

Charakterisierung und Optimierung von
replikationskompetenten murinen Leukämieviren (MLV)
als Gentransfervehikel

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Katja Sliva
aus Frýdek-Místek
(Tschechien)

Frankfurt (2006)

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: _____

Gutachter: _____

Datum der Disputation: _____

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	ENTSTEHUNG UND GENTHERAPIE VON KREBS	2
1.2	EGFR ALS ZIELSTRUKTUR DER TUMORTHERAPIE	4
1.3	STAT3 ALS ZIELSTRUKTUR DER TUMORTHERAPIE	9
1.4	GENTRANSFERSYSTEME FÜR DIE KREBSGENTHERAPIE	11
1.5	MLV ALS GENTHERAPIEVEHIKEL	12
1.5.1	DAS MLV-HÜLLGLYKOPROTEIN	16
1.5.2	DER RETROVIRALE REZEPTOR MCAT-1	17
1.6	REPLIKATIONSKOMPETENTE RETROVIREN ALS VEHIKEL	19
1.7	TARGETINGSTRATEGIEN VON RETROVIREN	20
1.7.1	CXCR4 UND SDF-1 α	24
1.8	RNA-INTERFERENZ	26
1.8.1	MICRORNA	29
1.8.2	BIOLOGISCHE FUNKTION VON SI/MIRNA IN DER VIRUSABWEHR	31
1.9	SIRNA IN DER GENTHERAPIE	33
1.10	SHRNA ALS THERAPEUTISCHES GEN	34
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	36
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	37
3.1	MATERIALIEN	37
3.1.1	CHEMIKALIEN	37
3.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	38
3.1.3	GERÄTE UND APPARATUREN	38
3.1.4	KOMMERZIELL ERHÄLTICHE SYSTEME, KITS UND STANDARDS	39
3.2	BAKTERIENSTÄMME	40
3.3	SEQUENZEN VERWENDETER OLIGONUKLEOTIDE	41
3.4	PLASMIDE	43
3.5	ANTIKÖRPER	46
3.6	ZELLEN	47
3.7	ZELLKULTUR	48
3.7.1	ZELLKULTURREAGENZIEN	48
3.7.2	STERILTEST AUF MYCOPLASMEN	49
3.7.3	LEBENDZELLZAHLBESTIMMUNG	49
3.7.3.1	Lebendzellzahlbestimmung mithilfe des COULTER COUNTERS	49
3.7.3.2	Zellzahlbestimmung mithilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode	49
3.7.4	KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN	50
3.7.5	PRÄPARATION VON IL-3-HALTIGEM MEDIUM	50
3.7.6	KULTIVIERUNG VON ZELLEN	50
3.7.6.1	Adhärent wachsende Zellen	51
3.7.6.2	Suspensionszellen	51

3.7.7	TRANSFEKTIONSMETHODEN	51
3.7.7.1	Kalziumphosphat-Präzipitation	51
3.7.7.2	Transfektion mithilfe des Transfektionsreagenz FuGENE	52
3.7.7.3	Transfektion mithilfe des Transfektionsreagenz PolyFect	52
3.7.7.4	Transfektion mithilfe des Transfektionsreagenz SuperFect.....	53
3.8	GENTECHNISCHE ARBEITSMETHODEN	53
3.8.1	REAGENZIEN	53
3.8.2	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	53
3.8.3	TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIENSTÄMME	54
3.8.4	PLASMID-PRÄPARATION	54
3.8.5	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS ZELLEN	55
3.8.6	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER DNA	55
3.8.7	RESTRIKTION VON PLASMID-DNA.....	55
3.8.8	AUFFÜLLEN VON ÜBERHÄNGENDEN DNA-EINZELSTRANGENDEN	56
3.8.9	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON DNA.....	56
3.8.10	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN.....	57
3.8.11	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS ENZYMREAKTIONEN.....	57
3.8.12	LIGATION VON DNA.....	57
3.8.13	DEPHOSPHORILIERUNG LINEARISierter PLASMID-DNA	58
3.8.14	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	58
3.8.15	KLONIERUNG DER pSUPER-PLASMIDE.....	59
3.8.16	DNA-SEQUENZIERUNG.....	59
3.9	ARBEITEN MIT PROTEINEN	60
3.9.1	REAGENZIEN	60
3.9.2	HERSTELLUNG VON GESAMTPROTEINEXTRAKTEN AUS ZELLEN.....	60
3.9.3	PROTEIN-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD	61
3.9.4	SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE	61
3.9.5	ELEKTROTRANSFER	62
3.9.6	IMMUNDETEKTION.....	63
3.9.7	CHEMILUMINESZENZ-DETEKTION VON PROTEINEN.....	63
3.9.8	WIEDERVERWENDUNG VON WESTERN-BLOT-MEMBRANEN (<i>STRIPPEN</i>)	63
3.10	RETROVIRALE ARBEITSTECHNIKEN.....	64
3.10.1	RETROVIRALE VEKTORPRODUKTION.....	64
3.10.2	TRANSDUKTION/INFEKTION UND TITRATION	64
3.10.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	64
4	<u>ERGEBNISSE.....</u>	66
4.1	MONITORINGSYSTEM DER MLV-INFEKTION	66
4.1.1	CHARAKTERISIERUNG DES GFP-MOV.....	67
4.1.2	MONITORING DER REZEPTORBINDUNG DES GFP-ENV-FUSIONSPROTEINS.....	71
4.2	VERGRÖßERUNG DER KODIERUNGSKAPAZITÄT.....	72
4.2.1	VERPACKBARES MLV-GAG-POL MIT RFP	73
4.2.2	VERPACKBARES MLV-ENV MIT GFP.....	74
4.2.3	DETEKTION DER VEKTORKONSTRUKTE IN TRANSFIZIERTEN ZELLEN	75
4.2.4	BILDUNG VON SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN.....	76
4.2.5	VERANSCHAULICHUNG DER VORGÄNGE IN ZELLKULTUR NACH	

KOTRANSFEKTION DER TEIL-GENOME	80
4.2.6 TRANSDUKTION VON NIH3T3x4 MIT ÜBERSTÄNDEN DER KOTRANSFEKTION.....	82
4.2.7 TEST AUF STABILITÄT DES INSERierten GFP	84
4.2.8 TEST AUF GENETISCHE STABILITÄT DER SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN.....	86
4.3 TARGETING VON ECOTROPEM MLV-ENV	88
4.3.1 ERWEITERUNG DES WIRTSTROPISMUS MITTELS LIGANDENINSERTION	89
4.3.1.1 Herstellung eines zweifach modifizierten, ecotropen Hüllproteins.....	94
4.3.1.2 Klonierung eines RCR mit GFP und SDF-1 α	99
4.3.1.3 Test auf genetische Stabilität des SDF-1 α	101
4.3.1.4 Klonierung von SDF-1 α in pZAP (ohne GFP Env).....	102
4.3.2 ERWEITERUNG DES WIRTSTROPISMUS MITTELS GERICHTETER EVOLUTION	109
4.4 EINFÜGEN VON GFP IN DAS AMPHOTROPE MLV-HÜLLPROTEIN	115
4.4.1 KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES MLV MIT DEN SEQUENZEN FÜR GFP ALS FUSION AM N-TERMINUS DES AMPHOTROPEN HÜLLPROTEINS	117
4.4.2 CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN VIREN	118
4.4.3 UNTERSUCHUNG DER REPLIKATIONSEIGENSCHAFTEN DER REKOMBINANTEN GFP-TRAGENDEN AMPHOTROPEN MLVs AUF HUMANEN ZELLEN.....	122
4.5 SHRNA ALS THERAPEUTISCHES GEN	126
4.5.1 HERSTELLUNG VON REPLIKATIONSKOMPETENTEN SHRNA- EXPRESSIONSKASSETTEN TRAGENDEN MLVs.....	130
4.5.2 EFFEKT DER SHRNA-TRAGENDEN REPLIKATIONSKOMPETENTEN VIREN AUF DIE PROTEINEXPRESSION DER ZIELGENE	133
4.5.3 GENOMISCHE STABILITÄT DER REKOMBINANTEN VIREN	135
4.5.4 ÜBERPRÜFUNG DER INTERFERON-AUSSCHÜTTUNG.....	138
 5 <u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	 140
 6 <u>DISKUSSION.....</u>	 141
6.1 REPLIKATIONSKOMPETENTE MLV ALS GENTHERAPIEVEHIKEL.....	141
6.2 ERWEITERUNG DER INSERTIONSKAPAZITÄT VON MLV.....	144
6.3 TARGETING UND MONITORING VON ECOTROPEN RETROVIREN	145
6.4 MONITORING VON AMPHOTROPEN RETROVIREN	150
6.5 ÜBERTRAGUNG VON SHRNA.....	152
 7 <u>ANHANG.....</u>	 156
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR.....	156
7.1.1 BASEN	156
7.1.2 AMINOSÄUREN	156
7.1.3 ANGLIZISMEN	157
7.1.4 SONSTIGE ABKÜRZUNGEN	158
7.2 LITERATURVERZEICHNIS	164
7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	179

1 Einleitung

Mit zunehmender Kenntnis der in Zellen ablaufenden biophysikalischen Prozesse und deren Regulation auf molekularer Ebene wird es möglich, Krankheiten mithilfe molekularer Therapieformen zu heilen. Während klassische Therapieformen vielfach auf dem Einsatz niedermolekularer Wirkstoffe beruhen, greift die moderne Medizin auf biologische Makromoleküle als Therapeutika zurück.

Gentherapie ist definiert als das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieses Gens einen therapeutischen Nutzen zu erzielen. Als Therapeutikum können hierbei verschiedene Arten von Nukleinsäuren, wie z.B. vollständige Gene, Genfragmente oder Oligonukleotide aber auch *antisense*-RNA (Gewirtz, 2000; Opalinska and Gewirtz, 2002; Tuschl, 2002) eingesetzt werden.

Bis heute konnte für eine wachsende Zahl von Krankheiten (Herzkrankungen, bösartige Neoplasien, Diabetes Mellitus) nachgewiesen werden, dass sie durch genetische Faktoren beeinflusst werden (Nabel, 2004; Weinberg, 1994). Dabei nimmt Krebs eine prominente Stellung ein. Laut dem Statistischen Bundesamt Deutschland (Stand 2004) erkranken in Deutschland jährlich ca. 400.000 Menschen an Krebs, was die zweithäufigste Todesursache nach den Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems (45 %) ist. Bei nahezu jedem vierten Sterbefall (25,5 %) wurde eine bösartige „Neubildung“ festgestellt (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2004).

Die Gentherapie stellt besonders bei der Tumorintervention ein alternatives Konzept zu herkömmlichen Therapien dar. Ihr Ziel ist die Behandlung der Krankheitsursachen, im Gegensatz zu bisherigen, sich auf die Behandlung der Krankheitssymptome beschränkenden, Therapieansätzen. Der Vormarsch der Gentherapie in der modernen Tumorbekämpfung wird bei der Betrachtung der Entwicklung klinischer Gentherapiestudien deutlich. 67 % aller bis Januar 2006 angemeldeten, weltweit durchgeführten klinischen Studien konzentrieren sich auf die Behandlung von

Krebserkrankungen (siehe Abbildung 1-1). Auch ein steigendes Potential in der Behandlung von Infektionskrankheiten oder monogenetischen Erkrankungen ist zu erkennen.

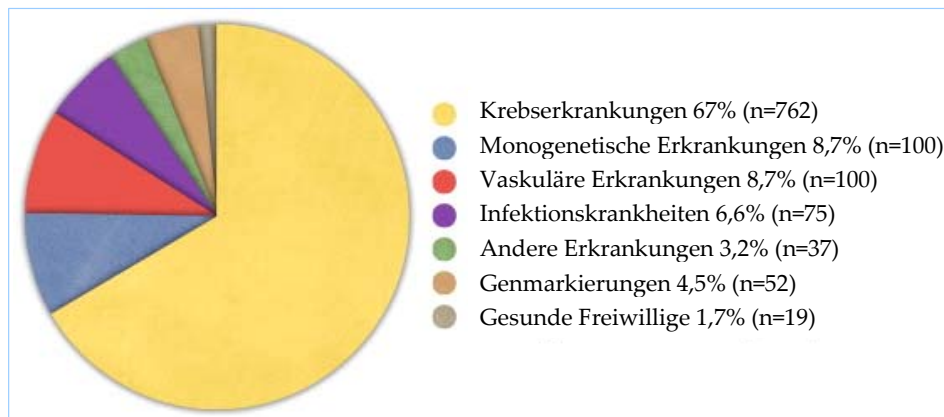


Abbildung 1-1 Behandlungsziele aller weltweit angemeldeten klinischen Studien der Gentherapie. Stand Januar 2006; modifiziert nach *Journal of Gene medicine* (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

1.1 Entstehung und Gentherapie von Krebs

Krebs ist die allgemeine Bezeichnung für eine bösartige Neubildung und stellt somit einen Sammelbegriff für verschiedene Erkrankungen dar, die genetischen Ursprungs sind, in Phasen ablaufen und sich durch genetische Instabilität und unkontrolliertes Wachstum auszeichnen (Stass and Mixson, 1997). Normalerweise sind die Zellen eines intakten, multizellulären Organismus auf Zusammenarbeit und Kooperation programmiert (Jackson and Loeb, 1998). Durch vererbte oder erworbene ursprüngliche genetische Alterationen und durch anschließende Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen gewinnen Krebszellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen, welcher durch invasives Wachstum sowie Metastasierung gekennzeichnet ist (Hanahan and Weinberg, 2000).

Im Allgemeinen sind Tumore klonaler Natur, was heißt, dass sie sich aus einer einzigen Zelle entwickelt haben. Die Mehrschritthypothese von Knudson beschreibt die maligne Transformation von Zellen über mehrere Stufen (Kinzler and Vogelstein, 1996; Knudson, Jr., 1985). Die Zelle erwirbt nach und nach Mutationen bzw. epigenetische Veränderungen, die Einfluss auf bestimmte zelluläre Wege oder Prozesse haben können. Solange nur ein Allel

durch die Mutation betroffen ist, kann dessen Funktion durch das andere noch gesunde Allel kompensiert werden. Treten zusätzlich jedoch Veränderungen im gesunden Allel auf, kann dies zu einem kompletten Ausfall der zellulären Funktion führen. Die Karzinogenese ist also kein singuläres Ereignis, sondern eine Serie somatischer Mutationen in unterschiedlichen Genen, die über mehrere Jahre hinweg kumulieren (Fearon and Vogelstein, 1990; Hahn *et al.*, 1999; Hanahan *et al.*, 2000) (siehe schematische Übersicht in Abbildung 1-2).

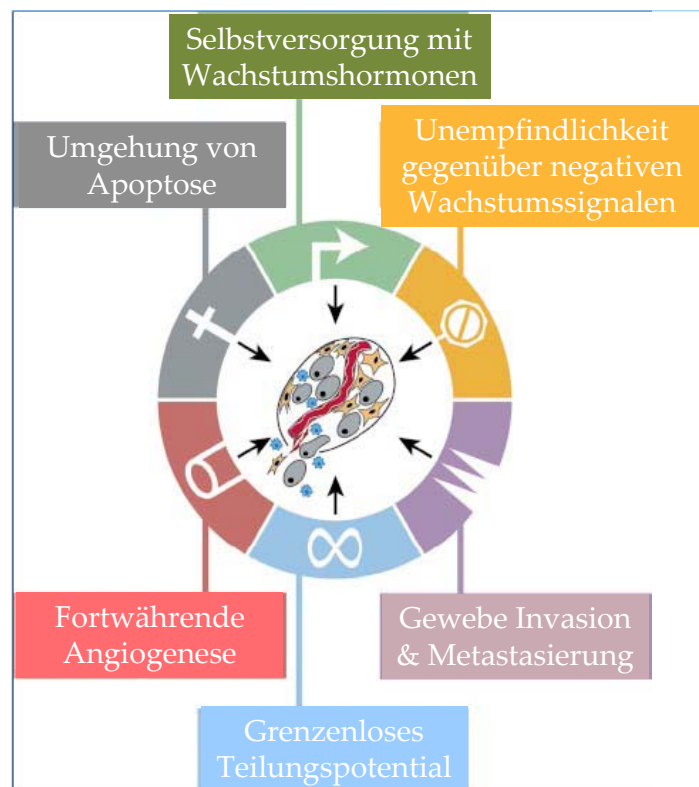


Abbildung 1-2 Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen. (Modifiziert nach Hanahan *et al.*, 2000).

Im transformierten Gewebe findet eine schrittweise Veränderung, die sog. Mikroevolution statt. Hierbei nehmen die Protoonkogene und die Tumorsuppressorgene eine entscheidende Stellung ein (Weinberg, 1994; Weinberg, 1991). Die bei neoplastischem Gewebe oft beobachtete ungehemmte Zellproliferation, sogar unter ungünstigen physiologischen Bedingungen und auch in völlig untypischer Umgebung (Metastasen), sowie die neuerworbenen Eigenschaften der Tumorzellen leiten sich genetisch aus einer Veränderung der Protoonkogene in Onkogene und/oder einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ab. Fortschreitende Veränderungen wie Punktmutationen, chromosomale Translokationen und Amplifikationen von Genabschnitten können zur Inaktivierung und Überexpression

von Genen führen, die zelluläre Signalkaskaden durch Überstimulation bzw. Inaktivierung (Abbildung 1-2) untereinander beeinflussen (Kinzler and Vogelstein, 1997; Olumi *et al.*, 1999; Skobe and Fusenig, 1998).

Für die Gentherapie von Krebs stehen zahlreiche Therapiemöglichkeiten zur Verfügung (Culver and Blaese, 1994; Nabel, 1999; Nabel, 2004). Die universellen Ansätze haben das künstliche Abtöten von Krebszellen zum Ziel, bauen auf die Stimulation der natürlichen Killerzellen gegen Krebszellen oder versuchen das benachbarte Gewebe vor einer Schädigung durch Chemo- oder Strahlentherapie zu schützen. Der in dieser Arbeit verwendete spezielle Ansatz der Gentherapie basiert auf der direkten Korrektur genetischer Defekte in Tumorzellen. Hierbei ist es wichtig zu wissen, welche Ursache die maligne Transformation in der behandelten Zelle hat. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf zwei mögliche Ziele bei der Behandlung von Krebszellen eingegangen.

1.2 EGFR als Zielstruktur der Tumorthherapie

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) spielen in der Tumorgenese und für malignes Zellwachstum eine bedeutende Rolle. Pathologische Veränderungen in der Expressionskontrolle oder in der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR (*epidermal growth factor receptor*) begünstigen die maligne Transformation gesunder Zellen.

Der EGFR ist ein Transmembran-Rezeptor auf der Oberfläche von Zellen und dient der Informationsübertragung vom externen Milieu in das Zellinnere. Der Rezeptor ist ein ca. 170 Kilo-Dalton (kDa) großes Protein und besitzt drei funktionelle Domänen: eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne (N-Terminus), eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (C-Terminus). Von den sieben bisher bekannten Liganden des EGFR ist EGF der bedeutsamste.

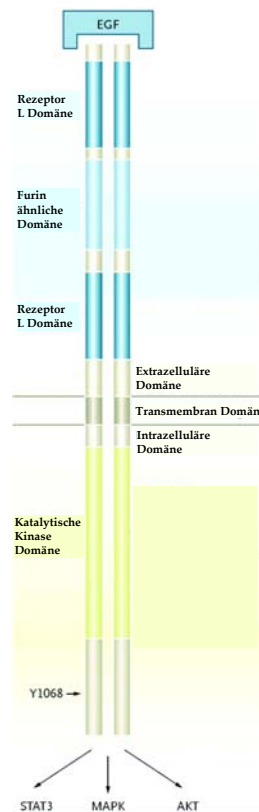


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors und der einzelnen Domänen. (Modifiziert nach Harari, 2004).

Nach Ligandenbindung kommt es im ersten Schritt der Aktivierung zur Dimerisierung der Rezeptormonomere, wobei entweder zwei EGFR (Homodimer) oder ein EGFR mit einem anderen HER (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*)-Familienmitglied zu einem Heterodimer dimerisieren kann (Yarden and Sliwkowski, 2001). Die Dimerisierung bewirkt eine Autophosphorylierung der in der intrazellulären Domäne des Rezeptors lokalisierten Tyrosinase. Dieser Aktivierung folgt die Bindung von zytoplasmatischen Botenproteinen, was die Einleitung von komplexen Signalkaskaden zur Folge hat. Dies können z.B. durch Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen (MAPK), STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (siehe Kapitel 1.3), aber auch durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT (Proteinkinase B) vermittelte Signalwege sein. Abbildung 1-4 zeigt einen Überblick über die bisher bekannte Signaltransduktion nach EGFR-Stimulation.

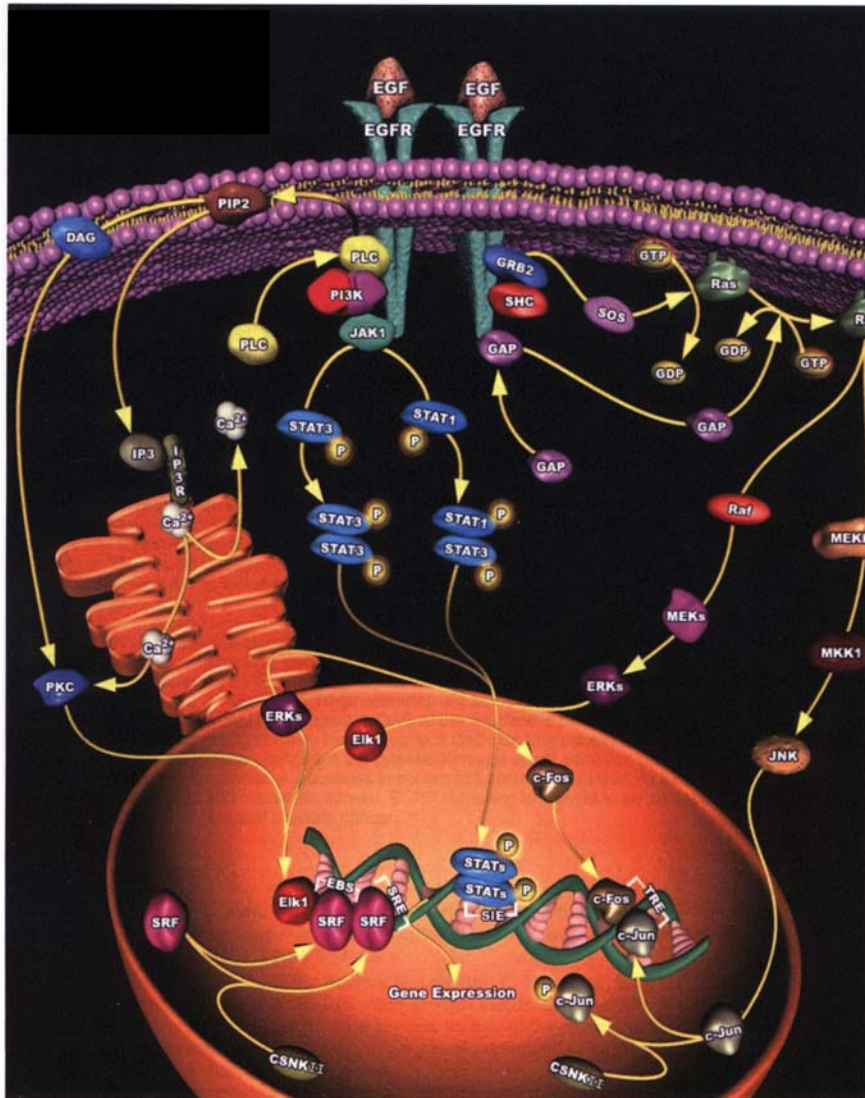


Abbildung 1-4 Überblick der Signalkaskaden nach Ligandenbindung an den EGFR. (Quelle: www.Proteinlounge.com).

Endpunkte dieser Kaskaden sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die z.B. die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung, aber auch Metastasierung und Angiogenese steuern. Nach erfolgter Aktivierung werden die Rezeptor-Liganden-Komplexe internalisiert und anschließend entweder recycelt oder abgebaut (Yarden *et al.*, 2001). Eine schematische Übersicht der Folgen der Signalkaskaden nach Ligandenbindung ist in Abbildung 1-5 dargestellt. Die Zusammenhänge, die zu einer proliferativen oder anti-proliferativen Antwort einer Zelle führen, sind in der Wissenschaft bisher jedoch nur in Ansätzen verstanden.

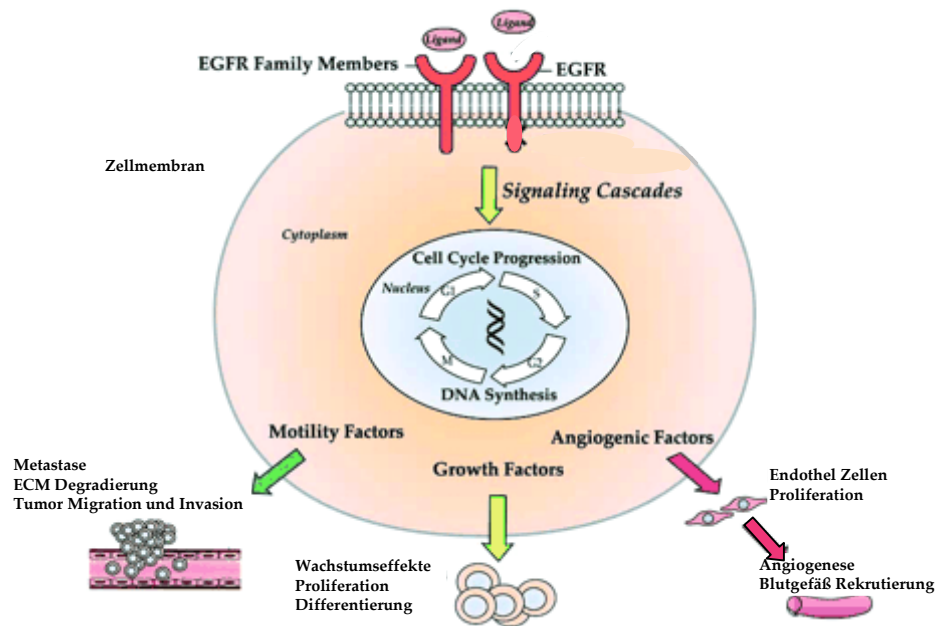


Abbildung 1-5 Schematische Übersicht der Folgen der Signalkaskaden nach Ligandenbindung.
(Modifiziert nach Harari, 2004).

Eine durch Genamplifikation verursachte Überexpression des EGFR kann den Zellzyklus oder die Zelldifferenzierung empfindlich stören und zum Entstehen eines Tumors beitragen. Eine zusammenfassende Studie der 1985 bis 2000 in *PubMed* (ein vom U.S. *National Institute of Health* (NIH) zur freien Verfügung gestelltes digitales Archiv aller biomedizinischen und biowissenschaftlichen Fachzeitschriften) veröffentlichten Literatur zeigt, dass Glioblastome, Lungenkarzinome, Mamma- und Ovarialkarzinome, Kopf- und Halstumore, Tumore des Gastrointestinaltraktes und Nieren-, Blasen-, und Prostatakarzinome eine erhöhte EGFR Expression aufweisen (Nicholson *et al.*, 2001).

Im Fall eines bestehenden Tumors bedeutet die Überexpression des Rezeptors, vor allem wenn sie mit einer erhöhten Koexpression der Liganden assoziiert ist, eine besonders ungünstige Prognose. Die Stimulation des EGFR führt in diesem Falle zu verstärktem Tumorwachstum, Stimulation von Metastasierung, Angiogenese und Gefäßinvasion sowie Apoptoseinhibition (Salomon *et al.*, 1995; Wells, 1999; Woodburn, 1999).

Die Behandlung der Tumoren ist schwierig, denn die EGFR-exprimierenden Karzinome werden im Laufe der Behandlung oft resistenter gegenüber Chemotherapien.

Neben einer EGFR-Überexpression kann die EGFR-Aktivität durch Heterodimerisierung des EGF-Rezeptors mit anderen Mitgliedern der HER-Familie, z.B. HER2, unphysiologisch erhöht sein. Des Weiteren sind verschiedene Mutationen im EGF-Rezeptorgen bekannt, welche eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors zur Folge haben.

Die in der Entstehung von Tumoren am häufigsten involvierte Form des EGFR ist die Mutante EGFRvIII, welche in mehr als 25 % aller Gliome (Wikstrand *et al.*, 1998; Wikstrand *et al.*, 1999) und auch in Lungen-, Brust- und Prostatakarzinomen (Lorimer, 2002) detektiert wurde. Es handelt sich hierbei um eine konstitutiv aktive Mutante des Rezeptors, welche keine Ligandenbindung zur Aktivierung der Signaltransduktion benötigt. Zusätzlich zu ihrer dysregulierten Aktivität sind die meisten Mutanten nicht mehr internalisierbar und verbleiben somit nach ihrer Aktivierung an der Zelloberfläche. Dadurch steigt die Anzahl der EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche, was das Zellwachstum weiter fördern kann.

In der Diagnostik ist vor allem die Überexpression des EGFR von Bedeutung und bestimmend für die Therapieentscheidung. Dabei dient der EGFR selbst als Zielobjekt für eine spezifische Tumorthherapie. Diese kann die Funktion des Rezeptors auf verschiedenen Ebenen gezielt angreifen und somit die Signaltransduktion unterbinden.

Die wichtigsten Methoden einer spezifischen Inhibition der Signalleitung sind die Anwendung von rezeptorspezifischen monoklonalen Antikörpern zur Blockierung der Ligandenbindung oder der lateralen Rezeptor-Interaktion, spezifische Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren (sog. *small molecules*), an Immunoliposomen gekoppelte Antikörper oder Liganden zum gezielten Transport von Toxinen, Wirkstoffen oder therapeutischen Genen (Azemar *et al.*, 2003; de Bono and Rowinsky, 2002; Marmor *et al.*, 2004). Aber auch siRNA und *Antisense*-Technik finden Verwendung bei der Inhibition der Expression der EGFR-Rezeptorgene (Zhang *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wird ebenfalls die *Antisense*-Technologie als Methode angewendet, um die Expression des EGFR herunterzuregulieren.

1.3 STAT3 als Zielstruktur der Tumorthherapie

STATs (*signal transducers and activators of transcription*) sind eine Familie von zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung beteiligt sind. Es gibt sieben Mitglieder dieser Familie, wobei alle eine konservierte Struktur aufweisen. STATs sind im Zytoplasma lokalisiert und befinden sich in einem inaktiven Zustand. Nach Zelloberflächen-Rezeptoraktivierung durch Bindung eines Liganden werden die STAT-Moleküle durch die rezeptorassoziierte Tyrosinkinase aktiviert. Signifikant in diesem Zusammenhang ist die JAK-Familie (Janus Protein Tyrosinase Kinase) der Tyrosinkinasen, welche sehr schnell (innerhalb einer Minute) nach ligandinduzierter Rezeptor-Dimerisierung/Multimerisierung durch Autophosphorylierung aktiviert werden. Die aktivierte JAK-Kinase phosphoryliert den Rezeptor, an welchen sie gebunden ist. Die Phosphorylierung des Rezeptors ermöglicht den STAT-Molekülen, an diesen Komplex anzudocken. Diese Bindung ermöglicht die Phosphorylierung des STAT an seinem C-Terminus, was wiederum zum Herauslösen des phosphorylierten Moleküls aus dem Rezeptor-Komplex und zur Homodimerisierung (im Falle von STAT3) der Moleküle führt. Dimerisierte STATs wandern sehr schnell in den Zellkern, wo sie an Promotoren binden, die spezielle DNA-Bindesequenzen besitzen (Clevenger, 2004). Eine schematische Übersicht der ausgelösten Signalkaskaden ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

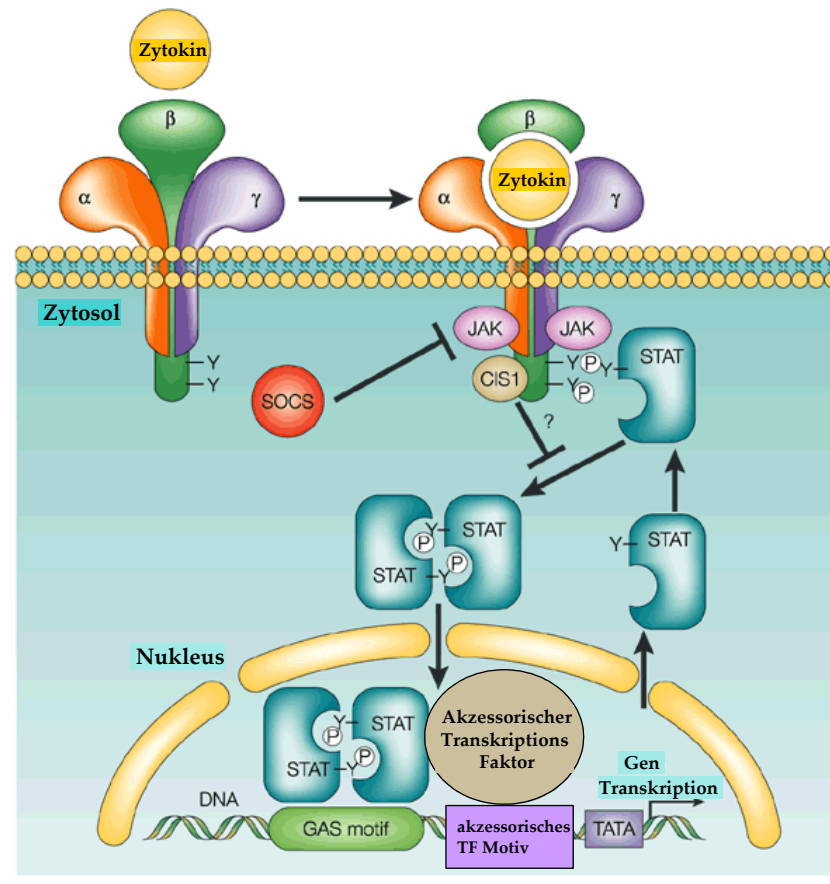


Abbildung 1-6 Funktion der STAT-Moleküle nach Aktivierung. (Modifiziert nach Leonard, 2001).

Während STAT3 als Transkriptionsfaktor an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung für Zellen unentbehrlich ist, ist auch hier eine nicht regulierte Aktivität bei einem Dutzend humaner Krebsarten beobachtet worden. In über 50 % aller Brust- und Lungenkrebsarten, in hepatozellulären Karzinomen, multiplen Myelomen und mehr als 95 % aller Krebsarten des Kopfes und des Halses ist eine Überexpression des STAT3-Moleküls beschrieben worden.

Wesentliche Anhaltspunkte für die Rolle der STATs im Prozess der malignen Transformation, insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen, ergaben sich aus Untersuchungen, in denen eine konstitutive Aktivierung von Mitgliedern der STAT-Familie gezeigt werden konnte. STAT3 wurde als konstitutiv aktiviert in z.B. AML (akute myeloblastische Leukämie) (Gouilleux-Gruart *et al.*, 1996), sowie in Non-Hodgkin-Lymphomen und der *Mycosis fungoides* (Nielsen *et al.*, 1997) beschrieben. Unterstützend zum Zusammenhang zwischen STAT-Aktivierung und maligner Zellentwicklung konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass in kultivierten Zellen der beschriebenen Krebsarten nach

Unterbrechung der STAT3-Aktivität, Apoptose induziert werden kann. Dies gelingt z.B. durch die Expression einer dominant negativen Variante des STAT3-Moleküls (Bromberg *et al.*, 1999) oder durch die negative Wirkung von *antisense* Oligonukleotiden, die auch in dieser Arbeit als therapeutische Gene Einsatz finden.

1.4 Gentransfersysteme für die Krebsgentherapie

Um maligne Zellen zu therapieren, stehen zwei Möglichkeiten des Gentransfers zur Verfügung. Es gibt Methoden, die auf dem direkten Einbringen des Gens in den Körper (*in vivo*) basieren. Eine andere Methode schleust das Gen *ex vivo* in den Körper, indem das Gen außerhalb des Körpers in leicht isolierbare Körperzellen (z.B. hämatopoetische Zellen und Leberzellen) transferiert wird und die manipulierten Zellen anschließend wieder reimplantiert werden. Für das Einschleusen genetischen Materials in Zellen *in vivo* wird ein Vehikel benötigt, das als Vektor bezeichnet wird. Der Vektor ist damit für das Erreichen der Zielzellen (*Targeting*) verantwortlich und beeinflusst somit die Effizienz der Genthherapie. Ein idealer Vektor muss folgende Anforderungen erfüllen: Der Transfer in die Zielzellen sollte selektiv und mit hoher Effizienz erfolgen. Die Genexpression sollte stabil und im besten Falle regulierbar sein. Der Vektor sollte eine ausreichende Aufnahmekapazität für Gene besitzen sowie eine geringe Pathogenität und Immunogenität in den Zielzellen haben. Im wirtschaftlichen Sinne sollte der Vektor einfach und kosteneffizient herstellbar sein sowie eine lange Stabilität aufweisen. Es gibt eine Reihe von physikalischen, chemischen und biologischen Methoden, die sich mit dem Problem des Gentransfers auseinandersetzen. Allgemein wird zwischen viralen und nicht viralen Vektoren unterschieden. Keines der zurzeit verfügbaren Vektorsysteme kann jedoch allen Ansprüchen genügen.

In der Krebsgentherapie sind die retroviralen neben den adenoviralen Vektoren nach wie vor die am häufigsten verwendeten Gentransfersysteme. Sie sind in der Lage, sehr effizient eukaryotische Zellen zu infizieren, dabei das Transgen stabil in das Wirtszellgenom zu inserieren und die kodierten Proteine über einen längeren Zeitraum zu exprimieren. Die Fähigkeit von Retroviren, sich nur in teilenden Zellen zu verbreiten, stellt eine Art

Tropismus dieser Viren zu dem meist sich entartet teilendem Krebsgewebe dar (Miller *et al.*, 1990).

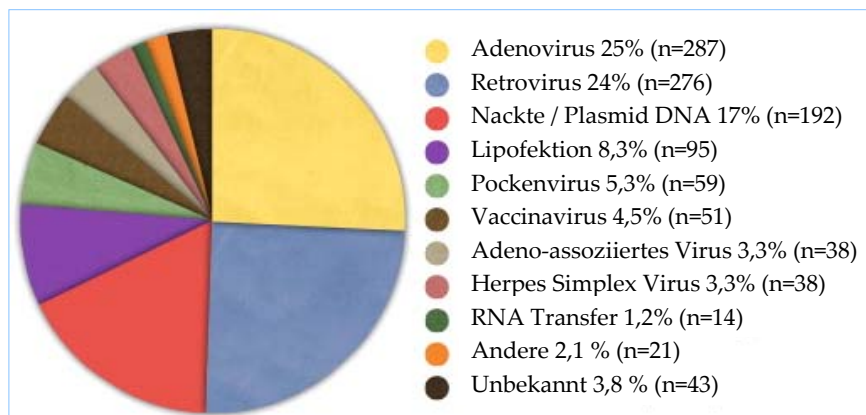


Abbildung 1-7 Verwendete Gentransfersysteme aller weltweit angemeldeten klinischen Studien. Stand Januar 2006; modifiziert nach *Journal of Gene medicine* (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

Abbildung 1-7 zeigt einen Überblick über die verwendeten Gentransfersysteme aller bis Januar 2006 weltweit angemeldeten klinischen Genthapiestudien. Die Retroviren stellen über ein Fünftel aller verwendeten Transfersysteme dar.

1.5 Murine Leukämieviren (MLV) als Genthapi Vehikel

Retrovirale Vektoren sind wertvolle Werkzeuge für den Transfer von Genen in tierische Zellen. Im Vergleich zu anderen Gentransfermethoden bieten sie den Vorteil der Fähigkeit, ihre Gene stabil in die Chromosomen der Wirtszellen zu integrieren und gewährleisten dadurch eine dauerhafte Expression der transferierten Gene. Die gängigen retroviralen Vektoren stammen vom murinen Leukämievirus (MLV) ab. Dieses Virus gehört zu den Gamma-Retroviren.

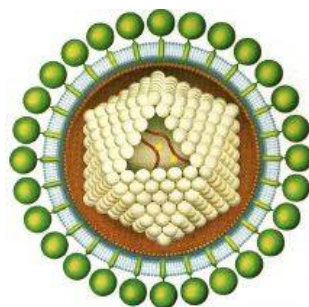


Abbildung 1-8 Schematische Darstellung eines Gamma-Retrovirus. (Quelle: www.tododrogas.net).

Die Familie der *Retroviridae* wird in drei Subfamilien unterteilt: Die *Orthoretroviridae*, die *Spumaretroviridae* sowie die *Lentiviridae*. Die *Orthoretroviridae* werden in einfache und komplexe Viren unterteilt. Die „einfachen“ Alpha-, Beta- und Gamma-Retroviren, zu denen MLV gehört, kodieren nur für die Hüll- und Strukturproteine und die viralen Enzyme. Die „komplexen“ Delta- und Epsilon-Retroviren, ebenso wie die *Lentiviridae*, exprimieren außerdem zusätzliche regulatorische und akzessorische Proteine. Ein prominentes Mitglied der Familie der *Lentiviridae* ist das humane Immundefizienz-Virus HIV.

Ihren Namen verdanken die Retroviren einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der so genannten reversen Transkriptase (Temin and Mizutani, 1970). Das Genom dieser einfach strukturierten, umhüllten Viren besteht aus zwei identischen RNA-Strängen und wird auch einzelsträngiges Plusstrang-RNA-Genom (ss(+)RNA) bezeichnet. Während des Replikationszyklus schreiben die Viren mithilfe der reversen Transkriptase ihr RNA-Genom in doppelsträngige DNA um. Sie sind somit in der Lage, den üblichen genetischen Informationsfluss von DNA über RNA zu Protein umzukehren. Da die reverse Transkription der RNA in DNA direkt von dem kodierten Strang ausgehen kann, wird das Genom als Plus-Strang-Genom bezeichnet.

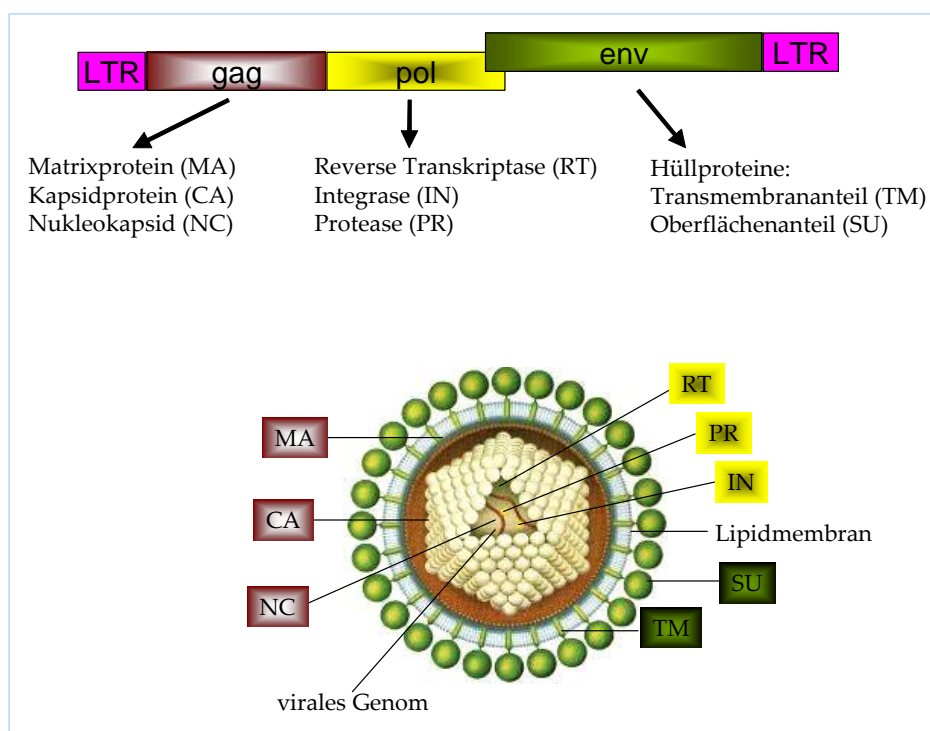


Abbildung 1-9 Schematische Darstellung des retroviralen Genoms und eines Viruspartikels.

Abbildung 1-9 zeigt eine schematische Darstellung des retroviralen Genoms. Die drei Gene *gag*, *pol* und *env* sind auf diesem Genom kontinuierlich angeordnet. Die Gene sind flankiert von den LTR (*Long Terminal Repeat*)-Promotorsequenzen. Sie enthalten verschiedene regulatorische Elemente wie Promotoren und *enhancer*, die eine entscheidende Rolle bei der Transkription des Provirus spielen. *gag* kodiert die Strukturproteine CA (Kapsidprotein), MA (Matrixprotein) und NC (Nukleokapsidprotein). Diese sind am Aufbau des Kapsids beteiligt. *pol* kodiert die für die Replikation des Virus notwendigen Enzyme: die reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Integrase (IN), welche die Fixierung des Provirus in das Wirtsgenom vornimmt und die virale Protease (PR), die bei der Reifung des Virus die als Polyproteine translatierten Virusproteine Gag und Gag-Pol spaltet. *env* kodiert das trimerisierende Hüllprotein, das für die Interaktion des Virus mit seinem Rezeptor auf der Zelloberfläche verantwortlich ist und die Fusion des Virus mit der Zelle vermittelt. Die Funktion der einzelnen Virusproteine wird bei Betrachtung des Lebenszyklus des MLV deutlich. Abbildung 1-10 zeigt eine schematische Darstellung des retroviralen Lebenszyklus.

