläche bedingt haben könnte. In der Tat konnte eine relative Zunahme der prozessierten Hüllproteine gegenüber den Env-Vorläuferproteinen

nachgewiesen werden. Die Hüllproteine des parentalen Virus wurden dagegen eher ineffizient an die Zelloberfläche transportiert, da hier weitaus weniger Hüllproteine in die Partikel eingebaut wurden (vgl. 3.3.2.1). Die verstärkte Inkorporation könnte demnach eine Rolle im Selektionsprozess gespielt haben.

Allerdings deuten drei voneinander unabhängige Hinweise darauf hin, dass die selektionierten Substratlinker in erster Linie MMP-Substrate mit verbesserter proteolytischer Sensitivität darstellen (vgl. 3.3.5.2), und somit die verbesserte proteolytische Aktivierung die treibende Kraft im Selektionsprozess war. Erstens wurde zwischen den selektionierten Virusvarianten ein zweifacher Unterschied in der relativen Inkorporationsrate festgestellt (vgl. 3.3.2.1), ohne Unterschiede in der Ausbreitungseffizienz in HT1080-Zellen zur Folge zu haben (vgl. 3.3.3). Ebenso zeigte das nicht spaltbare Virus E-A eine erhöhte Inkorporationsrate des Hüllproteins gegenüber dem parentalen Virus, ohne sich dadurch in HT1080-Zellen ausbreiten zu können (vgl. 3.3.2.1 und 3.3.3). Zweitens wurde kürzlich nachgewiesen, dass geringe Mengen inkorporierter Hüllproteine in MLV-Partikeln für eine Infektion ausreichen, und eine höhere Menge kaum eine Verbesserung der Infektiosität verursacht (Bachrach *et al.*, 2000). Drittens erfolgte eine effizientere Spaltung des Substratlinkers P-Q-G-L-Y-Q auch im Kontext einer anderen Blockierungsdomäne (CD40L) (vgl. 3.3.5.1), ohne dass eine erhöhte Inkorporationseffizienz des Hüllproteins festgestellt wurde (Hartl *et al.*, 2004). Daher zeigten diese Viren (Virus C-26-A) eine stärkere Ausbreitung in HT1080-Zellen sowie weiteren „MMP-positiven Zellen“ gegenüber dem parentalen Virus (C-MMP-A) (Hartl *et al.*, 2004). Ein weiterer Beleg geht aus der Selektion von Furin-aktivierbaren Retroviren mit Hilfe der ecotropen MLV-Bibliothek hervor. Hier wurden sehr heterogene Aminosäuresequenzen zusammen mit dem Furin-Konsensusmotiv R-X-X-R in den Substratlinkern selektioniert, wobei keine Unterschiede in der Inkorporation der entsprechenden Hüllproteine festgestellt wurden (Buchholz *et al.*, 1998).

Somit ist mit ziemlicher Sicherheit die effizientere proteolytische Aktivierung der selektionierten Hüllproteine durch MMPs der molekulare Parameter *in vivo*, der die Selektion begünstigt. Die verstärkte Inkorporation der Hüllproteine scheint eher einen Zusatzeffekt darzustellen, der in Abhängigkeit der verwendeten Blockierungsdomäne steht. Zusammengefasst sind sowohl die proteolytische Aktivierung als auch die Inkorporation der Hüllproteine in die Viruspartikel gegenüber der parentalen Virusvariante durch „molekulare Evolution“ verbessert worden.

Eine davon völlig unabhängige und sehr überraschende Beobachtung war das Auftreten der Stopkodonmutante. Hierbei handelt es sich um eine vermehrungsunfähige genetische Variante in der Viruspopulation, die sich im Laufe der Selektion beider Virus-Bibliotheken anreicherte, obwohl aufgrund der Mutation kein Hüllprotein exprimiert werden konnte (3.2). Diese Anreicherung konnte möglicherweise als „Satellitensequenz“ erfolgen, da Retroviren zwei Kopien des viralen Genoms in ein Viruspartikel einbauen und eine Verpackung des mutierten Genoms mit einem intakten Genom in infektiöse Viruspartikel nicht ausgeschlossen ist. Die naheliegende Vermutung, ihr Auftreten übe einen positiven Einfluss auf die replizierende Viruspopulation während der Selektion aus, ließ sich nicht experimentell bestätigen (vgl. 3.2). Dennoch ist anzunehmen, dass die Expression des mutierten *env*-Leserahmens höchstwahrscheinlich zur Sekretion von löslichem EGF führt (Transition von G zu A am 3'-Ende der EGF-kodierenden Sequenz), und ein solches Virus durch Sättigung der EGF-Rezeptoren und Stimulation der Zellproliferation einen positiven Effekt auf die Viruspopulation ausübt. Dafür spricht, dass die Zugabe von löslichem EGF eine Erhöhung der Transduktion EGF-Rezeptor positiver Zellen durch EGF-blockierte retrovirale Vektorpartikel bewirkte (Merten *et al.*, 2003) und zudem solche Partikel EGF-Rezeptor-vermittelt, wie nach einer natürlichen Ligandenbindung, internalisiert werden (Cosset *et al.*, 1995). Aus diesen Gründen sollte die Stopkodonmutante Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.3 Der Aktivierungsmechanismus MMP-aktivierbarer Retroviren

Die proteolytische Aktivierung der selektionierten Viren könnte sowohl beim Zelleintritt an der Zelloberfläche als auch bei ihrer Freisetzung erfolgen. Bei der Freisetzung könnten die Hüllproteine während des Transports in der Zelle oder an der Zelloberfläche vor bzw. nach dem Einbau in die Partikel gespalten werden.

Tatsächlich wurden die selektionierten Viruspartikel mit partiell gespaltenen Hüllproteinen in Zellkulturüberständen infizierter HT1080-Zellen nachgewiesen, was zunächst die Spaltung der Viruspartikel bei der Freisetzung belegt (vgl. 3.3.2.2).

Gegen die Spaltung der EGF-blockierten Hüllproteine während des Transports zur Zelloberfläche spricht, dass die Aktivierung der MMPs, wie z.B. MMP-2, erst zusammen mit MT-MMPs und TIMPs in einem sich formierenden Komplex an der Zelloberfläche erfolgt (Strongin *et al.*, 1995; Emmert-Buck *et al.*, 1995; Curran und Murray, 1999). Des Weiteren kann die Spaltung bereits freigesetzter Viruspartikel durch freie lösliche MMPs nicht ausgeschlossen werden. Allerdings führte die Inkubation aufgereinigter Viruspartikel mit aufkonzentrierten Zellkulturüberständen von HT1080-Zellen bzw. dem Zymogen von MMP-2 (pro-MMP-2) *in vitro* zu keiner nachweisbaren Spaltung der parentalen und selektionierten Hüllproteine (nicht gezeigt). Daher wurden die Hüllproteine wahrscheinlich vor dem Einbau in die Partikel durch den MMP/TIMP/MT-MMP-Komplex an der Zelloberfläche gespalten (Abb. 26, A). Hierbei könnte eine unterschiedliche Freisetzungskinetik der Partikel zwischen den parentalen und selektionierten Viren vorliegen, die auf die unterschiedliche Spaltungseffizienz bzw. die Abspaltung EGF-Rezeptor-gebundener Partikel hindeutet. Allerdings wurde kein Unterschied in der Freisetzungskinetik zwischen den selektionierten (E-26-A) und parentalen Viren (E-MMP-A) in HT1080-Zellen festgestellt, wobei eine zu geringe Sensitivität des Nachweisverfahrens nicht auszuschließen war (vgl. 3.3.4.3).