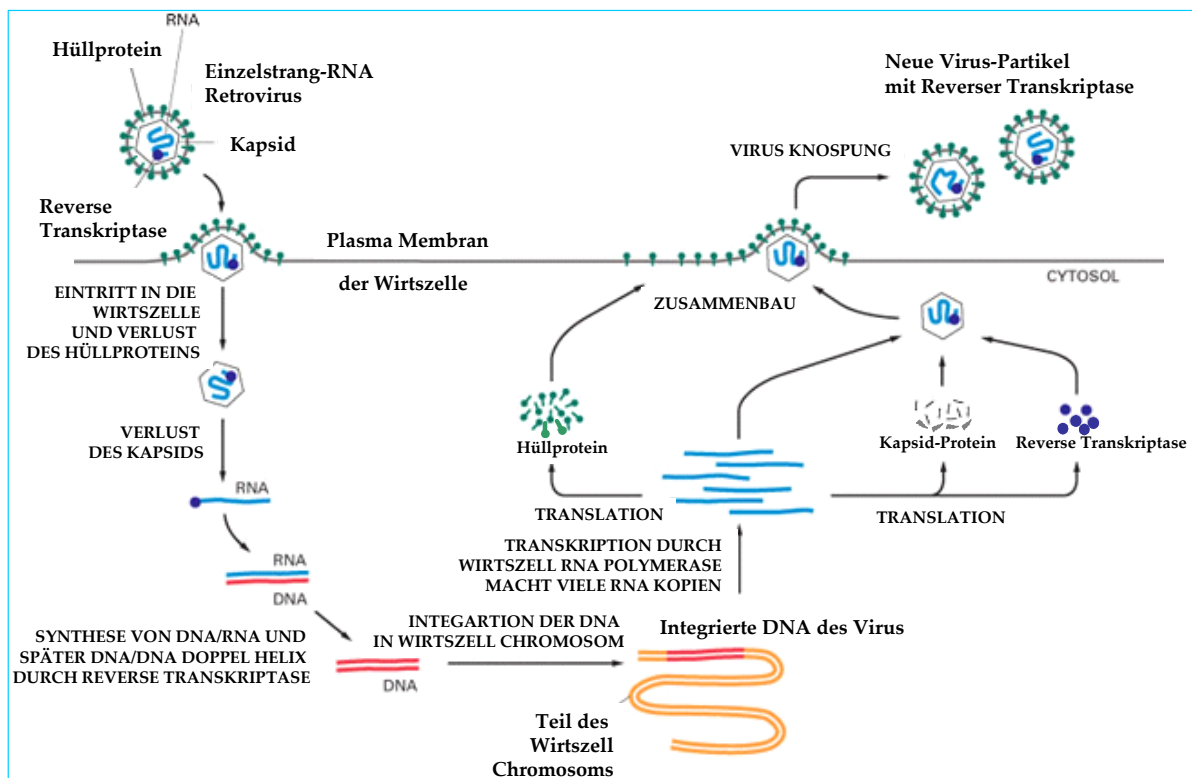


Abbildung 1-10 Schematische Darstellung des retroviralen Lebenszyklus.

(Quelle: www.accessexcellence.org).

Der Infektionszyklus von Retroviren lässt sich in eine frühe und in eine späte Phase einteilen (Varmus and Swanström, 1982). In der frühen Phase bindet das Virus über Env spezifisch an den Rezeptor auf der Zelloberfläche und leitet eine Konformationsänderung im Hüllprotein ein, die zur Exposition des Fusionspeptids führt (siehe Abbildung 1-12). Nach der Fusion mit der Wirtszellmembran wird die Virushülle abgebaut. Es erfolgt eine Freisetzung des Viruskapsids in das Zytoplasma der Zielzelle. Konformationsänderungen im Kapsid, die nach dessen Freisetzung ins Zytoplasma stattfinden, aktivieren die RT, welche daraufhin die doppelsträngige DNA-Kopie der viralen RNA synthetisiert. Das Provirus wird nun in den so genannten Präintegrationskomplex, in dem unter anderem die Integrase eingebunden ist, gebunden, in den Zellkern geschleust und vorwiegend am Startpunkt transkriptioneller Einheiten integriert (Wu *et al.*, 2003). Mittels der Promotoraktivität der 5'-LTR wird die Transkription der Gene initiiert.

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 sowie den Poly(A)-Schwanz. Nach der Translokation ins Zytoplasma werden von der Vollängen-RNA die Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine, von der gespleißten Form das Env-Vorläuferprotein translatiert. Diese Vorläuferproteine werden, beginnend in der Zelle und abschließend im Virion, zu reifen Proteinen prozessiert. Zwei ungespleißte, miteinander assoziierte RNA-Moleküle werden als neues Genom mithilfe ihres Verpackungssignals ψ in die entstehenden Virionen eingebaut (Prats *et al.*, 1990). Die Env-Vorläuferproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat zu reifen Hüllproteinen prozessiert und sekretorisch zur Zellmembran transportiert (Hunter and Swanstrom, 1990). Dort assoziieren die Hüllproteine mit Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen, wodurch die Ausknospung eines unreifen Virions eingeleitet wird. Beim Knospen nehmen die Viren von der Zelle die Membran inklusive Env und anderer Oberflächenproteine mit. Durch die Expression von Env auf der Zelloberfläche vermindern sich dort die Zugänglichkeit der mCAT-1- bzw. rPit-2-Rezeptormoleküle. Dieser als virale Interferenz bekannte Effekt verhindert die Superinfektion einer bereits MLV-infizierten Zelle durch weitere Viren, die denselben Rezeptor benutzen (Coffin *et al.*, 1997).

1.5.1 Das MLV-Hüllglykoprotein

Das MLV-Env-Protein ist, wie alle retroviralen Envs, ein Typ I-Membranprotein. Wie alle Membranproteine besteht es aus einer membrandurchspannenden Domäne (TM=transmembran) und einer extrazellulären Domäne (SU=*surface*, engl.: Oberfläche). Es wird als Vorläuferprotein synthetisiert und mittels seines N-terminalen Signalpeptids ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) geleitet. Im ER wird das Signalpeptid abgespalten, das Protein wird glykosyliert, und korrekt gefaltete Proteine finden zu Trimeren zusammen. Nach dem Transport zum Golgi-Apparat finden weitere Glykosylierungen statt. Das Vorläuferprotein wird durch Furin oder andere Proteasen in seine Untereinheiten gespalten. Die SU- und TM-Domänen sind im Falle des MLV-Env durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Spaltung ist Voraussetzung für die endgültige Env-Konformation, die jetzt erst fusionskompetent und für den viralen Eintritt in die Wirtszellen notwendig ist. Vom Golgi-Apparat wird das reife Env zur Plasmamembran transportiert, wo es in die knospenden Virionen eingebaut wird. Im Viruspartikel wird das Env weiter prozessiert. Ein kurzer Bereich des zytoplasmatischen Schwanzes von TM, das R-Peptid, wird von den viralen Proteasen abgespalten. Dieser Schritt ist notwendig, um das Fusionspotential des Env zu aktivieren (Coffin *et al.*, 1997). Vor dieser finalen Prozessierung ist das Env fähig, an seinen Rezeptor zu binden, jedoch unfähig, die Fusion einzuleiten. Die Bindung an den Rezeptor erfolgt über die Rezeptorbindedomäne (RBD).

Die Gruppe der murinen Leukämieviren kann unterschiedliche Hüllproteine auf der Oberfläche tragen, welche über den Wirtstropismus des Virus entscheiden. Anhand der unterschiedlichen Hüllproteine kann das MLV in vier unterschiedliche Wirtstropismus-Subgruppen unterteilt werden (Coffin *et al.*, 1997). Während das amphotrope (amphos = beide) Hüllprotein den rPit-2-Rezeptor, einen natriumabhängigen Phosphat-Transporter, erkennt, der auf allen Säugerzellen ubiquitär vorkommt, infiziert das ecotrope (ecos = heim) Hüllprotein nur Maus- und Rattenzellen über den mCAT-1-Rezeptor. Beide Viren sind exogene MLVs, die ursprünglich aus wilden Mausstämmen isoliert wurden. Das ecotrope Virus kann nur Zellen infizieren, aus denen es ursprünglich abstammt, während das amphotrope Virus Zellen des eigenen Ursprungs sowie andere Zellen infizieren kann. Die Wissenschaft unterscheidet weiterhin die polytropen und xenotropen Hüllproteine. Diese

Hüllproteine tragenden MLVs existieren als endogene Retroviren in allen durch Inzucht entstandenen Mausstämmen und sind unfähig, die Zellen des Organismus zu infizieren, aus dem sie stammen. Der Rezeptor für das xenotrope (xenos = fremd) MLV ist polymorph in Mäusen, jedoch nicht auf den Zellen anderer Spezies präsent. Der Genlocus des xenotropen Rezeptors ist vom Locus des polytropen Rezeptors nicht zu unterscheiden.

Sequenzvergleiche zwischen den Rezeptorbindedomänen der Hüllproteine unterschiedlicher Gamma-Retroviren, die an unterschiedliche Rezeptoren binden, enthüllten im RBD einen konservierten Rahmen, welcher zwei hypervariable Regionen VRA (variable Region A) und VRB (variable Region B) enthielt. Diesen Regionen wird die Rezeptorbindung zugesprochen (Battini *et al.*, 1995; Battini *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1993; Ott and Rein, 1992). Die Beobachtung, dass Mutationen in diesem Bereich die Rezeptorbindung aufheben, unterstützen diese These (Bae *et al.*, 1997; MacKrell *et al.*, 1996). Die prolinreiche Region zwischen der N- und der C-terminalen Region des SU ist kritisch für die Struktur und die Integrität des Moleküls. Das hydrophobe Fusionspeptid, welches nahe dem N-Terminus von TM lokalisiert ist, ist wichtig für die Induktion der Fusion. Abbildung 1-12 A zeigt die genomische Env-Domänenorganisation.

1.5.2 Der retrovirale Rezeptor mCAT-1

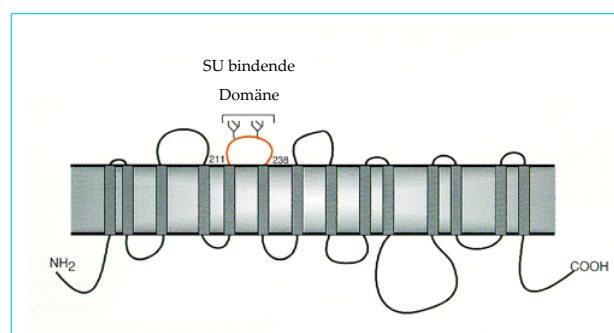


Abbildung 1-11 Rezeptor für ecotrope MLVs. Schematische Darstellung der 14 membrandurchspannenden Regionen, intrazellulären und extrazellulären Schleifen. (Rot hervorgehoben ist die Domäne, die in die Bindung des SU involviert ist).

Der ecotrope Rezeptor mCAT-1 ist ein Aminosäuren-Membran-Transporter-Molekül (Albritton *et al.*, 1989). Er besteht aus 622 Aminosäuren und durchdringt mit seinen 14 membrandurchspannenden Domänen mehrfach die Membran. Die Domäne zwischen den Aminosäuren 211 und 238 repräsentiert die Stelle, die in die Bindung des SU-Proteins involviert ist (siehe Abbildung 1-11). Nach Bindung der variablen Region an den Rezeptor finden Konformationsänderungen im Hüllprotein statt, welche zur Exposition des Fusionspeptids führen. Gleichzeitig kommt es zur Bildung eines Bündels aus sechs Helices. Diese Formation scheint das Ziel zu haben, den Abstand zwischen der viralen und der zellulären Membran zu verkleinern. Das exponierte Fusionspeptid ist verantwortlich für die Penetration in die Wirtszelle. Es katalysiert die Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran. Abbildung 1-12 B zeigt ein Modell der molekularen Umorientierung des Env nach Bindung an seinen Rezeptor.

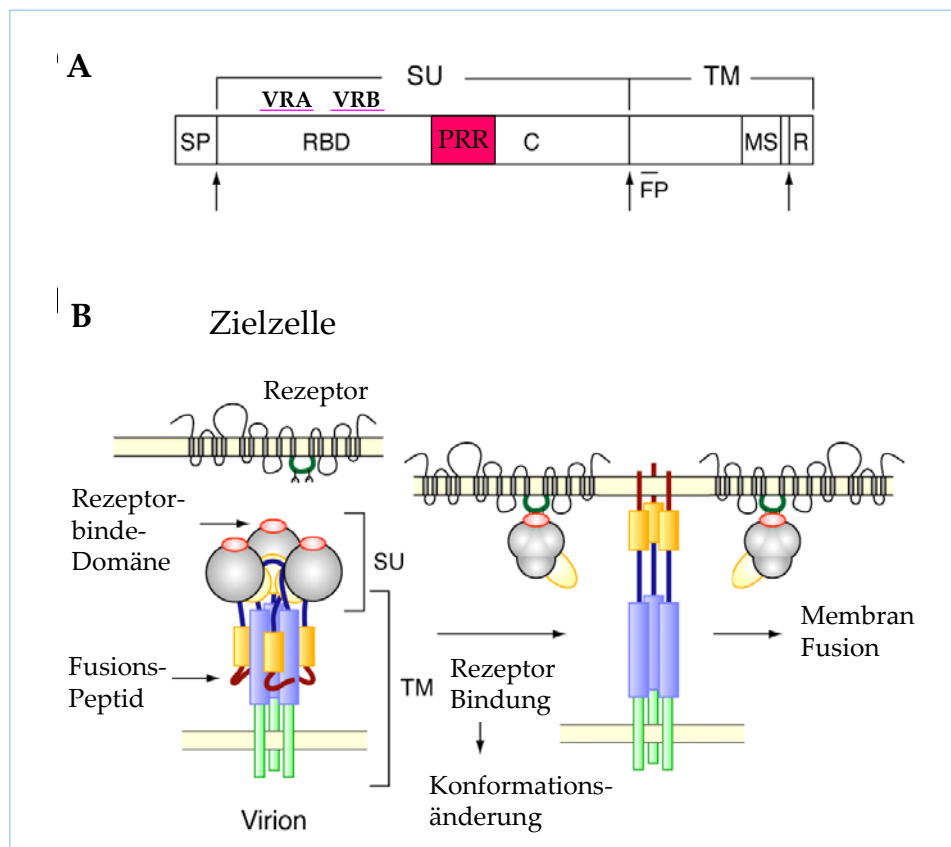


Abbildung 1-12 Struktur und Funktion von MLV-Env-Proteinen. A: Schematische Domänenorganisation des Env. SU: Oberflächendomäne, TM: Transmembrandomäne, SP: Signalpeptid, RBD: Rezeptorbindedomäne, VRA: variable Region A, VRB: variable Region B, PRR: prolinreiche Region, C: C-terminale Domäne, MS: membrandurchspannende Domäne, R: R-Peptid, FP: Fusionspeptid. Die horizontalen Pfeile deuten die Positionen der proteolytischen Spaltung des Env-Vorläuferproteins an. B: Modell der molekularen Umorientierung des Env nach Bindung an den Rezeptor. Die SU-Untereinheit

bindet an den Rezeptor, was zu einer Konformationsänderung führt und die Transmembrandomäne aktiviert, welche die Hüllprotein-Zell-Fusion durch das Fusionspeptid initiiert. (Modifiziert nach M. Katane, 2003).

1.6 Replikationskompetente Retroviren als Vehikel

Genbasierte Therapien für Krebs als eine neue Behandlungsmethode wurden innerhalb der letzten Jahre exzessiv untersucht, leider mit eher unbefriedigenden Resultaten. Das größte Hindernis bei dieser Art von Therapie ist die inadäquate Transgenexpression und die schlechte Verteilung von replikationsinkompetenten, viralen Vektoren innerhalb von soliden Tumoren. Nach der direkten *in vivo* (intratumoralen) Administration von nicht replizierenden, retroviralen oder adenoviralen Vektoren (die bis heute am häufigsten verwendeten Systeme zum Einschleusen von Genen (siehe Kapitel 1.4)) konnte die Transgenexpression nur in einem kleinen Teil (von ca. 10 %) innerhalb des Tumorgewebes erreicht werden (Ram *et al.*, 1997; Roth and Cristiano, 1997; Vile *et al.*, 2000). Nach Einbringen eines Vektors in das Tumorgewebe kann dieser nur einige Zellen transduzieren. Es findet keine Ausbreitung des Transgens in die Nachbarzellen statt (Sinn *et al.*, 2005). Um die Transduktionseffizienz der Vektoren zu erhöhen, muss nach Strategien gesucht werden, welche zur Infektion der umliegenden Zellen führen. Der so genannte *Bystander*-Effekt (engl. *Bystander*: umherstehende Zuschauer) kann durch eine Verwendung von replikationskompetenten Viren erreicht werden. Nach Applikation eines replikationskompetenten Virus in das Tumorgewebe ist es nicht wichtig, wie viele Zellen ursprünglich getroffen werden, denn jede erfolgreich infizierte Tumorzelle wird zu einer virusproduzierenden Zelle (Miller *et al.*, 1990). Das Virus kann also im Gewebe replizieren und umliegende Zellen ebenfalls mit dem Transgen versorgen (siehe Abbildung 1-13).

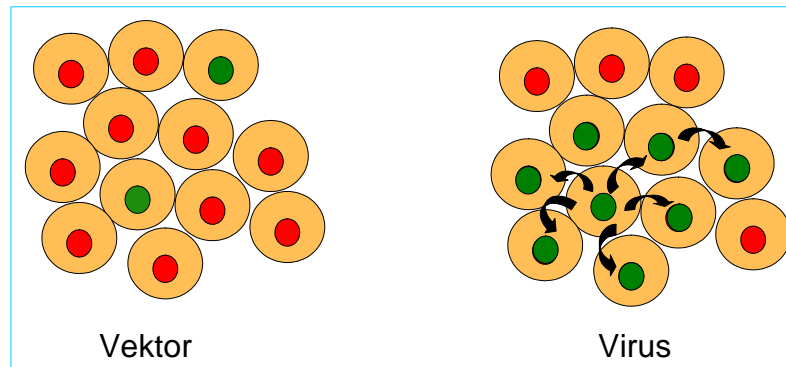


Abbildung 1-13 Schematische Darstellung der Verteilung eines replikationskompetenten Virus in Zellen im Vergleich zu einem nichtreplizierenden Vektor.

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Verwendung von replikationskompetenten MLVs als Vehikel für die humane Gentherapie, da sich diese als besonders effizient in ihrem *Bystander*-Effekt erwiesen haben. Replizierende MLVs weisen, aufgrund ihrer Unfähigkeit, ruhende Zellen zu infizieren, einen natürlichen Tumortropismus auf. Dies macht sie zu perfekten Kandidaten für die lokale Therapie von soliden Tumoren. Bevor replikationskompetente Viren jedoch für eine systemische Therapie zum Einsatz kommen können, sollte aus Sicherheitsgründen die Replikation dieser Viren zusätzlich strikt kontrolliert werden. Dies geschieht durch mehrere Manipulationen der Viren, z.B. im Hinblick auf ihre Wirksamkeit, also der Wahl des Transgens oder der in Hinblick der Sicherheit, also der Wahl der Zielgenauigkeit (*Targeting*).

1.7 Targetingstrategien von Retroviren

Auf dem Weg zur Entwicklung von Gentransfervehikeln, die unter anderem auch systemisch verabreichbar sein sollen, stellt das *Targeting* (das gerichtete Zielen) des retroviralen Eindringmechanismus ein zentrales Thema in der Entwicklung von Vektoren für die Gentherapie dar. Obwohl Retroviren nur aktiv teilende Zellen infizieren können, was ihnen den einzigartigen Vorteil eines gegebenen Tumortropismus verschafft, würde das gezielte *Targeting* auf spezielle humane Tumorzellen die Sicherheitsaspekte enorm erhöhen. Ein retroviraler Vektor mit definierter Infektionsspezifität würde das selektive Einschleusen eines therapeutischen Genes ermöglichen, ohne gesunde Zellen zu schädigen. Somit könnten

die unerwünschten Nebeneffekte erheblich reduziert und ein Weg für die klinische Applikation in der Gentherapie geebnet werden.

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, Retroviren gezielt in Zellen zu steuern. Der Einbau fremder Hüllproteine in die Hülle eines Virus ist ein natürlich vorkommendes Phänomen. Es kann bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit zwei unterschiedlichen, behüllten Viren auftreten und wird als Pseudotypisierung bezeichnet (Zavada, 1982). Diese Methode stellt eine Möglichkeit dar, retrovirale Vektoren einer gezielten Veränderung ihres Tropismus zu unterziehen. Allerdings ist dieser transiente Ansatz generell durch den Mangel viraler Hüllproteine mit sehr eingeschränktem zelltypspezifischem Tropismus limitiert. Aus diesem Grunde wurde schon früh nach Wegen gesucht, den Tropismus von Retroviren durch Modifikation der Hüllproteine (*envelope engineering*) zu verändern.

Das Ändern des Wirtstropismus eines retroviralen Vektors mittel *envelope engineering* basiert auf der Inkorporation eines DNA-Segments, welches für einen bestimmten Liganden oder einen *single-chain*-Antikörper kodiert, in das Gen des Hüllproteins. Eine solche Insertion könnte die spezifische Infektion von z. B. Tumorzellen erlauben, die den entsprechenden Rezeptor exprimieren. Gesunde Zellen wären geschützt, da diese weder den tumorspezifischen noch den ecotropen Rezeptor exprimieren und somit für dieses Virus nicht permissiv sind (siehe Abbildung 1-14).

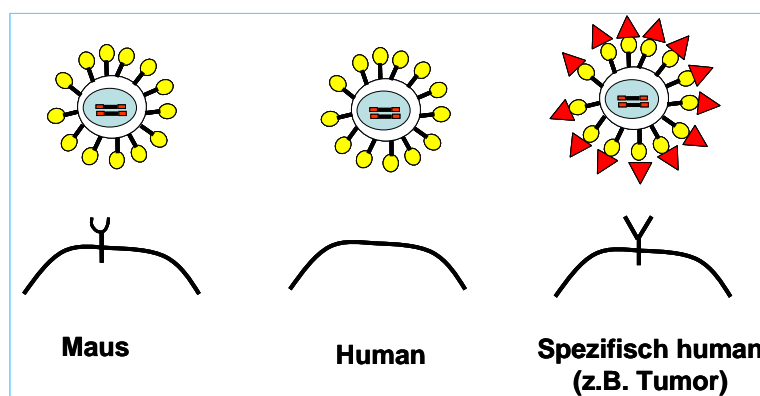


Abbildung 1-14 Schematische Darstellung der Erweiterung des Wirtstropismus von ecotropem MLV-Env auf spezifische humane (Tumor-)Zellen.

Zahlreiche Studien haben Positionen innerhalb des ecotropen Hüllproteins untersucht, die eine Insertion von zusätzlichen Sequenzen tolerieren (Ager *et al.*, 1996; Kayman *et al.*, 1999;

Wu *et al.*, 2000). Meist konnte mittels der Insertion eine erfolgreiche Bindung der modifizierten Viruspartikel an die Zielzellen beobachtet werden. Eine produktive Infektion erfolgte allerdings nicht, da die Bindung des Liganden an den neuen Rezeptor meist keine Konformationsänderung des Hüllproteins zur Folge hatte. Die Verschmelzung der Membranen wurde demzufolge verhindert.

Ein prominenter Fall war die Insertion des epidermalen Wachstumsfaktors EGF in das ecotrope MLV-Env. Die Insertion ermöglichte die Bindung der rekombinanten Viren an den neuen Zielrezeptor EGFR. Allerdings führte die Bindung zur direkten Weiterleitung der Viren in Endosomen wo sie abgebaut wurden und nicht zur Infektion führen konnten (Cosset *et al.*, 1995). Abbildung 1-15 zeigt eine schematische Abbildung der Vorgänge nach Bindung der EGF-modifizierten Viren an den EGFR.

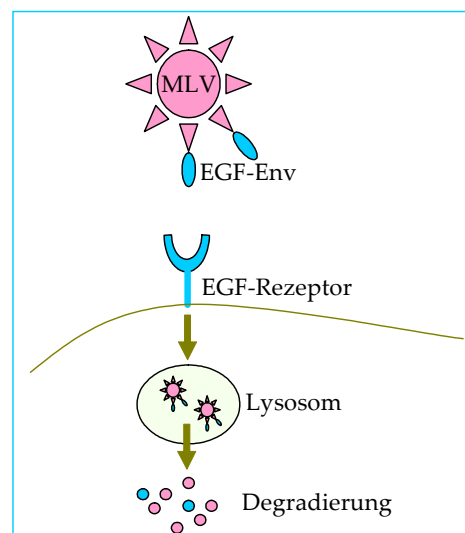


Abbildung 1-15 Endosomen-Degradierung von EGF-tragenden Retroviren nach Rezeptorbindung.

Aus diesen eher enttäuschenden Beobachtungen ließen sich neue Erkenntnisse für alternative Strategien ableiten; es entstand die Methode des inversen *Targetings*. Auch amphotrope Viren, welche EGF-Sequenzen in ihren Env-Proteinen tragen, werden auf EGFR-positiven Zellen in Lysosomen geleitet und degradiert, bleiben allerdings auf EGFR-negativen Zellen voll infektiös. Dieses sogenannte inverse *Targeting* kann benutzt werden, um selektiv Zellen zu transduzieren, die den Rezeptor nicht exprimieren (Fielding *et al.*, 1998). Peng *et al.* haben lentivirale Vektoren verwendet, die mit einem EGF-tragenden MLV-Env pseudotypisiert waren (Peng *et al.*, 2001). Sie studierten die Biodistribution nach

systemischer Inokulation dieser Vektoren. Hauptsächlich in der Niere wurden transduzierte Zellen beobachtet, während die EGFR-reichen Zellen der Leber kaum transduziert wurden.

Die Env-Konstrukte, die zum inversen *Targeting* benutzt werden, besitzen ihre ursprüngliche, natürliche Infektiosität, da sie an den retroviralen Rezeptor binden können. Durch Insertion von zusätzlichen Blockierungsdomänen (wie zum Beispiel dem trimerisierenden Polypeptid CD40L - näheres siehe Ergebnisse 4.4), kann die natürliche Bindung des Hüllproteins an seinen Rezeptor verhindert werden. Dies stellt eine weitere Möglichkeit des *Targetings* dar und wird als die „Methode der Maskierung der natürlichen Rezeptorbindestelle“ bezeichnet. Die Insertion der Blockierungsdomäne in das Hüllprotein verhindert die natürliche Infektiosität des amphotropen Env durch die Blockierung der Anlagerung des Hüllproteins an seinen natürlichen Rezeptor. Ist in das chimäre Env, welches eine *Targeting*sequenz sowie eine Blockierungsdomäne enthält, zusätzlich eine Protease-Spaltstelle eingefügt, kann die Blockierung mittels der Spaltung an dieser Stelle wieder aufgehoben werden (Peng *et al.*, 1997). Zellen, welche die relevante Protease in hohen Mengen exprimieren, können die Infektiosität der Viren wieder herstellen, indem sie die Blockierungsdomäne abspalten. Diese Methode der reversiblen Blockierung ist bereits mehrfach beschrieben worden (Hartl *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2002).

Ein neuer und völlig durchschlagender Erfolg auf dem Gebiet des *Targetings* mittels Ligandeninsertion konnte 2002 erzielt werden. Katane *et al.* publizierten im *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* eine erfolgreiche Transduktion von humanen, CXCR4-exprimierenden Zellen mit dem ecotropen Env, in welches der Ligand SDF-1 α in die variable Region A eingeführt wurde (Katane *et al.*, 2002; Katane *et al.*, 2004) (siehe Abbildung 1-16).

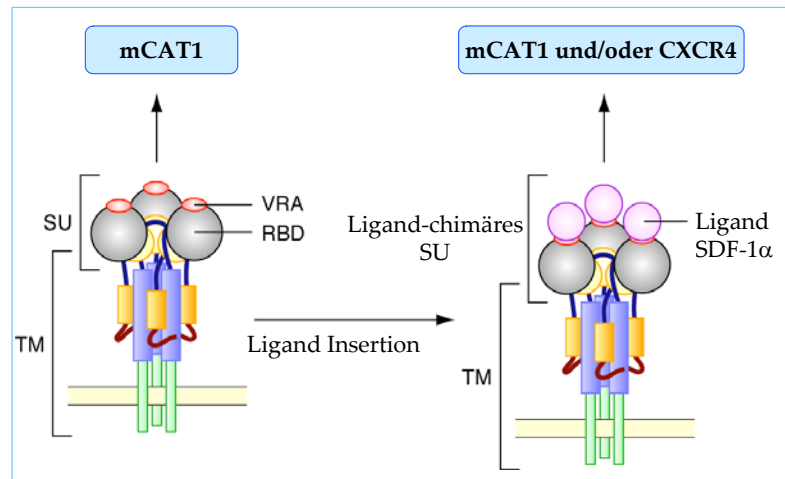


Abbildung 1-16 Direktes Targeting. Um den Infektionstropismus des ecotropen Hüllproteins auszuweiten, wurden die Sequenzen für SDF-1 α in die VRA eingefügt. Das chimäre Env ist in der Lage an den CXCR4-Rezeptor zu binden und eine Transduktion der Zelle zu erzielen. (Modifiziert nach Katane 2003).

1.7.1 CXCR4 und SDF-1 α

Der Chemokinrezeptor CXCR4 gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, *G protein coupled receptor*). Die Mitglieder dieser Gruppe sind Membranrezeptoren des Typs III. Sie besitzen eine N-terminale, extrazelluläre Domäne, sieben Transmembrandomänen (Helices) und eine C-terminale, zytoplasmatische Domäne. Die Transmembrandomänen sind durch drei extrazelluläre (ECL1 bis 3, *extracellular loop*) und drei intrazelluläre Schleifen getrennt (siehe Abbildung 1-17). Die intrazellulären Schleifen und der C-Terminus tragen wichtige Sequenzmotive für die Signaltransduktion und sind das Ziel zellulärer Proteinkinasen (Rodriguez-Frade *et al.*, 2001).

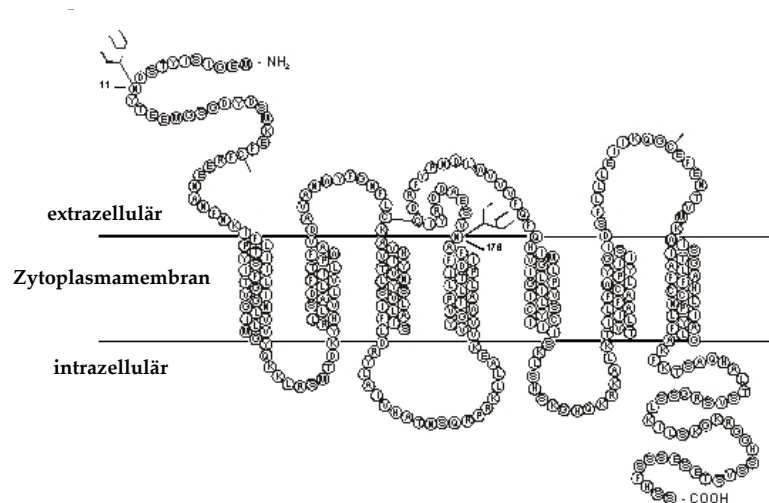


Abbildung 1-17 Graphische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR4. Gezeigt wird die Aminosäuresequenz. (Modifiziert nach Thordsen, 2002).

Die natürlichen Liganden der Chemokinrezeptoren sind die Chemokine (*chemoattractive cytokines*). Chemokine sind Peptide mit 70 bis 130 Aminosäuren, die von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen gebildet werden. Chemokine bestehen aus einer N-terminalen Region und einer C-terminalen, helikalen Domäne, die durch ein dreisträngiges β -Faltblatt voneinander getrennt sind (Crump *et al.*, 1997). Die Chemokine besitzen charakteristisch angeordnete Cysteinreste, die durch andere Aminosäurereste voneinander getrennt sein können. Die besondere Anordnung dieser Cysteinreste ist verantwortlich für die Namensgebung der Chemokine. Der *Stromal Cell Derived Factor-1* (SDF-1 α) ist der Ligand des CXCR4-Rezeptors. Die Interaktion des SDF-1 α mit seinem Rezeptor CXCR4 spielt eine bedeutende Rolle bei der gezielten Migration von Vorläuferzellen in geschädigtes Gewebe, bei der Hämatopoese sowie bei der Entstehung und Entwicklung des Immunsystems. Eine weitere wichtige Funktion des SDF-1 α -CXCR4-Zusammenspiels stellt die Gewebereparatur und -regeneration dar (Burger and Kipps, 2006; Richard *et al.*, 2006).

Eine Überexpression des CXCR4-Rezeptors wurde im Zusammenhang mit vielen unterschiedlichen hämatopoetischen Krankheiten, wie der Chronischen Lymphozytischen Leukämie, multiplen Myelomen, akuten Myelomen, aber auch in nicht hämatopoetischen Veränderungen wie Lungen- und Brustkrebs beobachtet. In den letzten fünf Jahren wurde eine Vielzahl weiterer Neoplasien beschrieben, die in Zusammenhang mit einer erhöhten CXCR4-Expression gebracht werden (Prostatakrebs, neuronale und gliale Tumore, etc.)

(Burger and Kipps, 2006). Es wurde beobachtet, dass die Expression des CXCR4 eine wichtige Rolle bei der Metastasierung maligner Tumorzellen zu spielen scheint. Hypoxia induziert ebenfalls CXCR4-Expression, weshalb in so vielen unterschiedlichen Tumorgeweben eine erhöhte Expression dieses Chemokinrezeptors zu finden ist (Richard *et al.*, 2006).

Der Rezeptor weist eine große Ähnlichkeit zu dem oben beschriebenen mCAT-1-Rezeptor, dem natürlichen Rezeptor des ecotropen Env, auf, weshalb die Ausweitung des Wirtstropismus auf CXCR4 von Erfolg gekrönt sein könnte. Das *Targeting* von ecotropem MLV-Hüllproteinen hin zu humanen CXCR4-exprimierenden Krebszellen könnte z.B. das gezielte Infizieren von humanen Brustkrebszellen zur Folge haben. Mit solch modifizierten Viren könnten gezielt maligne Zellen therapiert werden, da diese sich durch die Überexpression des CXCR4-Rezeptors auszeichnen.

1.8 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine relativ neue Methode, die in den wenigen Jahren seit ihrer Entdeckung die Molekularbiologie revolutioniert hat. Sie stellt eine einfache und günstige Methode dar, Gene spezifisch und effektiv zu inhibieren (Couzin, 2002) und dadurch Genfunktionen auf einfache Weise zu untersuchen. Die Methode gehört mittlerweile zum Standardprogramm bei der Identifizierung und Validierung biologischer Zielmoleküle, sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten, akademischen und industriellen Forschung. Auch im Kampf gegen Krankheiten ist RNAi bereits zu einem oft verwendeten Hilfsmittel geworden. Überall dort, wo eine Krankheit mit über der Norm aktivierten Genen einhergeht, ließe sich diese Aktivierung rückgängig machen.

Die Entdeckung der wichtigen Rolle der RNA-Moleküle bei der Regulation der Genexpression wird als ein revolutionärer Schritt für das Verständnis der Zellbiologie angesehen (siehe z. B. Dykxhoorn *et al.*, 2003). Das Magazin *Science* erklärte die Entdeckung der regulatorischen Funktion kleiner RNAs im Jahr 2002 zum „Durchbruch des Jahres“ (Couzin, 2002).

RNAi oder posttranskriptionelles Gen-Silencing (PTGS) ist die biologische Antwort auf doppelsträngige RNA (dsRNA). Sie ist hoch konserviert von Pilzen wie *Neurospora*, über Pflanzen wie *Arabidopsis* und Invertebraten wie *C. elegans* bis hin zu Vertebraten und Säugetieren und beschreibt die sequenzspezifische Stilllegung von Genen.

Die Bedeutung von RNAi liegt höchstwahrscheinlich im Schutz vor Viren, Transposons und repetitiven Sequenzen, mit dem Ziel die Genomstabilität zu gewährleisten (Montgomery, 2004; Tabara *et al.*, 1999; Waterhouse, 2006; Waterhouse and Helliwell, 2003). Neue genetische Analysen zeigen aber auch, dass RNAi eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielt. dsRNA führt nicht nur auf posttranskriptioneller Ebene zu einem *Silencing*-Effekt, sondern kann dies durch DNA-Methylierung auch auf der transkriptionellen Ebene bewirken (RDM = *RNA mediated DNA Methylation*). Wird in Pflanzen dsRNA mit Homologie zu Promotorsequenzen exprimiert, führt dies zur Methylierung des Promotors und zur transkriptionellen Stilllegung des Gens (Mette *et al.*, 2000).

Der Begriff RNAi wurde erstmals in der bahnbrechenden Arbeit von Andrew Fire und Craig Mello 1998 am Modell von *Ceanorhabditis elegans* geprägt (Fire *et al.*, 1998). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine zu einer endogenen mRNA homologe dsRNA, die in eine Zelle eingebracht wurde, zum Abbau der entsprechenden mRNA und damit zur sequenzspezifischen Stilllegung des Gens führt. Mittlerweile wurde dieses Ereignis bei zahlreichen weiteren Organismen reproduziert. Auch bei Vertebraten ist dieses Phänomen zu beobachten.

Im Gegensatz zu den Prozessen, die nach Vorhandensein von langen dsRNA-Molekülen in Vertebraten-Zellen ablaufen und zu einer unspezifischen Herunterregulierung der Proteinbiosynthese führen, wird RNAi von kurzen 19-23 bp langen RNA-Duplexen katalysiert und führt zum spezifischen Abbau oder zu einer Translationsinhibition der komplementären mRNA.

Der erste wichtige Schritt beim RNAi-Mechanismus ist die Prozessierung der eingebrachten dsRNA durch das Enzym *Dicer* in kleine Duplexe mit 2 nt-3'-überhängenden Enden, die *small interfering RNAs* (siRNAs) genannt werden. *Dicer*, eine Typ III-Ribonuklease, spielt

sowohl bei der Biogenese von siRNAs als auch von miRNAs (siehe 1.8.1) eine große Rolle indem es die circa 21 nt langen RNAs aus größeren Vorläufermolekülen prozessiert.

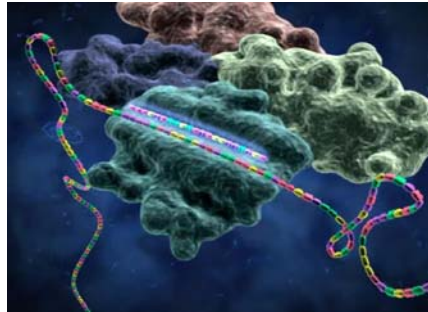


Abbildung 1-18 Dicer-Proteinkomplex gebunden an Ziel mRNA. (Quelle: www.proteinlounge.com).

Das Protein *Dicer* (im Menschen ca. 220 kDa groß) besitzt zwei RNase III-Domänen, eine PAZ-Domäne (ein RNA-bindendes Proteinmodul), eine dsRNA-Bindestelle und eine Helikase-Domäne (siehe Abbildung 1-18). Es liegt in der Zelle assoziiert mit Proteinen der Argonaut-Familie vor, die wichtige Funktionen bei der RNAi vornehmen. Dieser Komplex aus *Dicer* und Ago (Argonaut-Protein-Familie)-Proteinen (besitzen eine PAZ-Domäne zur miRNA-Übernahme und eine PIWI-Domäne zum Zerschneiden der Ziel-mRNA) erkennt spezifisch doppelsträngige RNA (lange RNA-Duplices im Falle von siRNA oder aber kurze *Hairpin*-Strukturen bei der Biogenese von miRNAs) und zerschneidet diese in die charakteristischen siRNAs (siehe Abbildung 1-19). Anschließend werden die kurzen RNA-Doppelstränge unter ATP-Verbrauch entwunden und eine der entstehenden kleinen, nun reifen, RNAs wird bevorzugt in den sogenannten RISC (*RNA-induced silencing complex*), einen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), eingebaut (Übersicht bei Tang, 2005). Der Komplex dirigiert den Weg zu seiner Ziel-RNA durch den eingebauten *antisense*-Strang der siRNA und schneidet die mRNA in der Mitte des Hybrids. Die Auswahl, welcher der beiden komplementären RNA-Stränge schließlich im RISC endet, findet anhand der Stabilität der Enden des RNA-Duplexes statt (Tomari *et al.*, 2004). Abbildung 1-19 zeigt eine schematische Darstellung des postulierten Mechanismus von RNAi nach Meister and Tuschl, 2004.

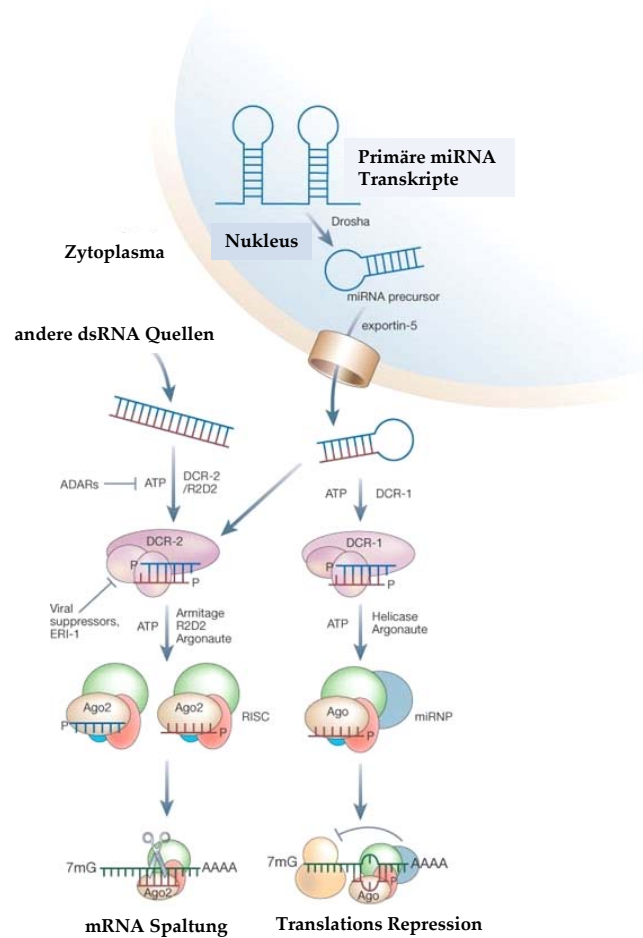


Abbildung 1-19 Mechanismus des RNAi. (Modifiziert nach Meister *et al.*, 2004).

Komponenten der Maschinerie, die bei der Gensuppression aktiv sind, sind auch an anderen wichtigen Prozessen beteiligt. Dazu zählen die spezifische Genregulation auf der Ebene der Translation durch microRNAs (miRNAs), die im zellulären Genom kodiert werden (Ambros *et al.*, 2003), sowie die Bildung von Heterochromatin, was durch *repeat associated small interfering RNAs* (rasiRNAs) oder heterochromatische RNAs ausgelöst wird und zu einem *Gensilencing* auf der Ebene der Transkription führen kann (Lippman *et al.*, 2004).

1.8.1 microRNA

miRNAs spielen wahrscheinlich eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression in jeder somatischen Zelle eines jeden metazoen Eukaryoten (Tiere und Pflanzen) (Bartel, 2004). Bis heute wurden mehr als 300 verschiedene humane miRNAs identifiziert und ähnliche Zahlen werden wahrscheinlich in anderen Vertebraten-Spezies

exprimiert. Viele miRNAs haben einzigartige und spezielle gewebespezifische oder Entwicklungsstadium-abhängige Expressionsmuster, so dass jedes humane Gewebe ein charakteristisches Muster an miRNAs besitzt (Bartel, 2004).

Alle zellulären miRNAs werden von der Polymerase II als eine Art lange Vorläufermoleküle, die sogenannten *primary* pri-miRNAs transkribiert. Eine einzige pri-miRNA kann ein Cluster von unterschiedlichen sowie einer einzigen miRNA enthalten und kann von ungefähr 200 nt bis hin zu mehreren Tausend nt lang sein. Innerhalb dieser pri-miRNA bilden einzelne, ca. 22 nt lange, reife miRNAs jeweils einen Haarnadel-Arm (Cullen, 2004). Im ersten Schritt der miRNA-Prozessierung wird dieser Arm zunächst von *Drosha*, einem RNase III-Enzym, gespalten. Dies führt zur Freisetzung eines Haarnadelintermediates, welches die charakteristischen 2 nt-3'-Überhänge besitzt. Diese Intermediate werden pre-miRNAs genannt (Lee *et al.*, 2003). Der nächste Schritt der miRNA-Biogenese stellt den nukleären Export der pre-miRNA mittels Exportin 5 dar. Im Zytoplasma angelangt, wird die pre-miRNA entlassen und kann nun von *Dicer* weiter prozessiert werden. Ab hier teilen die miRNA- und siRNA-Biogenese ihren Weg. Je nach Höhe der Homologie der miRNA zu ihrer mRNA findet eine Degradierung der mRNA oder aber nur eine Translationsinhibition statt. Allerdings benötigt dieser Schritt die Bindung mehrerer RISC-Komplexe (Doench *et al.*, 2003). Abbildung 1-20 zeigt eine schematische Darstellung der miRNA-Biogenese.

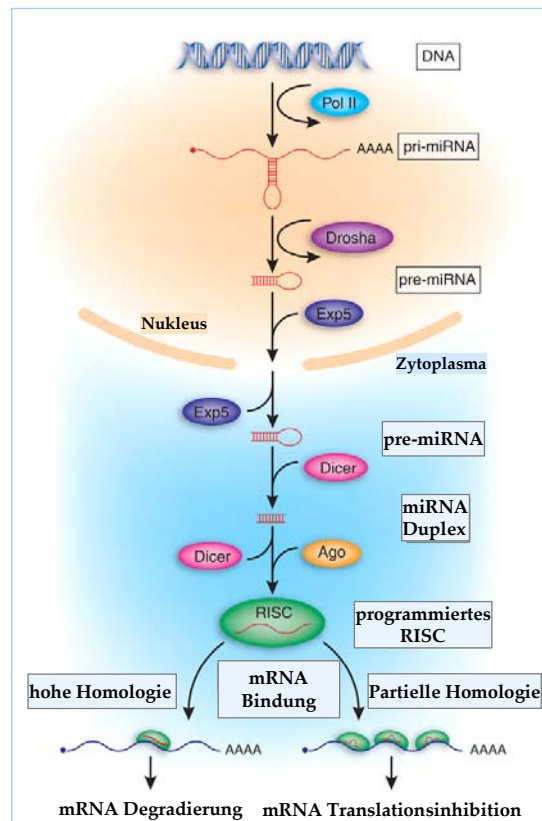


Abbildung 1-20 Biogenese und Funktion von humanen miRNAs. (Modifiziert nach Cullen, 2006).

1.8.2 Biologische Funktion von si/miRNA in der Virusabwehr

Wirbeltiere besitzen ein komplexes Immunsystem, welches auf das Eindringen von Pathogenen reagiert. Daher unterscheidet sich die Reaktion von Säugerzellen auf dsRNA deutlich von derjenigen, die Pflanzen und Wirbellose zeigen (Wang and Carmichael, 2004). Da viele Viren im Laufe ihres Replikationszyklus dsRNA produzieren, wird zytoplasmatisch lokalisierte dsRNA, die die Länge von etwa 30 bp überschreitet, als Zeichen einer viralen Infektion angesehen und löst eine Reihe drastischer Reaktionen aus. Zunächst wird die Produktion von α - und β -Interferonen induziert. Diese Zytokine werden von der Zelle sekretiert und haben mehrere Folgeeffekte sowohl in den infizierten Zellen selbst als auch im benachbarten Gewebe. Die Anwesenheit von Interferonen (IFN) führt zu einer vermehrten Expression der Proteinkinase R (PKR). Diese wird durch die Bindung von dsRNA aktiviert und phosphoryliert eine Anzahl von Substraten, unter anderem den eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor 2 (eIF-2). Dies führt zur Blockierung der Initiation der

Proteinsynthese. Als Parallelweg des Virus-Abwehrmechanismus wird gleichzeitig die 2'-5'-Oligoadenylatzyklase hochreguliert. Dieser Mechanismus führt über die Polymerisation von ATP (Adenosintriphosphat) zur Aktivierung der Endonuklease RNase L. Dieses Enzym katalysiert den Abbau aller zellulären und viralen mRNAs, so dass die Proteinsynthese in der Zelle zum Erliegen kommt. Abschließend führt die Interferon-Induktion zur Aktivierung von *natural killer*-Zellen (NKs) und ihrer Sensitivierung gegen infizierte Zellen. Diese Ereignisfolge stellt eine Barriere für die Ausbreitung einbrechender Viren dar, die dem Immunsystem Zeit gibt, eine spezifische adaptive Antwort aufzubauen.

In Pflanzen stellt PTGS/RNAi eine adaptive und gezielte Immunantwort dar, die gerichtet gegen Viren ist. Als eine Art der Gegenabwehr haben viele dieser Pathogene Suppressoren dieses Mechanismus der Stilllegung von Genen entwickelt (Voinnet, 2001).

Obwohl höhere Vertebraten einen definierten Abwehrmechanismus gegen Virusinfektionen entwickelt haben, sind in der Literatur immer mehr Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen RNAi und Virusinfektionen auch bei Vertebraten zu finden. Immer mehr viruskodierte Proteine werden beschrieben, denen ein negativer Einfluss auf die RNAi-Maschinerie in Vertebraten zugeschrieben wird (Sliva and Schnierle, 2006). So sollen zum Beispiel das Influenza-Protein NS1 (Bucher *et al.*, 2004; Delgadillo *et al.*, 2004) und das Vaccinia-Virus-Protein E3L (Li *et al.*, 2004) eine negative regulatorische Rolle bei der Beeinflussung von RNAi spielen.

Zusätzlich scheint RNAi eine Rolle bei der Kontrolle der retroviralen Abwehr vor der Immunantwort zu spielen. Lecellier *et al.* (Lecellier *et al.*, 2005) beschreiben eine humane miRNA, welche an der Behinderung der Virusreplikation des Primaten-Foamy-Virus Typ 1 (PFV-1) beteiligt sein soll. Gleichzeitig hat die Gruppe herausgefunden, dass PFV-1 das Protein Tas kodiert, welches die inhibitorische Wirkung der miRNA aufhebt. Des Weiteren gibt es Hinweise auf siRNA-Vorläufersequenzen im humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1), welche die Fähigkeit besitzen, RNAi zu induzieren. Und wieder kodiert das Virus als Gegenoffensive ein Protein Tat, welches der RNAi-Maschinerie entgegenwirkt (Bennasser *et al.*, 2005).

Allerdings gibt es auch aktuellste Meinungen (Cullen, 2006), die einen Zusammenhang zwischen humanen miRNAs als Suppressoren der viralen Replikation anzweifeln. Cullen stellt die Hypothese auf, dass die unterschiedlichen Expressionsmuster der miRNAs für den Gewebetropismus verschiedenster Viren verantwortlich sind und dass die beobachteten Ergebnisse der Lecellier *et al.*-Veröffentlichung (Lecellier *et al.*, 2005) ein Labor-Artefakt seien, da bei der Generierung der Ergebnisse 293T Zellen verwendet wurden, die normalerweise nicht Ziel der getesteten PFV sind. Abschließend lässt sich konstatieren, dass das Wissen um die Funktion von miRNA noch sehr lückenhaft ist und viel Spielraum für Interpretationen bietet.

1.9 siRNA in der Gentherapie

Der durchschlagende Erfolg von RNAi eröffnet viele Möglichkeiten, diesen Mechanismus für humane Therapien auszunutzen. Die Aussicht, siRNAs als potente, klein-molekulare Inhibitoren eines jeden beliebigen Genes einzusetzen, gibt Hoffnung bei der Therapie von heiklen und bislang schwer zu bewältigenden Erkrankungen. Beispiele hierfür sind Hepatitis C, HIV und neurodegenerativen Erkrankungen, die an die Expression eines dominant-negativen Allels gekoppelt sind. Aber auch das weite Feld der Krebserkrankungen gehört mit in diesen Kreis (Shankar *et al.*, 2005). Bis heute laufen unzählige Studien an Nagern, die positive Ergebnisse in der Behandlung vieler Erkrankungen erzielen konnten. Unter anderem gehören hierzu Hepatitis B (Giladi *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2003), Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Dorn *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004), Neurovaskularisierung des Auges (Reich *et al.*, 2003), Influenza (Ge *et al.*, 2004; Tompkins *et al.*, 2004) und RSV (*respiratoricay syncytial virus*) (Bitko *et al.*, 2005). Auch erfolgreiche Behandlungen von Tumoren wie Glioblastomen (Lakka *et al.*, 2004), Adenokarzinomen des Pankreas (Duxbury *et al.*, 2004) oder eines Keimbahntumors (Minakuchi *et al.*, 2004) konnten beobachtet werden.

Aber ebenso wie in allen anderen Gentherapieansätzen stellt die Beförderung einer ausreichenden Menge dieser kleinen Moleküle sowie die Ausbreitung in das gewünschte Gewebe bzw. den gewünschten speziellen Zelltyp den „Flaschenhals“ in der Entwicklung dieser Therapieform dar (Shankar *et al.*, 2005). Die Optimierung von viralen Vektoren als

Transportvehikel für siRNA steht im Vordergrund der momentanen Forschung und wurde auch in dieser Arbeit untersucht.

1.10 shRNA als therapeutisches Gen

Das Potential von siRNA in der Tumorthherapie und für die Aufklärung von Genfunktionen ist in der wissenschaftlichen Welt unumstritten anerkannt (s.o.). Um siRNA stabil in Zellen zu exprimieren, werden retrovirale Vektoren verwendet, die shRNA (*short hairpin* RNA = kurze Haarnadelstruktur RNA) unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III-Promotors exprimieren (Brummelkamp *et al.*, 2002; Rubinson *et al.*, 2003). Dieser Promotor produziert kleine RNA-Transkripte, welche keinen Poly(A)-Schwanz besitzen, einen gut definierten Transkriptionsstart sowie ein aus fünf Thymidinen bestehendes Terminationssignal haben. Das entstandene Transkript erfährt eine Spaltung nach dem zweiten Uridin des Terminationssignals. Diese Spaltung führt zu der Entstehung eines Transkriptes, welches an den Enden einer synthetischen siRNA gleicht. Die genspezifische Sequenz besteht aus 19 Nukleotiden (abgeleitet von der Zielsequenz), die mittels einer *Spacer*sequenz von der entgegengesetzten Komplementärsequenz getrennt wird, sodass sich das entstandene Transkript in sich selbst zusammenfaltet und eine 19-Basenpaar-Haarnadelstruktur bildet (siehe Abbildung 1-21 A). Als Grundgerüst dient hierbei meist der Expressionsvektor pSUPER (Brummelkamp *et al.*, 2002). Aus diesem werden die shRNA-Expressionskassetten herausgeschnitten und in retrovirale Vektoren integriert. Abbildung 1-21 A zeigt die schematische Darstellung des Vektors und der produzierten RNA-Transkripte. Die entstandenen Haarnadel-RNA-Transkripte werden im Zellkern generiert und müssen anschließend aus dem Zellkern geschleust werden. Dies geschieht durch Bindung von Exportin 5 an die RNA-Transkripte. Im Zytoplasma angelangt, werden die Transkripte aus dem Verband freigelassen. Hier werden die shRNAs von *Dicer* erkannt und in kurze doppelsträngige siRNAs mit überhängenden Enden gespalten. Diese werden anschließend in den RISC-Komplex eingebaut und führen zur Degradierung ihrer komplementären mRNA (siehe Abbildung 1-21 B).

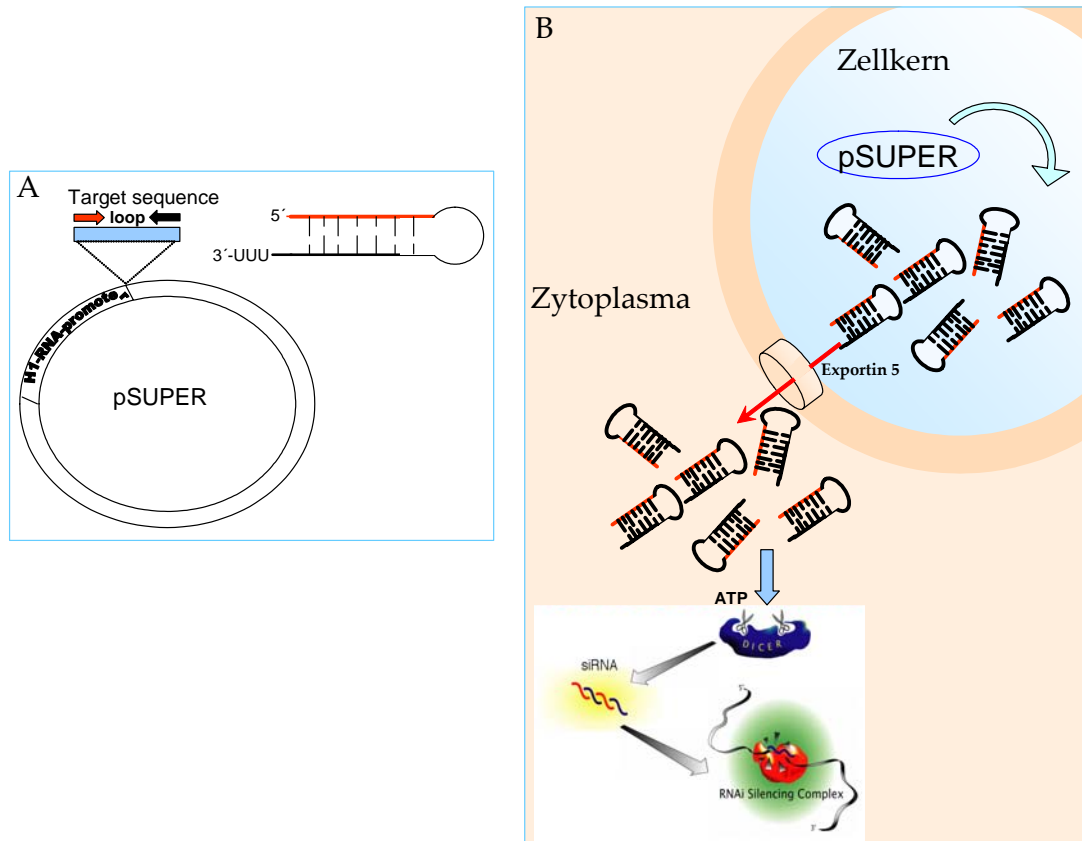


Abbildung 1-21 pSUPER shRNA A: Schematische Darstellung des pSUPER-Vektors und des entstehenden RNA-Transkripts. B: Schematische Darstellung der Prozessierung der RNA-Transkripte in der Zelle.

Die Verwendung viraler Vektoren als Überträger von shRNA-Expressionskassetten ist allerdings bereits an seine Grenzen gestoßen. Die Forscher stehen vor Problemen der geringen Titer, welche den Erfolg stark limitieren. Besonders in solidem Tumorgewebe limitiert die geringe Anzahl der viralen Partikel die Anzahl der transduzierten Zellen und somit einen messbaren Erfolg.

Die Insertion der shRNA-Expressionskassette in das komplette Genom des Retrovirus MLV eröffnet die Möglichkeit, ein replikationskompetentes MLV herzustellen, welches zusätzlich shRNA exprimiert. Nach intratumoraler Applikation könnte es replizierend das Transgen im gesamten Tumorgewebe verteilen und somit das Titerproblem lösen. Gleichzeitig stellen die shRNA-Expressionskassetten im Gegenzug die perfekten Kandidaten von Transgenen für die Insertion in replikationskompetente Viren dar. Aufgrund ihrer relativ kleinen Größe sollten sie ohne Probleme in die kompletten Virusgenomsequenzen eingefügt werden können, ohne an die Grenze der Verpackbarkeit des Genoms zu stoßen.

2 Zielsetzung

Diese Arbeit hatte die Herstellung und Optimierung von (semi-)replikationskompetenten MLV als Gentransfervehikel zur Aufgabe. Die Arbeit erstreckte sich über vier Hauptbereiche.

Zunächst stand die Etablierung eines Systems im Vordergrund, anhand dessen die Replikation des Virus einfach visuell durch fluoreszierende Proteine zu dokumentieren war. Von diesem System erhoffte man sich eine Erleichterung für die Optimierungsarbeiten am MLV als Gentherapievektor.

Um die Kodierungskapazität von replikationskompetenten MLVs zu erhöhen, sollte im zweiten Teil die Idee der Semireplikation erstmalig untersucht werden. Das Ziel war die Herstellung und Etablierung eines einzigartigen MLV-basierten Systems, anhand dessen größere Genabschnitte in Zielzellen übertragen werden könnten. Hierzu sollte das MLV-Genom auf zwei semireplikative Vektoren aufgeteilt werden. Auch hier sollte die Insertion der Fluoreszenzproteine die Replikation in Zielzellen sichtbar machen.

Parallel zu den Arbeiten des semireplikativen Systems sollte der Wirtstropismus des ecotropen MLV auf humane Zellen ausgeweitet werden. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten zwei Möglichkeiten des *Targetings* angewendet werden: erstens anhand von gerichteter Evolution von EGF-tragenden replikationskompetenten Viren auf EGF-abhängigen Zellen, zweitens anhand von Ligandeninsertion in die variable Region des ecotropen Hüllproteins und anschließender Replikation auf humanen CXCR4-exprimierenden Zellen. Auch hier war eine Selektion von adaptierten humaninfektiösen Viren das Ziel.

Als therapeutisches Molekül sollten shRNA-Expressionskassetten in replikationskompetente MLVs eingebaut werden mit dem Hauptziel, ein völlig neues Konzept zu etablieren, anhand dessen shRNA effizient in Zielzellen einzufügen ist und Proteine damit effektiv ausgeschaltet werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in reinster Qualität verwendet. Das Ansetzen von Lösungen erfolgte in bidestilliertem Wasser.

Aceton	Merck, Darmstadt
Acryl-Bisacrylamid-Mix	Roth, Karlsruhe
Ammonium-Persulfat	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	New England Biolabs, Frankfurt
Chloroform	Merck, Darmstadt
dNTP-MIX, 10 mM	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Schweiz
Formaldehyd 35 % (w/w)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, München
Glycin	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Sigma, München
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma, München
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma, München

TEMED	Sigma, München
Trypsin-EDTA	Cambrex, Belgien
Tween-20	Sigma, München
Universal-Agarose	Peqlab, Erlangen
Wasserstoffperoxyd	Sigma, München
Whatmanpapier	Sigma, München
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24- und 96-Loch-Zellkulturplatten	Corning, Kaiserslautern
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalspritzen	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Irland
Falcon-Gefäße	Becton Dickinson, Irland
Glasgefäße	Schott, Mainz
Kunststoffküvetten	Roth, Karlsruhe
Kunststoffpipetten	Greiner, Nürtingen
Latexhandschuhe	Braun, Melsungen
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran	BioRad, München
Pipettierhilfen	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	ART, USA
Quarzglasküvetten	Hellma, Mühlheim
Röntgenfilme	Amersham Bioscience, Freiburg
Sterilfilter	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen (25 bis 75 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen (10 cm ²)	Nunc, Wiesbaden

3.1.3 Geräte und Apparaturen

Autoklav	Dampfkochtopf	CertoClav, Österreich
	KSG Autoklav	CertoClav, Österreich
Bakterieninkubator		New Brunswick Scientific, Neu-Isenburg

Brutschränke		Heraeus Sorvall, Hanau
Durchflußzytometer (FACS)		Beckton Dickinson, Irland
Fast Blot 33		Biometra, Göttingen
Floureszenz-Imager		Tecan, Schweiz
Gelelektrophoreseapparaturen		Peqlab, Erlangen
Horizontalschüttler		Biometra, Göttingen
Kühl-/Gefrierschränke		New Brunswick Scientific, Neu-Isenburg
		Liebherr, Biberach
		Bosch, Gerlingen
Lumi-Imager		Roche, Mannheim
Mikroskope		Zeiss, Oberkochen
Mikrowellen		Privileg, Fürth
PCR-Apparatur		Biometra, Göttingen
Photometer		Amersham, Freiburg
PROTEAN III-System		Bio-Rad, München
Rühr-/Heizplatten		IKA, Staufen
SDS-Gelelektrophoreseapparaturen		Bio-Rad, München
Spannungsgeräte		Biometra, Göttingen
Sterilbänke		The Baker Company, USA
UV-Detektionsanlage		Intas, Göttingen
Vakuumpumpe		Amersham, Freiburg
Vortexapparatur	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
	MS1 Minishaker	IKA, Staufen
Waagen		Ohaus, USA
Wasserbäder		Memmert, Schwalbach
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus Sorvall, Hanau
	Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
	Omnifuge 20 RS	Heraeus Sorvall, Hanau
	Optima L-80 XP	Beckman-Coulter, München
	RC 5C Plus	Heraeus Sorvall, Hanau

3.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme, Kits und Standards

Bradfordreagenz, Protein Assay	Bio-Rad, München
DNA-Leitermix	New England Biolabs, Frankfurt

FuGENE 6–Transfection Reagent	Roche, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
PCR-Master Mix	Roche, Mannheim
PolyFect - Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Roti Load (4x) SDS-Probenpuffer	Roth, Karlsruhe
SuperFect - Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Molekulargewichtsmarker für Proteine MagicMark XP	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker für Proteine SeaBlue	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase + Puffersystem	New England Biolabs, Frankfurt
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PWO-Polymerase	Roche, Mannheim
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Klenow Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
CIP alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
Pfx Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinaseinhibitoren „Complete“	Roche, Mannheim
ECL-Plus	Amerham-Bioscience, Freiburg
Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt

3.2 Bakterienstämme

Die Abkürzungen der Genotypen der Bakterienstämme beziehen sich auf die Nomenklatur nach Bachmann (Bachmann, 1990). Als Wirtsstamm für molekularbiologische Standardarbeiten diente *Escherichia Coli* XL-1 Blue. Für die Klonierung der kompletten retroviralen Genome dienten HB101 und Top10 bei 30°C, für die Herstellung des Plasmids pHIT60 Sure.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL-1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg
Top10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139</i>	Invitrogen,

Stamm	Genotyp	Referenz
	$\Delta(araleu)7697$ galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Karlsruhe
Sure	<i>e14-</i> (McrA-) <i>D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171</i> endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
HB101	F- $\Delta(gpt-proA)62$ leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1 $\Delta(mcrC-mrr)$ rpsL20 (Str ^r) xyl-5 mtl-1 recA13	Sigma, München

3.3 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zusammengetragen. Dargestellt sind neben dem Namen die Sequenz, der Verwendungszweck für welchen die Oligonukleotide in vorliegender Arbeit dienen, die Referenz („u“ steht für unveröffentlicht) sowie die Hybridisierungstemperatur (H.T.). Das jeweilig verwendete Paar ist durch einen dickeren Strich abgetrennt.

Name	Beschreibung	Sequenz 5'→3'	Verwendungszweck	H.T.	Referenz
KS 5	si EGFR fw	gatccccgtgtgtaacggaataggattcaagagatacctattccgttacacacttttggaaa	Klonierung des pSUPER-EGFR	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 6	si EGFR rw	agcttttccaaaaagtgtgtaacggaataggatctcttgaatacctattccgttacacacggg	Klonierung des pSUPER-EGFR	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 9	Env Xho sense	gtcagtactaagcttctcga	Überprüfung der GFP-Stabilität in PRR und SDF-GFP (gDNA)	60°C	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
3' PRR	3' PRR	ggttttgtcaggactggtag	Überprüfung der GFP-Stabilität in PRR und SDF-GFP (gDNA)	60°C	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
KS 10	env Xho a-sense	ctcgagaagcttagtact	Überprüfung der Entstehung von Rekombinationen semireplikative Vektoren	60°C	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)

Name	Beschreibung	Sequenz 5'→3'	Verwendungszweck	H.T.	Referenz
BS 8	Pol env rv	gaatagaaccatcaaggagac	Überprüfung der Entstehung von Rekombinationen semireplikative Vektoren	60°C	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
KS 13	si stat3-1 fw	gatcccctgtcctctatcagcacaactcaag agagttgtgctgatagaggacatTTTTGGAA A	Klonierung des pSUPER-STAT3-1	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 14	si stat3-1 rv	agctttcAAAAATGCTCTATCAGCACA CTCTCTGAAGTTGTGCTGATAGAGGACAGG G	Klonierung des pSUPER- STAT3-1	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 15	si stat3-2 fw	gatcccaacatctgcctggaccgttcaag agagacggtccaggcagatgTTTTGGAA A	Klonierung des pSUPER-STAT3-2	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 16	si stat3-2 rv	agctttcAAAAAACATCTGCTGGACCGT CTCTTGAAGACGGTCCAGGCAGATGTTGG G	Klonierung des pSUPER-STAT3-2	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 18	si stat3-3 fw	gatcccctcagaccgccaacaattcaa gagattgtggcgggtctgaagTTTTGGAA A	Klonierung des pSUPER-STAT3-3	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 19	si stat3-3 rv	agctttcAAAAACTCAGACCCGCAACAA ATCTCTGAATTTGTTGGCGGGTCTGAAGGG G	Klonierung des pSUPER-STAT3-3	-	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 20	GFP-Sfi sense	aaaaggccagccggccgtgagcaagggc gaggagctg	Klonierung des pC-GFP-AiCD	60°C	K. Sliva (u)
KS 22	GFP-Not a-s neu	aaaagcggccctgtacagctcgtccatg cc	Klonierung des pC-GFP-AiCD	60°C	K. Sliva (u)
KS 25	eco-5' env sense	cgattagtccaattgtt	Überprüfung der Stabilität der shRNA-Expressions-kassette (gDNA)	53°C	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)

Name	Beschreibung	Sequenz 5'→3'	Verwendungszweck	H.T.	Referenz
KS 26	3'LTR eco	gctagcttgccaaacc	Überprüfung der Stabilität der shRNA-Expressionskassette (gDNA)	53°C	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
KS 33	amphGFP-Sfi fw	aaaaggcccagccggcctgcagagctaca accctccg	Klonierung des pC-GFP-aiCD-Spacer	68°C	K. Sliva (u)
KS 34	amphGFP-Not rv	aaaagcggccgcaggtggggagatctgtg gagg	Klonierung des pC-GFP-aiCD-Spacer	68°C	K. Sliva (u)
KS 36	eco-env fw	tccagtctcatcaagtct	Überprüfung der SDF-Stabilität (gDNA)	60°C	K. Sliva (u)
KS 37	eco-env back	agtagaaggagtctggac	Überprüfung der SDF-Stabilität (gDNA)	60°C	K. Sliva (u)

3.4 Plasmide

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten oder entstandenen Plasmide zusammengetragen. Dargestellt sind neben dem Namen die Beschreibung und der Verwendungszweck sowie Literaturhinweise (falls vorhanden).

Name	Beschreibung		Referenz
KS 4	GFP-MOV	Ecotropes MLV mit GFP in der PRR von Env	(Erlwein <i>et al.</i> , 2003)
KS 5	M 159	RFP kodierender, retroviraler Vektor mit Verpackungssignal	D. v Laer (u)
KS 9	pHIT 60	Gag-Pol unter LTR-Promotor und Verpackungssignal	(Miller and Rosman, 1989)
KS 10	pSG-wt-env-GFP	Ecotropes Env unter SV40-Promotor, Kontrolle mit GFP in der PRR	(Erlwein <i>et al.</i> , 2003)

Name	Beschreibung		Referenz
KS 12	pSFG-EGFP	GFP kodierender, retroviraler Vektor mit Verpackungssignal	(Lindemann <i>et al.</i> , 1997)
KS 14	pSUPER	Expressionsvektor für shRNA unter H1-Polymerase III-Promotor (leer)	(Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002)
KS 15	pSUPER-CD4	Expressionsvektor für shRNA gegen humanes CD4 unter H1-Polymerase III-Promotor	A. Bittner (u)
KS 16	pLTR-EGFR	Expressionsvektor für EGFR unter LTR-Promotor (Kontrolle)	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 17	pSG-DA	Expressionsplasmid für ecotropes Env	(Schnierle <i>et al.</i> , 1996b)
KS 19	pkaΔenv RFP	MLV-Genom ohne Env mit RFP ersetzt	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
KS 20	pMOV-3	Ecotropes MLV	(Harbers <i>et al.</i> , 1981)
KS 23	pZAPm-GFP	Ecotropes MLV mit IRES-GFP Expressionskassette am 3'-Ende von Env	(Logg <i>et al.</i> , 2001)
KS 24	pZAP-GFPenv-IRES-GFP	Ecotropes MLV mit IRES-GFP Expressionskassette am 3'-Ende von Env und GFP in der PRR von Env	K. Sliva (u)
KS 25	pZAP-GFPenv-SDF1-IRES-GFP	Ecotropes MLV mit IRES-GFP Expressionskassette am 3'-Ende von Env, GFP in der PRR und SDF-1α in der VRA von Env	K. Sliva (u)
KS 26	pSG-wt-env-GFP-SDF	Expressionsplasmid für ecotropes Env mit GFP in der PRR und SDF in der VRA	K. Sliva (u)
KS 27	pTES 3N	Expressionsplasmid für ecotropes Env mit SDF in der VRA	(Katane <i>et al.</i> , 2002)
KS 34	pcz-MLV-GFPenvΔHind	Expressionsplasmid für ecotropes Env mit GFP in der PRR ohne <i>HindIII</i> -Restriktionsschnittstelle	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
KS 36	pSUPER-EGFR	Expressionsvektor für shRNA gegen humanen EGFR unter H1-Polymerase III-Promotor	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 37	pZAP-GFPenv-SDFΔIRES	Ecotropes MLV mit GFP in der PRR von Env ohne IRES-GFP-Expressionskassette	K. Sliva (u)
KS 41	pJET	Expressionsvektor für ecotropen Rezeptor mCAT-1	(Albritton <i>et al.</i> , 1989)
KS 42	VSV-G	Expressionsplasmid für das VSV-Glykoprotein	(Burns <i>et al.</i> , 1993)

Name	Beschreibung		Referenz
KS 43	pZAPm-SDF	Ecotropes MLV mit IRES-GFP-Expressionskassette am 3'-Ende von Env und SDF in der VRA von Env	K. Sliva (u)
KS 48	pSUPER-STAT3-1	Expressionsvektor für shRNA gegen murines STAT3 (1) unter H1-Polymerase III-Promotor	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 49	pSUPER-STAT3-2	Expressionsvektor für shRNA gegen murines STAT3 (2) unter H1-Polymerase III-Promotor	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 51	pRCC-STAT3-FLAG	Expressionsvektor für STAT3-FLAG unter CMV-Promotor	E. Pfitzner (u)
KS 52	pZAP-GFPenv-siEGFR	Ecotropes MLV mit GFP in der PRR von Env und einer shRNA (gegen EGFR)-Expressionskassette am 3'-Ende von Env	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 53	pSUPER-STAT3-3	Expressionsvektor für shRNA gegen murines STAT3 (3) unter H1-Polymerase III-Promotor	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 54	pC-AK-AiCD	Amphotropes MLV mit Blockierungsdomäne am N-Terminus von Env und CD-Region am 5'-Ende von Env	(Schneider <i>et al.</i> , 2003)
KS 58	pZAP-GFPenv-siSTAT3	Ecotropes MLV mit GFP in der PRR von Env und einer shRNA (gegen STAT3)-Expressionskassette am 3'-Ende von Env	(Sliva <i>et al.</i> , 2006)
KS 63	pC-GFP-AiCD	Amphotropes MLV mit GFP am N-Terminus von Env und CD-Region am 5'-Ende von Env	K. Sliva (u)
KS 64	pC-GFP-AiΔCD	Amphotropes MLV mit GFP am N-Terminus von Env ohne CD-Region am 5'-Ende von Env	K. Sliva (u)
KS 65	GFP-EMO	Ecotropes MLV mit GFP in der PRR und EGF am N-Terminus von Env	(Sliva <i>et al.</i> , 2004a)
KS 66	pG-FLAEP-C	Amphotropes MLV Env mit EGF am N-Terminus umrahmt von <i>Spacer</i> -Sequenzen	(Spitzer <i>et al.</i> , 2003)
KS 68	pC-Ai-GFP-Spacer-AiCD	Amphotropes MLV mit GFP am N-Terminus von Env umrahmt von <i>Spacer</i> -Sequenzen und CD-Region am 5'-Ende von Env	K. Sliva (u)
KS 69	pC-Ai-GFP-Spacer-AiΔCD	Amphotropes MLV mit GFP am N-Terminus von Env umrahmt von <i>Spacer</i> -Sequenzen ohne CD-Region am 5'-Ende von Env	K. Sliva (u)
KS 70	pAZE	Amphotropes MLV mit IRES-GFP Expressionskassette am 5'-Ende von Env	(Logg <i>et al.</i> , 2001)
KS 79	Ampho-RBD	Expressionsplasmid für lösliche Bindedomänen des amphotropen MLV Rezeptors	(Lavillette <i>et al.</i> , 2001a)
KS 80	Eco-RBD	Expressionsplasmid für lösliche Bindedomänen des ecotropen MLV Rezeptors	(Lavillette <i>et al.</i> , 2001a)

Name	Beschreibung		Referenz
KS 83	pHIT 456	Expressionsplasmid für amphotropes MLV-Env	(Markowitz <i>et al.</i> , 1988)
	pcz-CFG5-IEGZ	Expressionsplasmid für IRES-ZEO-GFP unter LTR-Promotor und Verpackungssignal	(Dinev <i>et al.</i> , 2001)

3.5 Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Western-Blot und in FACS Analysen verwendet.

Antigen	Name/Charakteristik	Verwendung	Hersteller/Referenz
EGFR (528)	Mausantikörper IgG _{2a} (monoklonal)	WB 1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
FLAG M2	Mausantikörper IgG ₁ (monoklonal)	WB 1:1000	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
STAT3 (c-20)	Kaninchenantikörper IgG (polyklonal)	WB 1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
MLV-env 713	Ziegenantikörper (monoklonal)	WB 1:1000	Quality Biotech, Camden USA
β-Aktin	Kaninchenantikörper IgG ₁ (monoklonal)	WB 1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GFP	Kaninchenantikörper Ig (Mix aus mehreren polyklonalen Antikörpern)	WB 1:1000	Clontech, Heidelberg
Maus IgG	Schafantikörper IgG gekoppelt an HRP (polyklonal)	WB 1:10 000	Dianova, Hamburg
Kaninchen IgG	Ziegenantikörper IgG gekoppelt an HRP (polyklonal)	WB 1:4000	Dianova, Hamburg

Antigen	Name/Charakteristik	Verwendung	Hersteller/Referenz
Ziege IgG	Kaninchenantikörper IgG gekoppelt an HRP (polyklonal)	WB 1:6000	Dianova, Hamburg

3.6 Zellen

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen zusammengetragen. Dargestellt sind neben dem Namen der Zelllinie auch deren Bezeichnung, die ATCC-Referenznummer oder entsprechende Literaturhinweise. Ebenfalls sind die für diese Zellen notwendigen Kulturbedingungen abzulesen. (CM= *conditioned medium*=konditioniertes Medium der WEHI Zellen).

Zelllinie	Bezeichnung	Kulturmedium	Referenz
NIH 3T3	Embryonale Mausfibroblasten	DMEM	ATCC: CCL-92
NIH 3T3x4	Embryonale Mausfibroblasten, die den humanen CXCR4- und CD4- Rezeptor exprimieren	DMEM	(Deng <i>et al.</i> , 1997)
DHAE 801-P	Embryonale Mausfibroblasten stabil transfiziert mit EGFRvIII	DMEM + 1mg/ml G418	(Schmidt <i>et al.</i> , 1998)
HeLa	Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie	RPMI	ATCC: CCL-2
A431	Humane, epidermoide Karzinom-Zelllinie	DMEM	ATCC: CRL-1555
293T	Humane embryonale Nierenzellen mit Adenovirus und SV40-T-Antigen transformiert	DMEM	ATCC: CRL-1573
B16	Maus-Melanom-Zelllinie, konstitutiv- aktives STAT 3	RPMI	ATCC: CRL-6322

Zelllinie	Bezeichnung	Kulturmedium	Referenz
BaF/3	Hematopoetische Maus-Pre-B-Zelllinie (Suspensionszellen)	RPMI + 5% CM	T. Burgess, Australien
BaF/ERX	Hematopoetische Maus-Pre-B-Zelllinie, die EGFR exprimiert, wurde in EGF passagiert, bis Proliferation von EGF abhängig war (Suspensionszellen)	RPMI + 10% CM + 1,2 mg/ml G418	F. Walker, (u)
BaF/wtEGFR	Hematopoetische Maus-Pre-B-Zelllinie, die EGFR exprimiert (Suspensionszellen)	RPMI + 10% CM + 1,2 mg/ml G418	(Walker <i>et al.</i> , 1998)
WEHI-3B D-	Myelomonozytische Leukämie aus der Maus. Diese Zelllinie produziert IL-3	RPMI	ATCC: TIB-68

3.7 Zellkultur

3.7.1 Zellkulturreagenzien

DMEM, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Na-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
RMPI, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Na-Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
G 418	Calbiochem, Läufelfingen
FKS (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Cambrex, Verviers, Belgien
PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	137 mM NaCl, 3 mM KCL, 16,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Roth, Karlsruhe

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten erfolgte an einer sterilen Werkbank. Die oben beschriebenen eukaryotischen Zellen wurden alle im Inkubator bei 37°C, 10 % CO₂ und 90 %

wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Um die hitzeempfindlichen Komponenten des Komplement-Systems im Serum zu zerstören, wurde das verwendete FCS vor der ersten Verwendung nach dem Auftauen und Erreichen der Raumtemperatur bei 56°C 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert und anschließend in 50 ml-Röhrchen aliquotiert.

3.7.2 Steriltest auf Mycoplasmen (Russell *et al.*, 1975)

Die zu testenden Zellen wurden in 24-Loch-Zellkulturplatten in einer ungefähren Konfluenz von 50 % ausgesät. Die DAPI-Färbung erfolgte 15 Minuten mit 0,2 ml/cm² DAPI-Lösung (60 nM DAPI in Methanol 4°C) auf einem vorher mit Methanol (0,2 ml/cm²) für 15 Minuten fixierten Zellrasen. DAPI ist ein DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff. DAPI wird selektiv an AT-reiche Abschnitte der DNA gebunden. Bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 489 nm ergibt sich eine intensive blaue Fluoreszenz. Mykoplasmenfreie Zellen zeigten eine Kernfärbung während sich eine Kontamination durch eine starke Färbung außerhalb des Kerns (Mykoplasmen-DNA) auszeichnete.

3.7.3 Lebendzellzahlbestimmung

3.7.3.1 Lebendzellzahlbestimmung mithilfe des *COULTER COUNTERS*

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspension (1:50 – 1:100) in 10 ml Isoton II im *COULTER COUNTER*-Gerät gemessen. Die Ausschussgröße lebender Zellen betrug 5 – 18 µm.

3.7.3.2 Zellzahlbestimmung mithilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode

Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit der Trypanblau-Lösung (0,5 % in PBS) versetzt. Während der Farbstoff in lebende Zellen nicht eindringen kann, werden tote Zellen aufgrund der erhöhten Permeabilität der Plasmamembran blau angefärbt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte in der Neubauer-Zählkammer nach Angaben des Herstellers. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel herangezogen:

$$\text{Zellzahl} = \text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die Zahl der ungefärbten Zellen wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl herangezogen.

3.7.4 Kryokonservierung von Zellen (Doyle *et al.*, 1988)

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen von ihren Schalen abgelöst (bei Suspensionszellen nicht nötig), mittels langsamer Zentrifugation pelletiert, in ein Einfriermedium (10% (v/v) DMSO in FCS) in einer ungefähren Dichte von 4×10^6 Zellen/ml aufgenommen und zu je 1,5 ml auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Derart konservierte Zellen konnten ca. 1 Jahr bei -80°C oder in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei -120°C viele Jahre gelagert werden.

3.7.5 Präparation von IL-3-haltigem Medium

IL-3-produzierende WEHI3BD⁻ Suspensionszellen wurden benötigt, um konditioniertes Medium für BaF Zellen herzustellen. Während der Proliferation der WEHI3BD⁻ wird IL-3 ins Medium abgegeben. Dieses IL-3-haltige, konditionierte Medium (CM) wird gesammelt und als Mediumzusatz den BaF Zellen als Quelle für IL-3 zugegeben. Um konditioniertes Medium herzustellen, wurden WEHI3BD⁻-Zellen in 175 cm^2 ausgesät und mit 30 ml Medium aufgefüllt. Die Flaschen wurden stehend gelagert. Alle 3 bis 4 Tage erfolgte eine Zugabe von frischem Medium ohne Abnahme des alten. Insgesamt wurden die Zellen für ungefähr zwei Wochen kultiviert. Zwischendurch erfolgte eine Bestimmung des Lebendanteils. Sobald ca. 20 % der Zellen abgestorben waren, wurde das Medium abgenommen, steril filtriert ($0,22 \mu\text{m}$), aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. Mit konditioniertem Medium versetztes Medium ist bei 4°C ungefähr einen Monat haltbar.

3.7.6 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte in Zellkulturgefäßen (Schalen oder Flaschen) mit $0,2 \text{ ml/cm}^2$ Kulturmedium. Bei Konfluenz (alle 3 bis 4 Tage) wurden die Zellen je nach Teilungsgeschwindigkeit 1:5 oder 1:10 passagiert. Sämtliche Kulturmedien beinhalteten, falls nicht gesondert aufgeführt, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 E/ml

Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Weitere benötigte Medienzusätze sind in Absatz 3.6 aufgelistet.

3.7.6.1 Adhärenz wachsende Zellen

Adhärenz wachsende Zellen mussten vor ihrer Passagierung zunächst von der Oberfläche, auf der sie wuchsen, abgelöst werden. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen einmal mit 0,2 ml/cm² PBS gewaschen. Anschließend wurde 0,4 ml/cm² Trypsin/EDTA auf dem Zellrasen verteilt und so lange inkubiert (falls nötig im Brutschrank bei 37°C), bis die Zellen vom Untergrund gelöst waren. Die suspendierten Zellen wurden anschließend in frischem Kulturmedium aufgenommen. Mit dem benötigten Bruchteil erfolgte eine Neuaussaat oder Zellzahlbestimmung.

3.7.6.2 Suspensionszellen

Ein Zehntel bzw. Fünftel (je nach Teilungsgeschwindigkeit der Zellen) der Zellsuspension wurde alle 3-4 Tage in frisches Medium zu einer ungefähren Zelldichte von 0,5 – 2x10⁵ Zellen/ml ausgesät.

3.7.7 Transfektionsmethoden

3.7.7.1 Kalziumphosphat-Präzipitation (Graham and van der Eb, 1973)

Lösung A:	0,5 CaCl ₂ , 100 mM HEPES in Milli-Q-Wasser, pH 6,95 eingestellt mit NaOH, sterilfiltriert
Lösung B:	50 mM HEPES, 0,28 mM NaCl, 0,75 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,75 mM Na ₂ HPO ₄ in Milli-Q-Wasser, sterilfiltriert

Die Kalziumphosphat-Kopräzipitation ist eine chemische Transfektionsmethode, wobei Kalzium- und Phosphationen die Hauptkomponenten darstellen. Die DNA wird mit einer Kalziumchloridlösung gemischt. Nach Zugabe der phosphathaltigen Lösung B fällt Kalziumphosphat als Präzipitat aus. Die DNA fällt bei dieser Methode mit aus und wird mit dem Kalziumphosphat in die Zellen aufgenommen.

Adhärente Zellen wurden einen Tag vor Transfektion in einer Zelldichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen (auf 10 cm-Schalen) ausgesät. Zwei Stunden vor Transfektion wurde das Medium durch frisches ersetzt. 240 μl H₂O/DNA-Lösung wurden mit 240 μl Puffer A versetzt, auf dem Vortexer gemischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 480 μl Puffer B hinzugegeben. Dies erfolgte tröpfchenweise auf dem Vortexer, um durch Luftblasenbildung einen Präzipitationskeim zu erzeugen. Die anschließende Präzipitation verlief über 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das Transfektionsgemisch wurde vorsichtig auf die Zellen getropft und für 5 bis 7 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Zellen mit Zellkulturmedium für weitere 48 Stunden kultiviert.

3.7.7.2 Transfektion mithilfe des Transfektionsreagens FuGENE

Die Transfektion mit FuGENE basiert auf der Methode der Lipofektion mit einem Gemisch aus Lipiden. Bei dieser Methode wird die DNA ionisch an die Liposomen gebunden und anschließend von den Zellen aufgenommen. Adhärente Zellen wurden einen Tag vor Transfektion in einer Zelldichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm-Schalen, und 3×10^5 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion ca. 80 % konfluent waren. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei das verwendete DNA:FuGENE-Verhältnis 1:3 betrug. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 Stunden kultiviert.

Zellkulturgefäß	Zellzahl	Mediumvolumen	FuGENE	DNA
6-Loch-Platte	$2-5 \times 10^5$	94 μl	6 μl	2 μg
10 cm-Schale	$2-3 \times 10^6$	582 μl	18 μg	6 μg

3.7.7.3 Transfektion mithilfe des Transfektionsreagens PolyFect

Die Transfektionsmethode mit PolyFect ist ebenfalls eine Lipofektion mit aktivierten Dendrimeren. Die Transfektion erfolgte in 6-Loch-Platten oder 10 cm-Schalen nach Angaben des Herstellers.

3.7.7.4 Transfektion mithilfe des Transfektionsreagenz SuperFect

SuperFect ist eine weiterentwickelte Methode der PolyFect-Transfektion, wobei die Transfektionsreaktion bei Vorhandensein von Serum durchgeführt werden kann. Dies macht die Methode zeitsparender, da das Medium vor der Zugabe der Transfektionsreagenz nicht mehr gewechselt werden muss. Auch hier erfolgte die Transfektion in 6-Loch-Platten oder 10 cm-Schalen nach Angaben des Herstellers.

3.8 Gentechnische Arbeitsmethoden

3.8.1 Reagenzien

LB-Medium	Laura-Bertani-Medium, Bakto-Trypton (10 g/l), Bakto Hefe-Extrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l), pH 7,0; autoklaviert
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
SOC-Medium	Bakto-Trypton (20 g/l), Bakto Hefe-Extrakt (5 g/l), 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose, pH 7,0; sterilfiltriert
LB-Agar-Platten	Bakto-Agar (15 g/l) in LB-Medium, pH 7,0; autoklaviert
LB-Amp-Platten	LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin 1xTAE: 40 mM Tris/Essigäure, 1mM EDTA, pH 8,0

3.8.2 Herstellung kompetenter Bakterien (Chung *et al.*, 1998)

TFB1-Puffer:	30 mM Kalium-Acetat, 100 mM RbCl, 50 mM Mn(II)Cl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin, pH 5,8; sterilfiltriert
TFB2-Puffer:	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 6,5; sterilfiltriert

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterien verläuft unter natürlichen Bedingungen nicht sehr effizient. Daher müssen die Bakterien vor der Transformation zunächst für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorbereitet werden (Chung *et al.*, 1998). Die Bakterien wurden in 100 ml LB-Medium im Inkubator bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 erreichten. Damit wurde sichergestellt, dass sie sich in der exponentiellen Phase des Wachstums befanden. Daraufhin wurden die Zellen durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4°C pelletiert, in 20 ml eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert und in 2 ml TFB-2-Puffer aufgenommen. Die derart chemisch kompetent gemachten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.8.3 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Transformation beschreibt die Methode der Einbringung von DNA in kompetente Bakterien. Es wurde die Hitzeschockmethode verwendet. 50 µl bzw. 100 µl kompetente Bakterien wurden zunächst langsam aufgetaut, bevor die entsprechende DNA (10 µl eines 20 µl Ligationsansatzes oder 10 bis 50 ng Plasmid-DNA) hinzugegeben und durch leichtes Schnicken mit den Bakterien vermengt wurde. Der Mix wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, um eine Anlagerung der DNA an die Bakterien zu erzielen. Der anschließende Hitzeschock, der zur Aufnahme der DNA in die Zelle führt, wurde 90 Sekunden bei 37°C oder 30°C durchgeführt. Einer Inkubation von 2 Minuten auf Eis folgte die Zugabe von 250 µl bzw. 500 µl LB-Medium oder SOC-Medium. Um die Expression der Resistenz zu erreichen, wurden die Bakterien 30 bis 60 Minuten bei 30°C bzw. 37°C unter Schütteln inkubiert, bevor sie anschließend entweder auf LB-Amp-haltige Agarplatten ausplattiert wurden oder in ca. 150 ml LB-Amp-Flüssigmedium unter Schütteln über Nacht kultiviert wurden.

3.8.4 Plasmid-Präparation

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firma Qiagen bzw. Macherey & Nagel verwendet. Zur analytischen DNA-Präparation (Minipreps bis 10 µg DNA) wurde das Mini-Kit genau nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zur präparativen DNA-Isolierung (bis 500 µg) der Plasmid-DNA wurde das Maxi-Kit benutzt. Hierbei wurden abweichend vom Protokoll die Zentrifugationsschritte bei 4500 rpm in der

Untertischzentrifuge durchgeführt. Bei beiden Aufreinigungsmethoden wurde die Plasmid-DNA in einem Bakterienlysats an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, anschließend gewaschen und in H₂O eluiert.

3.8.5 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Die Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien erfolgte mit dem „DNeasy Tissue Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurden die Zellen zunächst durch Proteinase K und definierte Pufferbedingungen lysiert, anschließend wurde die Zellmembran aufgebrochen und die DNA an eine Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und mit H₂O eluiert.

3.8.6 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Konzentration wurde mit der Ultraviolettabsorptionsspektroskopie gemessen. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die präparierte DNA 1:100 verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Bei 260 nm entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus 260 nm und 280 nm stellt einen relativen Wert für die Reinheit der präparierten DNA dar. Werte niedriger als 1,8 deuten auf eine Verunreinigung mit Protein hin, höhere Werte könnten ein Hinweis auf vorhandene RNA oder denaturierte DNA sein.

3.8.7 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Spaltung von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen Typ II. Für einen Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken wurden 0,5 – 1 µg Plasmid-DNA mit einem etwa 5-fachen Enzymüberschuss (5 Units Enzym/µg DNA) in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer für 1 bis 2 Stunden bei der für das Enzym benötigten Temperatur inkubiert. Bei Benötigung mehrerer unterschiedlicher Restriktionsenzyme erfolgte die Inkubation entweder in einem gemeinsamen Puffer oder die Enzyme wurden nacheinander eingesetzt, während die Plasmid-DNA zwischen den Schritten über eine Säule

aufgereinigt wurde. Benötigten die Enzyme unterschiedliche Temperaturen aber den gleichen Puffer, wurden sie ebenfalls nacheinander inkubiert, während das zweite Enzym nach der Inkubation des ersten hinzugegeben wurde. Für den Restriktionsverdau von DNA, die später für Klonierungen verwendet werden sollte, wurden meist 3 – 5 µg DNA eingesetzt und die Enzymmenge entsprechend erhöht.