Im Gegensatz zur Partikelfreisetzung konnte ein deutlicher Einfluss der proteolytischen Aktivierung durch MMPs zugunsten der selektionierten Virusvarianten auf der Ebene des Zelleintritts nachgewiesen werden. Bei der Inkubation von HT1080-Zellen mit dem parentalen (E-MMP-A) und dem selektionierten Virus (E-26-A) für sehr kurze Zeiträume wurden bis zu 10-fach höhere Zelleintrittsereignisse für das selektionierte Virus gegenüber dem parentalen Virus gemessen (vgl. 3.3.4.2). Die somit verbesserte Zelleintrittskinetik des selektionierten Virus E-26-A korrelierte sehr gut mit der *in vitro* beobachteten erhöhten Umsatzrate für die Spaltung des entsprechenden Substratlinkers durch MMP-2 (vgl. 3.3.5.2).

Eine weitere Bestätigung der verbesserten proteolytischen Aktivierung des selektionierten Virus E-26-A konnte auf „MMP-negativen“, aber EGF-Rezeptor-positiven A431-Zellen gezeigt werden. Hier war eine Zugabe von MMP-2 notwendig, um diese Zellen mit den selektionierten Viren als auch den parentalen Viren zu infizieren, wobei die selektionierten Viren fast 50 % der Infektiosität auf HT1080-Zellen erreichten (vgl. 3.3.6). Unabhängig davon konnte bereits zuvor eine proteolytische Aktivierung von replikationsinkompetenten EGF-blockierten Retroviren, die das

MMP-Standardsubstrat trugen, auf A431-Zellen durch Zugabe des Zymogens von MMP-2 (pro-MMP-2) demonstriert werden (Peng *et al.*, 1997). Hierbei war sogar die Anzahl der Zelleintritte von der Konzentration des Zymogens abhängig. Dies sprach für eine Aktivierung dieser Retroviren an der Zelloberfläche, da das Zymogen erst im Komplex mit TIMP-2 und MT1-MMP katalytisch aktiv wird (Strongin *et al.*, 1995; Emmert-Buck *et al.*, 1995).

Des Weiteren konnte kürzlich eine Zellfusion zwischen „MMP-positiven“ und „MMP-negativen“ Zellen gezeigt werden, indem ähnlich zu den hier modifizierten Retroviren blockierte MMP-aktivierbare Hüllproteine in den MMP-negativen Zellen exprimiert wurden. Hierbei handelte es sich um genetisch trunkierte Hüllproteine, die außerhalb des viralen Kontextes eine Zellfusion durchführen können, vorausgesetzt die Blockierungsdomäne wird proteolytisch entfernt. Die Zellfusionen wurden hier seitens der „MMP-positiven“ Zellen durch die Abspaltung der Blockierungsdomäne ausgelöst (Johnson *et al.*, 2003).

Aus den hier präsentierten Daten lässt sich ein Modell der proteolytischen Aktivierung an der Zelloberfläche für die selektionierten MMP-aktivierbaren Retroviren ableiten. Die Blockierungsdomäne EGF führt zur Bindung des Viruspartikels an den EGF-Rezeptor der Zelloberfläche, wodurch das Partikel wahrscheinlich in die räumliche Nähe des MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP-Komplexes gelangt. Die Substratlinker werden daraufhin gespalten, und es entstehen unblockierte Hüllproteine. Diese können nun mit dem zellulären viralen Rezeptor interagieren, und die Fusion des Partikels mit der Zelle wird dadurch ausgelöst (Abb. 26, B).

Zusammenfassend ist die proteolytische Aktivierung der selektionierten MMP-aktivierbaren Retroviren sowohl auf der Ebene des Zelleintritts als auch auf der des Zellaustritts vorstellbar, wenngleich die Aktivierung beim Zelleintritt wahrscheinlich der dominierende molekulare Parameter für deren Selektion war.