3.8.8 Auffüllen von überhängenden DNA-Einzelstrangenden

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder 5'- bzw. 3'- überhängende Enden (*sticky ends*). Um *sticky ends* nach Bedarf aufzufüllen, wurde die Klenow Polymerase verwendet. Zur Reaktion wurde 1 Einheit/µg DNA Klenow Polymerase, der vom Hersteller empfohlene Puffer sowie 2 µl dNTP-Mix (10 mM) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.8.9 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung und Analyse von Restriktionsfragmenten oder PCR-Produkten für analytische und präparative Zwecke erfolgte durch Elektrophorese in 0,8 – 2 %-igen Agarosegelen in horizontalen Gelelektrophoresekammern. Die Gelelektrophorese basiert auf der Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe. DNA wandert aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste zur Anode. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 % bis 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellengerät gelöst. Der Lauf erfolgte in 1xTAE-Laufpuffer bei ungefähr 8 Volt/cm Gellänge. Die Gele wurden entweder direkt mit Ethidiumbromid versehen (5 µg/ml Agarose) oder nach dem Lauf in ein Ethidiumbromid-Bad (5 µg/ml 1xTAE-Puffer) gelegt. Als DNA-Größenstandard wurde je nach Bedarf eine 1 kb-, 100 bp- oder 2-log-DNA-Leiter verwendet. Aufgrund der interkalierenden Eigenschaft des Ethidiumbromids konnte die aufgetrennte DNA anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid ist eine polyzyklische, planare und chromophore Verbindung, die sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einlagert. Bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert der Interkalator mit einer Wellenlänge von 590 nm im rot-orangen Bereich des sichtbaren Spektrums. Für Klonierungen und Sequenzierreaktionen von PCR-Produkten

wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente aus der Agarose ausgeschnitten und aufgereinigt.

3.8.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Fragmente wurden mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus den Agarosegelstücken wurde das „QiaQuick-Gelextraktionskit“ von Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet. Das Prinzip basiert auf der Bindung der DNA-Fragmente an eine Silica-Gel-Membran, deren Waschen und anschließendem Eluieren in H₂O.

3.8.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Enzymreaktionen

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

3.8.12 Ligation von DNA

Bei der Ligationsreaktion wurden *Insert* und Vektor in einem ungefähren Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Die Ermittlung der Verhältnisse erfolgte mittels Abschätzung auf einem Agarosegel. Zur Reaktion wurde Ligasepuffer und 400 U T4-DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20 µl zugegeben. Die Inkubation erfolgte entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur, über Nacht im Wasserbad bei 16°C oder es blieben die Reaktionsgefäße in einem Eisbehälter über Nacht bei Raumtemperatur stehen, sodass das Eis langsam auftaute. Um die Qualität des Vektors und die Zahl der eventuellen Religationen in der nachfolgenden Transformation abschätzen zu können, wurde als Kontrolle eine Ligation ohne *Insert* durchgeführt.

3.8.13 Dephosphorilierung linearisierter Plasmid-DNA


Das Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) spaltet Phosphatreste an den 5'-Enden der geschnittenen DNA-Fragmente ab. Dies dient der Verhinderung der Selbstzirkularisierung eines Vektors ohne den Einbau eines *Inserts* und erfolgte direkt nach einem Restriktionsverdau. Zum Restriktionsansatz wurde nach der Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym 1 µl CIP gegeben. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C.

3.8.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird benutzt, um einen kurzen, definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler in einem 50 µl Reaktionsansatz. Es wurde mit unterschiedlichen Polymerasen gearbeitet. Wurde ein PCR-Produkt für weitere Klonierungen benötigt, erfolgte die Amplifikation mit der Pwo- oder Pfx-Polymerase, welche eine *Proof-reading*-Aktivität (Funktion zur Überprüfung auf korrekte Basenabfolge) besitzen. Zur Kontrolle der Stabilität der rekombinanten Viren wurde die einfache Taq-Polymerase zusammen mit dem *Mastermix* von Roche verwendet.

Die PCR-Ansätze und PCR-Programme unterschieden sich je nach verwendeter Polymerase, die Hybridisierungstemperaturen waren abhängig von den verwendeten *Primern*, die Zyklenzahlen unterschieden sich je nach dem, wie viele Kopien des gewünschten Produktes im *Template* zu erwarten waren. Die Hybridisierungstemperaturen der verwendeten Primer sind Kapitel 3.3 zu entnehmen.

Standardprogramm für PCR mit genomischer DNA:

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
94°C	5 Minuten	
94°C	30 Sekunden	 30x
50°C	30 Sekunden	
72°C	60 Sekunden	
72°C	7 Minuten	
4°C	unendlich	

3.8.15 Klonierung der pSUPER-Plasmide

Annealing Puffer: 100 mM Kaliumacetat, 30mM HEPES-KOH
pH 7,4, 2 mM Magnesiumacetat

Zur Herstellung der shRNA-Expressionskassetten tragenden pSUPER-Plasmide wurden die Oligonukleotide entsprechend den Anleitungen des Autors (Brummelkamp *et al.*, 2002) entworfen und bei der Firma MWG-Biotech in der Reinheit 0,05 μ M bestellt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in H₂O gelöst, bis sie eine Konzentration von 100 pmol hatten. Anschließend wurden je zwei komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide (vorwärts und rückwärts) zu Doppelstrang-Stücken hybridisiert. Je 2 μ l der gelösten Oligonukleotide wurden mit 46 μ l *Annealing*-Puffer versetzt und 4 Minuten bei 95°C inkubiert. Darauf folgten eine Inkubation von 10 Minuten bei 70°C und ein abschließendes, langsames Auskühlen bis auf 4°C. Hierzu wurden die Proben im Anschluss an die Erhitzung im ausgeschalteten Heizblock stehen gelassen, bis sie eine ungefähre Zimmertemperatur erreicht hatten. Anschließend wurden sie in einem Styroporbehälter in den Kühlschrank gestellt. Das Styropor dient dazu, die Kälte nur langsam an die Probe zu lassen.

An das *Annealing* folgte die Phosphorylierung der Oligonukleotide. Hierzu wurden 2 μ l der hybridisierten Oligos mit Ligase-Puffer und der PKN-Polynukleotid-Kinase versehen. Der Ligase-Puffer dient hierbei neben der Herstellung der optimalen Pufferbedingungen als Quelle für ATP. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C, welcher eine Hitzeinaktivierung der PNK bei 70°C für 10 Minuten folgte. Abschließend wurden die phosphorylierten Oligos in den *Bgl*II- und *Hind*III-verdauten (und mithilfe der alkalischen Phosphatase behandelten und somit dephosphorylierten) pSUPER-Vektor ligiert.

3.8.16 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Dazu wurden 1 bis 2 μ g der zu sequenzierenden MINI-DNA oder eine ausgeschnittene und in H₂O eluierte PCR-Bande komplett eingetrocknet und zusammen mit verdünnten Lösungen der benötigten Oligonukleotide (falls von der Firma nicht bereitgestellt) (10 pmol) verschickt. Die

Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit den Programmen Vector NTI oder DNA Strider.

3.9 Arbeiten mit Proteinen

3.9.1 Reagenzien

Zellysispuffer:	1% NP40, 50 mM Tris HCl, pH 7,5, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, ad H ₂ O
Proteaseinhibitoren:	Complete Tabletten von Roche, 1 Tablette gelöst in 2 ml Reinstwasser, sterilfiltriert
PBS-T:	PBS mit 0,05 % Tween 20
SDS-Laufpuffer:	250 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8

3.9.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen wurde zunächst der Lysispuffer hergestellt und anschließend frisch mit den Proteaseinhibitoren (40 µl gelöste Tablette/ml Lysispuffer) versetzt. Die entsprechenden Zellen wurden anschließend auf ihrer Zellkulturschale mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, in PBS resuspendiert und in ein 15 ml-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Pelletierung der Zellen für 5 Minuten bei 1500 rpm in der Untertischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Zellysispuffer resuspendiert. Die Menge des hinzugegebenen Lysispuffers bestimmte hierbei die Zelldichte und die Größe der verwendeten Zellkulturschale. Für eine dichte Schale einer 6-Loch-Platte (ca. 2x10⁶ Zellen) wurden ungefähr 200 µl Lysispuffer verwendet. Die in Lysispuffer resuspendierten Zellen wurden in Eppendorff-Gefäße überführt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Abtrennung der Zelltrümmer, Zellmembranbestandteile und der genomischen DNA mittels Zentrifugation bei 13000 g für 15 Minuten. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Falls benötigt, wurde die Proteinmenge mittels der Bradford-Methode bestimmt und anschließend bei -80° für weitere Verwendungen weggefroren.

3.9.3 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzellextrakten erfolgte mithilfe des „Bio-Rad Protein Assay“. Hierzu wurden 5 µl Proteinextrakt zu einem Gemisch aus 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz gegeben, gut gemischt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Mithilfe einer BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

3.9.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970)

Zusammensetzung des Trenngels (10 ml):

Lösungen	8 %	10 %	12 %
Trenngelpuffer (375 mM Tris-HCl pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml
H ₂ O	4,6 ml	4 ml	3,3 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl

Zusammensetzung des Sammelgels (10 ml):

Lösungen	5 %
Sammelgelpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8)	1,25 ml
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid)	1,7 ml
H ₂ O	6,8 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	10 µl

Gesamtproteine wurden über sog. SDS-Polyacrylamidgele unter reduzierenden Bedingungen im diskontinuierlichen System elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag je nach Proteingröße zwischen 8 – 12 %. Die Zusammensetzung der Puffer erfolgte nach Sambrock *et al.* (1989). Für die Elektrophorese wurden pro Gelspur 20 – 120 µg Gesamtproteinextrakt zusammen mit SDS-Laufpuffer für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und zur Auftrennung im PROTEAN III-System in 1x SDS-Laufpuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromdichte von ca. 40 mA/cm².

3.9.5 Elektrotransfer (Kyhse-Andersen, 1984)

SDS-Laufpuffer:	250 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS; pH 8
Anoden-Puffer 1:	300 mM Tris/HCl pH 10,4; 10 % (v/v) Methanol
Anoden-Puffer 2:	25 mM Tris/HCl pH 10,4; 10 % (v/v) Methanol
Kathoden-Puffer:	25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM ε- Capronsäure, 10 % (v/v) Methanol

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren, wurde das *semi-dry-blotting*-Verfahren mithilfe der *Fast Blot*-Blottingapparatur verwendet. Nachdem die Membran sowie die Whatmanpapiere in 1x-Blotpuffer äquilibriert wurden, erfolgte der Transfer der Proteine bei 100 mA für eine Stunde auf die Nitrozellulosemembran. Abbildung 3-1 zeigt den genauen Aufbau und die Abfolge der getränkten Whatmanpapiere.

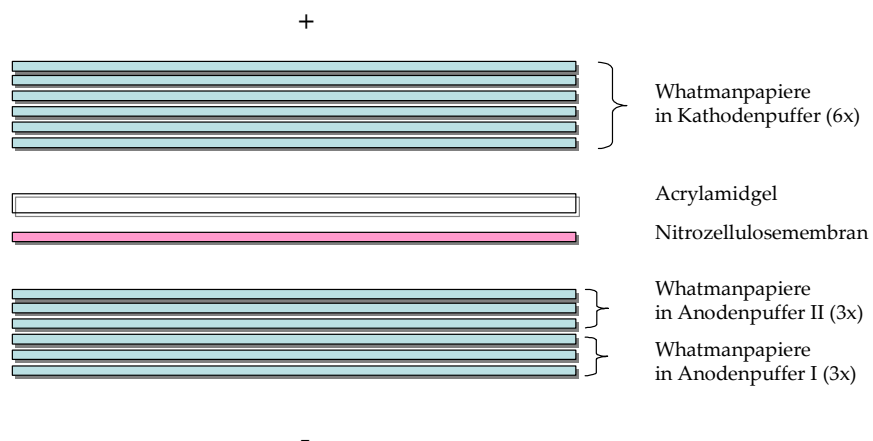


Abbildung 3-1 Schematische Zeichnung des Blot-Aufbaus.

3.9.6 Immundetektion

Die Nitrozellulosemembran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS mit 0,05 % Tween-20 (PBS-T) und 3 % Magermilchpulver (w/v) blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei einer Verdünnung von 1:100 – 1:10 000 in PBS-T unter Rollen über Nacht bei 4°C. Hierzu wurde die Membran in ein 50 ml-Gefäß gerollt, so dass die Fläche mit den Proteinen nach innen zeigte. Dann wurde die Antikörperverdünnung hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde die Membran mit dem passenden *horse raddish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper nach Herstellerangaben inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Kapitel 3.5 zusammengestellt.

3.9.7 Chemilumineszenz-Detektion von Proteinen

Die auf die Membran transferierten Proteine wurden mithilfe des ECL-Plus-Detektionssystems von Amersham nach Herstellerangaben detektiert. Das Enzym HRP, welches an den sekundären Antikörper gebunden ist, bewirkt eine chemische Reaktion des in der ECL-Lösung vorhandenen Substrates Luminol, was zu dessen Anregung führt. Als Folge dieser Reaktion tritt Lumineszenz auf. Die Exposition erfolgte mit Röntgenfilmen oder anhand des Roche Lumi-Imagers.

3.9.8 Wiederverwendung von Western-Blot-Membranen (*Strippen*)

Sollen auf einer Membran mehrere unterschiedliche Proteinbanden detektiert werden, können nach Exposition bereits gebundene primäre und sekundäre Antikörper mit Behandlung von 0,2 M NaOH wieder abgelöst werden. Hierzu wurde die Membran 5 Min in H₂O, anschließend 5 Minuten in 0,2 M NaOH und abschließend erneut 5 Minuten in H₂O geschwenkt. Nach einer 5-minütigen Inkubation in PBS-T wurde die Membran erneut für eine Stunde in 5 %iger Magermilchlösung (in PBS-T) zum Blockieren unspezifischer Bindungen inkubiert, bevor eine erneute Erstantikörperinkubation erfolgen konnte.

3.10 Retrovirale Arbeitstechniken

3.10.1 Retrovirale Vektorproduktion

Zur Herstellung retroviralen Vektoren wurden 293T mit Virusprotein-kodierenden Plasmiden transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen, sterilfiltriert (45 µm-Filter) und entweder direkt auf Zellen gegeben oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.10.2 Transduktion/Infektion und Titration

Für die Transduktion wurde eine bestimmte Zellzahl der zu transduzierenden Zellen ausgesät. Nachdem die Zellen sich am Boden des Zellkulturgefäßes abgesetzt hatten, erfolgte die Zugabe der vektorhaltigen Zellkulturüberstände. 24 Stunden nach Transduktion wurde der Überstand abgenommen und die Zellen durchflußzytometrisch auf die Expression von GFP untersucht. Die Titer wurden mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\% \text{ Anteiltransduzierte Zellen} \times \text{ausgesäte Zellen}}{100} \times \frac{1}{\text{Volumen Virus (ml)}} = \text{IE / ml}$$

Eine Infektion von Zellen mit replikationskompetenten Viren erfolgte entweder direkt mittels Transfektion der Zellen mit dem Plasmid, welches das gesamte Virusgenom kodiert oder durch Zugabe von Virushaltigen Zellkulturüberständen auf frische Zellen.

3.10.3 Durchflußzytometrie

„FIX for FACS“: PBS mit 5 % Formaldehyd

Mithilfe der durchflußzytometrischen Analyse können einzelne Zellen innerhalb einer Zellpopulation klassifiziert werden. Das Durchflußzytometer erlaubt Aussagen über die Zellgröße (FSC), die Granulardichte (SSC) und die Intensität der Fluoreszenz der Zelle an sich oder der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörper. Mithilfe der Durchflußzytometrie wurde in dieser Arbeit die Effizienz von Transfektionen bestimmt, die

Titer nach Transduktionen ermittelt sowie das Replikationsverhalten der direkt fluoreszenzmarkierten replikationskompetenten MLV und semireplikationskompetenten Vektoren untersucht. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen (bei Verwendung adhärent wachsender Zellen mit Trypsin von ihrer Schale abgelöst) und ein Teil in FACS-Röhrchen überführt. Nach der Pelletierung wurden die Zellen in PBS mit 4 % Formaldehyd aufgenommen. Hierbei war zu beachten, dass die Zellen in einer für die FACS-Messung geeigneten Dichte eingestellt wurden. Bei der FACS-Messung sollte mit einer ungefähren Dichte von 300 bis maximal 1000 *Events*/Sekunde gemessen werden, da die Messung ansonsten ungenau ausfallen würde. Dies entspricht ungefähr 2×10^5 Zellen pro 100 ml „Fix for FACS“.

4 Ergebnisse

Der Einsatz von murinen Leukämieviren (MLV) als Gentherapievektor ist gut erforscht und weit verbreitet. Allerdings konnte mit nichtreplizierenden Vektoren kein durchschlagender Erfolg in der Therapie von soliden Tumoren erzielt werden. Dies liegt am Unvermögen von Vektoren, alle Tumorzellen innerhalb eines Tumors zu transduzieren. Replikationskompetente Viren hingegen haben das Potential, in der Therapie von soliden Tumoren eingesetzt zu werden, da sie nur in sich teilenden Zellen replizieren und durch ihre Replikationsfähigkeit das Transgen somit auch in umliegenden Tumorzellen verteilen können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, replikationskompetente MLV als Gentherapievehikel für shRNA zu etablieren. Primär als Werkzeuge um Genfunktionen zu untersuchen mit dem großen Ziel ein perfektes Vehikel für die humane Gentherapie zu entwerfen. Bevor replikationskompetente Retroviren für die humane Gentherapie eingesetzt werden können, müssen sie wichtige Sicherheitsaspekte erfüllen. In dieser Arbeit wurde zunächst ein Replikations-Monitoringsystem etabliert, um die Arbeit mit den MLV zu erleichtern. Dann sollte mit semireplikativen Vektoren die Kodierungskapazität eines retroviralen Genoms vergrößert werden. Außerdem wurde versucht, den Wirtstropismus des ecotropen Hüllproteins auf humane Tumorzellen zu erweitern. Am Ende konnte gezeigt werden, dass shRNA erfolgreich *in vitro* übertragen werden kann und das Abschalten einzelner Gene bewirkt.

4.1 Monitoringsystem der MLV-Infektion

Murine Leukämieviren verursachen keinen zytopathischen Effekt in infizierten Zellen, sodass die Beobachtung der viralen Replikation nur mittels Immunfärbungen oder der Messung der Reversen-Transkriptase-Aktivität erfolgen kann. Die Insertion von Markergenen in das Virusgenom könnte eine Visualisierung der Replikation der Viren

ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen für das grün fluoreszierende Protein GFP als Fusion in das Hüllprotein Env inseriert (Erlwein *et al.*, 2003).

Die Herstellung des modifizierten, replikationskompetenten MLV GFP-MOV, welches die GFP-Sequenzen in der prolinreichen Region (PRR) trägt, erfolgte mittels Amplifikation der Sequenzen für GFP per PCR und anschließender Ligation über die Restriktionsschnittstellen *PflMI* und *SgrAI* in die prolinreiche Region des ecotropen Hüllproteins. Die GFP-Sequenz ersetzt in dem rekombinanten Virus die Aminosäuren 265-273 des Hüllproteins (Erlwein *et al.*, 2002). Es entstand das Virus GFP-MOV (siehe Abbildung 4-1).

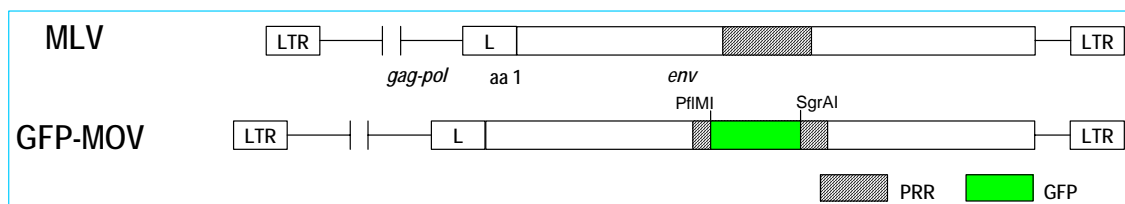


Abbildung 4-1 Schematische Darstellung des GFP-MOV. Die gestrichelten Kästchen stellen die prolinreiche Region des ecotropen Hüllproteins dar, das grüne Kästchen repräsentiert die inserierten Sequenzen für GFP.

4.1.1 Charakterisierung des GFP-MOV

Die Modifikation des MLV-Hüllproteins mit dem GFP sollte die Visualisierung der Virusreplikation mithilfe der Durchflußzytometrie ermöglichen. Infizierte Zellen könnten von nicht infizierten Zellen aufgrund ihrer grün fluoreszierenden Eigenschaften im Durchflußzytometer (FACS = *fluorescent activated cell sorter*) getrennt und separat gezählt werden. Die Präsenz des GFP innerhalb einer Zelle repräsentiert deren Infektion. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen innerhalb der Zellpopulation stellt somit die Verteilung und Replikation des Virus visuell dar. 2×10^6 am Tag vor Transfektion ausgesäte NIH3T3 Zellen wurden mit $10 \mu\text{g}$ GFP-MOV oder ohne DNA (*mock*) mittels der Kalziumphosphatmethode transfiziert. An den Tagen 2, 3, 4, 6, 9 und 13 nach Transfektion wurden jeweils 5×10^5 Zellen abgenommen und im Durchflußzytometer auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. In einem Graphen zusammengestellt (siehe Abbildung 4-2), ermöglicht die Auftragung des

prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen innerhalb der Zellpopulation (Y-Achse) gegen die Tage nach Infektion bzw. Transfektion (X-Achse) die Generierung einer Wachstumskurve.

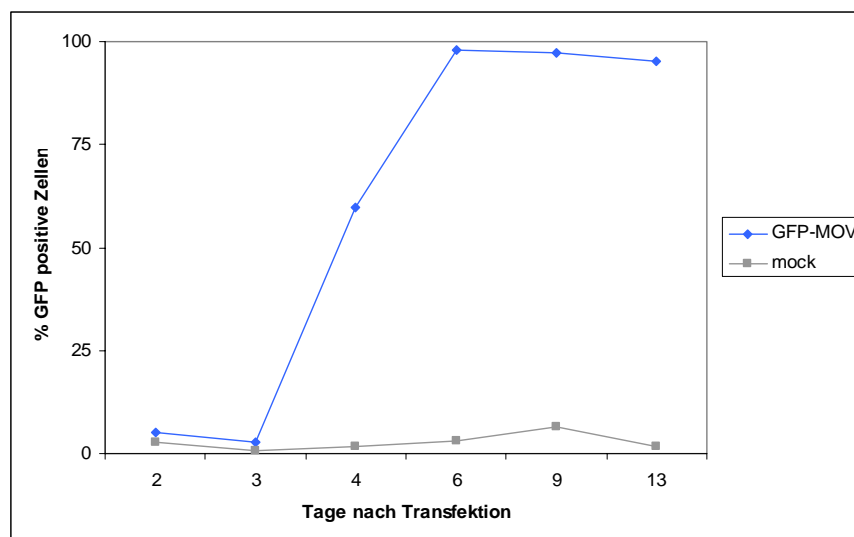


Abbildung 4-2 Replikationskinetik des GFP-MOV nach Transfektion in NIH3T3. Die X-Achse stellt die Tage nach Transfektion dar, die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozent (%). Die graue Linie zeigt *mock*-transfizierte Zellen, während die blaue Linie den Anstieg von GFP-positiven Zellen nach Transfektion mit dem GFP-MOV-Plasmid darstellt.

Abbildung 4-2 zeigt, dass die Insertion des GFP in das MLV-Hüllprotein die direkte Beobachtung der Virusreplikation mittels Messung der GFP-positiven Zellen ermöglicht. Die entstandene Kurve zeigt eine Standard-Replikationskurve für Retroviren. Der Wert an Tag zwei repräsentiert die Transfektionseffizienz. Die transfizierten Zellen produzieren die viralen Proteine und entlassen reife Virionen. Nach drei Tagen beginnt die exponentielle Phase der Replikation bis am fünften Tag nach Transfektion alle Zellen innerhalb der Population infiziert und GFP-positiv sind. Um zu untersuchen, ob die Insertion einen negativen Einfluss auf das Replikationsverhalten hat, bedarf es des Vergleichs mit einem Wildtyp-Env-tragenden, replizierenden Vergleichsvirus. Das Plasmid pZAPm-GFP (Abbildung 4-3) (Logg *et al.*, 2001) ist charakterisiert durch die Insertion eines *encephalomyocarditis*-Virus-IRES-Elements, an welches die Sequenzen für das grün fluoreszierende Protein gekoppelt sind. IRES (*internal ribosomal entry site*) ist eine cis-agierende RNA-Sequenz, welche das Andocken der 40S-Ribosomenuntereinheit strangabwärts eines Translations-Initiations-Kodons unabhängig von einer Cap-Struktur bewirkt und somit die Expression von zwei Proteinen, die auf einer mRNA kodiert sind,

ermöglicht (Sizova *et al.*, 1998). Die Expressionskassette wurde direkt hinter das Env-Terminations-Kodon kloniert.

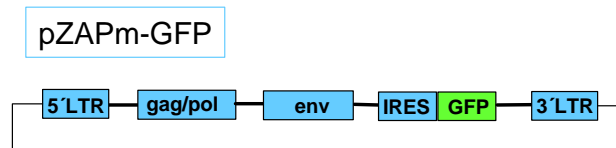


Abbildung 4-3 Schematische Darstellung des pZAPm-GFP-Genoms.

Logg *et al.* (Logg *et al.*, 2001) konnten zeigen, dass die Insertion der IRES-GFP-Expressionskassette für mindestens acht Infektionsrunden stabil im Genom inseriert blieb und die Beobachtung der Replikation des Virus über die Messung der Anzahl der GFP-positiven Zellen innerhalb der infizierten Zellpopulation ermöglichte. Um eine vergleichende Replikationskinetik erstellen zu können, wurden einen Tag vor Versuchsbeginn 2×10^5 NIH3T3 Zellen in 6-Loch-schalen ausgesät und am darauf folgenden Tag mit je $2 \mu\text{g}$ GFP-MOV oder pZAPm-GFP transfiziert (FuGENE). An den Tagen 3, 6, 7 und 9 nach Transfektion wurde jeweils ein Teil der Zellen abgenommen und im FACS auf GFP-Expression untersucht.

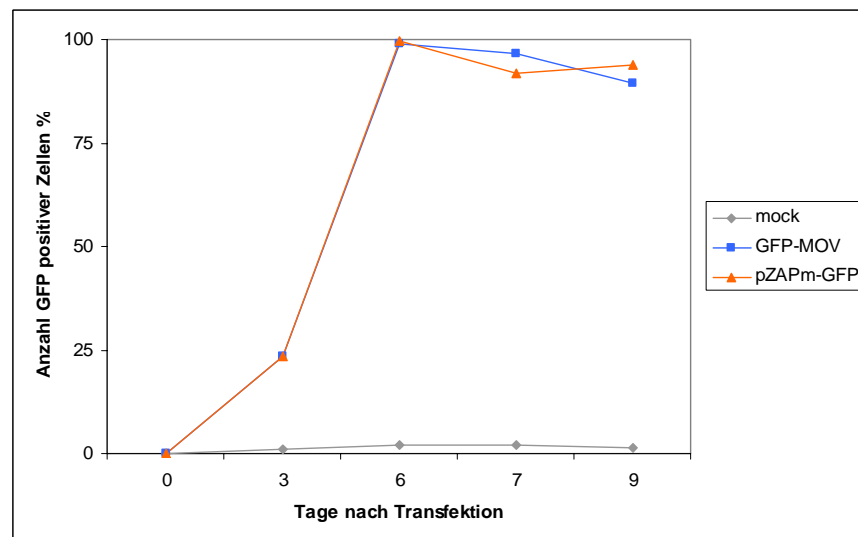


Abbildung 4-4 Replikationskinetik der Viren GFP-MOV und pZAPm-GFP auf NIH3T3 Zellen. Die X-Achse stellt die Tage nach Transfektion dar, die Y-Achse repräsentiert die Anzahl der GFP-positiven Zellen in Prozent (%). Die graue Linie zeigt *mock*-transfizierte Zellen, während die blaue Linie den Anstieg von GFP-positiven Zellen nach Transfektion mit dem GFP-MOV-Plasmid und die orange Linie den Anstieg nach Transfektion mit dem pZAPm-GFP-Plasmid zeigt.

Die Replikationskinetik in Abbildung 4-4 zeigt, dass die Insertion des GFP in die prolinreiche Region des ecotropen Hüllproteins (blaue Linie, GFP-MOV) keinen negativen Einfluss auf dessen Replikation hat. Das Virus repliziert ohne signifikante Unterschiede zum Virus, welches die Insertion der GFP-Sequenzen direkt hinter dem Env-Terminationskodon trägt.

Bei Betrachtung eines Aliquots der infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich bei den Zellen ein unterschiedliches Muster der GFP-Verteilung, je nachdem, mit welchem Virus sie infiziert worden waren (siehe Abbildung 4-5 A und B).

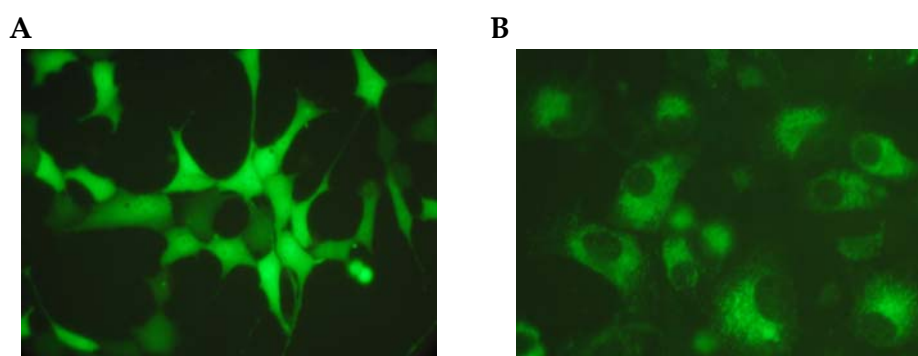


Abbildung 4-5 Zelluläre Verteilung von IRES-GFP (A) und GFP-Env (B) in infizierten NIH3T3 Zellen.

Die pZAPm-GFP infizierten NIH3T3 Zellen zeigen eine Verteilung der grünen Fluoreszenz in der gesamten Zelle (Abbildung 4-5 A) während GFP-MOV-infizierte Zellen eine Färbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi-Apparats sowie der Plasmamembran aber keine Färbung des Kerns zeigen (Abbildung 4-5 B). Das GFP-MOV-Virus kodiert das GFP als Fusionsprotein mit dem Env. Die Aufenthaltsorte von Hüllproteinen in einer infizierten Zellen sind das ER, der Golgi-Apparat sowie die Zellmembran, was somit auch die Aufenthaltsorte des GFP bestimmt. GFP hingegen, welche vom IRES aus translatiert wird, wie es im pZAPm-GFP-Virus der Fall ist, ist an kein virales Protein gebunden und kann frei in der Zelle diffundieren. Die GFP-Verteilung innerhalb der infizierten Zellen entspricht also genau dem theoretisch erwarteten Muster.

4.1.2 Monitoring der Rezeptorbindung des GFP-Env-Fusionsproteins

Da sich die Sequenzen für GFP als Fusion im Hüllprotein des Virus befinden und das Hüllprotein zusammen mit dem GFP auf der Oberfläche des Virus lokalisiert ist, müsste auch eine Untersuchung der Bindung der Viruspartikel an Zielzellen mittels Messung der Fluoreszenz möglich sein. Um dies zu untersuchen, wurden sterilfiltrierte Virusüberstände von GFP-MOV-infizierten NIH3T3 Zellen mit 2×10^5 Zielzellen im FACS-Röhrchen fünf Minuten lang inkubiert und nach einem Waschschrift die Fluoreszenzeigenschaften der Zellpopulation direkt durchflußzytometrisch bestimmt (Abbildung 4-6 A). Verwendung fanden murine NIH3T3 Zellen, welche den Rezeptor für das ecotrope Hüllprotein mCAT-1 exprimieren sowie humane mCAT-1-negative 293T Zellen. Exprimieren die Zellen den spezifischen Rezeptor, können die fluoreszierenden Viren an diesen binden und verursachen damit im FL-1-Kanal eine Bewegung der Population nach rechts (grüne Fluoreszenz).

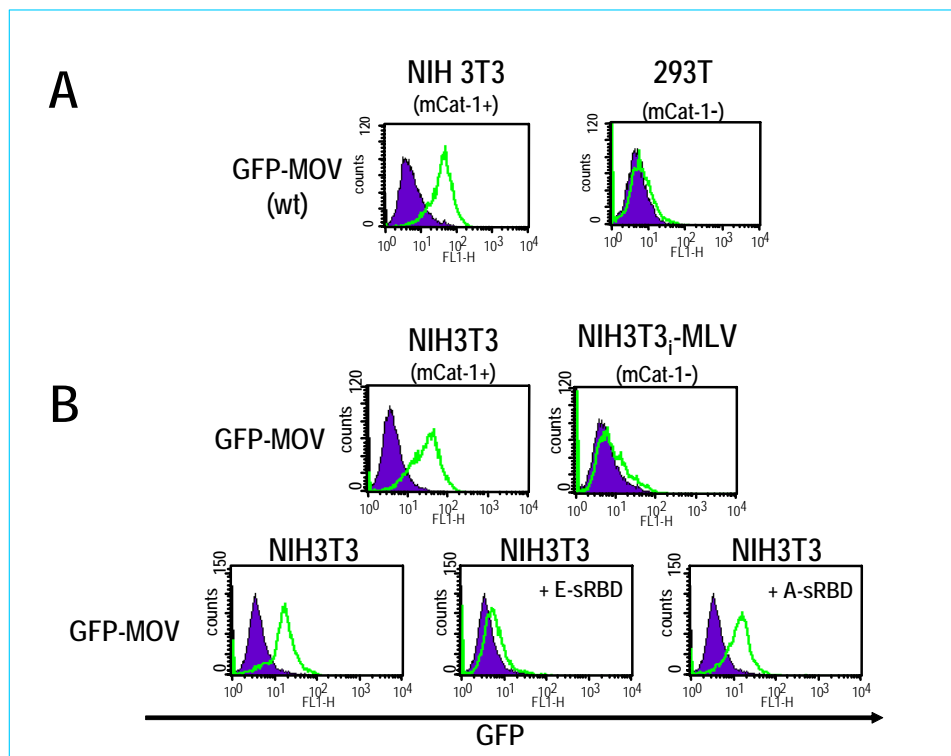


Abbildung 4-6 Bindung des GFP-MOV an Zellen A: Überstände von GFP-MOV-infizierten NIH3T3 Zellen wurden mit den Zielzellen NIH3T3 und 293T inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Das Binden der Viruspartikel ist durch die Bewegung der Population nach rechts hin zur grünen Fluoreszenz erkennbar. B: Überstände von GFP-MOV-infizierten NIH3T3 Zellen wurden mit den oben dargestellten Zellen inkubiert und durchflußzytometrisch analysiert. Lösliche Rezeptorbindedomänen des ecotropen oder amphotropen MLV-Env (E-sRBD, A-sRBD) wurden vor Inkubation mit den Viren zu den Zellen gegeben.

Abbildung 4-6 A zeigt, dass GFP-MOV eindeutig an NIH3T3 Zellen, welche den Rezeptor für das ecotrope Hüllprotein mCAT-1 exprimieren, binden kann. Dass diese Bindung spezifisch ist, bestätigt der Versuchsansatz der Negativkontrolle mit den 293T Zellen, welche den mCAT-1-Rezeptor nicht exprimieren. Hier findet keine Bewegung der Zellpopulation im FL-1 statt, demzufolge binden keine fluoreszierenden MLVs.

Eine MLV-Infektion bewirkt in der Wirtszelle eine Herunterregulierung des mCAT-1-Rezeptors mittels des Superinfektions-Mechanismus, was die Zellen immun gegen weitere Infektionen mit MLV macht. Inkubiert man solche Zellen (NIH3T3i-MLV) mit den GFP-MOV-Überständen, sollte keine Virusbindung stattfinden. Abbildung 4-6 B, obere Reihe, bestätigt die Erwartungen. Im Gegensatz zu uninfizierten Zellen findet bei den infizierten NIH3T3 (NIH3T3i) keine Bindung der fluoreszierenden Viren und somit kein *Shift* der Population statt. Der gleiche Effekt sollte beobachtet werden, wenn die Zielzellen NIH3T3 vor Zugabe der Überstände mit löslichen Rezeptorbindedomänen inkubiert werden. Die Rezeptorbindedomänen-Proteine stammen von mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (Lavillette *et al.*, 2001a) transfizierten 293T. Die untere Reihe der Abbildung 4-6 B zeigt, dass nach Vorinkubation der Zielzellen mit den ecotropen, löslichen Rezeptorbindedomänen die Bindung der GFP-MOV behindert wird, während amphotrope lösliche Bindedomänen keinen Einfluss auf die GFP-MOV-Bindung haben. Die ecotropen Domänen blockieren spezifisch die Bindestelle des GFP-MOV im Rezeptor, was eine Bindung der Viren verhindert.

Die Insertion des GFP in die prolinreiche Region des ecotropen Hüllproteins von MLV ermöglicht also nicht nur die direkte Beobachtung der Virusreplikation via Messung der Fluoreszenz, sondern auch die Untersuchung der Bindung von Viren an Zellen.

4.2 Vergrößerung der Kodierungskapazität

Um ein effizientes Verpacken des Virusgenoms zu gewährleisten, ist das retrovirale Genom auf eine Größe von ca. 11000 Basenpaaren limitiert. Sollen MLVs als replikationskompetente

Gentransfervehikel zum Einsatz kommen, müssen neben etwaigen Modifikationen (z.B. des Hüllproteins) und Insertionen von Transgenen alle Teile des Virusgenoms erhalten bleiben. Je nach dem, welche therapeutischen Gene in das Virusgenom eingeschleust werden sollen, kann die Größenlimitierung Schwierigkeiten bereiten. Perfekte Gentransfervehikel sollten effektiv in der Expression des Transgens, zielgerichtet und sicher sein. Über die Effektivität entscheidet das therapeutische Gen. Die Wirtsspezifität von MLV kann anhand von z.B. Liganden und/oder Blockierungsdomänen bestimmt werden, die Sicherheit wird durch z.B. induzierbare oder gewebspezifische Promotoren erhöht. All diese Bestandteile müssen zusätzlich in das Genom eingeschleust werden.

Auf der Suche nach Möglichkeiten, die Kodierungskapazität von MLV zu erweitern, kam die Idee auf, das Virusgenom auf zwei unterschiedliche Vektoren aufzuteilen. Da das MLV-Genom aus drei Genen (*gag*, *pol* und *env*) besteht und Gag-Pol als ein Polypeptid exprimiert wird, besteht die Möglichkeit der Auftrennung des Gag/Pol-Bereichs vom Env-Teil auf zwei unterschiedliche Vektoren. Diese Vektoren werden als semireplikationskompetent bezeichnet. Ein Teil alleine ist nicht in der Lage, neue, infektiöse Viruspartikel zu generieren. Befinden sich allerdings beide Teile in einer Zelle, findet die Bildung von Viruspartikeln statt. Versieht man die beiden so aufgeteilten Teile des Genoms mit z.B. Fluoreszenzmarkern, sollte die Virusreplikation mittels eines Fluoreszenzmikroskops oder der Durchflußzytometrie einfach zu dokumentieren sein.

4.2.1 Verpackbares MLV-Gag-Pol mit RFP

Der retrovirale Vektor pKA Δ envRFP stellt einen Teil der semireplikationskompetenten Vektoren dar. Er kodiert für die Proteine Gag und Pol unter der Kontrolle eines LTR-Promotors, für das Verpackungssignal ψ^+ und das rot fluoreszierenden Protein RFP, welches von der gespleißten mRNA abgelesen wird (siehe Abbildung 4-7).

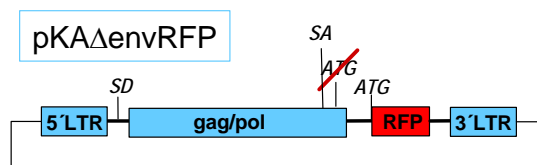


Abbildung 4-7 Schematische Darstellung des retroviralen Vektors *pKAΔenvRFP*. SD: Spleiß-Donor-Stelle; SA: Spleiß-Akzeptor-Stelle; RFP: rot fluoreszierendes Protein.

Der offene Leserahmen des *env*-Gens wurde gegen die Sequenzen, die das RFP kodieren, getauscht. Der Spleiß-Akzeptor des Hüllproteins blieb erhalten, das Startkodon wurde deletiert und gegen das Startkodon des RFP ersetzt (Abbildung 4-7). Zellen, die mit diesem Vektor transfiziert sind, können die Proteine Gag und Pol sowie das rot fluoreszierende Protein exprimieren. Das Verpackungssignal ermöglicht die Verpackung des Teilgenoms in Partikel. Zur Bildung infektiöser Partikel fehlt der Zelle die Information für das Hüllprotein (Env).

4.2.2 Verpackbares MLV-Env mit GFP

Das ecotrope Hüllprotein, welches die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein GFP in der prolinreichen Region trägt, wurde in den Vektor *pczCFG5 IEGZ* kloniert (Abbildung 4-8). Die für diese Klonierung wichtigen Bestandteile dieses Vektors sind das Verpackungssignal ψ^+ , die 5'-LTR und ein CMV-Promoter, welcher die 5'-LTR ergänzt und somit zu einer erhöhten Proteinexpression beitragen soll. Im 3'-Bereich befindet sich zusätzlich eine EGFP-ZEOZIN-Expressions-Kassette, deren Translation von einer *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) aus gestartet wird. Die Klonierung des GFP-tragenden Hüllproteins erfolgte über *EcoRI* (*sticky*) und *BglII* (*blunt*) in den *EcoRI* (*sticky*) und *BamHI* (*blunt*) verdauten Polylinker des Vektors *pczCFG5 IEGZ* (Abbildung 4-8).

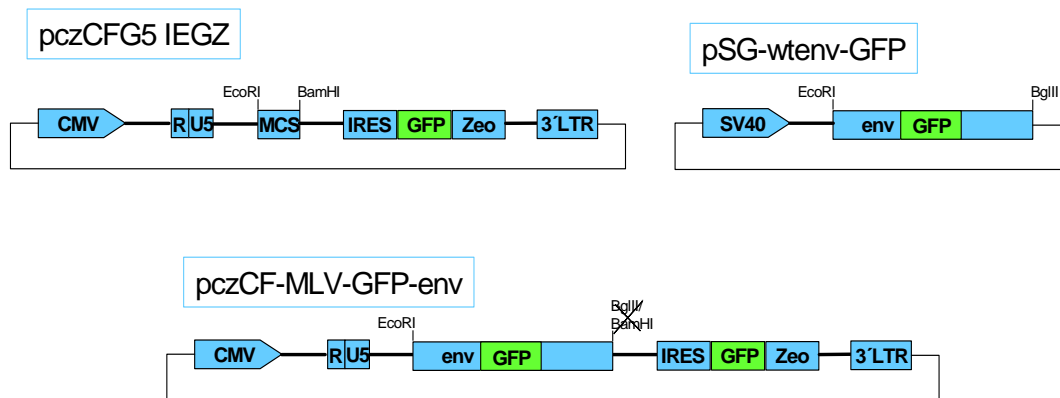


Abbildung 4-8 Klonierungsschema des retroviralen Vektors pczCF-MLV-GFP-Env.

Es entstand ein verpackbares, ecotropes Env, welches die Sequenzen für GFP in der PRR Region trägt. Zellen, die mit diesem Vektor transfiziert sind, können das GFP-tragende Hüllprotein exprimieren. Das Verpackungssignal ermöglicht die Verpackung des Teilgenoms in Viruspartikel.

4.2.3 Detektion der Vektorkonstrukte in transfizierten Zellen

Der Vektor pczCF-MLV-GFP-Env kodiert neben GFP in der prolinreichen Region im Env außerdem noch für GFP, welches durch ein IRES-Element verbunden ist. Das GFP-Env wird als Fusionsprotein exprimiert. Die unterschiedlichen Aufenthaltsorte von GF-Proteinen, die vom IRES aus translatiert werden, und GFP-Env-Hüllproteinen sind auf Seite 67 bereits beschrieben worden.

Nach Transfektion von 10 μg pczCF-MLV-GFP-Env in 2×10^6 NIH3T3 Zellen (Kalziumphosphat) zeigte sich nach 48 Stunden folgendes Bild im konfokalen Mikroskop (siehe Abbildung 4-9A).

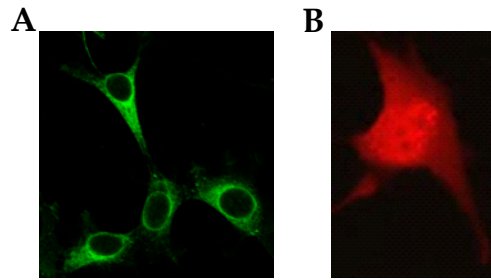


Abbildung 4-9 A: GFP-Env-exprimierende NIH3T3 Zellen. Die grüne Fluoreszenz des GFP-Env-Fusionsproteins ist in allen Bereichen, die den Nukleus umgeben (ER/Golgi) und in der Plasmamembran, detektierbar. **B: Gag/Pol-RFP-exprimierende NIH3T3 Zelle.** Die RFP-Expression kann in der gesamten Zelle detektiert werden, da RFP nicht an ein virales Protein gekoppelt ist und frei in der Zelle diffundieren kann.

Alle GFP-positiven Zellen in diesen Experimenten zeigen eine Färbung des Endoplasmatischen Reticulums, Golgi-Apparats sowie der Plasmamembran, aber keine Färbung des Zellkerns. Dies entspricht genau dem erwarteten Muster, in welchem das Hüllprotein Env in einer Zelle verteilt ist. Die Expression des IRES-GFP ist so schwach, dass sie nicht detektierbar ist. Die Überlegung, das IRES-GFP aus dem Vektor zu entfernen, erübrigte sich deshalb.

Die Transfektion von 10 µg pKAΔenvRFP in NIH3T3 Zellen (Kalziumphosphat) zeigte nach 48 Stunden eine Verteilung der roten Fluoreszenz in der gesamten Zelle (Abbildung 4-9B). Das RFP ist an kein virales Protein gekoppelt und kann somit frei in der Zelle diffundieren.

4.2.4 Bildung von semireplikativen Vektoren

Nachdem die Klonierungen abgeschlossen und die korrekte Expression der Fluoreszenzproteine überprüft worden waren, erfolgte die Untersuchung der Umsetzbarkeit der theoretischen Methode der semireplikativen Viren in der Zellkulturschale. NIH3T3 Zellen wurden mit den beiden Vektoren kotransfiziert. In eine 10 cm-Schale, in welche einen Tag vor Transfektion 2×10^6 NIH3T3x4 Zellen ausgesät worden waren, erfolgte eine Transfektion der beiden Vektorkonstrukte in unterschiedlichen Verhältnissen mittels der Kalziumphosphatmethode:

- 10 µg pKAΔenvRFP + 10 µg pczCF-MLV-GFP-env (1 gag/pol : 1 env)
- 2 µg pKAΔenvRFP + 20 µg pczCF-MLV-GFP-env (1 gag/pol : 10 env)
- 20 µg pKAΔenvRFP + 2 µg pczCF-MLV-GFP-env (10 gag/pol: 1 env)

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transfektion und zum Vergleich des Replikationsverhaltens erfolgte die Transfektion von 10 µg des Plasmids GFP-MOV, welches für das komplette Genom kodiert. Die Zellen blieben 32 Tage nach Transfektion in Kultur. An den Tagen 2, 4, 6, 11, 18, 25 und 32 nach Transfektion wurden jeweils 1×10^6 Zellen entnommen und durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die graphische Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 4-10 dargestellt.

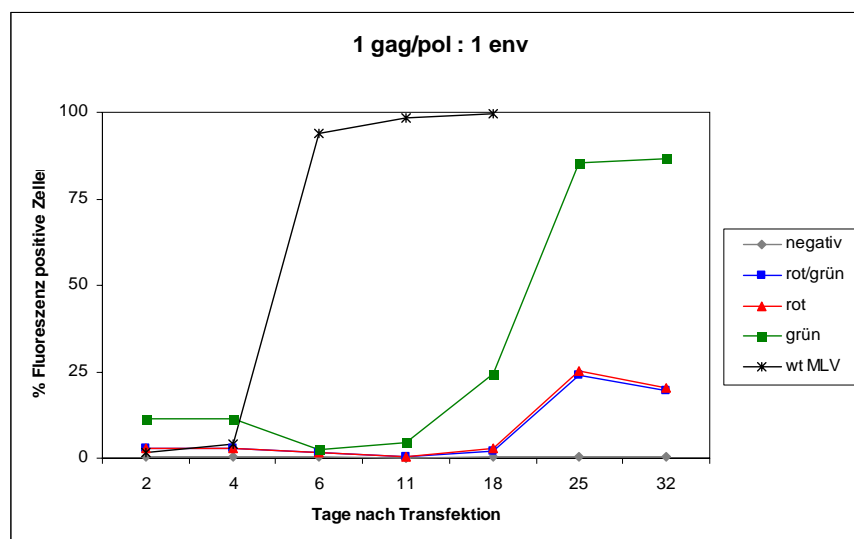


Abbildung 4-10 Replikationskinetik der semireplikativen Vektoren nach Kotransfektion im Verhältnis 1gag/pol : 1env. Die X-Achse steht für die prozentuale Anzahl der Fluoreszenz-positiven Zellen (RFP oder GFP oder beides). Die Y-Achse stellt die Tage nach Transfektion dar. Die grüne Linie stellt den Anteil der GFP-positiven Zellen innerhalb der Zellpopulation dar, die rote Linie, den RFP-positiven Anteil, die blaue Linie den rot/grün doppelt-positiven Anteil der Zellen, die schwarze Linie die grüne Fluoreszenz der Wildtyp-GFP-MOV-transfizierten Zellen und die graue Linie die untransfizierten Zellen.

Abbildung 4-10 zeigt die Replikationskinetik der semireplikativen Vektoren im Vergleich zum GFP-MOV nach Transfektion im gleichen Verhältnis. Es wurden die jeweiligen prozentualen Mengen von positiven Zellen dargestellt. Das GFP-MOV-Virus benötigt vier Tage, bis genügend Viruspartikel gebildet sind, damit es in die exponentielle Phase der Virusreplikation gelangt und innerhalb der folgenden zwei Tage die komplette Zellkulturschale infizieren kann. Bei den semireplikativen

Vektoren dauert es elf bzw. 18 Tage, bevor genügend Viren bzw. Vektoren produziert wurden, um Nachbarzellen signifikant infizieren zu können. Doppelt-positive Zellen finden sich nur zu 23,95 %, RFP-einzelpositive Zellen zu 25,35 % und GFP-einzelpositive Zellen zu 86,73 %. Die Wachstumskurve der GFP-einzelpositiven Zellen schwächt sich am Ende um einige Prozente ab.

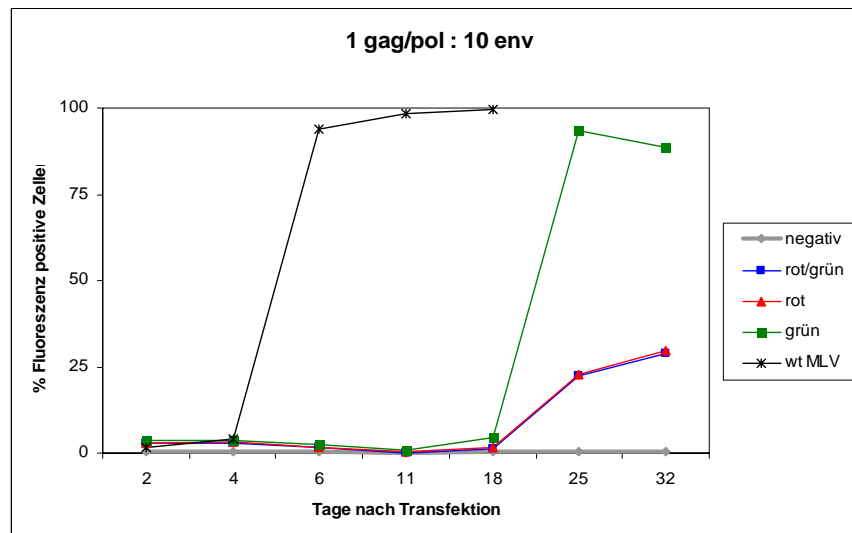


Abbildung 4-11 Replikationskinetik der semireplikativen Vektoren nach Kotransfektion im Verhältnis 1 *gag/pol* : 10 *env*. Beschreibung wie Abbildung 4-10.

Die Kinetik in Abbildung 4-11 nach Kotransfektion im Verhältnis 1 *gag/pol* : 10 *env* unterscheidet sich nicht signifikant von der Kinetik, welche nach Transfektion im Verhältnis 1 *gag/pol* : 1 *env* entsteht. Die Kurve der nur GFP-positiven Zellen steigt bereits ab Tag 18 an, während sie sich im Ansatz mit dem Transfektionsverhältnis 1 *gag/pol* : 1 *env* erst nach 25 Tagen deutlich von der Negativkontrolle abhebt.

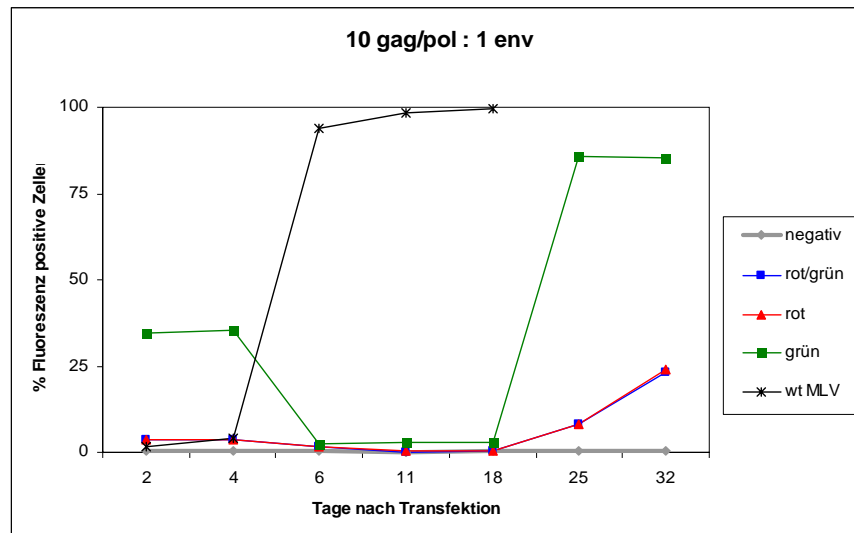


Abbildung 4-12 Replikationskinetik der semireplikativen Vektoren nach Kotransfektion im Verhältnis 10 *gag/pol* : 1 *env*. Beschreibung wie Abbildung 4-10.

Abbildung 4-12 zeigt die entstandene Kinetik nach Kotransfektion der Vektoren im Verhältnis 10 *gag/pol* : 1 *env*. Sie zeigt einige Unregelmäßigkeiten an den Tagen zwei bis fünf im Verlauf der nur GFP-positiven Zellen. Die Kurve ist schon zu Beginn der Messungen bei 34 %, fällt nach Tag vier wieder auf ein Niveau zurück, welches sich nicht signifikant von der Negativkontrolle abhebt. Diese Unregelmäßigkeit könnte mit einer hohen, ursprünglichen Transfektionseffizienz des Vektors *pczCF-MLV-GFP-env* erklärt werden.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die Theorie der semireplikativen Viren erfolgreich war. Die Aufteilung des Virusgenoms auf zwei Vektoren, die alleine jeweils nicht replikationskompetent sind, führte nach Kotransfektion dieser Vektoren in Zielzellen zur Bildung von Vektoren, die wiederum neue Zellen infizieren konnten. Ungefähr 25 % der Zellen innerhalb der Zellpopulation waren doppelt positiv. Die unterschiedlichen Transfektionsverhältnisse hatten keinen signifikanten Einfluss auf das spätere Replikationsverhalten der semireplikativen Viren. Das Aufteilen des viralen Genoms auf zwei Konstrukte verlangsamte die Replikation deutlich im Vergleich zu einem Virus, welches die Sequenzen für alle viralen Proteine auf einem Genom trägt.

4.2.5 Veranschaulichung der Vorgänge nach Kotransfektion der Teilgenome

Bei einer Kotransfektion der beiden Vektoren kann eine Zelle vom GFP-Env-Vektor, dem Gag/Pol-RFP-Vektor oder von beiden gleichzeitig penetriert werden. Treffen beide Vektoren auf eine Zelle (Abbildung 4-13 A), können alle viralen Proteine (Gag, Pol und Env) exprimiert werden. Solche Zellen sind demzufolge in der Lage, neue Viren zu produzieren. Beide Teile des viralen Genoms besitzen jeweils ein eigenes Verpackungssignal, normalerweise werden jedoch nicht zwei unterschiedliche Genome in ein Viruspartikel aufgenommen. Zellen, die beide Teilgenome exprimieren, sind doppelt (GFP und RFP)-positiv und können Vektoren mit jeweils einem Teil des Genoms generieren (Abbildung 4-13 A).

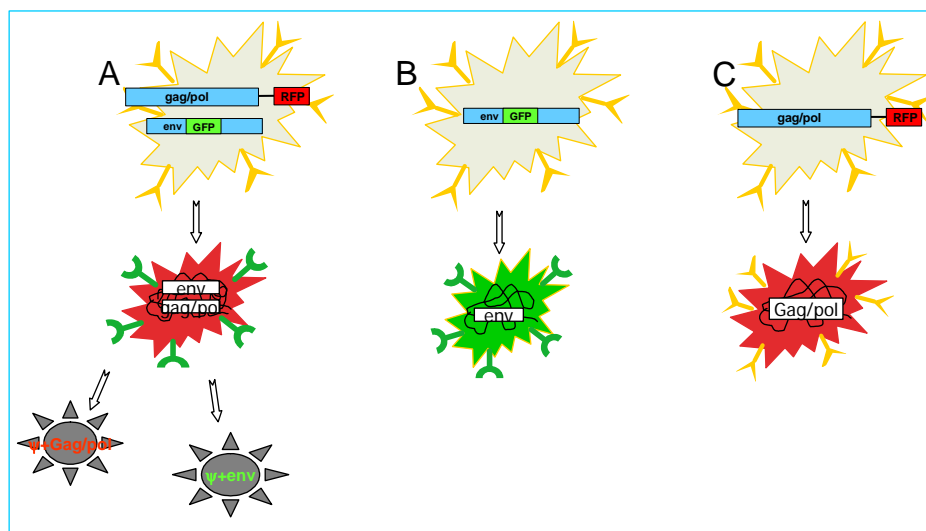


Abbildung 4-13 Schematische Darstellung der Vorgänge in der Zellkulturschale nach Kotransfektion der beiden semireplikativen Vektoren.

In dem Fall des Eindringens des GFP-Env-Vektors in eine Zelle (Abbildung 4-13 B) werden die GFP-tragenden Hüllproteine produziert und auf der Zelloberfläche exponiert. Diese Zelloberflächenpräsentation (=Superinfektionsresistenz) verhindert weitere Infektionen bzw. Transduktionen von Viren oder Vektoren. GFP-Env-exprimierende Zellen leuchten nach Anregung grün. Sie können keine neuen Vektoren generieren, da ihnen die Strukturproteine Gag und Pol fehlen, können aber auch (nach ca. sechs Stunden) von keinen weiteren

Vektoren transduziert werden. Diese Zellen stellen eine Sackgasse in diesem Experiment dar (Abbildung 4-14B).

In dem Fall, dass eine Zelle den Gag/Pol-RFP-Vektor aufnimmt (Abbildung 4-13 C), produziert sie die Strukturproteine Gag, Pol und RFP und leuchtet somit rot im Fluoreszenzmikroskop. Allerdings fehlt ihr Env, was die Bildung neuer Viren verhindert. Da sie kein Hüllprotein auf der Zelloberfläche exprimieren, können diese Zellen weiterhin von Vektoren transduziert werden (Abbildung 4-14A). Erfolgt nun die Transduktion dieser Zelle mit dem GFP-Env-Vektor, besitzt die Zelle alle Informationen und kann neue Vektoren produzieren. Diese Zellen werden zu doppelt-positiven Zellen und können wiederum Vektoren mit jeweils einem Genomteil generieren.

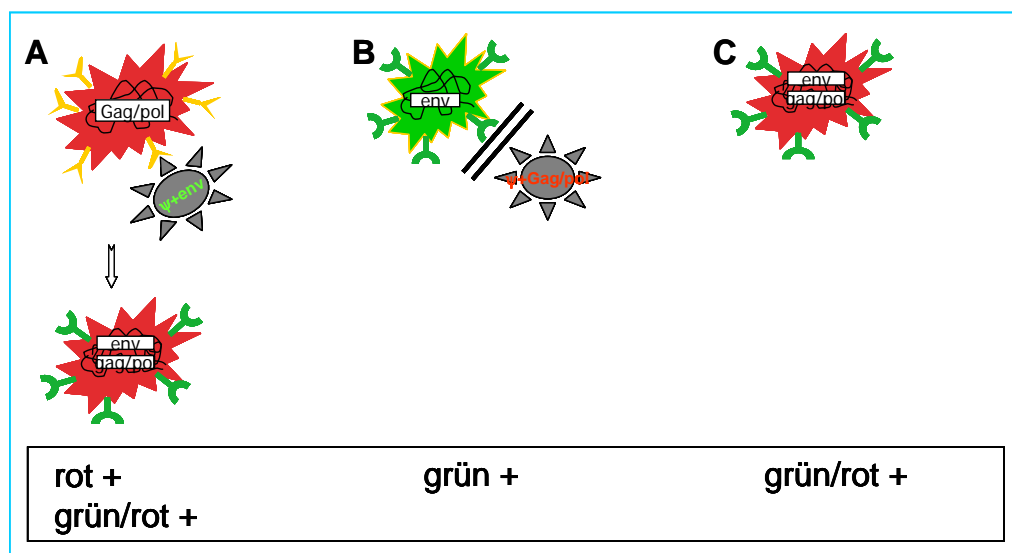


Abbildung 4-14 Schematische Darstellung der weiteren Vorgänge nach der ersten Bildung von Vektoren.

In keinem der Versuchsansätze (1 *gag/pol* : 1 *env*; 1 *gag/pol* : 10 *env*; 10 *gag/pol* : 1 *env*) konnte eine komplette Durchinfektion des Zellrasens mit beiden Konstrukten beobachtet werden. Es schienen sich bevorzugt Vektoren mit dem GFP-Env-Teil des Genoms gebildet zu haben, da GFP-positive Zellen den Hauptanteil in der Zellpopulation ausmachten. Eventuell könnte das an dem besonders verstärkten Promotor liegen. Allerdings veränderte sich dieses Phänomen nicht, selbst wenn die zehnfache Menge des Gag/Pol-RFP-Vektors kotransfiziert wurde.

4.2.6 Transduktion von NIH3T3x4 mit Überständen der Kotransfektion

Um einen genaueren Einblick in die Vektorverhältnisse in der transfizierten Zellkulturschale zu erlangen, wurden die Vektorüberstände der oben beschriebenen Kotransfektionsversuche am Tag 43 nach Transfektion auf frische Zellen gegeben. Hierzu wurden 2×10^5 NIH3T3x4 Zellen mit jeweils 1 ml Virusüberstand infiziert. Einen Tag nach Infektion erfolgte die Titerbestimmung per FACS-Analyse. Die errechneten Titer nach Infektion sind in Tabelle 1 dargestellt.

<i>Kotransfektionsverhältnis</i>	<i>Fluoreszenz</i>	<i>Titer</i>
<i>1 gag/pol : 1 env</i>	GFP-positiv	$1,4 \times 10^4$
	RFP-positiv	-
	Doppelt-positiv	$2,2 \times 10^2$
<i>10 gag/pol : 1 env</i>	GFP-positiv	$9,24 \times 10^3$
	RFP-positiv	-
	Doppelt-positiv	4×10^2
<i>1 gag/pol : 10 env</i>	GFP-positiv	$1,1 \times 10^4$
	RFP-positiv	-
	Doppelt-positiv	$5,5 \times 10^2$

Tabelle 1 Zusammenstellung der errechneten Transduktionstiter der rekombinanten, semireplikativen Vektoren auf NIH3T3x4 Zellen.

Tabelle 1 lässt den ersten Schluss zu, dass im Experiment Viren entstanden sein müssen, die entweder beide Genome gleichzeitig verpackt tragen oder Rekombinationsereignisse zur Bildung von Volllängengenomen geführt haben. Denn sonst hätte die Transduktion mit den Virusüberständen zur Bildung einer roten und einer grünen Zellpopulation führen müssen. Doppelt-positive Zellen entstehen nur, wenn eine bereits rote Zelle vom GFP-Env-Vektor transduziert wird. Basierend auf dieser Erklärung sind die Titer der Viren, welche beide Genome in sich tragen, um zwei Log-Stufen geringer, als die Titer der Vektoren, welche das GFP-Env-Genom kodieren. Die unterschiedlichen, ursprünglichen Transfektionsverhältnisse hatten keinen Einfluss auf die Titer.

An den Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 und 11 nach Infektion wurden jeweils wenige Zellen entnommen und im FACS auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die Daten wurden in einer Tabelle zusammengetragen und in einem Graphen dargestellt (Abbildung 4-15).

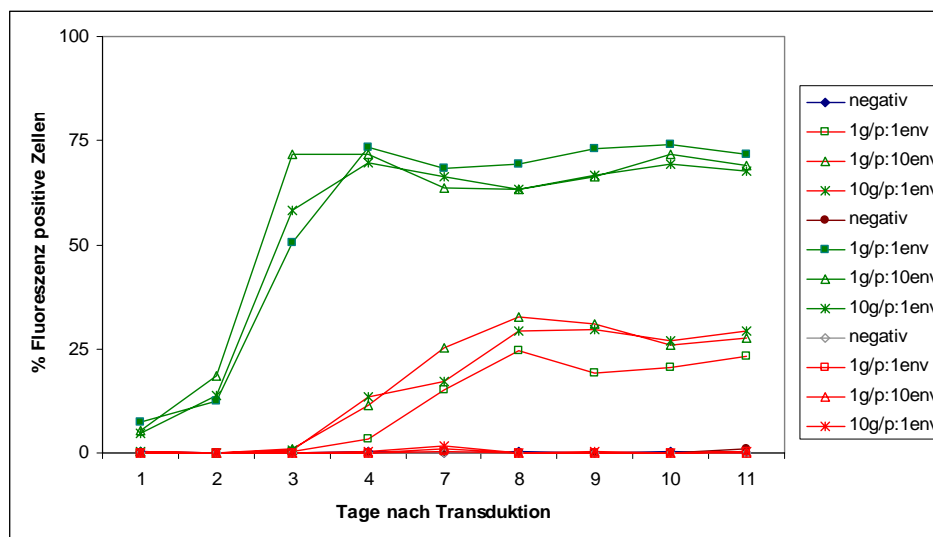


Abbildung 4-15 Replikationskinetik nach Transduktion mit Vektorüberständen. Die X-Achse repräsentiert den prozentualen Anteil der Fluoreszenz-positiven Zellen, die Y-Achse stellt die Tage nach Transduktion dar. Die roten Linien mit den grünen Markierungen stellen alle Zellen dar, welche doppelt-positiv, also GFP- und RFP-positiv sind, die grünen Linien mit den grünen Markierungen repräsentieren nur GFP-positiven Zellen, die roten Linien mit roten Markierungen stellen den Anteil der RFP-positiven Zellen dar.

Die Replikationskinetik spiegelt die geringen Ursprungstitern der semireplikationskompetenten Vektoren wieder. Die Anzahl der nur GFP-positiven Zellen steigt charakteristisch für ein Wildtyp-Virus an. Die Kinetik repräsentiert nicht das erwartete Replikationsverhalten der semireplikationskompetenten Vektoren. Vektoren, welche nur das GFP-Env-Genom tragen, können nicht weiter replizieren, es sei denn, sie treffen auf eine Zelle, die bereits das Gag/Pol-RFP trägt. Nur in einer solchen Zelle können wieder replikationskompetente Viren produziert werden, welche Nachbarzellen infizieren können. Dies würde aber bedeuten, dass Zellen, welche bereits RFP-positiv sind, zu doppelt-positiven Zellen werden würden. In dem Experiment überschreitet die Anzahl der nur RFP-positiven Zellen nicht den Wert 1,2 %. Zellen, die den GFP-Env-tragenden Vektor aufgenommen haben, erscheinen im Fluoreszenzmikroskop grün, können allerdings keine neuen Viren generieren. Die Kinetik der nur GFP-positiven Zellen ähnelt der eines Wildtyp-Virus und lässt auf die Möglichkeit von Rekombinationsereignissen schließen. Bei einer Rekombination wäre es schwieriger, das GFP, welches sich direkt im Hüllprotein befindet,

zu verlieren als das RFP, welches nicht als Fusionsprotein exprimiert wird. Zunächst sollte die Stabilität des inserierten GFP im Hüllprotein Env untersucht werden.

4.2.7 Test auf Stabilität des inserierten GFP

Die bisherigen Untersuchungen des Replikationsverhaltens der semireplikationskompetenten Vektoren und replikationskompetenten Viren basieren auf der Expression der Fluoreszenzproteine (RFP und GFP). Die detaillierten Betrachtungen mittels des Fluoreszenz- und konfokalen Mikroskops ergaben bei den GFP-MOV-infizierten sowie bei den GFP-Env-transfizierten Zellen eine deutliche ER/Golgi- und Membranfärbung, was die Aufenthaltsorte von Hüllproteinen in einer infizierten Zelle repräsentiert. Die Zellkerne waren deutlich ausgespart. Allerdings sind unter dem Mikroskop keine Viren zu erkennen, welche die GFP-Sequenzen deletiert haben. Die Untersuchung der Stabilität der inserierten GFP-Sequenzen erfolgte mittels PCR anhand genomischer DNA.

Nach Infektion integrieren Retroviren ihr virales Genom in das der Wirtszelle. Die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus infizierten Zellen und anschließende PCR ermöglicht folglich die Analyse des viralen Genoms, da dieses im Wirtsgenom integriert ist. Die gewählten *Primer* flankieren die Sequenzen des GFP in der prolinreichen Region des Hüllproteins, sodass eine Deletion zur Bildung eines verkürzten PCR-Produktes führen würde (siehe Abbildung 4-16).

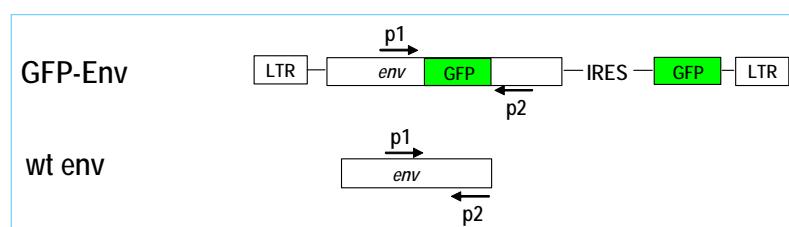


Abbildung 4-16 Schematische Darstellung des semireplikativen Vektors GFP-Env. Positionen der *Primer*, welche die Stabilität des GFP im Hüllprotein untersuchen sollen sind als p1 und p2 dargestellt. SA: *Splice Acceptor Site*; SD: *Splice Donor Site*, LTR: *Long Terminal Repeat*.

Zur Herstellung genomischer DNA wurden Zellen herangezogen, welche 32 Tage transfiziert/infiziert waren mit den semireplikationskompetenten Vektoren in allen drei Verhältnissen. Als Kontrolle dienten gDNA untransfizierter Zellen und Plasmid-DNA des Env-GFP sowie des Wildtyp-Env ohne GFP-Sequenzen in der PRR.

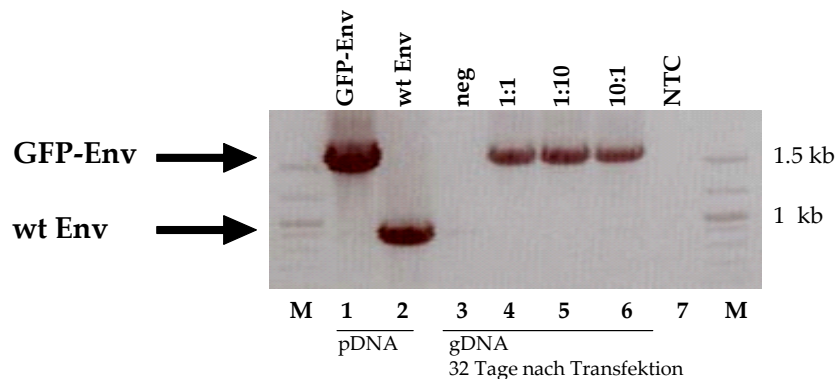


Abbildung 4-17 PCR-Analyse zur Überprüfung der genetischen Stabilität des GFP-Env. gDNA von NIH3T3 Zellen transfiziert mit den semireplikativen Vektoren in den drei unterschiedlichen Verhältnissen 32 Tage nach Transfektion. M: Marker, NTC: *no template control*, pDNA: Plasmid-DNA, gDNA: genomische DNA.

Abbildung 4-17 zeigt die Ergebnisse der PCR-Reaktion nach Auftrennung auf einem Agarosegel. Das PCR-Produkt in Spur eins wurde von einem GFP-Env-kodierenden Plasmid generiert, Spur zwei zeigt das PCR-Produkt nach Amplifikation des Wildtyp-Env von einer Plasmid-Matrize. Die GFP-Env-Sequenz führt zu der Bildung eines 1,5 kb-Fragments, das Wildtyp-Env generiert ein 800 bp-Fragment. Spur drei zeigt das Ergebnis nach PCR-Reaktion mit gDNA aus untransfizierten NIH3T3 Zellen. In diesen Zellen hat keine Infektion stattgefunden, demzufolge sind keine retroviralen Sequenzen im Genom der Zellen integriert, weshalb kein PCR-Produkt entstand. Die Spuren vier bis sechs zeigen die generierten PCR-Produkte von NIH3T3 Zellen gDNA 32 Tage nach Transfektion. Die ursprünglichen Transfektionsverhältnisse sind über der Abbildung angedeutet: 1:1; 1:10; 10:1. Die erste Zahl stellt das molare Verhältnis des Gag/Pol-Plasmids dar, die zweite das Env-kodierende Plasmid. Spur sieben zeigt die Kontrolle, in welcher keine DANN-Matrize zur Produktion eines PCR-Produktes hinzugefügt wurde (NTC = *no template control*), die Qualitäts- und Reinheitskontrolle der PCR.

Aufgrund der hohen Fehlerraten während der retroviralen Replikation könnten unterschiedliche Mutationen entstanden sein. Bei einer Deletion könnten die Sequenzen des GFP entweder komplett oder nur teilweise aus dem Env entfernt worden sein. Eine vollständige Deletion würde zur Bildung einer Wildtyp-Bande in der PCR-Reaktion führen, während das Fehlen von nur Teilen der GFP-Sequenzen eine verkürzte PCR-Bande zur Folge hätte. Wären innerhalb der 32 Tage mehrere unterschiedliche Deletionen aufgetreten, hätte dies einen Schmier der PCR-Produkte zur Folge, da unterschiedliche Zellen innerhalb der Zellkulturschale unterschiedliche Varianten des Virus in ihr Genom integriert hätten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Insertion des GFP in die prolinreiche Region des Env 32 Tage nach Transfektion genetisch stabil ist.

Diese Fluoreszenz-Markierung des Hüllproteins kann für weitere Versuche als verlässlicher Indikator für Virusreplikation verwendet werden. Allerdings hat die Untersuchung keinen Aufschluss darüber gegeben, was auf genetischer Basis mit den semireplikativen Vektoren nach Transfektion in Zellkultur und Passagierung für mehrere Tage geschehen sein könnte. Hierzu wurde nun untersucht, ob aus den beiden einzeln nicht replikationskompetenten Genomteilen ein einzelnes entstanden ist, das alle Genomteile auf einem einzigen vereint und mühelos replizieren konnte.

4.2.8 Test auf genetische Stabilität der semireplikativen Vektoren

Beide Teilgenome wurden in unterschiedlichen Verhältnissen in NIH3T3 Zellen kotransfiziert (siehe Abschnitt 4.2.4). An den Tagen 13 und 32 nach Transfektion wurde genomische DNA isoliert und zur PCR-Analyse verwendet. Als Positivkontrolle diente gDNA GFP-MOV-infizierter NIH3T3 Zellen, als Negativkontrolle gDNA uninfizierter NIH3T3 Zellen. Abbildung 4-18 zeigt die *Primer* p3 und p4, welche die Entstehung von replikationskompetenten Retroviren analysieren sollten.

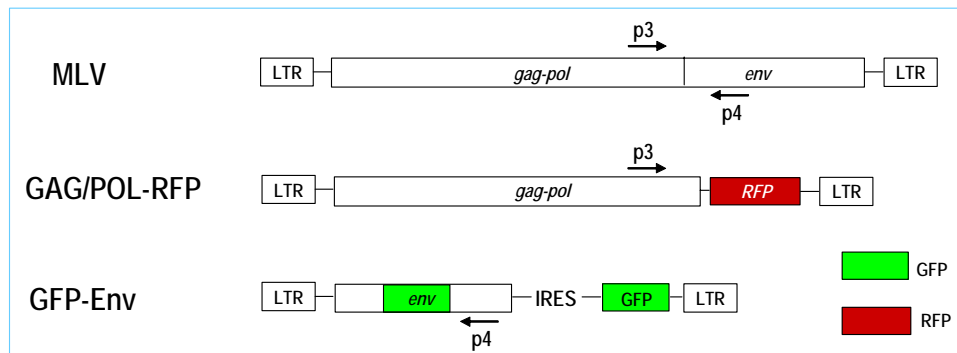


Abbildung 4-18 Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten, semireplikativen Vektoren und Lage der Primer, die zur Analyse der genomischen Stabilität dienen. SA: Splice Acceptor Site; SD: Splice Donor Site, LTR: Long Terminal Repeat, IRES: Internal Ribosomal Entry Site.

Primer p3 paart in *gag/pol*, während der *antisense-Primer* p4 im *env* paart. Befinden sich beide Teile des MLV-Genoms auf unterschiedlichen Vektoren, kann kein PCR-Produkt entstehen (siehe Abbildung 4-18). Sollte ein Rekombinationsereignis zur Bildung eines Volllängen-Genoms geführt haben, entsteht ein PCR-Produkt der Größe von 800 bp.

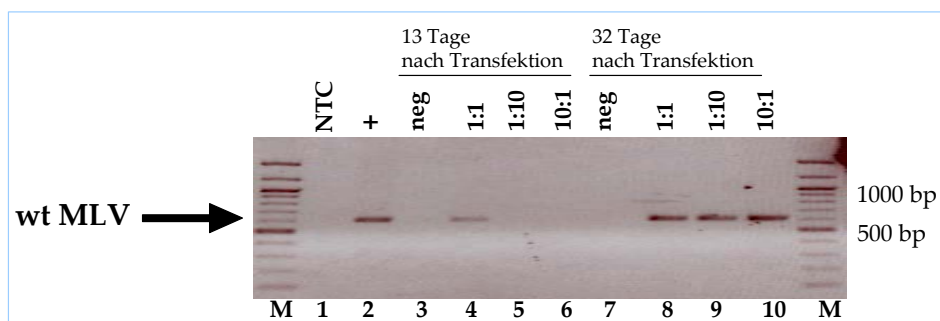


Abbildung 4-19 PCR-Analyse zur Überprüfung von Rekombinationsereignissen. Verwendet wurde genomische DNA von NIH3T3 Zellen, welche mit den semireplikativen Vektoren in unterschiedlichen Verhältnissen transfiziert waren. gDNA wurde 13 und 32 Tage nach Transfektion isoliert.

Spur eins von Abbildung 4-19 repräsentiert die Negativkontrolle, welche keine DNA-Matrize für die Amplifikation zur Verfügung hatte (NTC). Spur zwei zeigt die charakteristische Bande, die entsteht, wenn Zellen mit einem Wildtyp-MLV-Virus infiziert sind. Das Volllängen-MLV-Genom generiert ein 800 bp-Fragment. Aus der DNA der semireplikativen Vektoren sollte kein PCR-Produkt entstehen, da die *Primer* nicht an das gleiche Genom binden. Spur zwei repräsentiert *mock*-infizierte Zellen an Tag 13. Die Spuren vier bis sechs zeigen die Ergebnisse nach Isolierung der genomischen DNA aus Zellen, welche 13 Tage mit den unterschiedlichen Verhältnissen der *Split*-Genome transfiziert waren. Die erste Zahl stellt das molare Verhältnis des Gag/Pol-Plasmids dar, die zweite das

Env-kodierende Plasmid. Die Spuren sieben bis zehn zeigen die gleichen Experimente mit genomischer DNA aus Zellen, welche 32 Tage nach Transfektion passagiert worden waren.

Der Versuchsansatz 1 *gag/pol* : 1 *env* zeigt das Erscheinen einer Rekombinationsbande an Tag 13 nach Transfektion, welche an Tag 32 an Intensität zunimmt. Die genomische DNA der Zellen 32 Tage nach Transfektion zeigt in allen Transfektionsverhältnissen Banden, die eine Rekombination des Virus enthüllen. Verglichen mit den Ergebnissen der Replikationskinetiken in den Abbildungen Abbildung 4-10, Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12 wird deutlich, dass die Replikationskinetik der nur GFP-positiven Zellen im Versuchsansatz 1:1 bereits ab Tag elf beginnt, exponentiell anzusteigen. In den anderen beiden Versuchsansätzen steigt diese erst am Tag 18 an. Hier haben auch die Rekombinationsereignisse später stattgefunden, nämlich nach Tag 13. Die bisherigen Ergebnisse und Untersuchungen lassen auf die Entstehung eines Virus schließen, welches GFP-Env sowie Gag- und Pol-Sequenzen auf einem Genom besitzt, während RFP-Sequenzen deletiert worden sind.

Es wird deutlich, dass der Ansatz der semireplikativen, retroviralen Vektoren einer ausgefeilten Feinarbeit bedarf, bevor diese zur weiteren Verwendung eingesetzt werden können. Alle weiteren Arbeiten mussten deshalb vorerst mit Wildtyp-Vollängen-MLV erfolgen. Da GFP sich als stabil inseriert im Hüllprotein befindet, konnte diese Markierung weiter als verlässliche Indikation für Virusreplikation eingesetzt werden.

Das ecotrope MLV-Env kann nur Maus- und Rattenzellen infizieren. Soll das ecotrope Env als Hüllprotein von Gentransfervektoren für humane Therapie eingesetzt werden, muss der Wirtstropismus auf humane Zellen ausgeweitet werden.

4.3 Targeting von ecotropem MLV-Env

Das ecotrope Hüllprotein von MLV kann Maus- und Rattenzellen über die Bindung an den mCAT-1-Rezeptor dieser Zellen infizieren. Da humane Zellen diesen Rezeptor nicht exprimieren, können sie von diesem Hüllprotein nicht penetriert werden. Diese Eigenschaft

macht das ecotrope Hüllprotein zu einem hervorragenden Kandidaten für die humane Gentherapie. Gelingt es, die human nicht infektiösen Viren derart zu manipulieren, dass sie spezifisch humane Tumorzellen infizieren können, andere humane Zellen jedoch nicht, wären sie ideale Kandidaten. Es gibt unterschiedliche Ansätze, den Wirtstropismus von ecotropem MLV-Env zu erweitern. Eine Möglichkeit des gerichteten Zielens (*Targeting*) basiert auf dem Einfügen von Liganden in das Hüllprotein.

4.3.1 Erweiterung des Wirtstropismus mittels Ligandeninsertion

Katane *et al.* (Katane *et al.*, 2002) beschrieben die Erweiterung des Wirtstropismus von ecotropem Env auf CXCR4-exprimierende, humane Zellen durch die Insertion der Sequenzen für den Liganden SDF-1 α in ecotropes Env. Die Vektorproduktion und Transduktion von unterschiedlichen Zellen erfolgte transient, wobei die errechneten Titer 10^3 - 10^4 IE/ml auf humanen CXCR4-exprimierenden Zellen betragen im Vergleich zu 10^6 - 10^7 IE/ml auf Zellen, die den ecotropen Rezeptor exprimieren, was einen 100-10.000-fachen Titerunterschied bedeutete.

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Verwendung von replikationskompetenten Viren als Transportvehikel für Gentherapie. Geringere Titer aufgrund von Insertionen in das Hüllprotein könnten durch die erhaltene Replikationsfähigkeit des rekombinanten Virus ausgeglichen werden.

Das SDF-1 α -Env-kodierende Plasmid (pTES3N) wurde von M. Katane (Riken, Japan) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Vor seiner Verwendung für weitere Klonierungen mit dem Ziel, das rekombinante Hüllprotein in ein replikationskompetentes MLV einzubauen, musste überprüft werden, ob es funktional war und die publizierten Daten reproduzierbar waren. Dies geschah mithilfe von pseudotypisierten Vektoren. Unter Pseudotypisierung versteht man die Herstellung von Vektoren, welche ein fremdes Hüllprotein tragen (Sliva and Schnierle, 2004b). Die Herstellung MLV-basierter Vektoren erfolgte mittels Kotransfektion dreier Plasmide in 293T Zellen. Das Plasmid pHIT60 kodiert für die viralen Strukturgene (Gag/Pol), das Plasmid pSG5-EGFP kodiert für das Trans- bzw.

Markergen (GFP) mit dem Verpackungssignal und den LTR-Regionen, und das dritte Plasmid kodiert das jeweilig gewünschte Hüllprotein. In der transfizierten Zelle werden die viralen Proteine exprimiert und zusammengebaut, was zur Entstehung infektiöser Partikel führt. Über den Wirtstropismus dieser Vektoren entscheidet hierbei das Hüllprotein. Abbildung 4-20 veranschaulicht schematisch die Bildung von pseudotypisierten Vektoren. Die unterschiedlichen verwendeten Hüllproteine und ihre Wirtstropismen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

<i>Hüllprotein</i>	<i>Wirtstropismus</i>
Ecotropes MLV-Env	mCAT-1 (Maus- und Rattenzellen)
Amphotropes MLV-Env	rPIT-2 (alle Säugerzellen)
VSV-G	Lipid-Oberflächenstrukturen der Zellmembran (alle Zellen)
Ecotropes MLV-Env mit SDF-1α	mCAT-1 und/oder humanes CXCR-4 (Maus- u. Rattenzellen + CXCR4 exprimierende Zellen)

Tabelle 2 Überblick über die verwendeten Hüllproteine und deren Tropismen.

Da die Expressionsplasmide für Gag/Pol und Env kein Verpackungssignal besitzen, wird nur das Markergen als Genom in die entstandenen Vektoren gepackt. Diese Vektoren sind folglich replikationsinkompetent, da sie keine Information mitbringen, anhand derer die Wirtszelle neue Vektorpartikel produzieren kann (siehe Abbildung 4-20). In diesem Versuch wurde zum einen untersucht, welche Zellen welche Art von Rezeptoren exprimieren, zum anderen in welcher Menge die Rezeptoren exprimiert werden relativ zu den im Versuch mittransduzierten Zellen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die rekombinanten Hüllproteine eine Transduktion von Zielzellen erlauben.

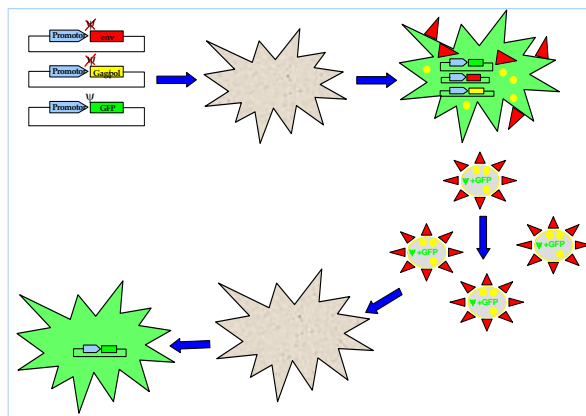


Abbildung 4-20 Schematische Darstellung der Vorgänge nach Transfektion der drei Expressionsplasmide und Transduktion von Zielzellen mit den generierten Vektoren.

Für die Vektorproduktion wurden zunächst 2×10^6 293T ausgesät und am darauf folgenden Tag mittels der Kalziumphosphatmethode mit folgenden Konstrukten transfiziert:

- 2 µg pTES3N (SDF-Eco-Env) + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 5 µg pSG-EGFP (ψ+ GFP)
- 2 µg pSG-DA (eco-Env) + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 5 µg pSG-EGFP (ψ+ GFP)
- 2 µg pHIT456 (ampho-Env) + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 5 µg pSG-EGFP (ψ+ GFP)
- 2 µg VSV-G + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 5 µg pSG-EGFP (ψ+ GFP)
- kein Env + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 5 µg pSG-EGFP (ψ+ GFP)

Nach zwei Tagen Inkubation erfolgte die Abnahme der Überstände, welche sterilfiltriert zu je 1,5 ml auf Zielzellen gegeben wurden. Transduziert wurden die Maus-Linien NIH3T3, NIH3T3x4 (humaner CXCR4-Rezeptor), mit ecotropem MLV infizierte NIH3T3 (NIH3T3pMOV) und NIH3T3x4 (NIH3T3x4pMOV) sowie die humanen Zelllinien A431 und HeLa. NIH3T3pMOV wurden zu $1,8 \times 10^5$ Zellen, HeLa zu $1,6 \times 10^5$ Zellen, allen anderen Zelllinien zu 2×10^5 Zellen pro Platte ausgesät. Die durchflußzytometrische Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der Zellen erfolgte zwei Tage nach Transduktion mit 1×10^6 Zellen. Die Rohdaten des Experimentes sind in der Abbildung 4-21 zusammengestellt.

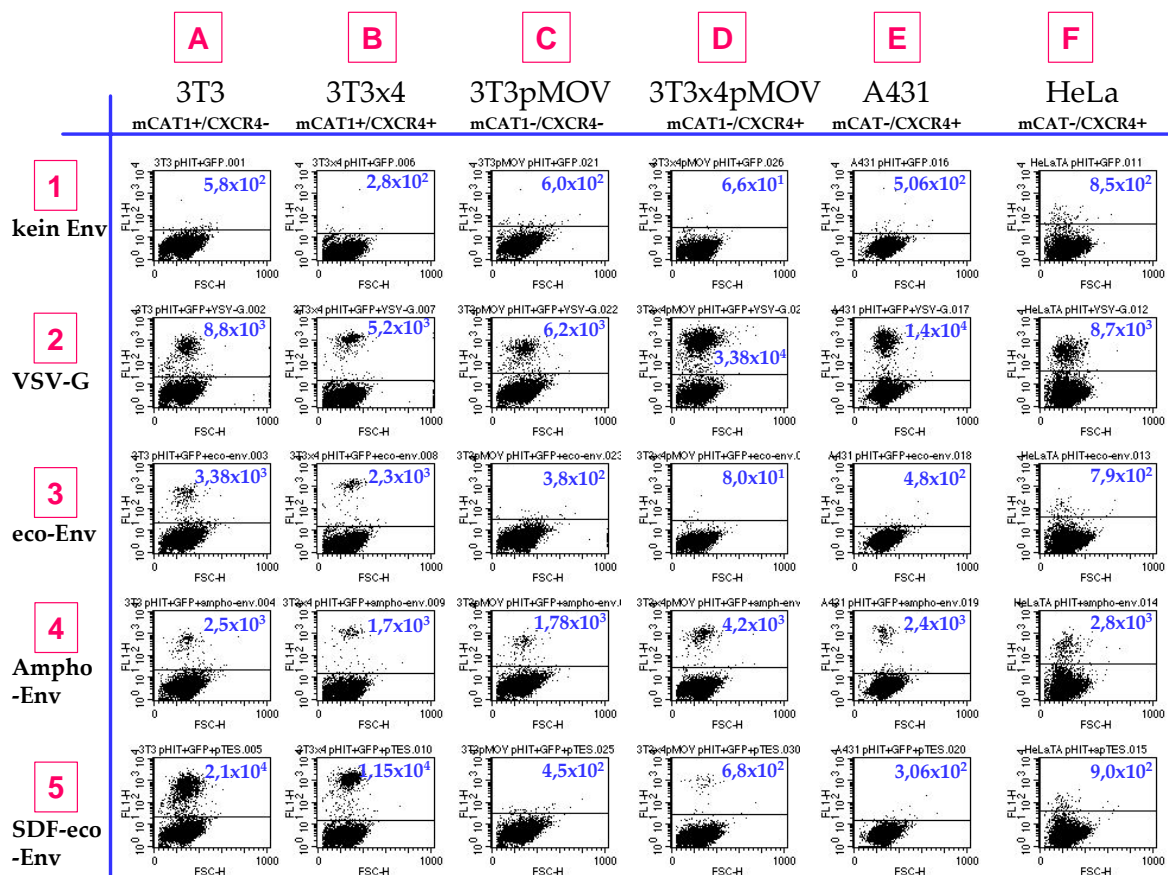


Abbildung 4-21 Ergebnisse zwei Tage nach Transduktion der unterschiedlichen Zellen mit Vektorpartikeln, welche unterschiedliche Hüllproteine tragen. Die blauen Zahlen stellen die berechneten Transduktionstiter dar. Die roten Buchstaben und Zahlen dienen der Einteilung der Daten in Raster und sollen die Beschreibung vereinfachen.