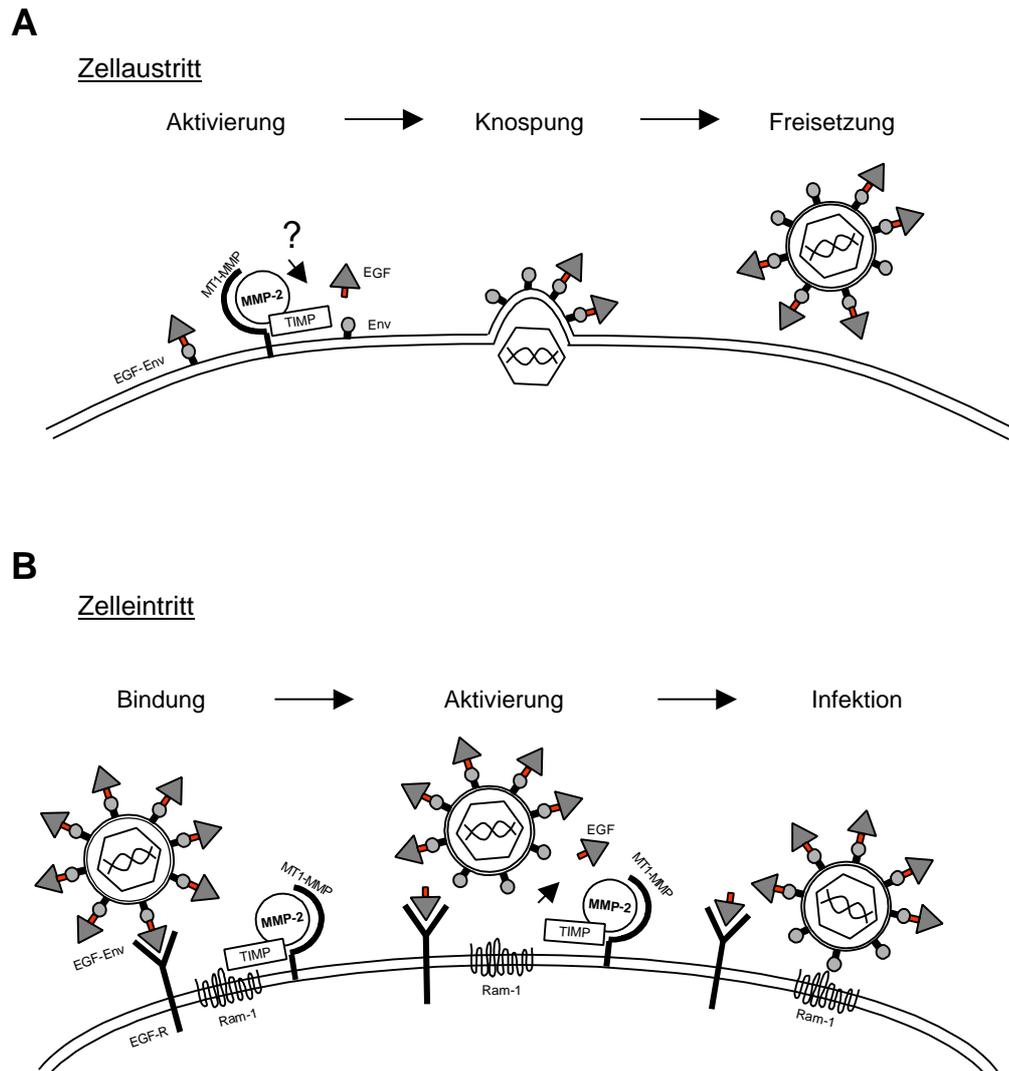


Abb. 26: Modell der MMP-Aktivierung selektionierter Retroviren

A) Die schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung der Viruspartikel beim Zellaustritt. Die Spaltung (Pfeil) der Hüllproteine (EGF-Env) könnte an der Zelloberfläche durch den MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP-Komplex erfolgen. Somit würden gespaltene Hüllproteine während der Knospung in das Partikel eingebaut. Dies würde schließlich zur Freisetzung bereits aktivierter Viruspartikel führen. B) Die schematische Darstellung der Aktivierung EGF-blockierter Viruspartikel beim Zelleintritt. Das Viruspartikel bindet über sein Hüllprotein (EGF-Env) an den EGF-Rezeptor (EGF-R) der Zelloberfläche. Dadurch gelangt das Partikel in die räumliche Nähe des MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP-Komplexes, woraufhin die Spaltung des Substratlinkers (Pfeil) erfolgt. Die entstandenen unblockierten Hüllproteine können nun mit dem zellulären viralen Rezeptor (Ram-1) interagieren, wodurch die Infektion der Zelle ausgelöst wird.

4.4 Selektionierte Substrate und ihre Anwendbarkeit in der Tumorthherapie

Während seit langem für die *in vitro*-Charakterisierung der Substrate gereinigter Proteasen das gut etablierte Selektionssystem der Phagen-„*Display*“-Bibliotheken eingesetzt wird, sind die retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken zur Identifizierung von Protease-Substraten in lebenden Zellen in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. Mit Hilfe des Phagen-Systems konnten bisher die Substrate einiger MMPs u. a. von MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und MT1-MMP charakterisiert werden (Smith *et al.*, 1995; Kridel *et al.*, 2001; Ohkubo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Dabei spalteten die einzelnen MMPs neben sehr selektiven Substraten auch überlappende Substratmotive. In diesen Untersuchungen wurden vor allem Peptide, die das Konsensusmotiv -P-X-X-Hy- (Hy = große hydrophobe Aminosäuren) trugen, von allen oben genannten MMPs gespalten, wobei die Spaltung vor der hydrophoben Aminosäure erfolgte. Dieses Motiv stimmt mit den hier aufeinanderfolgend in HT1080-Zellen selektionierten Substratlinkern überein, da diese den Konsensus P-Q-G-[L/I/V]- bildeten (vgl. 3.1.5 und 3.1.7).

HT1080-Zellen selbst produzieren in hohen Mengen MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 (Okada *et al.*, 1992; Emmert-Buck *et al.*, 1995; Maquoi *et al.*, 1998), aber auch MMP-1 und MMP-7 (Giambernardi *et al.*, 1998). So überrascht es nicht, dass die hier selektionierten Substratlinker nicht nur durch die zunächst intensiv untersuchte MMP-2 (vgl. 3.3.5.1), sondern auch durch weitere MMPs *in vitro* gespalten wurden (vgl. 3.3.5.3), zumal die selektionierten Sequenzen die optimalen Substrate für die proteolytische Aktivierung der Retroviren durch HT1080-Zellen darstellen. Demzufolge gingen aus der Selektion der beiden retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken Sequenzen von MMP-Substraten hervor, die sich direkt in den Kontext MMP-aktivierbarer Therapeutika einbringen lassen.

Generell kann das hier vorgestellte System für das Design und die Optimierung Protease-aktivierbarer Therapeutika eingesetzt werden. Hierbei kommt es in erster Linie auf eine sehr effiziente Spaltung des verwendeten Protease-Substrates unter physiologischen Bedingungen an. Die retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken, die auf den Prinzipien der molekularen Evolution basieren und noch dazu in euka-

ryotischen Zellen selektioniert werden können, sind dafür ein bedeutendes Werkzeug. Beispielsweise stehen die hier selektionierten MMP-Substrate schon jetzt für den Einbau in MMP-aktivierbare Therapeutika zur Verfügung. Sie können in MMP-aktivierbare retrovirale Vektoren für den gezielten Transfer therapeutischer Gene sowie in MMP-aktivierbare „fusogene“ retrovirale Hüllproteine oder auch MMP-aktivierbare Toxine als therapeutische Proteine für die Tumorthapie eingebaut werden (Peng *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Galanis *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003). Darüber hinaus könnten die hier selektionierten Retroviren direkt zu „konditionell“ replizierenden Vektoren (RCRs) für die Tumorthapie weiterentwickelt werden. Dafür sind der Tumorzell-spezifische Tropismus und die Insertion eines therapeutischen Gens notwendig (Buchholz *et al.*, 1999; Logg *et al.*, 2001a; Sandrin *et al.*, 2003). Die hier selektionierten Retroviren zeigten eine schnellere Ausbreitung innerhalb der verwendeten Modell-Tumorzelllinie HT1080, wobei sie ihren Tropismus für diese EGF-exprimierende MMP-positive Zelllinie behielten (Schneider *et al.*, 2003; Hartl *et al.*, 2004). Übertragen in die *in vivo*-Situation könnten mit Hilfe solcher Viren möglicherweise Tumortypen mit hoher EGF-Rezeptordichte therapiert werden. Selbst wenn EGF-blockierte Viren teilweise gespalten aus den Tumorzellen entlassen werden, ist ihre Ausbreitung auf das „MMP-positive“ Gewebe limitiert, vorausgesetzt im „MMP-negativen“ Gewebe ist eine genügend hohe EGF-Rezeptordichte vorhanden.