Die Reihe eins (erste horizontale Reihe) in Abbildung 4-21 zeigt die Negativkontrollen des Experimentes. Wird kein Hüllprotein-kodierendes Plasmid mittransfiziert, können keine viralen Partikel gebildet werden. Die errechneten positiven Titer stellen den Hintergrundwert des Experiments dar.

Zur anschaulichen Darstellung wurden die errechneten Titerwerte der Negativkontrollen von den Werten der eigentlichen Transduktionen abgezogen und in einem Diagramm zusammengestellt (Abbildung 4-22).

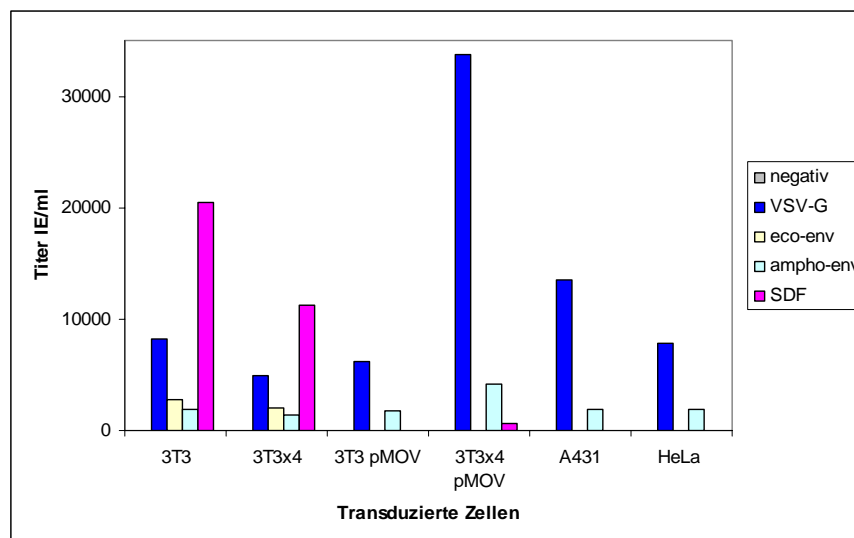


Abbildung 4-22 Untersuchung der Transduktionstiter der pseudotypisierten Vektoren auf unterschiedlichen Zellen.

Die Versuchsansätze mit VSV-G, dem amphotropen und dem ecotropen Hüllprotein stellen die Positivkontrollen des Experimentes dar. Wird im Transfektionsansatz VSV-G als Hüllprotein mittransfiziert, entstehen Vektorpartikel, die alle verwendeten Zellen transduzieren können. Vektorpartikel, welche mit dem amphotropen Hüllprotein umgeben sind, sollten in der Lage sein, alle verwendeten Zellen über den rPIT-2-Rezeptor zu transduzieren. Partikel mit dem ecotropen Hüllprotein können hingegen nur mCAT-1-exprimierende Zellen penetrieren. Die roten Balken in Abbildung 4-22 zeigen die Transduktionstiter mit dem SDF-1 α -eco-Env (pTES3N) nach Abzug der Negativkontrolle. Das Experiment zeigt, dass das SDF-Env funktional ist, da eine erfolgreiche Transduktion der murinen NIH3T3 Zellen erfolgt ist. Die Titer sind unterschiedlich auf NIH3T3 und NIH3T3x4 Zellen. Die NIH3T3x4 Zellen exprimieren zusätzlich zum ecotropen Rezeptor den humanen CXCR4-Rezeptor (und den humanen CD4-Rezeptor). Auf diesen Zellen können SDF-eco-Env-tragende Vektoren über mCAT-1 oder CXCR4 in die Zelle gelangen. Die Ergebnisse zeigen, dass auf diesen „doppelt-positiven“ Zellen die Transduktionstiter niedriger sind als auf NIH3T3 Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transduktion des rekombinanten SDF-Env bevorzugt über den mCAT-1-Rezeptor stattfindet. Vielleicht findet eine Bindung der SDF-Env-pseudotypisierten Vektoren an den CXCR4-Rezeptor statt, dem aber eventuell nicht in allen Fällen auch eine Fusion folgt. Dementsprechend werden Vektorpartikel „abgefangen“, die demzufolge über den mCAT-1-Rezeptor nicht mehr

transduzieren können. Somit ist die Anzahl der positiven Zellen in diesem Versuchansatz niedriger.

NIH3T3x4pMOV Zellen exprimieren aufgrund der Rezeptor-Interferenz keinen mCAT-1-Rezeptor auf der Zelloberfläche und sind deshalb nicht mehr von ecotropen Vektorpartikeln transduzierbar (siehe Abbildung 4-21 D3), während amphotrope Vektorpartikel diese Zellen weiterhin transduzieren können (Abbildung 4-21 D4). Alle positiven Transduktionen, welche in diesen Zellen mit SDF-1 α -eco-Env-pseudotypisierten Vektoren gelangen, erfolgten somit nur über den CXCR4-Rezeptor. Diese Daten demonstrieren, dass SDF-1 α -Env tragende Vektoren eindeutig Zellen über den CXCR4-Rezeptor transduzieren können (Abbildung 4-21 D5). Die Transduktion von humanen Zellen über den CXCR4-Rezeptor konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4-21 E5; F5).

Verglichen mit den selbst beobachteten Titerunterschieden und in anbetracht der von Katane *et al.* (Katane *et al.*, 2002) publizierten Daten, liegt die Vermutung nahe, dass die zu Beginn vorherrschenden Titer zu gering sein könnten, um humane Zellen zu transduzieren. Katane *et al.* zeigten bis zu 10.000-fache Titerunterschiede zwischen Transduktionen über den mCAT-1- und den CXCR4-Rezeptor. Die Herstellung eines replikationskompetenten, ecotropen MLV könnte das Titerproblem lösen, zusätzlich könnte die Passagierung auf humanen Zellen die Selektion optimierter Varianten erlauben.

4.3.1.1 Herstellung eines zweifach modifizierten, ecotropen Hüllproteins

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Insertion in der prolinreichen Region des ecotropen Env im Falle des GFP oder in der variablen Region A im Fall von SDF-1 α ohne einen Verlust von Funktionalität möglich ist. Nun sollte getestet werden, ob das Env auch beide Insertionen gleichzeitig toleriert. Hierzu wurde der Bereich des Env, welcher die Insertion des SDF-1 α trägt, mittels *BstEII* und *PfIMI* aus dem pTES3N-Vektor ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pSG-wtenv-GFP ligiert (siehe Abbildung 4-23). Der Vektor pSG-wtenv-GFP kodiert für das ecotrope Env, welches die Sequenzen für

GFP in der prolinreichen Region unter der Kontrolle eines SV-40-Promotors (Promotor aus dem SV40 Polyomavirus) trägt.

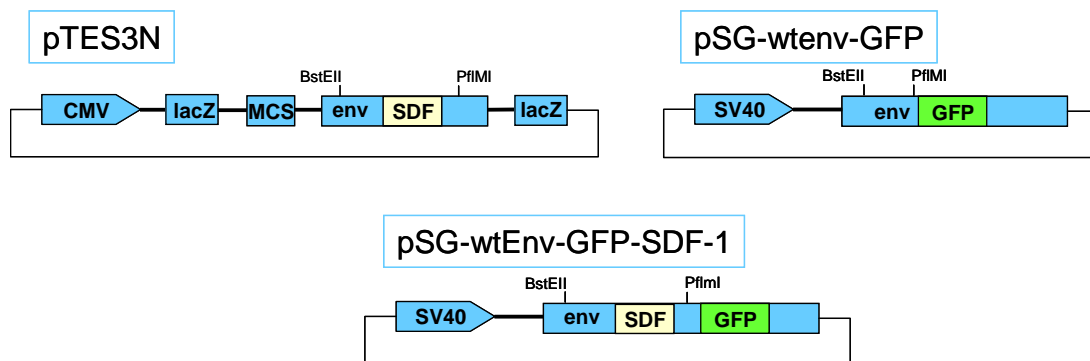


Abbildung 4-23 Schematische Klonierung des pSG-wtEnv-GFP-SDF-1α.

Nachdem das ecotrope Hüllprotein mit beiden Insertionen, den GFP-Sequenzen und den SDF-1α-Sequenzen erweitert wurde, musste die Funktionalität des rekombinanten Env auf Infektiösität überprüft werden. Das Hüllprotein wurde in zwei Schritten charakterisiert und untersucht. Zunächst erfolgte eine Untersuchung des Proteins nach Transfektion in 293T Zellen anhand einer Western-Blot-Analyse. Dies diente dazu, einen ersten Einblick in das neue Protein zu erlangen sowie zur Größenbestimmung und Validierung des neu entstandenen Envs. Anschließend wurden Vektorpartikel hergestellt, die mit dem rekombinanten Hüllprotein pseudotypisiert waren. Erfolgreiche Transduktionen von Zielzellen zeugen von einem funktionellen Env. 2×10^6 293T Zellen wurden ausgesät und mithilfe der Kalziumphosphatmethode mit folgenden Konstrukten transfiziert:

- 2 µg wtEnv-GFP-SDF-1α + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 3 µg M159 (ψ+ RFP)
- 2 µg wtEnv-GFP + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 3 µg M159 (ψ+ RFP)
- kein Env + 7 µg pHIT60 (gag/pol) + 3 µg M159 (ψ+ RFP)

Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Abnahme der Überstände für die Transduktionsexperimente. Für die Western-Blot-Analyse wurden die transfizierten 293T Zellen lysiert und 80 µg Zellysate auf das Gel geladen. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen das Hüllprotein Env und dem entsprechenden HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper inkubiert.

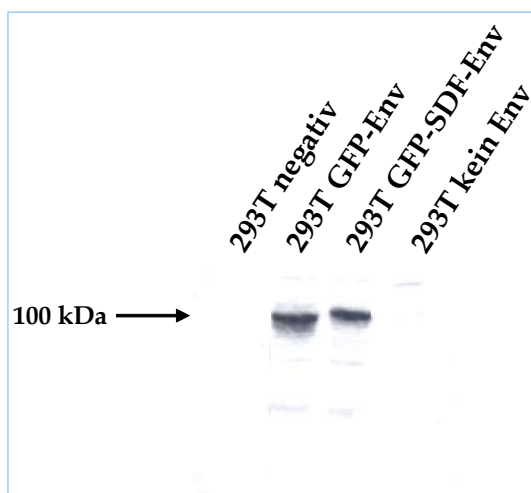


Abbildung 4-24 Western-Blot von Zelllysaten der transfizierten 293T Zellen.

Abbildung 4-24 zeigt den Western-Blot nach Inkubation mit dem ECL-Plus-Substrat. Die Bande in der Spur mit dem GFP-SDF-1 α -Env zeigt einen leichten *Shift* zu einem höheren Molekulargewicht aufgrund der Insertion der 219 bp-SDF-1 α -Sequenzen. Die Bande zeigt ebenfalls, genauso wie die GFP-Env-Bande, einen leichten Schmier nach unten hin, was auf eine erfolgte Prozessierung und Glykosylierung des Envs hinweist. Die Banden entsprechen den theoretischen Erwartungen, was der erste Hinweis auf die Funktionalität des rekombinanten Envs war.

Vor der Lyse der transfizierten 293T Zellen wurden die Überstände abgenommen und sterilfiltriert auf NIH3T3x4 Zellen gegeben, welche in 6-Loch-Schalen zu 2×10^5 Zellen ausgesät worden waren. Zwei Tage nach Transduktion der NIH3T3x4 Zellen erfolgte die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften mittels eines Fluoreszenzmikroskops. Die von den 293T produzierten Vektoren haben die Sequenzen des roten, fluoreszierenden Proteins (RFP) als Genom verpackt und bei Funktionstüchtigkeit des rekombinanten Hüllproteins auf die Zielzellen NIH3T3x4 übertragen. Bei diesem Experiment wurde RFP anstelle von GFP als verpackbares Genom gewählt, um eine erfolgreiche Transduktion der Zellen (Expression von RFP) von einer eventuell nur stattgefundenen Bindung der GFP-positiven Vektorpartikel an Zellen zu unterscheiden.

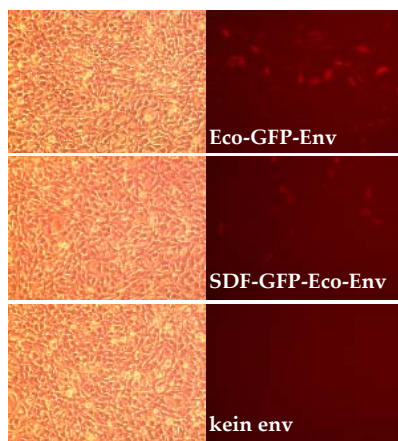


Abbildung 4-25 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transduzierten NIH3T3x4 Zellen mit Vektoren welche das GFP-Env, das SDF-1 α -Env oder gar kein Env trugen. Im Durchlicht (links) und mit dem 549 nm/590 nm-Filter.

Abbildung 4-25 zeigt die transduzierten Zellen untersucht auf rote Fluoreszenzeigenschaften. Die Transduktion der NIH3T3x4 Zellen mit Vektoren, welche das Eco-Env-GFP-Hüllprotein tragen, dient als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Transfektion und Transduktion. Das Vorhandensein einer eindeutigen Zellpopulation, die das RFP exprimiert, zeigt eine erfolgreiche Transduktion und zeugt von der Funktionalität des doppelt rekombinanten Env. Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Insertionen (des GFP in die prolinreiche Region sowie des SDF-1 α in der variablen Region A der Rezeptorbindedomäne) gleichzeitig toleriert werden und die Bildung von infektiösen Partikeln ermöglichen. Auch in diesem Zwischenschritt der Klonierung sollte die Fähigkeit des Hüllproteins, humane Zellen über den CXCR4-Rezeptor zu transduzieren, untersucht werden. Hierzu wurden 2×10^6 293T Zellen ausgesät und mithilfe der Kalziumphosphatmethode mit folgenden Konstrukten transfiziert.

- 2 μ g wtEnv-GFP-SDF-1 α + 7 μ g pHIT60 (gag/pol) + 5 μ g pSG-EGFP (ψ + GFP)
- 2 μ g wtEnv-GFP + 7 μ g pHIT60 (gag/pol) + 5 μ g pSG-EGFP (ψ + GFP)
- 2 μ g pHIT456 (ampho-Env) + 7 μ g pHIT60 (gag/pol) + 5 μ g pSG-EGFP (ψ + GFP)
- 2 μ g VSV-G + 7 μ g pHIT60 (gag/pol) + 5 μ g pSG-EGFP (ψ + GFP)
- kein Env + 7 μ g pHIT60 (gag/pol) + 5 μ g pSG-EGFP (ψ + GFP)

Die Transduktion erfolgte 48 Stunden nach Transfektion auf je 2×10^5 Zellen der Zelllinien NIH3T3x4, NIH3T3x4pMOV, A431 und HeLa in 6-Loch-Schalen mit unterschiedlichen Mengen an Vektorüberstand. Die Mengenbestimmung der verwendeten Überstände erfolgte

je nach erwarteter Transduktionseffizienz in Anlehnung an das vorhergehende Experiment. Vom Überstand ohne Hüllprotein wurde 1 ml auf die Zellen gegeben, von den Überständen mit VSV-G und amphi-Env wurden 2 ml auf die Zellen gegeben. Der eco-Env-Überstand wurde mit 3 ml und der SDF-1 α -eco-Env mit 3,5 ml auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden zwei Tage nach Transduktion durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die unterschiedlichen Vektorüberstandsmengen gingen in die Titerberechnung mit ein und sind zusammen mit den Rohdaten in der Abbildung 4-26 dargestellt.

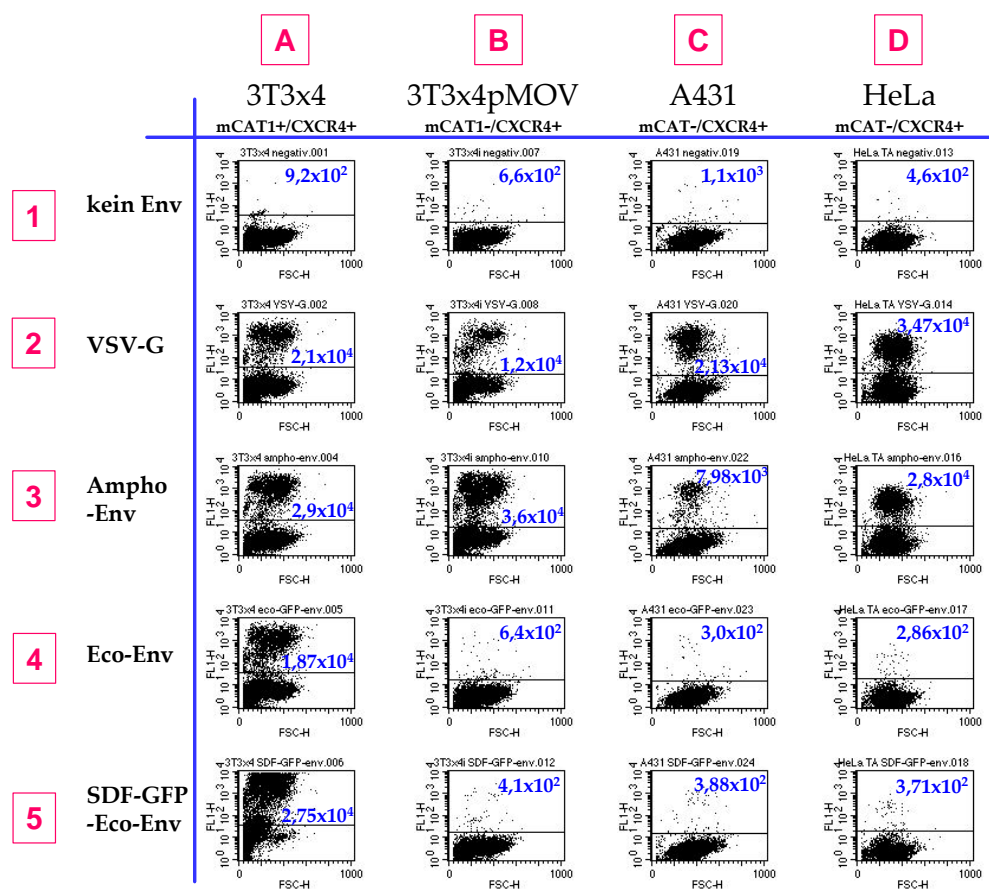


Abbildung 4-26 FACS-Ergebnisse zwei Tage nach Transduktion der unterschiedlichen Zellen mit Vektorpartikeln, welche unterschiedliche Hüllproteine tragen. Die blauen Zahlen stellen die berechneten Transduktionstiter dar. Die roten Buchstaben und Zahlen dienen der Einteilung der Daten in Raster und sollen die Beschreibung vereinfachen.

Wieder wurden die errechneten Titer der Negativkontrolle (Transduktion von Zellen mit Überständen, welche keine Hüllprotein enthalten) von den errechneten Titern abgezogen und in Abbildung 4-27 dargestellt.

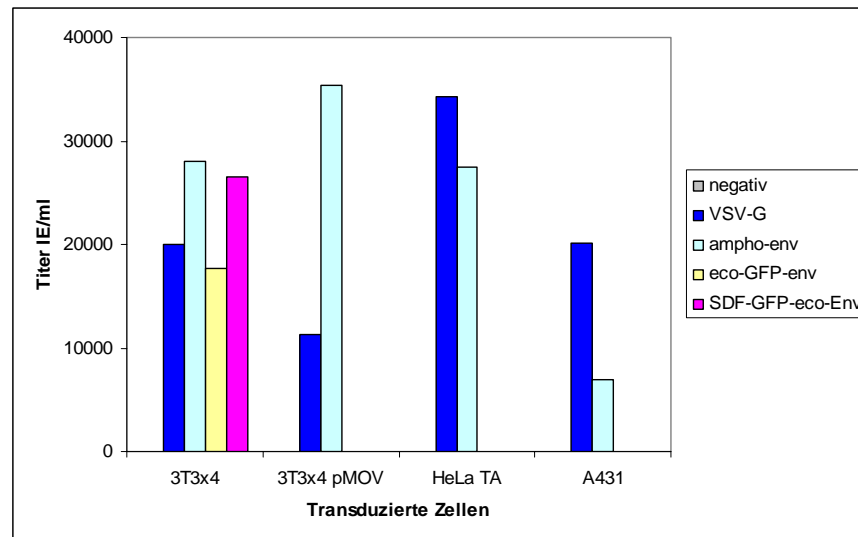


Abbildung 4-27 Untersuchung der Transduktionstiter der pseudotypisierten Vektoren auf unterschiedlichen Zellen nach Abzug der Negativkontrollen.

Der rote Balken in Abbildung 4-27 zeigt die Infektiosität des neuen SDF-1 α -GFP-Env-Vektors. Der Transduktionstiter von $2,65 \times 10^4$ zeigt erneut, dass die Doppelinserion des GFP und des SDF-1 α , vom Env toleriert wird und zur Bildung infektiöser Partikel führt. Es erfolgte keine signifikante Transduktion von humanen und auch nicht von MLV-infizierten NIH3T3x4 Zellen. Dies kann erneut auf zu geringe Titer zurückgeführt werden. Im nächsten Schritt der Klonierung wurde das rekombinante Hüllprotein in das komplette Genom eines replikationskompetenten MLV (das pZAPm-GFP) inseriert.

4.3.1.2 Klonierung eines RCR mit GFP und SDF-1 α

Das Plasmid pZAPm-GFP (Logg *et al.*, 2001) (siehe 4.1.1 und Abbildung 4-3) ist charakterisiert durch die Insertion einer IRES-GFP-Expressionskassette direkt hinter dem Env-Terminations-Kodon. Die Arbeitsgruppe um Kazahara konnte in einer Veröffentlichung (Logg *et al.*, 2001) demonstrieren, dass Insertionen an dieser Stelle (der Env untranslatierten Region) des Virusgenoms gut toleriert werden und stabil sind, solange sie einen gewissen Schwellenwert in der Größenbeschränkung von 1,3 kb nicht überschreiten. Die Expressionskassette ist von einmaligen Restriktionsschnittstellen flankiert und stellt die theoretische Insertionsstelle des therapeutischen Gens dar. Auf diesem Plasmid basierte die folgende Klonierung:

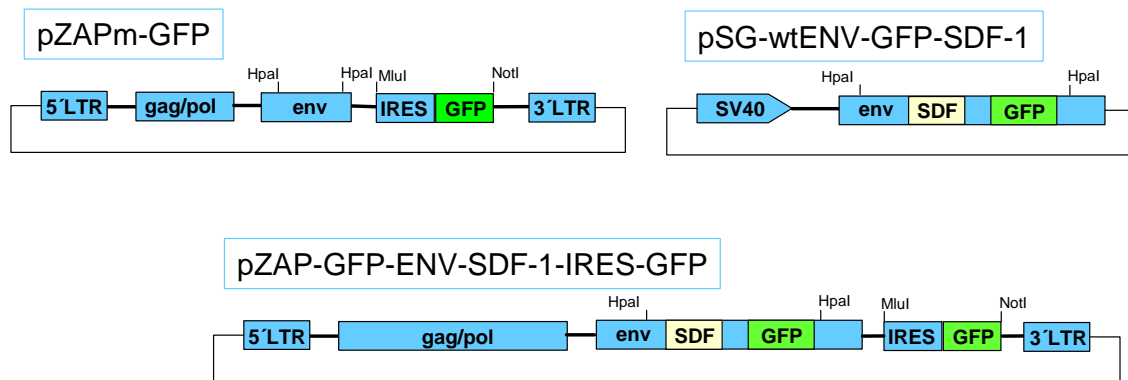


Abbildung 4-28 Schematische Darstellung der Klonierung des pZAP-GFP-ENV-SDF-1 α -IRES-GFP.

Das Env-GFP-SDF-1 α wurde über *HpaI* direkt in das Volllängengenom des MLV-pZAPm-GFP einkloniert. Es entstand das Virus pZAP-GFP-ENV-SDF-1 α -IRES-GFP mit einer Größe von 13008 Basenpaaren (siehe Abbildung 4-28). Das klonierte Plasmid überschreitet die bereits beschriebene Größenlimitierung von MLV-Genomen. Die Verpackung des Genoms in die Viruspartikel ist somit nicht mehr garantiert. Alle theoretischen Insertionen eines therapeutischen Gens sollten die Größe der IRES-GFP-Expressionskassette (an deren Stelle sie inseriert werden) nicht überschreiten, idealerweise sogar unterschreiten. Um das neu entstandene Virus besser charakterisieren und sein Replikationsverhalten untersuchen zu können, musste die Expressionskassette entfernt werden. Da sich im Hüllprotein eine Insertion des GF-Proteins befindet, wird die IRES-GFP-Expressionskassette zur visuellen Verfolgung der Replikation überflüssig und kann aus dem Virusgenom entfernt werden. Dies gelang über den Restriktionsverdau mit *MluI* und *NotI*. Beide Schnittstellen sind einzigartig in dem Virusgenom und flankieren die Expressionskassette. Nach dem Verdau wurden die nicht kompatiblen Enden mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt, was sie zu kompatiblen *blunt ends* machte und anschließend miteinander verbunden. Es entstand das Virus pZAP-GFP-ENV-SDF-1 α (siehe Abbildung 4-29).

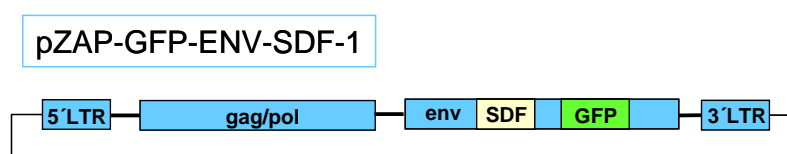


Abbildung 4-29 Schematische Darstellung des pZAP-GFP-ENV-SDF-1 α -Plasmids.

4.3.1.3 Test auf genetische Stabilität des SDF-1 α

Um die genetische Stabilität der inserierten SDF-1 α - und GFP-Sequenzen nach Replikation in Zielzellen zu untersuchen, wurden NIH3T3x4 Zellen mit dem rekombinanten Provirus transfiziert. 2×10^6 Zellen wurden in 10 cm-Schalen ausgesät und mit 10 μ g der Plasmid-DNA mittels des Superfect-Reagenz transfiziert. An den Tagen sieben und 33 nach Transfektion wurde die genomische DNA aus den Zellen isoliert. Die Infektion (GFP-Expression) der Zellen wurde anhand des Fluoreszenzmikroskops kontrolliert. Die anschließende PCR-Reaktion erfolgte mit *Primern*, welche vor den SDF-1 α - und nach den GFP-Sequenzen im Hüllproteingen binden (siehe Abbildung 4-30). Es wurde also nicht nur die Stabilität der SDF-Sequenzen, sondern zusätzlich auch die der GFP-Sequenzen untersucht. Zur Kontrolle wurden Plasmid-DNA oder keine DNA als Matrize zugegeben.

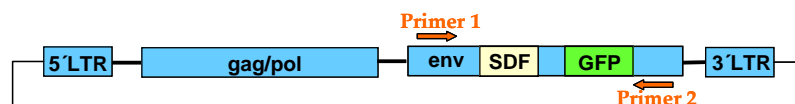


Abbildung 4-30 Schematische Darstellung der Lage der zur PCR verwendeten *Primer*.

Die erwarteten Banden betragen 1833 Basenpaare bei stabiler Insertion der SDF-1 α - und GFP-Sequenzen und 1614 Basenpaare bei Fehlen der SDF-1 α -Sequenzen.

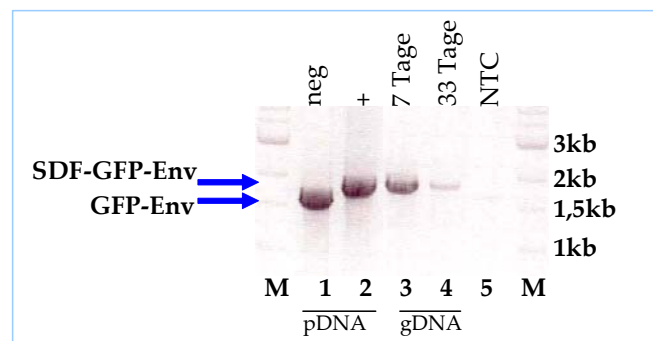


Abbildung 4-31 Untersuchung der genomischen Stabilität des SDF-1 α -GFP-Env an den Tagen 7 und 33 nach Transfektion des Virusgenoms in NIH3T3x4 Zellen. Beschreibung siehe Text.

Die Abbildung 4-31 zeigt das Ergebnis der PCR-Analyse. Spur eins zeigt die entstandene Bande nach Zugabe von Plasmid-DNA des Virusgenoms pZAP-GFPenv. Dieses Genom besitzt GFP im Env, jedoch kein SDF-1 α , und führte zu der Bildung eines Amplikons der

Größe 1614 bp. Auf der zweiten Spur wurde das Ergebnis nach Amplifikation von der DNA-Matrize aufgetragen, welche das pSG-wtENV-GFP-SDF-1 α enthält. Hier entstand die erwartete größere Bande von 1833 Basenpaaren. Die Spuren drei und vier zeigen das Ergebnis nach Amplifikation von der isolierten genomischen DNA sieben Tage (Spur drei) und 33 Tage (Spur vier) nach Transfektion des pZAP-GFPenv-SDF-1 α . Beide Banden zeigen die erwartete, größere Bande von 1833 bp. Nach unten hin ist kein Schmier sichtbar, welcher auf eventuelle Deletionen hinweisen würde. Spur fünf zeigt die Qualität der PCR-Reaktion, da zu diesem Ansatz keinerlei Matrizen hinzugegeben wurden. Die Daten zeigen eine stabile Integration der GFP- sowie SDF-Sequenzen im viralen Genom.

4.3.1.4 Klonierung von SDF-1 α in pZAP (ohne GFP-Env)

Zur Kontrolle und als Vergleich wurde ein Virus kloniert, welches nur die SDF-1 α -Sequenzen jedoch kein GFP im Env trägt, und zur Visualisierung der Replikation die IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env erhalten geblieben ist. Als Grundgerüst der Klonierung dienen das Virus pZAPm-GFP und pTES3N (Katane *et al.*, 2002). Die SDF-1 α -enthaltenden Sequenzen des Env wurden aus dem pTES3N mittels *HpaI* herausgeschnitten und direkt in den *HpaI*-verdauten Vektor ligiert. Es entstand das Virus pZAP-SDF-1-IRES-GFP (siehe Abbildung 4-32).

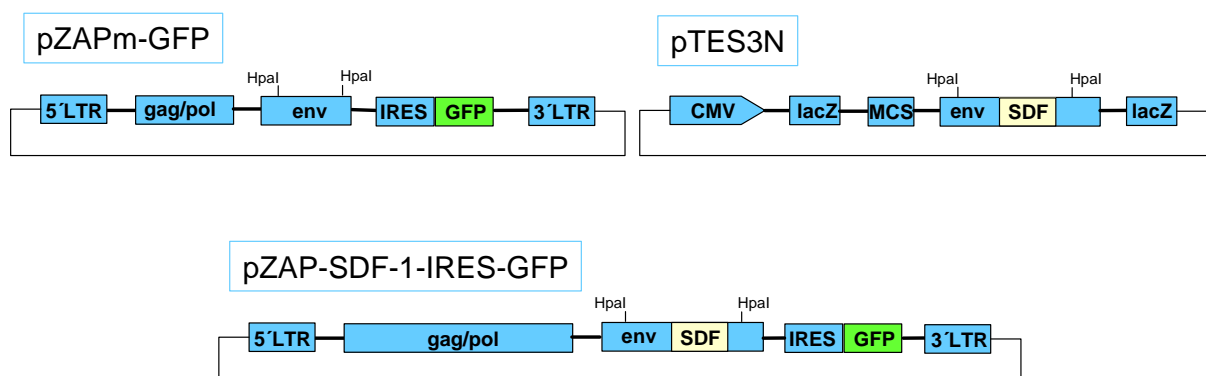


Abbildung 4-32 Schematische Darstellung der Klonierung des pZAP-SDF-1 α -IRES-GFP.

Im Anschluss an die Klonierung sollten die beiden rekombinanten SDF-1 α -Sequenz-tragenden Viren auf ihre Replikationsfähigkeit in humanen Zellen untersucht werden. Trotz

positiver Transfektionseffizienz fand keine Zunahme der GFP-positiven Zellen statt (Daten nicht gezeigt). Um das Problem zu analysieren, wurde die Replikation zunächst auf NIH3T3 getestet. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden 5×10^5 NIH3T3 Zellen in 6-Loch-Schalen ausgesät und anschließend mit je $3 \mu\text{g}$ der Plasmide GFP-MOV, pZAPm-GFP, pZAP-SDF- 1α -IRES-GFP und pZAP-GFPenv-SDF1- α mithilfe des FuGENE-Reagenz transfiziert. Von den transfizierten NIH3T3 Zellen wurde an den Tagen 2, 3, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 22, und 27 jeweils ein Teil der Zellen abgenommen und durchflußzytometrisch auf die Expression des GFP untersucht. Die Daten der Replikationskinetik der Viren in den NIH3T3-Zellen sind in Abbildung 4-33 dargestellt.

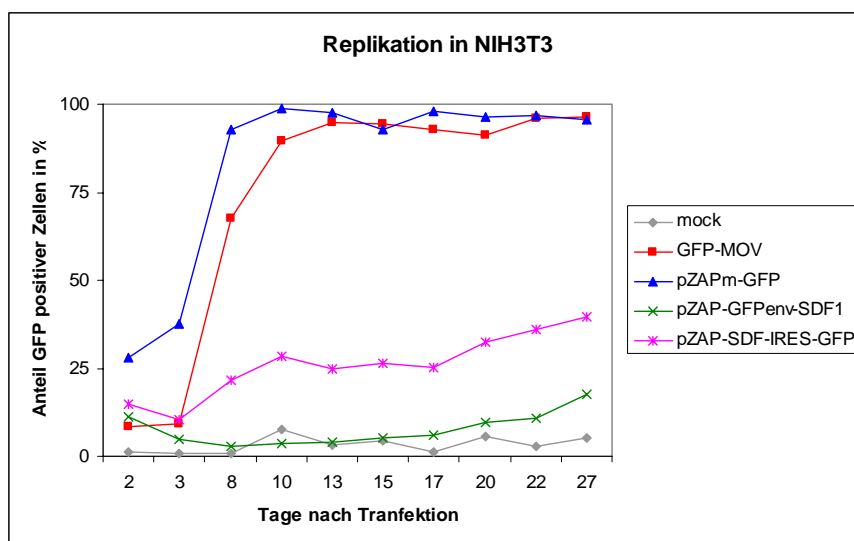


Abbildung 4-33 Replikationskinetik der Viren in NIH3T3 Zellen. Beschreibung siehe Text.

Abbildung 4-33 zeigt die entstandene Replikationskinetik der unterschiedlichen Viren in NIH3T3 Zellen. Die rote Linie des GFP-MOV und die blaue Linie des pZAPm-GFP stellen die Replikation der Positivkontrollen dar. Beide Viren sind bereits beschrieben und auf NIH3T3 Zellen getestet worden. Sie zeigen auch in diesem Versuchsansatz ein vergleichbares Replikationsverhalten. Die blaue Linie des pZAPm-GFP steigt schneller an, was auf eine höhere, ursprüngliche Transfektionseffizienz zurückzuführen ist. Die rekombinanten SDF- 1α -tragenden Viren jedoch zeigen ein gestörtes Replikationsverhalten. Selbst nach 27 Passagierungstagen gelang es nicht, die Zellkulturschale komplett durchzuinfizieren. Obwohl beide Virusgenome mit einer vergleichbaren Transfektionseffizienz in die Zellen gelangt sind (pZAP-GFPenv-SDF- 1α : 11,13 %; pZAP-SDF-IRES-GFP:

14,62 %), steigt die Anzahl der GFP-positiven Zellen im pZAP-SDF-IRES-GFP-Ansatz bis zum Tag zehn auf 28,51 % an, während das pZAP-GFPenv-SDF1-Virus sich nicht signifikant von der Negativkontrolle abhebt.

Die Überstände der transfizierten Zellen wurden am Tag 22 nach Transfektion gesammelt, sterilfiltriert und auf 2×10^5 in 6-Loch-Platten ausgesäte NIH3T3, NIH3T3x4, 293T, A431 und HeLa Zellen gegeben. Die Zellen NIH3T3 und NIH3T3x4 dienten als Positivkontrollen. Da die Viren auf diesen Zellen hochgezüchtet worden sind, sollten sie diese Zellen ebenfalls zu gleichen Titern infizieren können. Die 293T Zellen dienten als Negativkontrolle, denn sie exprimieren weder den mCAT-1- noch den humanen CXCR4-Rezeptor im Gegensatz zu den HeLa und A431 Zellen. Hierbei handelt es sich um humane Zellen, welche den humanen CXCR4-Rezeptor in großen Mengen exprimieren (Daten nicht gezeigt). Der Prozentanteil GFP-positiver Zellen 24 Stunden nach Infektion (Transduktion) wurde im FACS analysiert und ist in Abbildung 4-34 dargestellt.

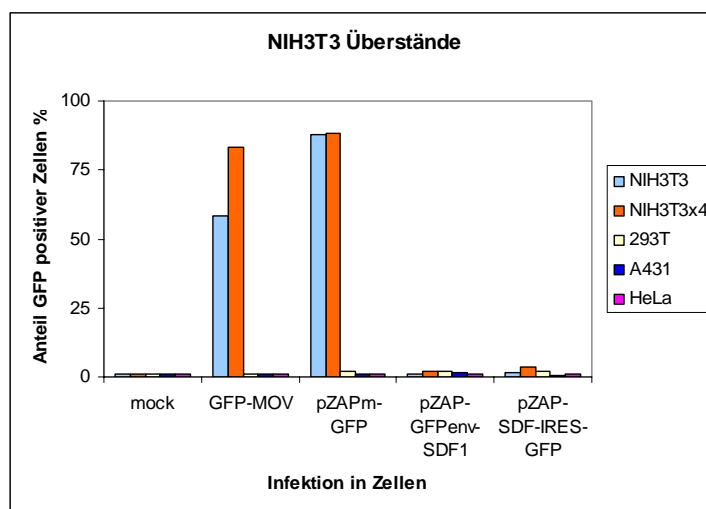


Abbildung 4-34 Transduktion/Infektion der Virusüberstände der transfizierten NIH3T3 in unterschiedlichen Zellen.

Abbildung 4-34 zeigt die Effizienz der Viren, unterschiedliche Zellen zu infizieren. Die Überstände der NIH3T3, welche mit den Kontrollviren GFP-MOV und pZAPm-GFP transfiziert waren, erreichten eine hohe Effizienz der Infektion neu ausgesäter Zellen. Alle anderen Überstände konnten keine signifikante Erhöhung des Anteils an GFP-positiven Zellen erzielen. Obwohl das Virus pZAP-SDF-IRES-GFP in der transfizierten

Zellkulturschale eine Effizienz von 35,9 % an GFP-positiven Zellen bewies, konnte keine Infektion neuer Zellen erzielt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die ursprünglich transfizierten Zellen keine neuen Viren zu produzieren schienen.

Nach diesem unerwarteten Ergebnis wurde die Replikation der Viren auf NIH3T3x4 Zellen untersucht. Diese Zellen exprimieren beide Rezeptoren und ermöglichen den Viren den Zelleintritt über beide Rezeptoren. Es sollte untersucht werden, ob dieser Umstand einen Einfluss auf das Replikationsverhalten hat. Die Transfektion erfolgte genau wie bei den NIH3T3 Zellen. Von den transfizierten NIH3T3x4 Zellen wurde an den Tagen 2, 3, 8, 10, 13, 17, 20, 22, 24 und 27 jeweils ein Teil der Zellen abgenommen und durchflußzytometrisch auf die Expression des GFP untersucht. Die Daten der Replikationskinetik der unterschiedlichen Viren auf den NIH3T3x4 Zellen sind in Abbildung 4-35 dargestellt.

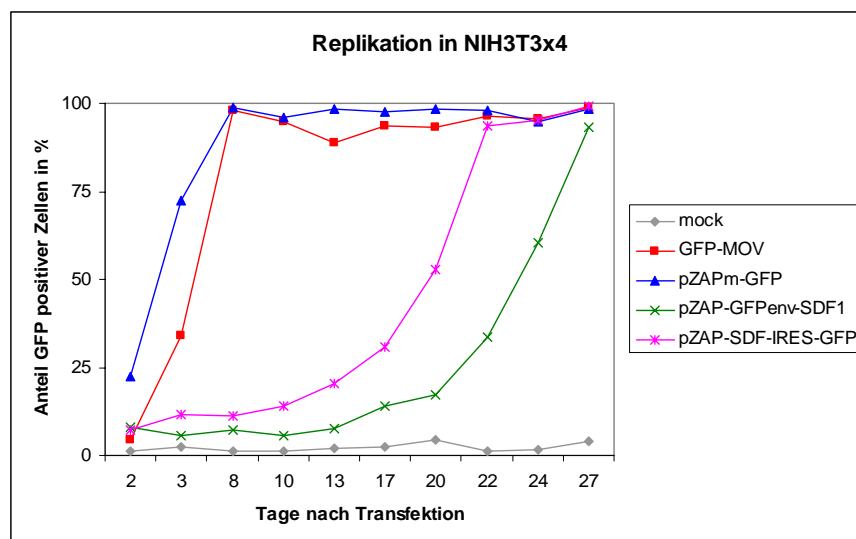


Abbildung 4-35 Replikationskinetik der Viren in NIH3T3x4 Zellen.

Abbildung 4-35 zeigt die entstandene Replikationskinetik. Auch in diesem Versuchsansatz zeigen die beiden Positivkontrollen GFP-MOV und pZAPm-GFP ein bekanntes Replikationsverhalten. Überraschenderweise replizieren die rekombinanten SDF-1 α -Viren, allerdings verzögert verglichen mit den Ausgangskonstrukten. Das Virus pZAP-SDF-IRES-GFP gelangt erst nach 13 Tagen in die exponentielle Phase der Replikation, das Virus pZAP-GFPenv-SDF1 α sogar erst nach 18 Tagen. Doch am Ende gelingt es beiden Viren die Zellkulturschale komplett durchzuinfizieren.

Auch in diesem Versuchsansatz wurden die Überstände der transfizierten Zellen am Tag 22 nach Transfektion gesammelt, sterilfiltriert und auf 2×10^5 in 6-Loch-Platten ausgesäte NIH3T3, NIH3T3x4, 293T, A431 und HeLa Zellen gegeben. Der Prozentanteil GFP-positiver Zellen 24 Stunden nach Infektion wurde im FACS analysiert und ist in Abbildung 4-36 dargestellt.

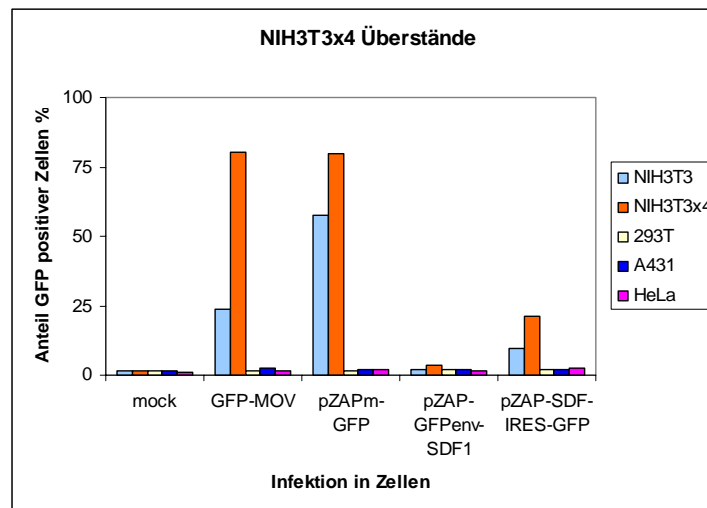


Abbildung 4-36 Transduktion/Infektion der Virusüberstände der transfizierten NIH3T3x4 in unterschiedlichen Zellen.

Abbildung 4-36 zeigt die Effizienz der Überstände auf den unterschiedlichen Zellen. Die Infektionsergebnisse auf den Positivkontroll-Zellen NIH3T3 und NIH3T3x4 entsprechen in sehr abgeschwächter Form in etwa dem Stand der Infektion in der Ursprungsschale am Tag 22. Das Virus pZAP-GFPenv-SDF-1 α erreichte am Tag 22 eine Durchinfektion der Zellen zu 33,56 % auf NIH3T3x4, während das pZAP-SDF-IRES-GFP-Virus 93,41 % der Zellen infiziert hatte.

Allerdings konnte in keinem der Versuchsansätze das ursprüngliche Ziel, humane Zellen über den CXCR4-Rezeptor zu infizieren, erreicht werden. Die Beobachtung der verlangsamten Replikation der Viren auf NIH3T3x4 und der fast nicht vorhandenen Replikation auf NIH3T3 Zellen lässt die Vermutung des Auftretens von Rekombinationsereignissen aufkommen. Obwohl die genetische Stabilität des GFP-Env-Virus nach 33 Tagen bereits untersucht worden ist, wurde die gDNA der infizierten Zellen erneut analysiert. Um die genetische Stabilität der inserierten SDF-1 α -Sequenzen in den

rekombinanten Viren während der Replikation auf NIH3T3 und NIH3T3x4 Zellen zu untersuchen, wurde 22 Tage nach Transfektion in allen Versuchsansätzen ein Teil der Zellen zusätzlich zur FACS-Analyse für die Herstellung von gDNA benutzt.

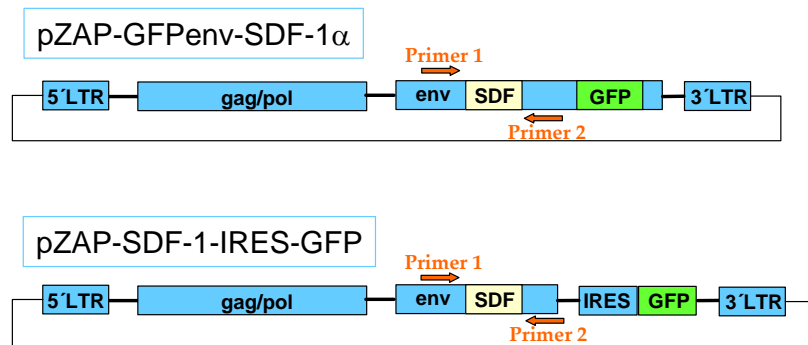


Abbildung 4-37 Lage der zur PCR verwendeten *Primer*.

Diese wurde in einer anschließenden PCR-Reaktion unter der Verwendung von *Primern*, welche die Insertionsstelle der SDF-1α-Sequenzen flankieren (siehe Abbildung 4-37), auf die Stabilität dieser Sequenzen hin untersucht. Hüllprotein-Sequenzen, welche die Sequenzen für SDF-1α integriert haben, zeigten eine Bande der Größe 621 bp, während die an dieser Stelle Wildtyp-Env-Sequenzen zur Entstehung einer verkürzten 402 bp-Bande führten. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 4-38 zusammengestellt.

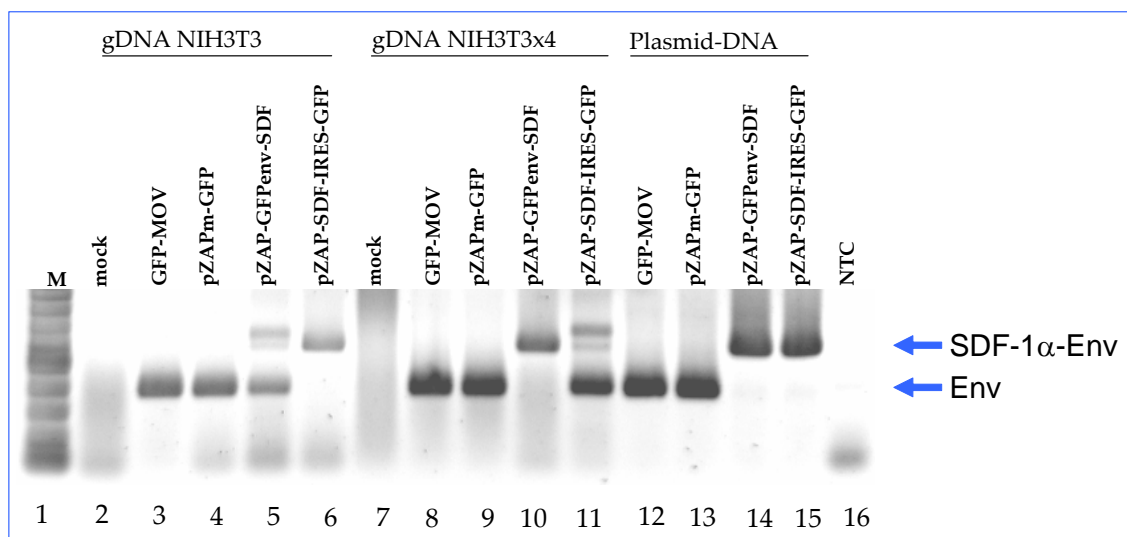


Abbildung 4-38 PCR-Analyse der SDF-1α-Sequenzen in den rekombinanten Viren während deren Replikation auf NIH3T3 und NIH3T3x4 Zellen.

Abbildung 4-38 zeigt die Ergebnisse der PCR-Reaktion nach Verwendung genomischer DNA der transfizierten NIH3T3 (Spuren zwei bis sechs) und NIH3T3x4 Zellen (sieben bis elf) 22 Tage nach Transfektion der unterschiedlichen Virusgenome. Die letzten vier Spuren (zwölf-15) zeigen die Ergebnisse nach Zugabe von Plasmid-DNA. Das Virus pZAP-GFPenv-SDF-1 α stieg auf NIH3T3 Zellen bis zum Tag 22 kaum merklich signifikant zur Negativkontrolle an. Dieses Virus schien demnach unfähig, die murinen, mCAT-1-exprimierenden Zellen produktiv zu infizieren. Allerdings war in der Replikationskinetik ab dem Tag 17 ein leichter Trend zu beobachten. Die Daten der PCR zeigen, dass die Sequenzen für SDF-1 α nicht stabil im Genom integriert waren. Es treten drei Banden in diesem Versuchsansatz auf. Eine Bande befindet sich auf der richtigen Höhe (verglichen mit den Ergebnissen, welche nach Zugabe der Plasmid-DNA zur PCR-Reaktion erzielt wurden; und nach Vergleich der entstandenen Bandengröße mit der Sequenzabfolge). Eine weitere Bande befindet sich etwas oberhalb der erwarteten Sequenz. Zusätzlich erscheint eine Bande, welche eindeutig die SDF-1 α -Sequenzen deletiert hat. Die Insertion der Sequenzen für GFP und SDF-1 α schien die Replikation dieses rekombinanten Virus auf NIH3T3 Zellen erheblich zu stören. Wurden die Sequenzen aus dem Hüllprotein deletiert, schien das Virus wieder zur Replikation fähig zu sein.

Das Virus pZAP-SDF-IRES-GFP schien in seiner Replikationsfähigkeit auf NIH3T3 Zellen ebenfalls gehindert zu sein. Es schien sich zu Beginn des Versuchs auszubreiten, konnte jedoch nicht die gesamte Schale durchinfizieren. Auch konnten die Überstände dieser Zellen keine neuen Zellen infizieren. Die SDF-1 α -Sequenzen waren bis zum Tag 22 stabil im Hüllprotein-Genom integriert.

Ein umgekehrtes Verhältnis der SDF-1 α -Stabilität der rekombinanten Viren war nach Replikation auf NIH3T3x4 Zellen zu beobachten. Während das pZAP-GFPenv-SDF-1 α -Virus die SDF-Sequenzen bis zum Tag 22 stabil im Genom trug, sind die Sequenzen im pZAP-SDF-IRES-GFP deletiert worden. Oben (Abbildung 4-31) ist bereits beschrieben worden, dass das pZAP-GFPenv-SDF-1 α am Tag 33 nach Replikation auf NIH3T3x4 Zellen stabil die SDF-1 α sowie die GFP-Sequenzen integriert trägt. Die anfänglich erfreuliche Beobachtung war, dass das stabile Virus auf den NIH3T3x4 replizieren konnte und zu einer kompletten Durchinfektion der Zellkulturschale führte. Jedoch konnten die gesammelten Überstände

aus diesem Versuch keine Infektion bzw. Transduktion humaner CXCR4-exprimierender Zellen erzielen. Es wurden unterschiedlichste humane Zellen getestet, die laut Literatur unterschiedliche CXCR4-Rezeptor-Expressionslevel besitzen. Es konnte bei keinem der Versuche eine Infektion erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Es wird deutlich, dass dieser Versuchsansatz – das Targeting von ecotropem Env auf humane CXCR4-exprimierende Zellen – nicht weiter verfolgt werden muss, da selbst die Herstellung replikationskompetenter Viren das ursprünglich zugrunde liegend geglaubte Titerproblem nicht lösen konnte.

4.3.2 Erweiterung des Wirtstropismus mittels gerichteter Evolution

Bei der Erweiterung des Wirtstropismus von MLV mittels der Insertion von Liganden in das ecotrope Hüllprotein konnte bis heute kein durchschlagender Erfolg erzielt werden. Die Versuche mit den Sequenzen für SDF-1 α in dieser Arbeit sind gescheitert, genauso wie bereits 1995 die Arbeitsgruppe um S. Russel (Cosset *et al.*, 1995) erfolglos ein *Targeting* des ecotropen Hüllproteins mittels der Insertion von EGF als Fusion an den N-Terminus des ecotropen Hüllproteins zu erreichen versuchte. Allerdings wurden die Versuche mit Vektoren durchgeführt. Die Herstellung eines replikationskompetenten Virus, welches die EGF-Modifikation trägt, könnte zu der Selektion von Viren führen, die der Endosomen-Degradierung entgehen könnten. Das Virus GFP-EMO (siehe Abbildung 4-39) ist ein replikationskompetentes ecotropes MLV, welches am N-Terminus des Hüllproteins die Sequenzen für EGF trägt (zusätzlich zu der Insertion der GFP-Sequenzen in der PRR).

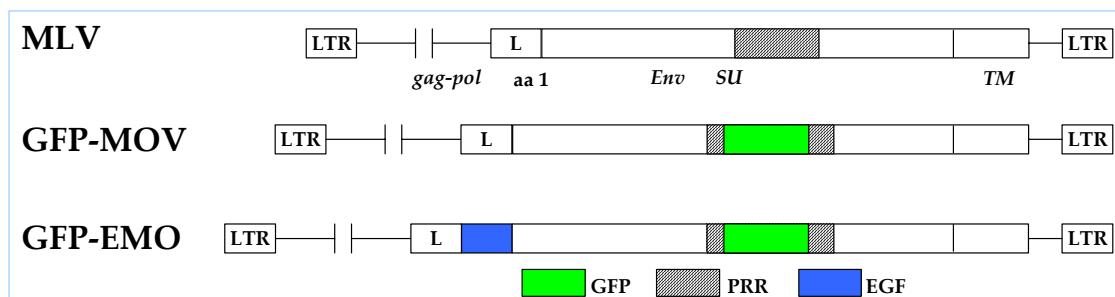


Abbildung 4-39 Schematische Darstellung des GFP-EMO.

Die beiden GFP-markierten Viren GFP-MOV und GFP-EMO wurden in NIH3T3 Zellen transfiziert. Zur Überprüfung, ob die Insertion der Sequenzen für EGF an dieser Stelle des Env im replikationskompetenten Kontext vom Virus toleriert wird oder die Replikation beeinflusst, wurde eine Replikationskinetik erstellt. An den Tagen 2, 3, 4, 6, 9 und 13 nach Transfektion wurde jeweils ein Teil der Zellen zur durchflußzytometrischen Analyse herangezogen. Alle Werte sind in Abbildung 4-40 dargestellt.

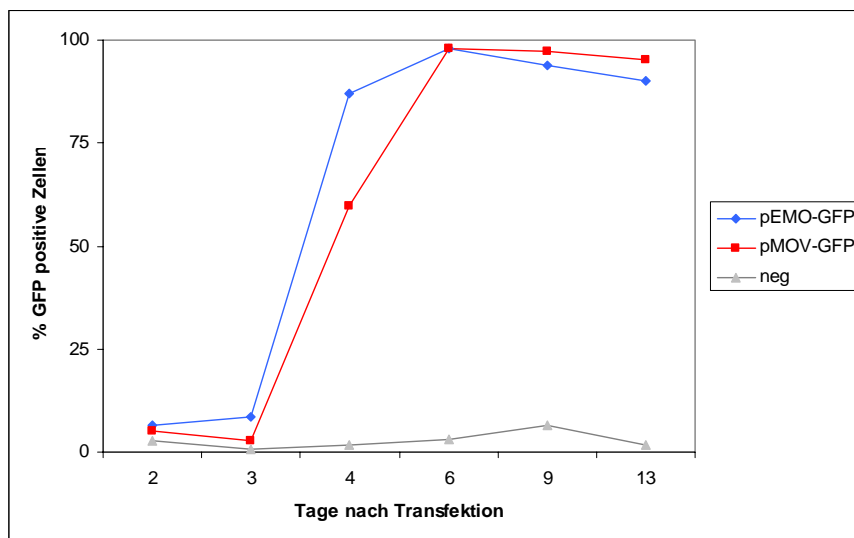


Abbildung 4-40 Replikationskinetik der rekombinanten Viren GFP-MOV und GFP-EMO auf NIH3T3 Zellen.

Die Replikationskinetik in Abbildung 4-40 zeigt, dass die Insertion der Sequenzen für EGF in den N-Terminus des Env zusätzlich zu der GFP-Insertion in der prolinreichen Region toleriert wird, zur Bildung infektiöser Partikel führt und die Replikation des Virus auf NIH3T3 nicht behindert.

Anhand von Bindungsassays wurde die Fähigkeit der rekombinanten Viren zur Bindung an Zielzellen untersucht. Hierzu wurden je 2×10^5 Zellen von NIH3T3, 293T und A431 ausgesät. Die Zellen wurden für fünf Minuten mit den Virusüberständen inkubiert, gewaschen und im FACS auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-41 dargestellt.

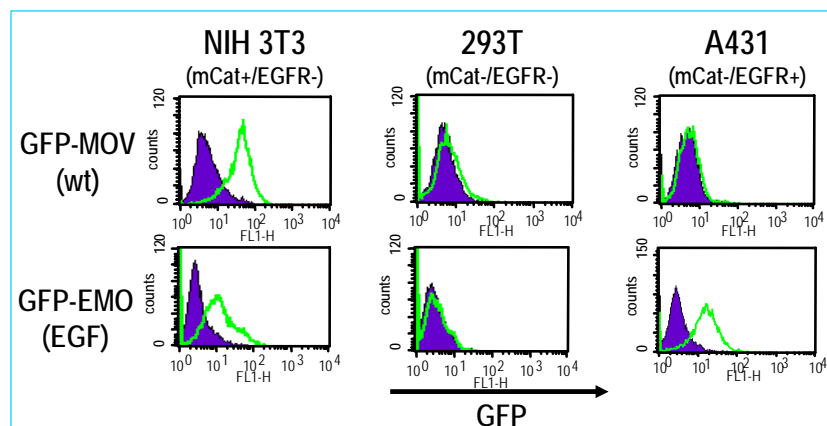


Abbildung 4-41 Bindungsassay der Überstände von GFP-EMO und GFP-MOV auf NIH3T3, 293T und A431 Zellen.

Die NIH3T3 Zellen dienen bei diesem Versuch als Positivkontrolle, die 293T Zellen, die weder EGFR noch mCAT-1 exprimieren, als Negativkontrolle. Das rekombinante GFP- und EGF- tragende, replikationskompetente Virus GFP-EMO ist in der Lage, spezifisch an den EGFR-Rezeptor zu binden, was die Ergebnisse mit den humanen EGFR-exprimierenden A431 Zellen deutlich machen. Es ist eine klare Bewegung der gesamten Population nach rechts zur grünen Fluoreszenz erkennbar, die bei den 293T Zellen nicht zu beobachten ist.

Retroviren sind bekannt für ihre relativ hohe genetische Instabilität. Während der Replikation in Zielzellen können sie verschiedenste Modifikationen erfahren. Die Insertion des EGF in das Genom des MLV verhindert die Replikation auf EGFR-exprimierenden Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die behindernde Insertion schnell aus dem Genom entfernt wird, und nach dieser Deletion das Virus ungehindert replizieren kann (Erlwein *et al.*, 2003). Sollte die Wirtszelle jedoch EGF zum Überleben benötigen, liegt die Vermutung nahe, dass die Insertion der EGF-Sequenzen toleriert wird, und die Replikation auf diesen Zellen eventuell zur Selektion einer Mutante führt, welche nach Bindung an den EGF-Rezeptor nicht in Endosomen geleitet wird bzw. aus diesen schneller wieder herausgelangen und produktiv replizieren kann.

Als Zielzellen eignen sich hierfür Zellen, die den EGF-Rezeptor, allerdings keinen ecotropen Rezeptor exprimieren. Die Zellen BaF/ERX und BaF/wtEGFR (Walker *et al.*, 1998) sind murine pre-B-Zellen, die in ihrer Proliferation auf das Vorhandensein von IL-3 angewiesen

sind, jedoch nicht von ecotropem MLV infiziert werden können (Daten nicht gezeigt). Die Zellen stammen von BaF/3 Zellen ab, sind stabil mit dem EGF-Rezeptor transfiziert (BaF/wtEGFR) und so lange selektioniert worden, bis sie in der Proliferation von EGF abhängig waren (BaF/ERX) (F. Walker, Viktoria, Australien unveröffentlicht). Um diese Abhängigkeit zu überprüfen, wurden am Tag null je $8,17 \times 10^4$ Zellen BaF/wtEGFR und je $1,1 \times 10^5$ Zellen BaF/ERX ausgesät und für sechs Tage unter Zugabe von IL-3, EGF oder nur RPMI ohne Zusätze passagiert. An den Tagen drei und sechs nach Aussaat erfolgte eine Bestimmung der Lebendzellzahl mittels der Trypanblau-Ausschlussmethode. Die Werte sind in Abbildung 4-42 zusammengestellt.

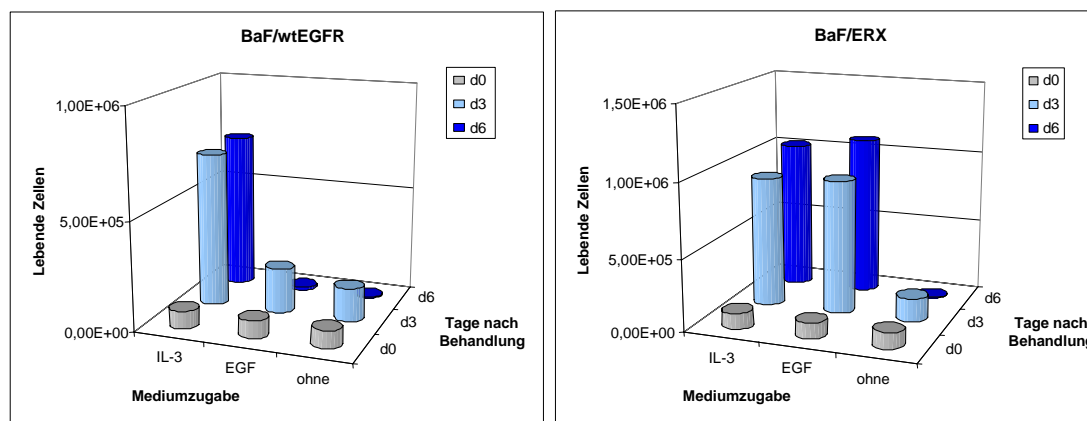


Abbildung 4-42 Lebendzellzahlbestimmung der BaF/wtEGFR und BaF/ERX Zellen an den Tagen 0, 3 und 6 nach erfolgter oder nicht erfolgter Zugabe von IL-3 bzw. EGF zum RPMI-Wachstumsmedium.

Abbildung 4-42 zeigt das erwartete Wachstumsverhalten. BaF/wtEGFR Zellen proliferieren nur, wenn IL-3, nicht jedoch EGF dem Medium zugegeben ist oder keine Zusätze im Medium vorhanden sind. Die selektionierte Mutante BaF/ERX proliferiert unabhängig mit IL-3 oder EGF, stirbt allerdings langsam im RPMI-Medium ohne Zusätze ab. Die BaF/ERX Zellen sind hervorragende Kandidaten für die Selektion von GFP-EMO-Virus-Varianten. Die Zellen sind von diesem Virus aufgrund des nicht vorhandenen ecotropen Rezeptors nur über die Bindung des EGF an den EGF-Rezeptor infizierbar. Findet allerdings eine Degradierung des Virus in den Endosomen statt, verlieren die Zellen ihre Überlebensgrundlage, da keine neuen Viruspartikel gebildet werden, welche wiederum an den EGF-Rezeptor binden und die Proliferation der Zellen stimulieren können. Das Überleben der Zellen hängt somit von der Virusreplikation ab. Zunächst wurden die Zellen

GFP-EMO und als Negativkontrolle mit GFP-MOV infiziert und das Proliferationsverhalten untersucht.

Zur Virusproduktion wurden einen Tag vor Versuchsbeginn je 3×10^6 293T in einer 10 cm-Schale ausgesät und am darauf folgenden Tag mit je $8 \mu\text{g}$ GFP-MOV und GFP-EMO mittels dem Polyfect-Reagenz transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion erfolgte die Aussaat von $4,5 \times 10^4$ Zellen BaF/ERX und $1,1 \times 10^5$ BaF/wtEGFR Zellen in RPMI (ohne jegliche Proliferationszusätze). Die Überstände der transfizierten 293T wurden sterilfiltriert und 5 ml Virusüberstand jeweils auf die ausgesäten BaF-Zellen gegeben. An den Tagen 4, 8, 11 und 16 erfolgte eine Lebendzellzahlbestimmung der unterschiedlichen Ansätze. Die Werte sind in Abbildung 4-43 zusammengestellt.

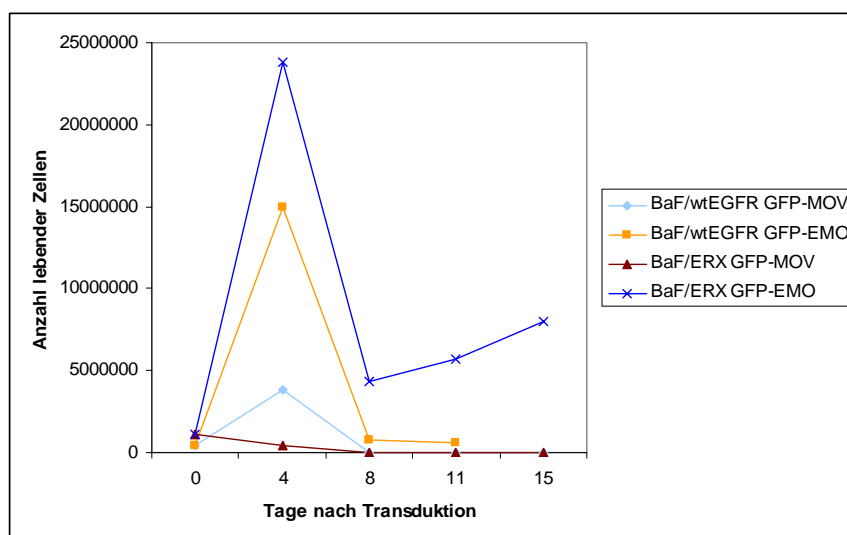


Abbildung 4-43 Lebendzellzahlbestimmung der BaF/wtEGFR und BaF/ERX-Zellen nach Behandlung mit GFP-MOV und GFP-EMO-Überständen.

Die Lebendzellzahl der GFP-EMO-infizierten BaF/ERX Zellen (dunkelblaue Linie) nahm bis zum Tag vier sehr stark zu, während die Zellzahl der GFP-MOV-kontrollinfizierten BaF/ERX Zellen nur leicht anstieg. Jedoch nahm die Lebendzellzahl der GFP-EMO-infizierten BaF/wtEGFR ebenfalls sehr stark zu. Diese Zunahme wurde bei der reinen Zugabe von EGF in den Ergebnissen der Wachstumskinetik in Abbildung 4-42 nicht beobachtet. Allerdings fiel die Lebendzellzahl bis zum Tag acht wieder sehr stark ab, vergleichbar stark bei BaF/wtEGFR und BaF/ERX. Die GFP-EMO-infizierte BaF/wtEGFR Zellen starben bis zum Tag elf fast vollständig ab, bis bei der nächsten Zählung am Tag 15 keine lebenden Zellen

mehr vorhanden waren. Die GFP-EMO-infizierten BaF/ERX Zellen proliferierten weiter, und die Zellzahl stieg bis zum Tag 15 nach Infektion wieder an. Unter dem Mikroskop und bei der durchflußzytometrischen Untersuchung konnten jedoch keine GFP-positiven Zellen beobachtet werden. Um eine eventuelle Infektion der Zellen zu untersuchen, wurden die infizierten Zellen lysiert und im Western-Blot auf die Expression von Virus-Proteinen untersucht. Es wurden hierbei Zellen verwendet, welche 22 Tage passagiert worden waren. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von Retroviren konnten an diesen Zellen folglich keine ursprünglichen Viruspartikel mehr angeheftet gewesen sein. 22 Tage nach Transduktion erfolgte die Lyse der Zellen, und je 60 µg Zelllysate wurden im Western-Blot analysiert. Die Inkubation erfolgte mit einem Env-Antikörper aus der Ziege sowie einem GFP-Antikörper aus dem Kaninchen und den entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern. Als Positivkontrolle wurden Zelllysate von GFP-EMO-transfizierten 293T (die zur Herstellung der Virusüberstände benutzt wurden) herangezogen.

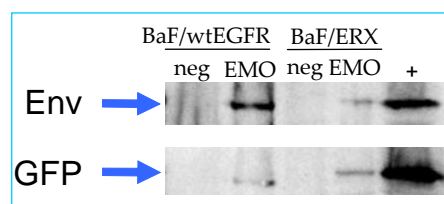


Abbildung 4-44 Analyse der Expression des viralen Hüllproteins Env in BaF/wtEGFR und BaF/ERX Zellen ohne und mit Behandlung dieser Zellen mit GFP-EMO-Virusüberständen. Im oberen Abschnitt ist die Membran mit einem Env-Antikörper behandelt worden, im unteren Abschnitt mit einem Antikörper gegen GFP. Als Positivkontrolle dienten GFP-MOV- infizierte NIH3T3 Zellen.

Die Banden in Abbildung 4-44 zeigen deutlich die Infektion der GFP-EMO-behandelten BaF-Zellen. Die GFP-EMO-behandelten Zellen zeigen eine deutliche Bande in der gleichen Höhe sowohl mit dem Env-Antikörper als auch mit dem GFP-Antikörper (ca. 110 kDa). Da die Zellen proliferierten und im WB positiv auf das virale Hüllprotein waren, sollte nun überprüft werden, ob Überstände dieser Zellen wiederum frische Zellen infizieren können. Es wurden hierbei die Zelllinien NIH3T3 als „Positivkontrolle“, HeLa als „Negativkontrolle“ und humane A431, die den EGF-Rezeptor exprimieren, als Testzellen benutzt. Zusätzlich wurden die Überstände auf BaF/3, BaF/wtEGFR und BaF/ERX Zellen gegeben. Je 3×10^5 Zellen wurden mit 5 ml Überstand behandelt. Die BaF-Zellen wurden auf Proliferation, die NIH3T3, HeLa und A431 im FACS auf Expression des GF-Proteins untersucht.

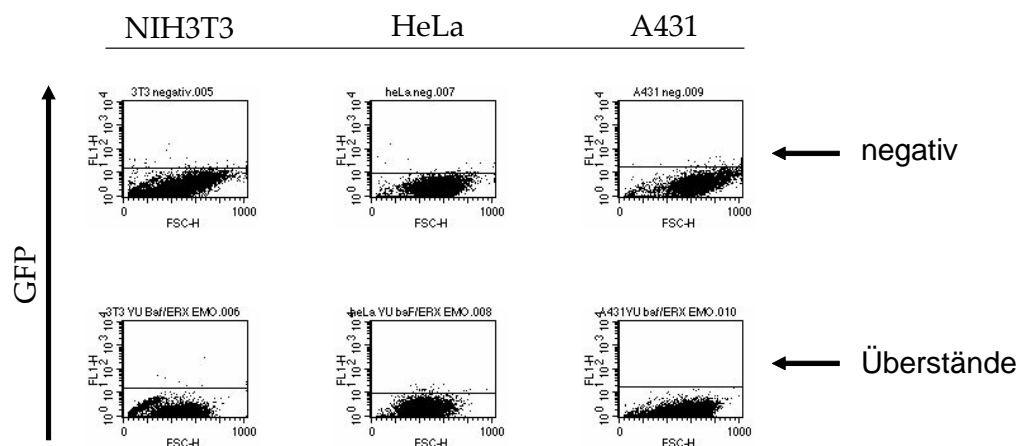


Abbildung 4-45 Durchflußzytometrische Analyse von NIH3T3, HeLa und A431 Zellen mit und ohne Behandlung mit Überständen der GFP-EMO-infizierten BaF Zellen.

Abbildung 4-45 zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse der adhärennten Zellen. Keine der untersuchten Zellen ist positiv auf GFP-Expression, was zeigt, dass die Zellen nicht infiziert worden sind. Ebenfalls sind alle behandelten BaF-Zellen innerhalb von vier Tagen abgestorben (Daten nicht gezeigt). Es wird deutlich, dass der Versuch der gerichteten Selektion von Virusvarianten, welche den endosomalen Abbau umgehen, nicht gelungen ist. Eine anfänglich erfolgreiche Infektion der BaF/ERX Zellen reichte nicht aus, um eine Virusvariante zu erhalten, die auf humanen EGFR-exprimierenden Zellen replizieren kann. Das Ergebnis der nicht erfolgten Infektion der murinen NIH3T3 Zellen mit den Überständen deutet darauf hin, dass sich keine Viren im Überstand befanden. Vielleicht gelang es den Zellen lediglich, das EGF-tragende Env-Protein zu exprimieren. Dies hätte ihnen das Überleben gesichert, allerdings erlaubten die Zellen keine Produktion von replikationskompetenten EGF-tragenden MLVs.

4.4 Einfügen von GFP in das amphotrope MLV-Hüllprotein

Das erfolgreiche Einfügen der Sequenzen für GFP in die prolinreiche Region des ecotropen Hüllproteins ermöglichte die direkte Beobachtung der Virusreplikation sowie die Untersuchung der Bindung von ecotropen Viruspartikeln an Zellen. Dieses Prinzip sollte

nun auf das amphotrope Hüllprotein übertragen werden. Hierzu wurden die GFP-Sequenzen an den N-Terminus des amphotropen Hüllproteins 4070A fusioniert. Spitzer *et al.* konnten 2003 zeigen (Spitzer *et al.*, 2003), dass diese Stelle im amphotropen Hüllprotein die Insertion toleriert. Nun sollte geprüft werden, ob ein derart modifiziertes Env im Vollängengenom des MLV zur Bildung von infektiösen, replikationskompetenten, GFP-markierten Viren führt.

Es wurden zwei unterschiedliche GFP-Envs kloniert. Als Grundgerüst wurde das Virus pC-AK-AiCD (Schneider *et al.*, 2003) gewählt. Das Virus besitzt am N-Terminus der Hüllproteins eine Blockierungsdomäne, die von Morling *et al.* (Morling *et al.*, 1997) beschrieben worden ist, und zwischen dem Env-Gen und der 3'-LTR eine IRES-CD (Cytosin Deaminase) Expressionskassette. Die Cytosin Deaminase ist ein kleines Enzym aus Hefe (Mullen *et al.*, 1994), das eine untoxische Vorstufe in ein toxisches Produkt umwandelt. Demzufolge ein typisches Suizidgen für die Gentherapie. Diese Expressionskassette ist von einzigartigen Restriktionsschnittstellen umrahmt, sodass an dieser Stelle einfacher Transgene inseriert werden können.

Die Blockierungsdomäne ist vom trimerisierenden Typ-2-Transmembranprotein CD40-Ligand (CD40L) abgeleitet. Am N-Terminus ist die membrandurchspannende Domäne deletiert. Erhalten sind die Trimerisierungsdomäne und der C-Terminus. Diese Sequenzen sind C-terminal an den N-Terminus des SU-Proteins fusioniert. Nach Abspaltung des Signalpeptids im ER bleibt das verkürzte CD40L-Molekül als N-terminale Domäne von Env erhalten. Eine Interaktion mit dem natürlichen Liganden CD40 ist durch die Fusion eines Typ-1- (Env) und eines Typ-2-Membranmoleküls (CD40L) nicht mehr möglich (Peng *et al.*, 1997). Der Mechanismus der Blockierung des Env beruht darauf, dass die beiden Proteine (Env und CD40L) als Trimer vorliegen und die Bindung des Env an seinen Rezeptor sterisch gehindert ist. Dies hat eine universelle Blockierung des Hüllproteins zur Folge.

Das Virus besitzt die einzigartigen Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* am N-Terminus des amphotropen Hüllproteins 4070A. Die an dieser Stelle ursprünglich sitzende Blockierungsdomäne CD40L wurde über *SfiI* und *NotI* herausgeschnitten und durch GFP-Sequenzen ersetzt. Zusätzlich zu diesem Plasmid pC-GFP-AiCD, wurde ein Virus kloniert,

bei dem die GFP-Sequenzen von *Spacer*- (engl.: Platzhalter) Sequenzen flankiert sind. Diese Strategie wandten Spitzer *et al.* (Spitzer *et al.*, 2003) an und es sollte überprüft werden, ob die Insertion flankierender *Spacer*sequenzen Einfluss auf Stabilität oder Infektiösität des rekombinanten Env hat.

4.4.1 Klonierung und Charakterisierung eines MLV mit den Sequenzen für GFP als Fusion am N-Terminus des amphotropen Hüllproteins

Für die Herstellung des pC-GFP-AiCD (siehe Abbildung 4-48) wurden die Sequenzen für GFP mittels PCR aus dem Expressionsplasmid pSG-EGFP (Lindemann *et al.*, 1997) amplifiziert, mit *Primern*, die an die Enden die jeweiligen Restriktionsschnittstellen einfügen (siehe Abbildung 4-46).

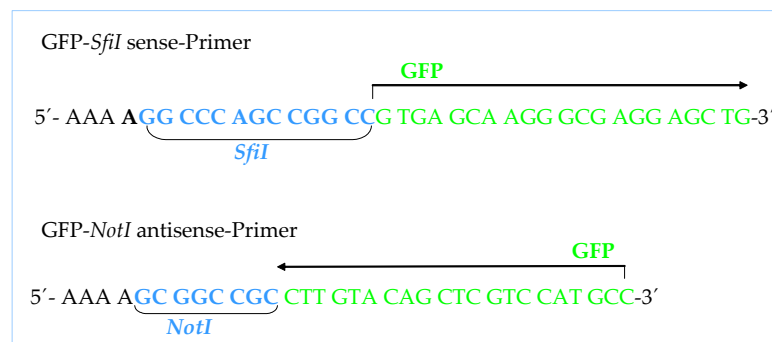


Abbildung 4-46 Zur Amplifikation des GFP verwendete *Primer* zur Klonierung des pC-GFP-AiCD.

Für die Herstellung des pC-GFP-aiCD-*Spacer* wurden die Sequenzen für GFP per PCR aus einem Expressionsplasmid pG-Flaep-C (Spitzer *et al.*, 2003) amplifiziert. Dieses Plasmid ist ein Expressionsplasmid für das amphotrope MLV-Env. Es trägt die Sequenzen für GFP umrahmt von *Spacer*sequenzen als Fusion am N-Terminus des amphotropen Envs. Die Amplifikation erfolgte mit *Primern*, die an die Enden die jeweiligen *Spacer*sequenzen zusätzlich vor die Restriktionsschnittstellen einfügen (siehe Abbildung 4-47).

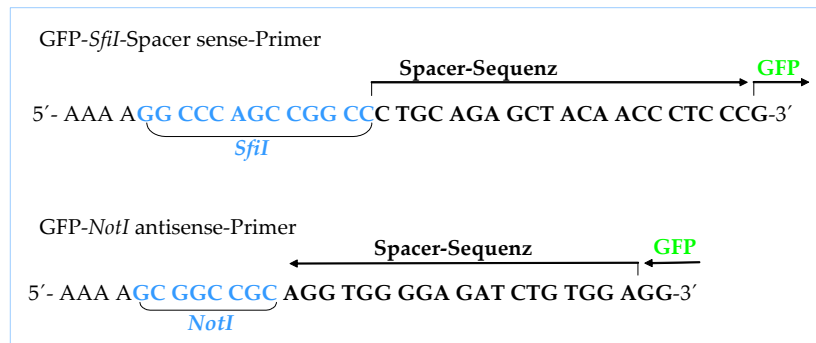


Abbildung 4-47 Zur Amplifikation des GFP und der Spacersequenzen verwendete Primer zur Klonierung des pC-GFP-AiCD-Spacer.

Nach dem jeweiligen Verdau mit den beiden Enzymen *SfiI* und *NotI* wurde das Fragment in das Virusgenom kloniert, aus dem die Blockierungsdomäne über *SfiI* und *NotI* entfernt worden ist (siehe Abbildung 4-48).

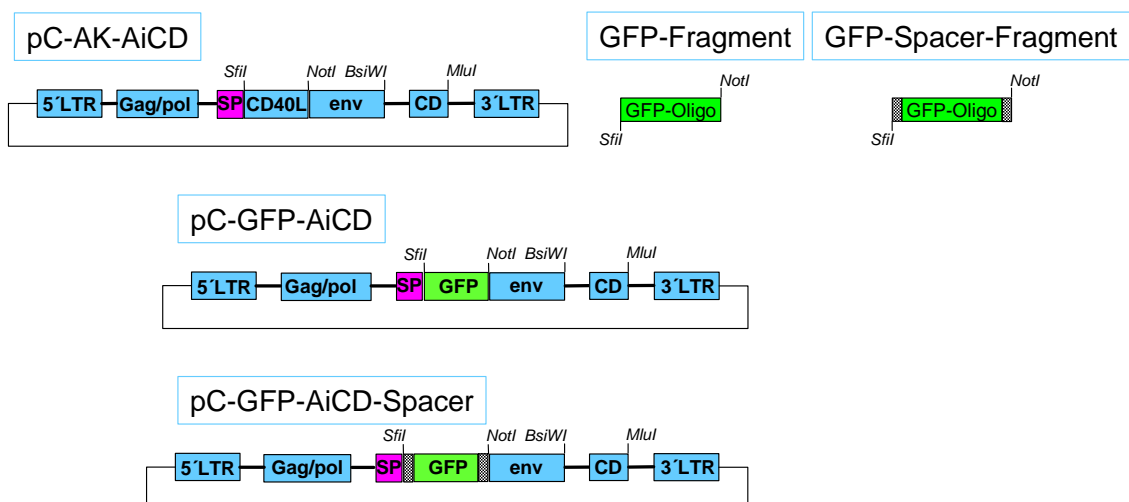


Abbildung 4-48 Schematische Klonierung der Viren pC-GFP-AiCD und pC-GFP-AiCD-Spacer. Die schraffierte schwarz-weiße Fläche stellt die Spacersequenz dar. Die rote Fläche stellt die Lage des Signalpeptids dar.

4.4.2 Charakterisierung der rekombinanten Viren

Um die Replikationsfähigkeit der beiden rekombinanten Viren zu testen, wurden 5×10^5 NIH3T3 Zellen mit je $2 \mu\text{g}$ des Virusgenoms mittels der FuGENE-Methode transfiziert. An den Tagen 2, 3, 5 und 7 wurden jeweils ca. 2×10^5 Zellen entnommen und deren Fluoreszenzeigenschaften durchflußzytometrisch bestimmt. Die Werte sind im Graphen in der Abbildung 4-49 dargestellt.

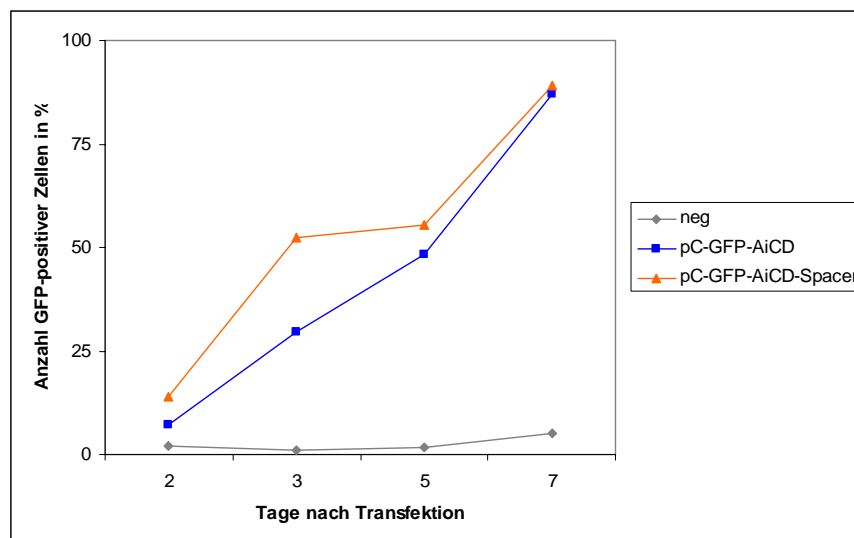


Abbildung 4-49 Replikationskinetik der rekombinanten amphotropen MLVs mit GFP als Fusion am N-Terminus mit und ohne *Spacer* in NIH3T3 Zellen. Die rote Linie zeigt den Anstieg GFP-positiver Zellen nach Transfektion mit dem amphotropen Virus, welches die Sequenzen für GFP (flankiert von *Spacer*sequenzen) trägt, die blaue Linie zeigt die Zellen nach Transfektion mit dem amphotropen MLV, welches das GFP ohne *Spacer* trägt.

Die Kinetik in der Abbildung 4-49 zeigt das Replikationsverhalten der beiden rekombinanten Viren in NIH3T3 Zellen. Es wird deutlich, dass die Insertion des GFP als Fusion an den N-Terminus des Env toleriert wird und zur Bildung von replikationskompetenten Viren führt. Ebenfalls ist kein signifikanter Unterschied im Replikationsverhalten zu erkennen. Die Wachstumskurve des *Spacer*-tragenden Virus scheint schneller anzusteigen als die des Virus ohne *Spacer*. Dies könnte auf die ursprünglich geringere Transfektionseffizienz des Virus ohne *Spacer* zurückzuführen sein. Unabhängig davon wird für weitere Arbeiten und Vergleiche das Virus mit der *Spacer*-GFP-Sequenz verwendet, da diese Insertionsart auch in der Literatur beschrieben und charakterisiert worden ist.

Das amphotrope Virus, welches die Sequenzen für GFP zusammen mit den *Spacer*sequenzen am N-Terminus trägt, hat eine Größe von 13242 Basenpaaren, während das GFP-MOV eine Größe von 12300 Basenpaaren hat. Das verlangsamte Replikationsverhalten des amphotropen Virus könnte auf die Genomgröße zurückgeführt werden. Die Beobachtung zeigt, dass alle zukünftig geplanten Insertionen von therapeutischen Genen an dieser Stelle die Größe von 1032 Basenpaaren (was der Größe der momentanen Insertion entspricht) nicht überschreiten sollten. Um das Virus weiter zu charakterisieren, wurde die CD-Region (Cytosin-Deaminase-Expressionskassette), welche eine Größe von 1032 Basenpaaren hat,

entfernt. Hierzu wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *BsiWI* und *MluI* geschnitten, mit der Klenow-Polymerase die überhängenden Enden aufgefüllt und die erst dann kompatiblen Enden anschließend mithilfe der Ligase wieder miteinander verbunden. Es entstand das Virus pC-GFP- Δ CD-*Spacer*, welches eine Genomgröße von 12206 Basenpaaren aufweist (Abbildung 4-50).

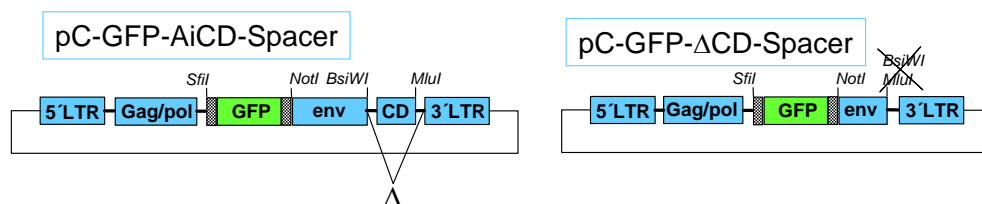


Abbildung 4-50 Schematische Klonierung des pC-GFP- Δ CD-*Spacer*.

Zur Untersuchung des Replikationsverhaltens des neuen Virus wurden NIH3T3 Zellen, welche am Tag zuvor zu je 5×10^5 Zellen in 6-Loch-Schalen ausgesät worden sind, mit je $2 \mu\text{g}$ der Virus-Plasmid-DNA mittels der FuGENE-Methode transfiziert. An den Tagen 2, 3, 5 und 7 nach Transfektion erfolgte eine FACS-Analyse von ungefähr 2×10^5 Zellen (Abbildung 4-51).

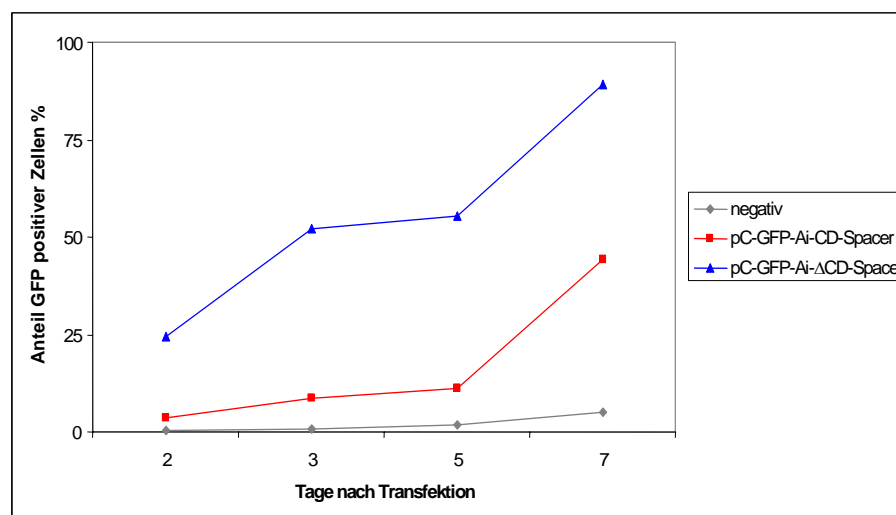


Abbildung 4-51 Replikationskinetik der amphotropen MLVs mit GFP als Fusion am N-Terminus und *Spacer* mit oder ohne CD-Region auf NIH3T3 Zellen. Die blaue Linie zeigt den Anstieg GFP-positiver Zellen nach Transfektion mit dem Virus ohne CD-Region, die rote Linie die Zellen nach Transfektion mit dem Virus, welches die CD-Region noch besitzt.

Abbildung 4-51 zeigt das Replikationsverhalten der beiden modifizierten Viren. Das Virus, welches keine CD-Region mehr trägt und somit um 1032 Basenpaare kleiner ist, scheint

schneller zu replizieren. Das kleinere Genom hat zusätzlich Auswirkungen auf eine größere Transfektionseffizienz, da der Versuchsansatz mit dem kleineren Virus am Tag zwei nach Transfektion bereits 24,5 % GFP-positive Zellen aufweist im Vergleich zu 3,68 % GFP-positiven Zellen nach Transfektion mit dem CD-Region-tragenden Virus. Die Daten unterstreichen die Notwendigkeit der Größenlimitierung eines später zu inserierenden Transgens auf eine Größe unter 1032 bp.

Um die neuen, rekombinanten, amphotropen Viren mit dem Replikationsverhalten des ecotropen GFP-MOV zu vergleichen, wurden in einem neuen Versuchsansatz 5×10^5 NIH3T3 Zellen mit je $2 \mu\text{g}$ GFP-MOV oder das amphotrope GFP-Virus mit *Spacer* mittels der FuGENE-Methode transfiziert. Hier sollte untersucht werden, ob und inwieweit sich das amphotrope und das ecotrope Virus in ihrer Replikation unterscheiden und ob die unterschiedlichen Insertionen einen erkennbaren Unterschied im Replikationsverhalten bewirken. An den Tagen 1, 2, 4, 7, 10 und 13 nach Transfektion wurden jeweils 5×10^5 Zellen entnommen und durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die ermittelten Prozentanteile GFP-positiver Zellen wurden in einem Graphen zusammengetragen (Abbildung 4-52).

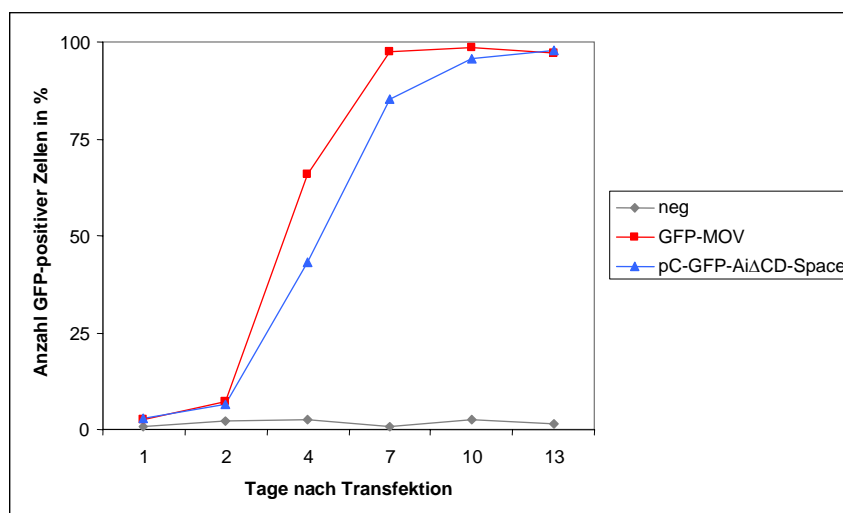


Abbildung 4-52 Replikationskinetik der rekombinanten ecotropen und amphotropen MLVs mit GFP als Fusion in der PRR bzw. am N-Terminus mit *Spacer* auf NIH3T3 Zellen. Die rote Linie zeigt den Anstieg GFP-positiver Zellen nach Transfektion mit dem ecotropen GFP-tragenden Virus, die blaue Linie die Zellen nach Transfektion mit dem amphotropen MLV, welches das GFP am N-Terminus getrennt durch einem *Spacer* trägt.