Dies stellt allerdings auch eine offensichtliche Einschränkung bezüglich des Sicherheitsprofils EGF-blockierter RCRs dar. Zudem ist diese Einschränkung unmittelbar für die Selektion der hier hergestellten EGF-blockierten retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken auf weiteren Tumorzelllinien gegeben. EGF-blockierte Bibliotheken können nur auf Zellen mit einer hohen EGF-Rezeptordichte selektioniert werden (Schneider *et al.*, 2003). Sie sind somit für die Identifizierung von Protease-Substraten auf Tumorzellen mit einer niedrigen EGF-Rezeptordichte aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks ungeeignet. Die Blockierungsdomäne CD40L ist dagegen für eine universelle Anwendbarkeit retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken bzw. Entwicklung Rezeptor-unabhängig blockierter RCRs besser geeignet. Die Blockierung der Infektion beruht hierbei auf der Trimerisierung der Domäne und wird Rezeptor-unabhängig vermittelt (Morling *et al.*, 1997). Bereits während der Durchführung dieser Arbeit konnte eine entsprechende retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek, die einen an vier Positionen diversifizierten

Substratlinker (X-X-G-L-X-X) unter Ausschluss der Aminosäure Arginin trug, entwickelt und auf HT1080-Zellen selektioniert werden (Hartl *et al.*, 2004). Dabei wurden erneut MMP-Substrate selektioniert, wobei eines der prominentesten Konsensusmotive, das Motiv P-[S/T]-G-L-Y-[Q/K], mit einem der hier selektionierten Motive bis auf die Aminosäuren an Position P2 identisch war. In zur Zeit weiterführenden Arbeiten werden diese und weitere Bibliotheken auf primärem Tumormaterial selektioniert, um damit individualisierte Protease-aktivierbare Retroviren für einen möglichen Einsatz zur Bekämpfung gegebener Tumore zu erzeugen (A. Schwantes, persönliche Kommunikation). Des Weiteren werden bereits selektionierte

Retroviren im Maus-Tumor-Modell charakterisiert (I. Hartl und Y. Sun, persönliche Kommunikation).

Darüber hinaus lassen sich die mit Hilfe retroviraler Protease-Substrat-Bibliotheken selektionierten Substratlinker auch in den Kontext anderer viraler Hüllproteine übertragen, um beispielsweise tumorspezifisch proteolytisch aktivierbare onkolytische Viren oder bestehende retrovirale bzw. lentivirale Vektoren weiter zu entwickeln (Russell, 2002; Sandrin *et al.*, 2003; Bucheit *et al.*, 2003). Jenseits dessen liegt in retroviralen Bibliotheken weiteres Potential zur Selektion und Charakterisierung biologischer Moleküle unter natürlichen bzw. physiologischen Bedingungen. So sind beispielsweise parallel zur Durchführung dieser Arbeit in Analogie zum Phagen-System retrovirale Peptid- und scFv-Bibliotheken entwickelt worden, die zum einen die Identifizierung von Antikörper-Epitopen (Khare *et al.*, 2003) und zum anderen die Selektion von scFv's gegen ein spezifisches Antigen erlauben (Urban, 2003).

5. Zusammenfassung

Protease-aktivierbare Retroviren bieten die Möglichkeit des gezielten Gentransfers in solche Tumorzellen, die an der Zelloberfläche proteolytisch aktive Proteasen, wie beispielsweise Matrix Metalloproteasen (MMP), exprimieren. Hierfür wird zunächst der Zelleintritt der Retroviren durch eine mit den Hüllproteinen fusionierte Blockierungsdomäne verhindert. Zwischen dieser Blockierungsdomäne und dem Hüllprotein befindet sich ein für eine zelluläre Protease fungierender Substratlinker, worüber die Blockierung entfernt und der natürliche Infektionsmechanismus der Retroviren wieder hergestellt wird. In Bezug auf die Tumorthherapie mittels eines solchen Gentransfers ist es jedoch unmöglich vorherzusagen, welches Protease-Substrat für einen bestimmten Tumortyp am besten geeignet ist.

Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit retrovirale Protease-Substrat-Bibliotheken entwickelt, um erstmalig die Substrate der tumorassoziierten MMPs in lebenden Tumorzellen zu selektionieren und damit verbunden MMP-aktivierbare Retroviren mit verbesserten molekularen Eigenschaften für den gezielten Gentransfer zu evolvieren. Hiefür wurden, ausgehend von einem Protease-aktivierbaren Retrovirus, welches als Substratlinker das MMP-Standardsubstrat P-L-G-L-W-A präsentiert, Retroviren erzeugt, in denen dieses Substrat kombinatorisch diversifiziert wurde.

In einer ersten retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek wurde zunächst an drei Stellen zu P-X-G-L-X-X unter Ausschluss der Aminosäure Arginin diversifiziert, um die Selektion durch Proprotein-Konvertasen wie Furin zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Selektion der Virus-Bibliothek in der Modell-Tumorzelllinie HT1080, wofür hier das entsprechende Protokoll etabliert wurde. Die Substratlinker der am häufigsten selektionierten Retroviren enthielten die beiden Konsensusmotive P-Q-G-L-Y-[Q/K] und P-Q-G-L-Y-[A/S]. Zur Identifizierung der optimalen Aminosäuren an allen sechs Positionen des Substrates wurden in einer zweiten Bibliothek die variierten Positionen auf Grundlage der selektionierten Konsensusmotive fixiert und die zuvor konstanten Positionen zu X-Q-X-X-Y-[Q/A] diversifiziert. Die aus dieser Bibliothek selektionierten Retroviren enthielten das Konsensusmotiv P-Q-G-

[L/I/V]-Y-[Q/A], womit die zuvor selektionierten MMP-aktivierbaren Retroviren bestätigt wurden.

Die biochemische Charakterisierung von mit den selektionierten Substratlinkern rekonstituierten Retroviren zeigte, dass ihre Substratlinker eine bemerkenswerte Verbesserung der Spaltung durch MMP-2 und eine erhöhte Inkorporation der dazugehörigen Hüllproteine in die Partikel aufwiesen. Außerdem ermöglichten die selektionierten Substratlinker den entsprechenden Retroviren sich schneller innerhalb der Zellpopulation auszubreiten, ohne dabei die Abhängigkeit von der MMP-Aktivierung zu verlieren. Darüber hinaus konnte sowohl die Kinetik des Zelleintritts bis zu 10-fach als auch die Infektiosität bis zu 1000-fach gegenüber dem parentalen Virus, das den Standard-Substratlinker trug, gesteigert werden. Letztendlich waren hierfür nur zwei selektionierte Aminosäureaustausche gegenüber dem MMP-Standardsubstrat verantwortlich, nämlich Glutamin (Q) und Tyrosin (Y), die zu dem Motiv P-Q-G-L-Y-A führten.

Ausschlaggebend für die beschriebenen Selektionen waren die mehrfache Abdeckung der kombinatorischen Vielfalt der Substratlinker auf Partikel-Ebene bereits vor Selektion sowie die langsame Erhöhung des angelegten Selektionsdrucks während der Selektion. Dadurch konnte eine Deletion des kodierenden Bereichs der Blockierungsdomäne (EGF) im Virusgenom vermieden werden. Als treibende Kraft der Selektion stellte sich die proteolytische Aktivierung der selektionierten Retroviren an der Zelloberfläche heraus. Die Ergebnisse führen schließlich zu einem Modell der MMP-Aktivierung EGF-blockierter Retroviren. Danach binden die Partikel an die EGF-Rezeptoren der Zelloberfläche und gelangen so in die räumliche Nähe des MMP-Aktivierungskomplexes. Daraufhin werden sie proteolytisch aktiviert und infizieren die Zielzellen. Die hier selektionierten Substratlinker bzw. die entsprechenden Viren sind in Bezug auf die proteolytische Aktivierung optimal an die gewählte Tumorzelllinie angepasst.

6. Literaturverzeichnis

Adams, G., Vessillier, S., Dreja, H. und Chernajovsky, Y. (2003). Targeting cytokines to inflammation sites. *Nat Biotechnol* 21, 1314-1320.

Ager, S., Nilson, B. H., Morling, F. J., Peng, K. W., Cosset, F. L. und Russell, S. J. (1996). Retroviral display of antibody fragments; interdomain spacing strongly influences vector infectivity. *Hum Gene Ther* 7, 2157-2164.

Albritton, L. M., Kim, J. W., Tseng, L. und Cunningham, J. M. (1993). Envelope-binding domain in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. *J Virol* 67, 2091-2096.

Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. und Pluckthun, A. (2001). In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* 12, 400-405.

Bachrach, E., Marin, M., Pelegrin, M., Karavanas, G. und Piechaczyk, M. (2000). Efficient cell infection by Moloney murine leukemia virus-derived particles requires minimal amounts of envelope glycoprotein. *J Virol* 74, 8480-8486.

Baramova, E. N., Bajou, K., Remacle, A., L'Hoir, C., Krell, H. W., Weidle, U. H., Noel, A. und Foidart, J. M. (1997). Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* 405, 157-162.

Battini, J. L., Heard, J. M. und Danos, O. (1992). Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. *J Virol* 66, 1468-1475.

Benedict, C. A., Tun, R. Y., Rubinstein, D. B., Guillaume, T., Cannon, P. M. und Anderson, W. F. (1999). Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: binding to CD34 does not catalyze virus-cell fusion. *Hum Gene Ther* 10, 545-557.

Boeke, J. D. und Stoye, J. P. (1997). Retrotransposon, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements. In "Retroviruses" (Coffin, J.M. Hughes, S.H. and Varmus, H.E). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 343-436.

Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M. und Varmus, H. E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* 3, 469-478.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

- Bremer, C., Tung, C. H. und Weissleder, R. (2001). In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. *Nat Med* 7, 743-748.
- Brown, P. O., Bowerman, B., Varmus, H. E. und Bishop, J. M. (1989). Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2525-2529.
- Bucheit, A. D., Kumar, S., Grote, D. M., Lin, Y., von Messling, V., Cattaneo, R. B. und Fielding, A. K. (2003). An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen. *Mol Ther* 7, 62-72.
- Buchholz, C. J., Peng, K. W., Morling, F. J., Zhang, J., Cosset, F. L. und Russell, S. J. (1998). In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus display libraries. *Nat Biotechnol* 16, 951-954.
- Buchholz, C. J., Stitz, J. und Cichutek, K. (1999). Retroviral cell targeting vectors. *Curr Opin Mol Ther* 1, 613-621.
- Chadwick, M. P., Morling, F. J., Cosset, F. L. und Russell, S. J. (1999). Modification of retroviral tropism by display of IGF-I. *J Mol Biol* 285, 485-494.
- Chen, E. I., Kridel, S. J., Howard, E. W., Li, W., Godzik, A. und Smith, J. W. (2002). A unique substrate recognition profile for matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem* 277, 4485-4491.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. und Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Cosset, F. L., Morling, F. J., Takeuchi, Y., Weiss, R. A., Collins, M. K. und Russell, S. J. (1995). Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J Virol* 69, 6314-6322.
- Coussens, L. M., Fingleton, B. und Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- Curran, S. und Murray, G. I. (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 189, 300-308.
- Curran, S. und Murray, G. I. (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36, 1621-1630.
- Deperthes, D. (2002). Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity. *Biol Chem* 383, 1107-1112.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. und Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.

Emmert-Buck, M. R., Emonard, H. P., Corcoran, M. L., Krutzsch, H. C., Foidart, J. M. und Stetler-Stevenson, W. G. (1995). Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/TIMP-2 complex. *FEBS Lett* **364**, 28-32.

Foda, H. D. und Zucker, S. (2001). Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov Today* **6**, 478-482.

Fouchier, R. A. und Malim, M. H. (1999). Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* **52**, 275-299.

Galanis, E., Bateman, A., Johnson, K., Diaz, R. M., James, C. D., Vile, R. und Russell, S. J. (2001). Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum Gene Ther* **12**, 811-821.

Galardy, R. E., Grobelny, D., Foellmer, H. G. und Fernandez, L. A. (1994). Inhibition of angiogenesis by the matrix metalloprotease inhibitor N-[2R-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide. *Cancer Res* **54**, 4715-4718.

Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. und Trono, D. (1995). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**, 379-388.

Giambernardi, T. A., Grant, G. M., Taylor, G. P., Hay, R. J., Maher, V. M., McCormick, J. J. und Klebe, R. J. (1998). Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol* **16**, 483-496.

Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C. und et al. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J* **12**, 725-734.

Griffiths, A. D. und Tawfik, D. S. (2000). Man-made enzymes--from design to in vitro compartmentalisation. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 338-353.

Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.

Hanahan, D. und Meselson, M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**, 333-342.

Harsh, G. R., Deisboeck, T. S., Louis, D. N., Hilton, J., Colvin, M., Silver, J. S., Qureshi, N. H., Kracher, J., Finkelstein, D., Chiocca, E. A. und Hochberg, F. H. (2000). Thymidine kinase activation of ganciclovir in recurrent malignant gliomas: a gene-marking and neuropathological study. *J Neurosurg* **92**, 804-811.

Hartl, I., Schneider, R. M., Sun, Y., Medvedovska, J., Chadwick, M. P., Russell, S. J., Cichutek, K. und Buchholz, C. J. (2004). Library based selection of retroviruses

selectively spreading through matrix metalloprotease positive cells. *Hum Gene Ther*, eingereicht.

Hughson, F. M. (1997). Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr Biol* 7, R565-569.

Hunter, E. und Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 157, 187-253.

Johnson, K. J., Peng, K. W., Allen, C., Russell, S. J. und Galanis, E. (2003). Targeting the cytotoxicity of fusogenic membrane glycoproteins in gliomas through protease-substrate interaction. *Gene Ther* 10, 725-732.

Kasahara, N., Dozy, A. M. und Kan, Y. W. (1994). Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266, 1373-1376.

Kavanaugh, M. P., Wang, H., Boyd, C. A., North, R. A. und Kabat, D. (1994). Cell surface receptor for ecotropic host-range mouse retroviruses: a cationic amino acid transporter. *Arch Virol Suppl* 9, 485-494.

Khare, P. D., Rosales, A. G., Bailey, K. R., Russell, S. J. und Federspiel, M. J. (2003). Epitope selection from an uncensored peptide library displayed on avian leukosis virus. *Virology* 315, 313-321.

Kim, J. W., Closs, E. I., Albritton, L. M. und Cunningham, J. M. (1991). Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352, 725-728.

Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S. K., Kin, Y., Jasti, S. L., Nirmala, C., Lakka, S. S., Adachi, Y., Kyritsis, A. P., Ali-Osman, F. *et al.* (2000). Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res* 60, 6851-6855.

Kridel, S. J., Chen, E., Kotra, L. P., Howard, E. W., Mobashery, S. und Smith, J. W. (2001). Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 276, 20572-20578.

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

Lakka, S. S., Rajan, M., Gondi, C., Yanamandra, N., Chandrasekar, N., Jasti, S. L., Adachi, Y., Siddique, K., Gujrati, M., Olivero, W. *et al.* (2002). Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion. *Oncogene* 21, 8011-8019.

Lavillette, D., Maurice, M., Roche, C., Russell, S. J., Sitbon, M. und Cosset, F. L. (1998). A proline-rich motif downstream of the receptor binding domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes. *J Virol* 72, 9955-9965.

- Liu, S., Netzel-Arnett, S., Birkedal-Hansen, H. und Leppa, S. H. (2000). Tumor cell-selective cytotoxicity of matrix metalloproteinase-activated anthrax toxin. *Cancer Res* 60, 6061-6067.
- Logg, C. R., Logg, A., Tai, C. K., Cannon, P. M. und Kasahara, N. (2001a). Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary. *J Virol* 75, 6989-6998.
- Logg, C. R., Tai, C. K., Logg, A., Anderson, W. F. und Kasahara, N. (2001b). A uniquely stable replication-competent retrovirus vector achieves efficient gene delivery in vitro and in solid tumors. *Hum Gene Ther* 12, 921-932.
- Maquoi, E., Noel, A., Frankenne, F., Angliker, H., Murphy, G. und Foidart, J. M. (1998). Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett* 424, 262-266.
- Marin, M., Noel, D., Valsesia-Wittman, S., Brockly, F., Etienne-Julan, M., Russell, S., Cosset, F. L. und Piechaczyk, M. (1996). Targeted infection of human cells via major histocompatibility complex class I molecules by Moloney murine leukemia virus-derived viruses displaying single-chain antibody fragment-envelope fusion proteins. *J Virol* 70, 2957-2962.
- Markowitz, D., Goff, S. und Bank, A. (1988a). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, 400-406.
- Markowitz, D., Goff, S. und Bank, A. (1988b). Construction of a safe and efficient retrovirus packaging cell line. *Adv Exp Med Biol* 241, 35-40.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. und Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
- Martin, F., Neil, S., Kupsch, J., Maurice, M., Cosset, F. und Collins, M. (1999). Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells. *J Virol* 73, 6923-6929.
- Matthews, D. J., Goodman, L. J., Gorman, C. M. und Wells, J. A. (1994). A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci* 3, 1197-1205.
- Matthews, D. J. und Wells, J. A. (1993). Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* 260, 1113-1117.
- Merten, C. A., Engelstaedter, M., Buchholz, C. J. und Cichutek, K. (2003). Displaying epidermal growth factor on spleen necrosis virus-derived targeting vectors. *Virology* 305, 106-114.

- Miller, D. G., Edwards, R. H. und Miller, A. D. (1994). Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 78-82.
- Miyamori, H., Takino, T., Kobayashi, Y., Tokai, H., Itoh, Y., Seiki, M. und Sato, H. (2001). Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 276, 28204-28211.
- Morling, F. J., Peng, K. W., Cosset, F. L. und Russell, S. J. (1997). Masking of retroviral envelope functions by oligomerizing polypeptide adaptors. *Virology* 234, 51-61.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W. und Klenk, H. D. (1999). Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res* 60, 55-65.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Nagase, H., Barrett, A. J. und Woessner, J. F., Jr. (1992). Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1, 421-424.
- Nagase, H. und Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327 (Pt 3), 625-635.
- Neuner, P., Cortese, R. und Monaci, P. (1998). Codon-based mutagenesis using dimer-phosphoramidites. *Nucleic Acids Res* 26, 1223-1227.
- Nilson, B. H., Morling, F. J., Cosset, F. L. und Russell, S. J. (1996). Targeting of retroviral vectors through protease-substrate interactions. *Gene Ther* 3, 280-286.
- Ohkubo, S., Miyadera, K., Sugimoto, Y., Matsuo, K., Wierzba, K. und Yamada, Y. (2001). Substrate phage as a tool to identify novel substrate sequences of proteases. *Comb Chem High Throughput Screen* 4, 573-583.
- Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. und Hayakawa, T. (1992). Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem* 267, 21712-21719.
- O'Neil, K. T. und Hoess, R. H. (1995). Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr Opin Struct Biol* 5, 443-449.
- Overall, C. M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* 22, 51-86.

- Park, H. I., Ni, J., Gerkema, F. E., Liu, D., Belozarov, V. E. und Sang, Q. X. (2000). Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor. *J Biol Chem* 275, 20540-20544.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. und Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-8396.
- Peng, K. W., Morling, F. J., Cosset, F. L., Murphy, G. und Russell, S. J. (1997). A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases. *Hum Gene Ther* 8, 729-738.
- Peng, K. W., Morling, F. J., Cosset, F. L., Murphy, G. und Russell, S. J. (1998). A retroviral gene delivery system activatable by plasmin. *Tumour Targeting* 3, 112-120.
- Prats, A. C., Roy, C., Wang, P. A., Erard, M., Housset, V., Gabus, C., Paoletti, C. und Darlix, J. L. (1990). cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J Virol* 64, 774-783.
- Puumalainen, A. M., Vapalahti, M., Agrawal, R. S., Kossila, M., Laukkanen, J., Lehtolainen, P., Viita, H., Paljarvi, L., Vanninen, R. und Yla-Herttuala, S. (1998). Beta-galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9, 1769-1774.
- Rao, J. S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3, 489-501.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. und Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12, 2099-2108.
- Russell, S. J. (2002). RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther* 9, 961-966.
- Russell, S. J., Hawkins, R. E. und Winter, G. (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res* 21, 1081-1085.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York *Second Edition*.
- Sandrin, V., Russell, S. J. und Cosset, F. L. (2003). Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 281, 137-178.

- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. und Seiki, M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370, 61-65.
- Schneider, R. M., Medvedovska, Y., Hartl, I., Voelker, B., Chadwick, M. P., Russell, S. J., Cichutek, K. und Buchholz, C. J. (2003). Directed evolution of retroviruses activatable by tumour-associated matrix metalloproteases. *Gene Ther* 10, 1370-1380.
- Schnierle, B. S., Stitz, J., Bosch, V., Nocken, F., Merget-Millitzer, H., Engelstadter, M., Kurth, R., Groner, B. und Cichutek, K. (1997). Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8640-8645.
- Seidah, N. G. und Chretien, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* 8, 602-607.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269, 32678-32684.
- Smith, M. M., Shi, L. und Navre, M. (1995). Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries. *J Biol Chem* 270, 6440-6449.
- Solly, S. K., Trajcevski, S., Frisen, C., Holzer, G. W., Nelson, E., Clerc, B., Abordo-Adesida, E., Castro, M., Lowenstein, P. und Klatzmann, D. (2003). Replicative retroviral vectors for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 10, 30-39.
- Stack, M. S. und Gray, R. D. (1989). Comparison of vertebrate collagenase and gelatinase using a new fluorogenic substrate peptide. *J Biol Chem* 264, 4277-4281.
- Stemmer, W. P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10747-10751.
- Stitz, J., Steidl, S., Merget-Millitzer, H., Konig, R., Muller, P., Nocken, F., Engelstadter, M., Bobkova, M., Schmitt, I., Kurth, R. *et al.* (2000). MLV-derived retroviral vectors selective for CD4-expressing cells and resistant to neutralization by sera from HIV-infected patients. *Virology* 267, 229-236.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. und Goldberg, G. I. (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270, 5331-5338.

- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Urban, J. (2003). Herstellung und Charakterisierung retroviraler single-chain Fv Bibliotheken. Diplomarbeit, angefertigt am Paul-Ehrlich-Institut und eingereicht in der Naturwissenschaftlichen Fakultät II der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Valente, P., Fassina, G., Melchiori, A., Masiello, L., Cilli, M., Vacca, A., Onisto, M., Santi, L., Stetler-Stevenson, W. G. und Albin, A. (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 75, 246-253.
- van Zeijl, M., Johann, S. V., Closs, E., Cunningham, J., Eddy, R., Shows, T. B. und O'Hara, B. (1994). A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1168-1172.
- Varmus, H. E. (1982). Form and function of retroviral proviruses. *Science* 216, 812-820.
- Varmus, H. E. und Swanström, R. (1982). Replication of retroviruses. In "Molecular biology of tumor viruses", 2nd Edition: RNA tumor viruses (ed. R. Weiss *et al.*). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 369-512.
- Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K. C., Wellenhofer, G. und Moroney, S. E. (1994). Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607.
- Vogt, V. M. (1997). Retroviral Virions and Genomes. In "Retroviruses" (Coffin, J.M. Hughes, S.H. and Varmus, H.E). Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 27-71.
- Vu, T. H. und Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14, 2123-2133.
- Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. und Kabat, D. (1991). Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352, 729-731.
- Westermarck, J. und Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* 13, 781-792.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. und Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-455.

- Wittmann, D. (2000). Herstellung und Charaktisierung einer retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek auf Basis des amphotropen murinen Leukämievirus. Diplomarbeit, angefertigt am Paul-Ehrlich-Institut eingereicht im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Woessner, J. F. und Nagase, H. (2000). Matrix Metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press, UK.
- Wyatt, R. und Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280, 1884-1888.
- Yana, I. und Weiss, S. J. (2000). Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11, 2387-2401.
- Yang, T. T., Cheng, L. und Kain, S. R. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 24, 4592-4593.
- Yoshiji, H., Harris, S. R., Raso, E., Gomez, D. E., Lindsay, C. K., Shibuya, M., Sinha, C. C. und Thorgeirsson, U. P. (1998). Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. *Int J Cancer* 75, 81-87.
- Zhang, Y. und Gray, R. D. (1996). Characterization of folded, intermediate, and unfolded states of recombinant human interstitial collagenase. *J Biol Chem* 271, 8015-8021.
- Zhao, Y., Zhu, L., Lee, S., Li, L., Chang, E., Soong, N. W., Douer, D. und Anderson, W. F. (1999). Identification of the block in targeted retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4005-4010.

7. Abkürzungsverzeichnis

Basen und Aminosäuren

A		Adenin	G		Guanin
C		Cytosin	T		Thymin
			U		Uracil
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
			X		beliebige Aminosäure

Sonstige Abkürzungen

A	Absorption oder Amper
Ac	Acetat
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-triphosphat
AZT	3'Azido-3'-Desoxythymidin
b	Base
bp	Basenpaare
Br	Brom oder Bromo-
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti-
C	Celsius oder Kohlenstoff
ca.	zirka
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
Cl	Chlor, -chlorid
CTP	Cytidin-triphosphat
kD	Kilodalton
d	Tag (<i>day</i>) oder Desoxy-

d.h.	dass heißt
DMEM	Dubelcco´s modifiziertes <i>Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>-acid</i>)
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
DTT	Dithio-1,4-threithol
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure
Env	Envelope
<i>et al.</i>	und andere
F	Farad
Fc	<i>Fragment constant</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
Gag	<i>group specific antigen</i>
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunde oder <i>human</i>
H	Wasserstoff
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i>
IPA	Immunperoxidase-Test
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
k	Kilo-
K	Kalium
l	Liter
LacZ	Beta-Galaktosidase
LB	Lauri Bertani
log	Logarithmus
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Milli- oder Meter
M	Molar
Mg	Magnesium
min	Minute
Mn	Mangan
MMP	Matrix Metalloprotease
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
μ	Mikro-
n	Nano-
N	Stickstoff
Na	Natrium

NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
NTP	Nukleosid-triphosphat
O	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
p	Piko-
P	Phosphor, -phosphat
p.a.	pro analysis
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	<i>post infection</i>
Pol	<i>polymerase</i>
Rb	Rhubidium
RCR	<i>replicaton competent retrovirus</i>
RLV	Rauscher Leukämie Virus
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
Rtemp	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natrium (<i>Sodium</i>)-dodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SU	<i>surface unit</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloprotease</i>
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-triphosphat
U	Einheit (<i>Unit</i>)
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
UTP	Uridin-triphosphat
UV	Ultraviolett
v	Volumen (<i>volume</i>)
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w	Gewicht (<i>weight</i>)
WB	Western Blot
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

Selektionierte Linkersequenzen aus der E-X3-A-Bibliothek

In der nachfolgenden Tabelle sind die Aminosäuresequenzen der Substratlinker nach zwei unabhängigen Selektionen der retroviralen E-X3-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen aufgelistet. Zur einfachen Darstellung wurden sie in Gruppen zusammengefasst. Die Gruppierung basiert auf der größtmöglichen Übereinstimmung gemeinsamer biochemischer Eigenschaften der Aminosäuren an den jeweiligen diversifizierten Positionen (vgl. 3.1.1 und 3.1.5).

	Frequenz (Sel. 1)	Frequenz (Sel. 2)		Frequenz (Sel. 1)	Frequenz (Sel. 2)
Gruppe 1			Gruppe 5		
PQGLFK		13/35	PAGLYK	1/20	
PQGLYK	2/20		PAGLYQ	1/20	
PQGLFQ	2/20		PAGLFK		1/35
PKGLFQ		2/35			
PKGLYK	1/20	1/35	Gruppe 6		
PQGLFK	1/20		PLGLYK		2/35
PQGLYQ	1/20	1/35	PLGLYA		1/35
PKGLFK		1/35	PLGLVP		1/35
			PIGLYS	1/20	
Gruppe 2			Gruppe 7		
PQGLYA	3/20		PKGLSI		1/35
PQGLYS		4/35	PQGLSL		1/35
Gruppe 3			Gruppe 8		
PQGLAQ	2/20		PIGLSK	1/20	
PKGLAQ		2/35	PVGLSK	1/20	
PQGLAK	1/20				
PQGLSQ	1/20		Gruppe 9		
Gruppe 4			PEGLYS	1/20	
PQGLWQ		3/35			
PQGLVQ		1/35			

Selektionierte Linkersequenzen aus der E-X3rev-A-Bibliothek

In der nachfolgenden Tabelle sind die Aminosäuresequenzen der Substratlinker nach Selektion der retroviralen E-X3rev-A-Bibliothek auf HT1080-Zellen aufgelistet. Zur einfachen Darstellung wurden sie nach den zuvor genannten Kriterien in Gruppen zusammengefasst (vgl. 3.1.6 und 3.1.7).

Gruppe 1	Frequenz	Gruppe 4	Frequenz
PQGLYA	6/38	DQCAYA	1/38
PQGIYA	4/38	KQCYYQ	1/38
PQGLYQ	5/38	PQCVYA	1/38
PQGVYA	1/38	PQFVYA	1/38
Gruppe 2		Gruppe 5	
PQALYA	1/38	YQGDYA	1/38
PQTIYQ	1/38	PQYDYA	1/38
FQSIYA	1/38	TQSDYA	1/38
LQALYA	2/38	Gruppe 6	
AQGLYQ	2/38	LQFNYA	1/38
AQALYQ	2/38	TQYSYA	1/38
IQGIYA	1/38	Gruppe 7	
Gruppe 3		HQSHYA	1/38
PQVAYA	1/38		
PQSAYA	1/38		

9. Danksagung

Herrn PD Dr. Christian J. Buchholz danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die sehr angenehme und freundliche Atmosphäre sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit, die in seinem Fachgebiet am Paul-Ehrlich-Institut entstand.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz vom Institut für Humangenetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main danke ich für die fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Medizinische Biotechnologie am Paul-Ehrlich-Institut.

Mein Dank geht an ehemalige und derzeitige Mitarbeiter der Abteilung Medizinische Biotechnologie, einschließlich des Fachgebietes Gentransferarzneimittel I, die mir bei der Bewältigung des Laboralltags zur Seite standen, stets zur fachlichen Diskussion bereit waren und durch ihre Kollegialität, Witz und Humor für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten. Danke an: Gundula Braun, Carsten Finger, Dr. Egbert Flory, Irene Hartl, Matthias Hamdorf, Julia Medvedovska, Dr. Renate König, Christoph Merten, Michael Mühlebach, Dr. Jeanette Neumann, Dr. Marcus Niebert, Daphne Nikles, Dr. Ralf Sanzenbacher, Dr. Isabel Schmitt, Dr. Astrid Schwantes, Dr. Jörn Stitz, Dr. Yuansheng Sun, Uli Tschulena, Bernhard Völker, Renate Wenig und Nina Wolfrum

Außerdem danke ich meinen Freunden, Alex, Armin, Bea, Bernd, Christelle, Claudia, Hauke, Jana, Martin, Ralf, Rolf, Tania und Zoe, auf deren Hilfe ich mich während der Anfertigung dieser Arbeit verlassen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Karin und Richard Schneider, ohne deren Unterstützung das Studium und die Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären, und auf deren Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Richard Schneider
Geburtsdatum/-ort: 29.05.1973 in Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Wissenschaftliche Tätigkeit und Ausbildung

10/2000 bis dato **Doktorarbeit** am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, in der Abteilung Medizinische Biotechnologie, Fachgebiet Gentransferarzneimittel I, unter der Leitung von Herrn PD Dr. Christian J. Buchholz
Titel der Doktorarbeit: „*Zielgerichtete Evolution Matrix Metalloprotease-aktivierbarer Retroviren*“

10/2000 bis dato **Promotionsstudium** der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

07/2000 Abschluss als **Diplom Biologe**, Gesamtnote: „Sehr gut“

10/1999 bis 07/2000 **Diplomarbeit** im Institut für Anthropologie und Humangenetik des Fachbereichs Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz
Titel der Diplomarbeit: „*Suche nach Interaktionspartnern von mDRAL in Myoblasten mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems*“

10/1995 bis 07/2000 **Studium der Biologie** an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main mit Schwerpunkt Zoologie, Biochemie und Humangenetik

04/1994 bis 10/1995 **Studium des Lehramts** für Biologie, Chemie und Sport an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

10/1992 bis 01/1994 **Zivildienst** im Int. Familienzentrum Frankfurt am Main

06/1992 **Abitur** an der Max-Beckmann-Schule Frankfurt am Main

Stipendien

1997 bis 1999 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Publikationen

Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., Behrens, J., von der Mark, K., Starzinski-Powitz, A. und Wixler, V. (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *Journal of Cellular Biology* 159, 113-122.

Schneider, R. M., Medvedovska, Y., Hartl, I., Voelker, B., Chadwick, M. P., Russell, S. J., Cichutek, K. and Buchholz, C. J. (2003). Directed evolution of retroviruses activatable by tumour-associated matrix metalloproteases. *Gene Therapy* 10, 1370-1380.

Hartl, I., Schneider, R. M., Sun, Y., Medvedovska, J., Chadwick, M. P., Russell, S. J., Cichutek, K. and Buchholz, C. J. (2004). Library based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease positive cells. (Manuskript eingereicht bei Human Gene Therapy)