Abbildung 4-52 zeigt, dass sich die Viren in ihrem Replikationsverhalten nicht signifikant unterscheiden. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen, welche mit dem ecotropen Virus transfiziert wurden (rote Linie), steigt steiler an und könnte auf eine etwas verlangsamte Replikation des amphotropen Virus (blaue Linie) hindeuten. Allerdings führen beide Transfektionen am Ende zu einer kompletten Durchinfektion des Zellrasens. Die Fusion des GFP an den N-Terminus des amphotropen Hüllproteins war demzufolge erfolgreich, da das Virus replizieren kann und somit bewiesen worden ist, dass das Hüllprotein seine Infektiösität nicht verloren hat.

4.4.3 Untersuchung der Replikationseigenschaften der rekombinanten GFP-tragenden amphotropen MLVs auf humanen Zellen

Um das Replikationsverhalten der amphotropen, rekombinanten Viren auf humanen Zellen zu untersuchen, wurden je 5×10^5 293T Zellen (welche einen Tag zuvor ausgesät worden sind) mit je 2 μg der Virusplasmide mittels der FuGENE-Methode transfiziert. An den Tagen 3, 5, 7 und 10 nach Transfektion wurden je ungefähr 5×10^5 Zellen abgenommen und im FACS analysiert. Die Werte sind in der Abbildung 4-53 zusammengestellt.

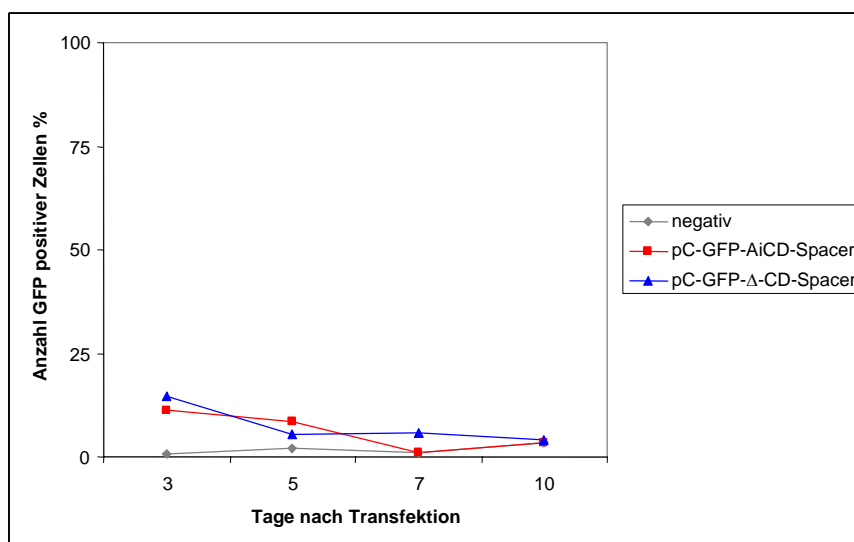


Abbildung 4-53 Replikationskinetik der Viren pC-GFP-AiCD-Spacer und pC-GFP- Δ CD-Spacer nach Transfektion auf 293T Zellen.

Abbildung 4-53 zeigt, dass obwohl die Replikation der Viren auf murinen Zellen ungestört verlief, die rekombinanten Viren nicht fähig waren, das grün fluoreszierende Protein in der transfizierten Population von humanen Zellen zu verteilen. Die anfängliche Transfektion erfolgte mit einer Effizienz von 11,39 % für das pC-GFP-AiCD-*Spacer*- und 14,47 % für das pC-GFP- Δ CD-*Spacer*-Virus. Anschließend konnte allerdings keine Virusreplikation mittels der Verteilung von GFP beobachtet werden.

Die NIH3T3 Zellen, welche mit den rekombinanten Viren transfiziert worden waren, zeigten am Tag sieben eine Durchinfektion des Zellrasens von 89,22 % nach Transfektion mit dem Virus pC-GFP-AiCD-*Spacer* und von 44,21 % mit dem verkürzten Virus pC-GFP- Δ CD-*Spacer*. Um dem Problem der fehlenden Replikationsfähigkeit auf humanen Zellen auf den Grund zu gehen, sollte untersucht werden, ob die Virusüberstände dieses Versuchs humane Zellen infizieren können. Hierdurch könnten technische Fehler wie zum Beispiel zu geringe Titer zu Beginn des Versuchs ausgeschlossen werden. Von den infizierten NIH3T3 Zellen (siehe Abbildung 4-51) wurden die Überstände abgenommen, sterilfiltriert und je 2 ml auf je 2×10^5 Zellen in einer 6-Loch-Schale gegeben. Verwendung fanden die humanen Zellen A431, HeLa und 293T sowie NIH3T3 als Positivkontrolle. Einen Tag nach der Infektion wurde ein Teil der Zellen durchflußzytometrisch auf seine Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die Werte sind in Abbildung 4-54 dargestellt.

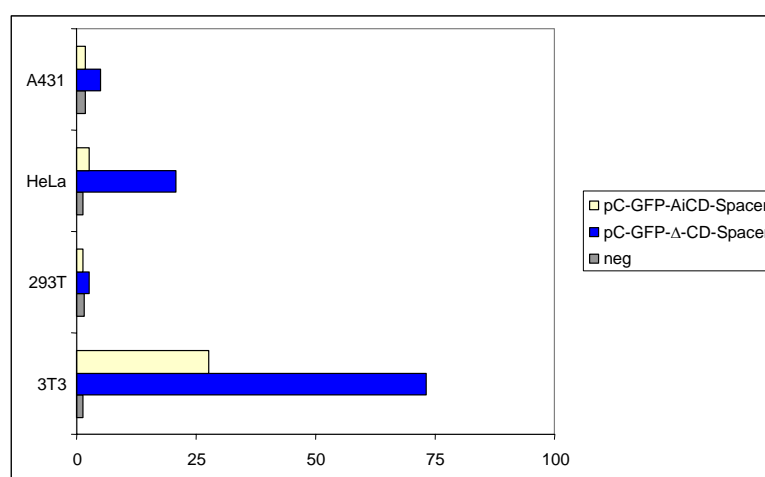


Abbildung 4-54 Infektionstiter der rekombinanten Viren auf unterschiedlichen Zellen.

Abbildung 4-54 wiederholt und bestätigt das beobachtete Ergebnis im vorhergehenden Versuch. Die Infektion der NIH3T3 Zellen entspricht den Prozentanteilen der GFP-positiven Zellen der Ursprungspopulation, von welcher die Virusüberstände gesammelt worden sind. Die humanen Zellen A431 und 293T ließen sich nicht signifikant mit den amphotropen, rekombinanten Viren infizieren, HeLa-Zellen zu einem geringen Prozentsatz. Auch in diesem Versuchsansatz wurden die infizierten Zellen weiterkultiviert, um eine Verbreitung des Virus in der Zellkulturschale zu ermöglichen. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen änderte sich jedoch nicht signifikant bzw. ging der Wert der GFP-positiven Zellen in dem Versuchsansatz mit den Linien A431 und HeLa sogar zurück (Daten nicht gezeigt). Die geringe Transduktionseffizienz der humanen Zellen und die im weiteren Verlauf des Experiments fehlende Verteilung des Virus innerhalb der Zellpopulation warfen Fragen auf. Am zehnten Tag nach Infektion/Transduktion der 293T Zellen wurden die Zellüberstände abgenommen, sterilfiltriert, und je 3 ml auf 3×10^5 NIH3T3 Zellen gegeben. Diese Zellen zeigten sich als permissiv für das rekombinante, amphotrope Virus. Es sollte überprüft werden, ob die humanen Zellen eventuell Viren produzierten, diese jedoch keine neuen humanen Zellen, vielleicht jedoch murine Zellen infizieren könnten. 24 Stunden später wurden die NIH3T3 Zellen durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht und die Daten in einem Balkendiagramm zusammengetragen (Abbildung 4-55).

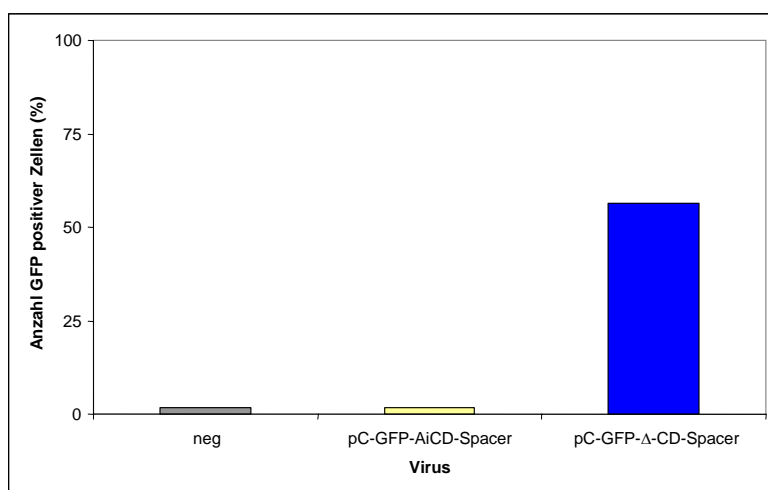


Abbildung 4-55 Transduktionstiter der rekombinanten Viren auf NIH3T3.

Die 293T Zellen, von welchen die Überstände abgenommen wurden, waren nicht signifikant GFP-positiv. Abbildung 4-55 macht deutlich, dass es gelungen ist, NIH3T3 Zellen mit den

Überständen dieser Zellen zu 56,75 % (mit dem Virusüberstand *pc-GFP-ΔCD-Spacer*) zu infizieren. Dieses Virus ist auch weiterhin replikationsfähig, da es nach Weiterpassagierung der Zellen zu einer Erhöhung der Anzahl der GFP-positiven Zellen innerhalb der Zellpopulation kam (Daten nicht gezeigt). Zusammengenommen sind alle diese Daten und Ergebnisse nicht eindeutig interpretierbar. Die humanen Zellen schienen infiziert zu sein und produktiv infektiöse Partikel zu bilden, allerdings ist die Virusreplikation in diesen Zellen nicht anhand von GFP detektierbar.

Um diese These zu untermauern, wurden die transduzierten/infizierten, humanen Zellen aus Abbildung 4-54 lysiert, um anhand eines Western-Blots mit einem Antikörper gegen das Hüllprotein Env das Vorhandensein viraler Proteine innerhalb der Zelle zu untersuchen. Die Inkubation der Membran, auf welche 60 µg Zellysate geblottet worden waren, erfolgte mit einem Antikörper gegen Env und anschließend mit dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper. Abbildung 4-56 zeigt das Ergebnis nach unterschiedlichen Expositionszeiten.

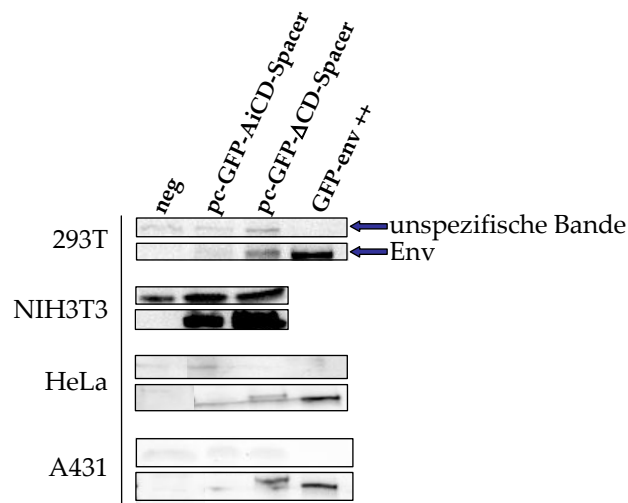


Abbildung 4-56 Untersuchung der Expression des viralen Hüllproteins Env in unterschiedlichen infizierten/transduzierten Zellen. Der obere Abschnitt stellt eine unspezifische Bande dar, welche vom Env-Antikörper produziert wird, und dient somit als Kontrolle für eine gleichmäßige Ladung. 293T, NIH3T3, HeLa und A431 Zellen wurden mit den Viren *pc-GFP-aiCD-Spacer* und *pc-GFP-ΔCD-Spacer* infiziert. Als Positivkontrolle dienten GFP-env-transfizierte Zellen.

Abbildung 4-56 zeigt, dass die humanen Zellen tatsächlich infiziert waren, da sie eine Env-Protein-Bande (ca. 110 kDa) nach Infektion/Transduktion mit beiden Viren, am deutlichsten

mit dem Virus pc-GFP- Δ CD-*Spacer* aufwiesen. Die NIH3T3 Zellen dienten hierbei als Positivkontrolle. Die Ergebnisse zeigten, dass sich das N-terminal modifizierte amphotrope Hüllprotein nicht effizient in humanen Zellen verbreiten konnte, während die Replikation auf murinen Zellen ohne signifikante Unterschiede zum ecotropen Hüllprotein möglich zu sein schien. Für Arbeiten mit humanen Zellen ist dieses modifizierte Virus in seiner momentanen Form ungeeignet.

4.5 shRNA als therapeutisches Gen

Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit konzentrierten sich auf die Herstellung rekombinanter MLV als Vektoren für Gentherapie. Der letzte Abschnitt beschäftigte sich nun mit dem therapeutischen Gen, welches mittels der Viren in das gewünschte Gewebe gezielt eingebracht werden sollte.

Die Expression von shRNAs (*short hairpin RNAs* = kurze Haarnadelstruktur RNAs) unter der Kontrolle eines Polymerase III-Promotors ist eine gut etablierte Methode der spezifischen Herunterregulierung von Genen. Eine Hürde stellt hierbei allerdings die Bestimmung des geeigneten Locus innerhalb des Gens dar. Inzwischen gibt es verschiedenste Algorithmen, anhand derer die Suche der geeigneten siRNA-Sequenzen innerhalb eines Gens erleichtert wird. Allerdings empfiehlt es sich hierbei, mehrere Sequenzen gleichzeitig in ihrer Fähigkeit die Proteinexpression herunterzuregulieren auszutesten.

In dieser Arbeit wurden als Zielsequenzen Gene gewählt, welche in Tumorzellen oft überexprimiert oder konstitutiv aktiv sind: der Signalübergeber und Aktivator der Transkription STAT3 sowie der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR.

Bei der Wahl von geeigneten Sequenzen, die in der Lage sind, die Proteinexpression effizient herunterzuregulieren, wurde auf bereits beschriebene Sequenzen aus der Literatur zurückgegriffen. Für STAT3 wurden drei beschriebene siRNA-Sequenzen ausgewählt. Die Sequenzen befinden sich in der *coiled-coil*-Domäne des STAT3-Moleküls im Falle der STAT3-

shRNA1 (Aminosäuren 227-245) (Lee *et al.*, 2004) und in der DNA-Bindedomäne in den Fällen von STAT3-shRNA2 (Aminosäuren 769-789) (Konnikova *et al.*, 2003) und STAT3-shRNA3 (823-842) (Baus and Pfitzner, 2006). Bei den veröffentlichten Sequenzen handelt es sich um siRNAs, welche die mRNA des humanen STAT3 zum Ziel haben. Das in dieser Arbeit verwendete STAT3 ist murinen Ursprungs. Eine Sequenzüberprüfung ergab, dass die Sequenzen für humanes und murines STAT3 nicht exakt übereinstimmen. Die Sequenzen wurden miteinander verglichen und für jede siRNA an die murine Sequenzabfolge angepasst (siehe Abbildung 4-57).

	(228)	228		240	
shRNA-STAT3-1 (human)	(1)	TGT	TCTCTATCAGCACAA	T---	
STAT3 mouse	(228)	TGT	CCTCTATCAGCACAA	CCTT	
Consensus	(228)	TGT	CTCTATCAGCACAA		
	(769)	769		780	7
shRNA-STAT3-2 (human)	(1)	AACATCTGCCT	AGATCCGCT	TA-	
STAT3 mouse	(769)	AACATCTGCCT	GACCGTCT	GG	
Consensus	(769)	AACATCTGCCT	GA	CG	CT
	(823)	823		830	840
shRNA-STAT3-3 (human)	(1)	CTTCAGACCCG	CAACAAAT	--	
STAT3 mouse	(823)	CTTCAGACCCG	CAACAAAT	TA	
Consensus	(823)	CTTCAGACCCG	CAACAAAT		

Abbildung 4-57 Darstellung der Abgleichung der humanen, publizierten siRNA-Sequenzen mit den Maussequenzen. Die Basen wurden beim Maus-shRNA-Design entsprechend ausgetauscht.

Die derart angepassten Sequenzen wurden als Oligonukleotide synthetisiert. Die einzelsträngigen, komplementären Nukleotide hybridisiert, phosphoryliert und anschließend in den *BglIII/HindIII*-geschnittenen pSUPER-Vektor kloniert. Der pSUPER-Vektor ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines H1-Polymerase III-Promotors, von welchem die shRNA-Synthese erfolgt (Brummelkamp *et al.*, 2002). Die kurzen, komplementären Sequenzen falten sich nach Transkription zu kleinen Haarnadelstrukturen zusammen, welche im Zytoplasma anschließend von *Dicer* in siRNAs gespalten werden. Nach Bestätigung der richtigen Sequenz mittels Sequenzierung erfolgte eine Kotransfektion der Plasmide in 293T Zellen. Da STAT3 endogen in allen Zellen exprimiert wird und eine geringe Transfektionseffizienz dazu führen könnte, dass nicht genügend siRNA-Moleküle in die Zelle gelangen, um das relativ hohe Niveau der endogenen Expression signifikant herunterzuregulieren, wurde auf die Methode der Kotransfektion zurückgegriffen. Hierbei wird das pSUPER-Plasmid zusammen mit einem Expressionsplasmid für das Zielprotein gleichzeitig in einer Zelle exprimiert. Der Trick ist hierbei, dass das Zielprotein vom Plasmid

mit einer Markierung versehen ist, die es erlaubt, im Western-Blot nur die vom Plasmid exprimierten Proteine zu detektieren. Benutzt wurde das Plasmid pRC-CMV-STAT3-FLAG (E. Pfitzner, Frankfurt am Main, unveröffentlicht), welches ein FLAG-markiertes STAT3-Protein unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert (ca. 70 kDa). 293T Zellen, welche einen Tag vor Transfektion zu 2×10^5 Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät worden waren, wurden mittels der FuGENE-Methode in gleichen Verhältnissen mit der Plasmid-DNA kotransfiziert:

- 1 μ g pRCC-STAT3-FLAG + 1 μ g pSUPER-EGFR
- 1 μ g pRCC-STAT3-FLAG + 1 μ g pSUPER-STAT3-1
- 1 μ g pRCC-STAT3-FLAG + 1 μ g pSUPER-STAT3-2
- 1 μ g pRCC-STAT3-FLAG + 1 μ g pSUPER-STAT3-3

48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen in jeweils 200 μ l Lysispuffer. Dem Blotten der elektrophoretisch aufgetrennten 25 μ g Zellysate folgte die Inkubation mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop sowie dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper. Abbildung 4-58 zeigt im oberen Abschnitt das Ergebnis.

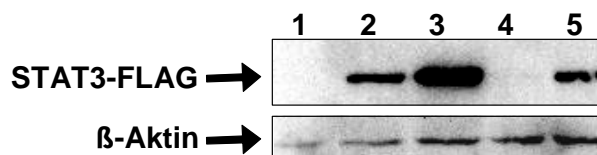


Abbildung 4-58 Identifizierung funktioneller shRNAs gegen STAT3. 293T wurden kotransfiziert mit dem pRC-CMV-STAT3-FLAG und den respektiven pSUPER-Plasmiden. Beschreibung siehe Text.

In die erste Spur wurden Zellysate von untransfizierten 293T Zellen aufgetragen, in der zweiten Spur ist das Ergebnis nach Kotransfektion der Plasmide STAT3-FLAG und des pSUPER-Plasmids, welches die STAT3-1-shRNA exprimiert, zu sehen. In der dritten Spur wurde pSUPER-STAT3-2, in der vierten Spur pSUPER-STAT3-3 kotransfiziert mit dem STAT3-FLAG Expressionsplasmid. Spur fünf zeigt die Kotransfektion von pSUPER, welcher eine irrelevante shRNA gegen EGFR exprimiert. Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin bestätigt (ca. 45 kDa). Der Western-Blot in Abbildung 4-58 zeigt deutlich, dass die shRNA STAT3-3 am effektivsten

in der Herunterregulierung des Zielproteins ist. Diese Sequenz wurde für alle weiteren Arbeiten verwendet.

Die gleiche Prozedur erfolgte bei der Suche nach einer geeigneten siRNA-Sequenz gegen den humanen, epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR. Auch hier wurde auf eine Sequenz zurückgegriffen, welche von Winfried Wels (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) bereits ausgetestet und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden ist. Da es sich um eine RNA-Sequenz handelte, musste sie in eine DNA-Sequenz, welche für die Expression über das pSUPER-Expressionsplasmid geeignet ist, umgewandelt werden. Die Sequenzen wurden als Oligonukleotide synthetisiert, phosphoryliert und anschließend in den *BglIII/HindIII*-geschnittenen pSUPER-Vektor kloniert. Nach Bestätigung der richtigen Sequenz per Sequenzierung erfolgte eine Transfektion des Plasmids zusammen mit dem für das Zielprotein kodierenden Plasmid in 293T Zellen mittels des FuGENE-Reagenz. Da 293T Zellen endogen keinen EGF-Rezeptor exprimieren, wird keine besondere Markierung des Proteins benötigt. Ein EGFR-Expressionsplasmid wurde entweder alleine transfiziert oder zusammen mit dem pSUPER-EGFR oder dem pSUPER-CD4-Expressionsplasmid. pSUPER-CD4 kodiert eine shRNA, welche gegen den humanen CD4-Rezeptor gerichtet ist und diente in diesem Versuch als unspezifische Kontrolle. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen in jeweils 200 µl Lysispuffer. Dem Blotten der aufgetrennten 60 µg Zelllysate folgte die Inkubation mit einem Antikörper, welcher gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist und anschließend dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper. Abbildung 4-59 zeigt das Ergebnis des Western-Blots.

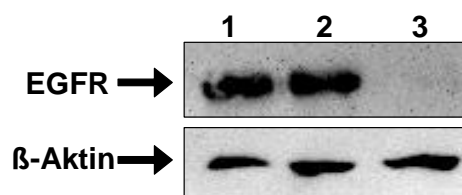


Abbildung 4-59 Testung der shRNA gegen den EGF-Rezeptor auf Effizienz in der Herunterregulation des EGFR-Proteins. 293T Zellen wurden entweder alleine mit dem pLTR-EGFR transfiziert, oder in gleichen Mengen mit einem shRNA-kodierenden Plasmid. Beschreibung siehe Text.

In die erste Spur wurden Zelllysate von 293T Zellen aufgetragen, welche nur mit dem pLTR-EGFR-Plasmid transfiziert worden sind (ca. 170 kDa). In der zweiten Spur ist das Ergebnis

nach Kotransfektion der Plasmide pLTR-EGFR und des pSUPER-CD4-Plasmides zu sehen. In der dritten Spur wurde pSUPER-EGFR kotransfiziert mit dem pLTR-EGFR Expressionsplasmid. Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde mittels der Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin bestätigt. Die nicht vorhandene Bande in der Spur drei des Western-Blots in Abbildung 4-59 zeigt deutlich, dass die EGFR-shRNA effektiv in der Herunterregulierung des Zielproteins EGFR ist.

4.5.1 Herstellung von replikationskompetenten shRNA-Expressionskassetten tragenden MLVs

Die größte Herausforderung in der therapeutischen Anwendung von si/shRNA ist immer noch die adäquate und effiziente *in vivo* Applikation. Um dieses Problem zu umgehen, sollte die shRNA-Expressionskassette in ein replikationskompetentes MLV eingebaut werden. Die Replikation des Virus in den Zielzellen sollte eine effiziente Verteilung der shRNA-Expressionskassette bewirken. Als Basis der Klonierung diente hierbei das Virus pZAPm-GFP (siehe 4.1.1 und 4.3.1.2). Dieses Plasmid kodiert das gesamte Genom eines ecotropen MLV und trägt zusätzlich am 5'-Ende des Hüllproteins eine IRES-GFP-Expressionskassette, welche von einmaligen Restriktionsschnittstellen flankiert ist. Diese Expressionskassette sollte durch die shRNA-Expressionskassette ersetzt werden. Um die Virusreplikation weiterhin anhand von Fluoreszenzproteinen einfach detektierbar zu machen, wurden die Sequenzen für GFP in die prolinreiche Region des ecotropen Hüllproteins kloniert. Hierzu wurden die Sequenzen für das Hüllprotein, welches das GFP in der prolinreichen Region trägt, über *HpaI* aus dem pSG-wtEnv-GFP Vektor direkt in den *HpaI*-verdauten pZAPm-GFP Vektor ligiert. Abbildung 4-60 zeigt die Klonierung schematisch. Es entstand das Virus pZAP-GFP-ENV-IRES-GFP.

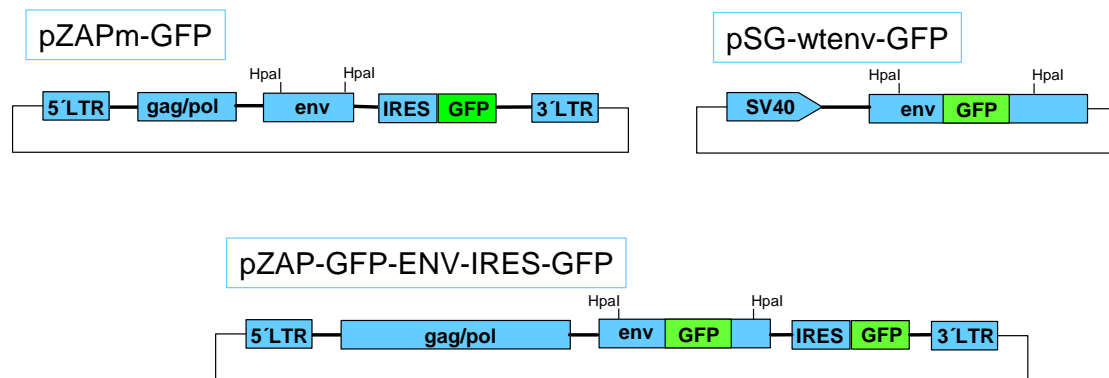


Abbildung 4-60 Schematische Darstellung der Klonierung des pZAP-GFP-ENV-IRES-GFP.

Im nächsten Schritt der Klonierung erfolgte der Austausch der IRES-GFP-Expressionskassette gegen die shRNA-Expressionskassette. Hierzu wurde die Expressionskassette samt H1-Promotor und shRNA-Sequenzen über *NotI* und *HindIII* aus dem pSUPER-Plasmid entfernt und in den *MluI* (*blunt*)- und *NotI* (*sticky*)-verdauten Vektor ligiert (siehe Abbildung 4-61). Die Insertion der Expressionskassette erfolgte somit entgegen der Leserichtung des Virusgenoms. Die Klonierung wurde sowohl mit dem pSUPER-STAT3-3 als auch mit dem pSUPER-EGFR durchgeführt. Die Beschriftung des entstandenen Virus mit pZAP-GFP-Env-shRNA steht symbolisch für beide shRNA-tragenden Viren.

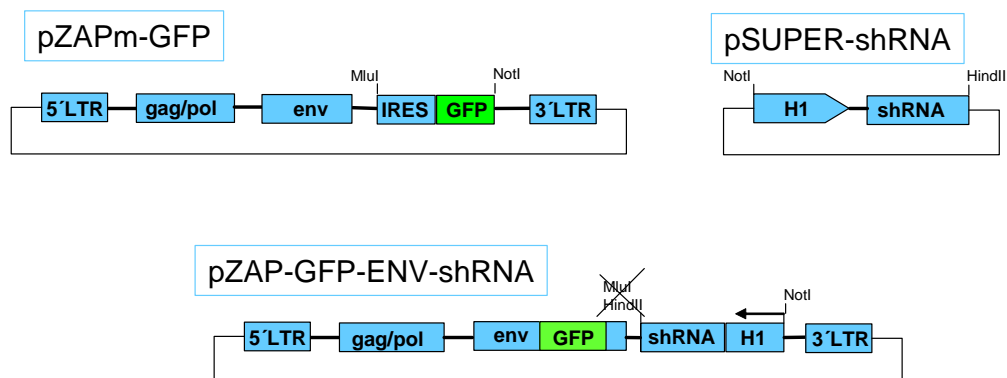


Abbildung 4-61 Schematische Darstellung der Klonierung des pZAP-GFP-Env-shRNA.

Die rekombinanten Viren wurden zunächst auf ihre Replikationsfähigkeit in NIH3T3 Zellen getestet. Hierzu wurden je 2 µg Plasmid-DNA der in Abbildung 4-62 dargestellten Viren in 2×10^5 NIH3T3 Zellen mittels der FuGENE-Methode transfiziert.

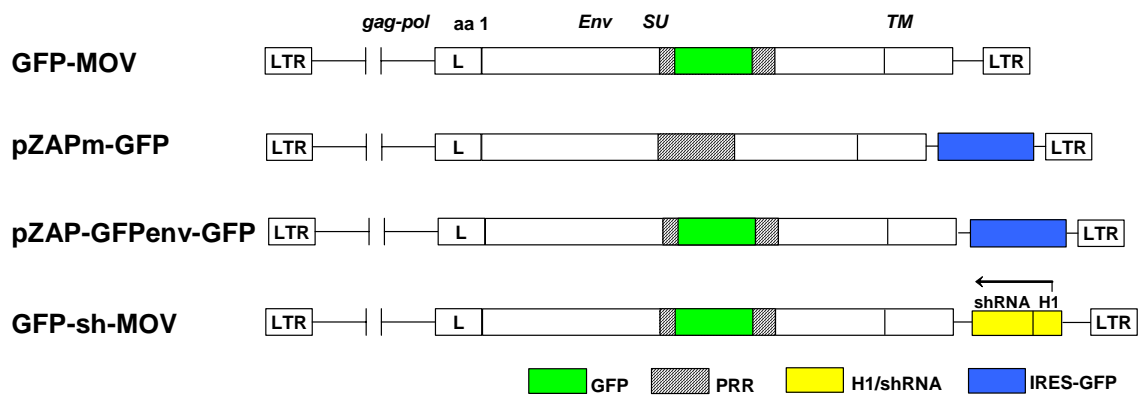


Abbildung 4-62 Schematische Darstellung der rekombinanten Viren. GFP: Grün fluoreszierendes Protein; PRR: prolinreiche Region; H1/shRNA: H1-Polymerase III-Promotor und shRNA; IRES-GFP: IRES-GFP-Expressionskassette.

Zur Herstellung einer Replikationskinetik wurden die transfizierten Zellen an den Tagen 3, 6, 7 und 9 durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Abbildung 4-63 zeigt die Werte nach Auftragung gegen die Tage nach Transfektion.

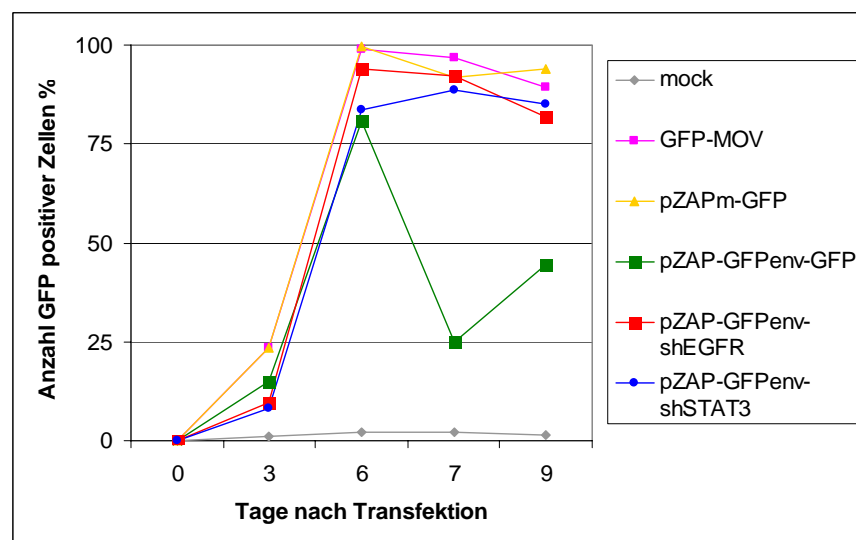


Abbildung 4-63 Replikationskinetik der rekombinanten Viren auf NIH3T3 Zellen.

Die Replikationskinetiken zeigen, dass die Insertion der shRNA-Expressionskassette keinen inhibierenden Einfluss auf die Replikation des Virus hatte, was eine Deletion der shRNA-Kassette als Folge haben könnte. Es replizierte mit einer ähnlichen Kinetik wie das Vorläufervirus pZAPm-GFP. Das Virus pZAP-GFPenv-IRES-GFP zeigt Unregelmäßigkeiten in der Replikation. Die gesamte Genomgröße dieses modifizierten Virus pZAP-GFPenv-IRES-GFP beträgt 12992 Basenpaare und stößt somit an die Grenzen der Verpackbarkeit des

Virusgenoms in Viruspartikel. Die abfallende Replikationskinetik deutet auf Deletionen des Fluoreszenzproteins hin. Dieses Ergebnis macht gleichzeitig deutlich, dass alle eventuell inserierten Transgene an die Stelle der IRES-GFP-Expressionskassette kleiner sein müssen als die Kassette selbst, um Stabilität und Verpackbarkeit des Genoms zu gewährleisten.

4.5.2 Effekt der shRNA-tragenden replikationskompetenten Viren auf die Proteinexpression der Zielgene

Um zu überprüfen, ob die Replikation der shRNA-tragenden Viren zur Verbreitung der shRNA-Expressionskassette innerhalb der Zellkulturschale führt, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Die gewählte siRNA erkennt unterschiedliche Varianten des Rezeptors: EGFR, die natürlich vorkommende Variante, sowie EGFRvIII, die konstitutiv aktive, in der Entstehung von Tumoren am meisten beteiligte Variante des Rezeptors (Wikstrand *et al.*, 1997).

DHΔE Zellen sind NIH3T3 Zellen, welche mit der konstitutiv aktiven Mutante des Rezeptors EGFRvIII stabil transfiziert sind. Diese Zellen wurden mit je 2 µg der viralen Genome GFP-MOV und pZAP-GFPenv-shEGFR transfiziert und fünf Tage später zur Herstellung von Gesamtzelllysaten lysiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Bestimmung des Prozentanteils infizierter Zellen zuvor zur FACS-Analyse eingesetzt (Abbildung 4-64 rechts).

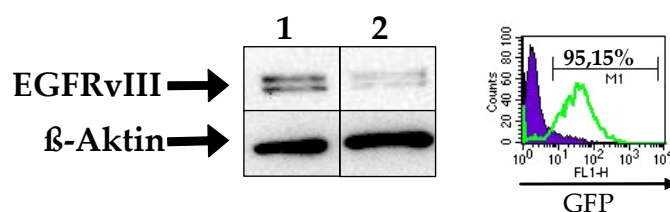


Abbildung 4-64 Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten von pZAP-GFPenv-shEGFR infizierten DHΔE Zellen. Beschreibung siehe Text.

Die Inkubation der geblotteten 20 µg Gesamtzelllysate mit einem Antikörper gegen EGFR und dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper ergab das Bild in Abbildung

4-64 links. Spur eins zeigt DHΔE Zellen infiziert mit GFP-MOV, Spur zwei DHΔE Zellen infiziert mit pZAP-GFPenv-shEGFR. Der untere Abschnitt diente als Kontrolle einer gleichmäßigen Ladung und wurde mit einem β -Aktin Antikörper inkubiert. Die reduzierte Bande in Spur zwei zeigt eine signifikant geringere Proteinexpression des EGFRvIII (ca. 170 kDa) und bestätigt damit die Effizienz der shRNA. Die Infektion der Zellen mit dem Wildtypvirus hatte keinen reduzierenden Einfluss auf die Proteinexpression (siehe Abbildung 4-64 Spur eins). Der rechte Teil der Abbildung zeigt die durchflußzytometrische Bestimmung GFP-positiver Zellen innerhalb der infizierten Population. Es waren 95 % infiziert.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit dem shSTAT3-Virus erzielt werden. Für den Versuch wurden in einer 6-Loch-Schale 2×10^5 NIH3T3 Zellen mit 2 μ g des pZAP-GFPenv-shSTAT3-Plasmids mittels der FuGENE-Methode transfiziert und anschließend passagiert. Am Tag zwei nach Transfektion wurde der prozentuale Anteil der infizierten Zellen mittels FACS-Analyse mit 1,68 %, am Tag sechs nach Transfektion mit 28,38 % bestimmt. Da die Viren bereits zuvor als gleich replizierend beschrieben worden sind, ist die langsame Replikation des Virus mit einer geringen Transfektionseffizienz zu erklären. Am Tag zehn nach Transfektion wurde die Zellpopulation geteilt. Ein Teil wurde lysiert und für den Western-Blot verwendet (Abbildung 4-65 A), der andere Teil weiter passagiert. Am Tag 37 nach Transfektion wurde ein kleiner Teil der Zellen zur durchflußzytometrischen Bestimmung verwendet. Abbildung 4-65 B zeigt, dass 81,37 % der Zellen infiziert waren. Der Hauptanteil der Zellen wurde lysiert und für die Western-Blot-Analyse verwendet (Abbildung 4-65 B).



Abbildung 4-65 Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten von pZAP-GFPenv-shSTAT3-infizierten NIH3T3 Zellen. **A:** Western-Blot-Analyse 10 Tage nach Transfektion. **B:** Western-Blot-Analyse 37 Tage nach Transfektion. Beschreibung siehe Text.

Lysate von infizierten und nicht infizierten NIH3T3 Zellen wurden mit einem Antikörper gegen STAT3 analysiert. Ein Antikörper gegen β -Aktin wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung verwendet. Abbildung 4-65 A zeigt die Ergebnisse zehn Tage nach Transfektion. In Spur eins wurden Lysate von uninfizierten Zellen geladen, in Spur zwei Lysate von pZAP-GFPenv-shSTAT3 infizierten NIH3T3 Zellen. Der untere Abschnitt zeigt die Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung. Die Abbildung 4-65 A zeigt deutlich, dass die STAT3-Proteinbande (ca. 70 kDa) im Vergleich zu nicht infizierten Zellen verringert ist. Zu diesem Zeitpunkt waren aufgrund einer verlangsamten Replikation des Virus nur 28,38 % (Daten nicht gezeigt) der Zellen infiziert. 37 Tage nach Transfektion wurde die weiterpassagierte Zellpopulation erneut lysiert und auf STAT3-Proteinexpression untersucht. Zu diesem Zeitpunkt waren laut FACS-Analyse 81,37 % GFP-positiv. Dieses Ergebnis ist auch in der Proteinmenge des STAT3-Proteins wieder zu finden. In Abbildung 4-65 Spur eins sind Lysate von uninfizierten Zellen geladen, in Spur zwei Lysate von pZAP-GFPenv-shSTAT3-infizierten NIH3T3 Zellen. Ein Antikörper gegen β -Aktin wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung verwendet. Das Ergebnis ist im unteren Abschnitt zu sehen. Es ist ein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression des Zielproteins der shRNA, dem STAT3-Protein zu beobachten. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass endogene Proteine auch längerfristig von den shRNA-exprimierenden Viren herunterreguliert werden können.

4.5.3 Genomische Stabilität der rekombinanten Viren

Replizierende Retroviruspopulationen sind für ihre hohe Mutationsrate bekannt. Eine Insertion von zusätzlichen 1300 Basenpaaren in die 3'-untranslatierte Region des *env* allerdings ist für über acht Infektionsrunden genetisch stabil (Logg *et al.*, 2001). Die Insertion der 360 Basenpaare großen shRNA-Expressionskassette sollte folgerichtig ebenfalls stabil im Virusgenom inseriert bleiben. Die Ergebnisse der erfolgreichen langfristigen Herunterregulation der Proteinexpression ließen einen ersten Schluss auf die Stabilität des Virus zu. Dies sollte anhand von PCR-Untersuchungen der genomischen DNA infizierter Zellen bestätigt werden (Abbildung 4-67). NIH3T3 Zellen wurden mit dem STAT3-shRNA-Virus transfiziert. Um eine komplette Durchinfektion der Zellen zu garantieren, erfolgte eine

Passagierung der transfizierten Zellen für neun Tage, bevor die Überstände an Tag neun abgenommen, sterilfiltriert und je 1 ml auf frisch ausgesäte 2×10^5 NIH3T3 Zellen gegeben wurden. Diese Prozedur wiederholte sich für vier weitere Infektionsrunden. Jeweils am Tag der Abnahme der Überstände zur Neuinfektion erfolgte eine Lyse der Zellen zur Isolierung genomischer DNA. Die ursprünglich transfizierten Zellen wurden weiterpassagiert und am Tag 43 nach Transfektion ebenfalls zur Lyse und PCR-Analyse herangezogen. Als Kontrollen des Experimentes wurden 293T Zellen, in welchen das Virus nicht replizieren kann, in der gleichen Anzahl ausgesät und mit dem rekombinanten shRNA tragenden ecotropen Virus oder dem Wildtyp-Virus transfiziert. Diese Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion lysiert und zur Herstellung genomischer DNA herangezogen. Als Kontrollen für die PCR Reaktion wurden drei Ansätze mit Plasmid-DNA mitgeführt: Das shRNA-tragende Virus, das Wildtyp-Virus sowie das Virus, welches die IRES-GFP-Expressionskassette anstatt der shRNA-Expressionskassette hinter dem Env trägt. Die *Primer* waren so gewählt, dass sie die gesamte Expressionskassette flankierten (Abbildung 4-66).

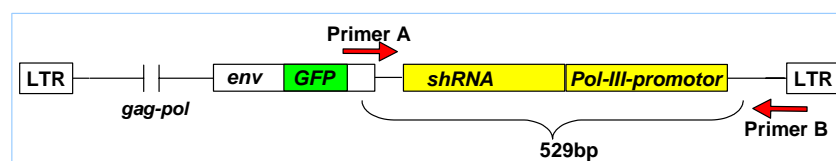


Abbildung 4-66 Schematische Darstellung der Lage der *Primer* zur Untersuchung der genomischen Stabilität des pZAP-GFPenv-shSTAT3.

Deletionen würden bei diesem PCR-Design als ein bzw. mehrere verkürzte PCR-Produkte identifiziert werden. PCR von GFP-MOV generiert ein 260 bp-Fragment, von pZAP-GFPenv-shSTAT3 ein 529 bp-Fragment, von der ursprünglichen IRES-GFP-Expressionskassette ein 1470 bp-Fragment.

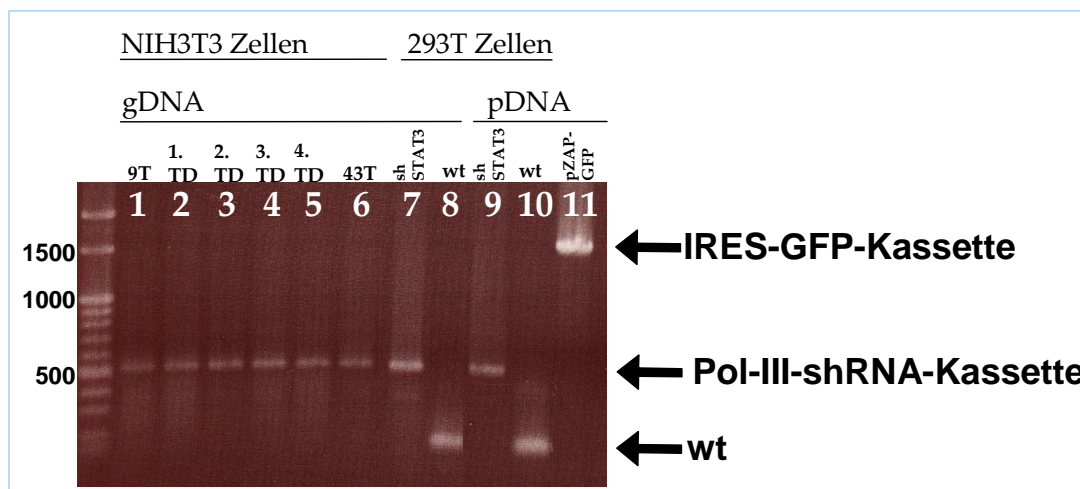


Abbildung 4-67 Genomische Stabilität der shRNA-Expressionskassetten wurde mittels PCR auf genomischer DNA analysiert. Beladung der Spuren siehe Text.

Abbildung 4-67 zeigt die Ergebnisse der PCR-Reaktion. Spuren eins bis sieben: PCR mit gDNA isoliert aus NIH3T3 Zellen. Spur eins: neun Tage nach Transfektion mit dem shSTAT3-Virus; Spur zwei: erste Infektionsrunde, Spur drei: zweite Infektionsrunde; Spur vier: dritte Infektionsrunde, Spur fünf: vierte Infektionsrunde; Spur sechs: 43 Tage nach Transfektion. Spuren sieben und acht: PCR mit gDNA isoliert aus 293T Zellen. Spur sieben: zwei Tage nach Transfektion mit shSTAT3-Virus, Spur acht: zwei Tage nach Transfektion mit GFP-MOV; Spuren neun bis elf: PCR mit Plasmid-DNA isoliert aus 293T Zellen. Spur neun: zwei Tage nach Transfektion mit shSTAT3-Virus, Spur zehn: zwei Tage nach Transfektion mit GFP-MOV; Spur elf: zwei Tage nach Transfektion mit pZAP-GFPenv-IRES-GFP. Alle vier Infektionsrunden ebenso wie die für 43 Tage passagierte Zellen weisen ein PCR-Produkt auf der Höhe von 529 bp auf. Es sind keine verkürzten Banden entstanden. Die shRNA-Expressionskassette ist somit für mindestens vier Infektionsrunden genomisch stabil. Zur Bestätigung der richtigen Sequenzabfolge wurden die PCR-Produkte aus dem Gel herausgeschnitten, sequenziert und mit der Ursprungssequenz abgeglichen. Es ergaben sich keine Abweichungen (siehe Abbildung 4-68):

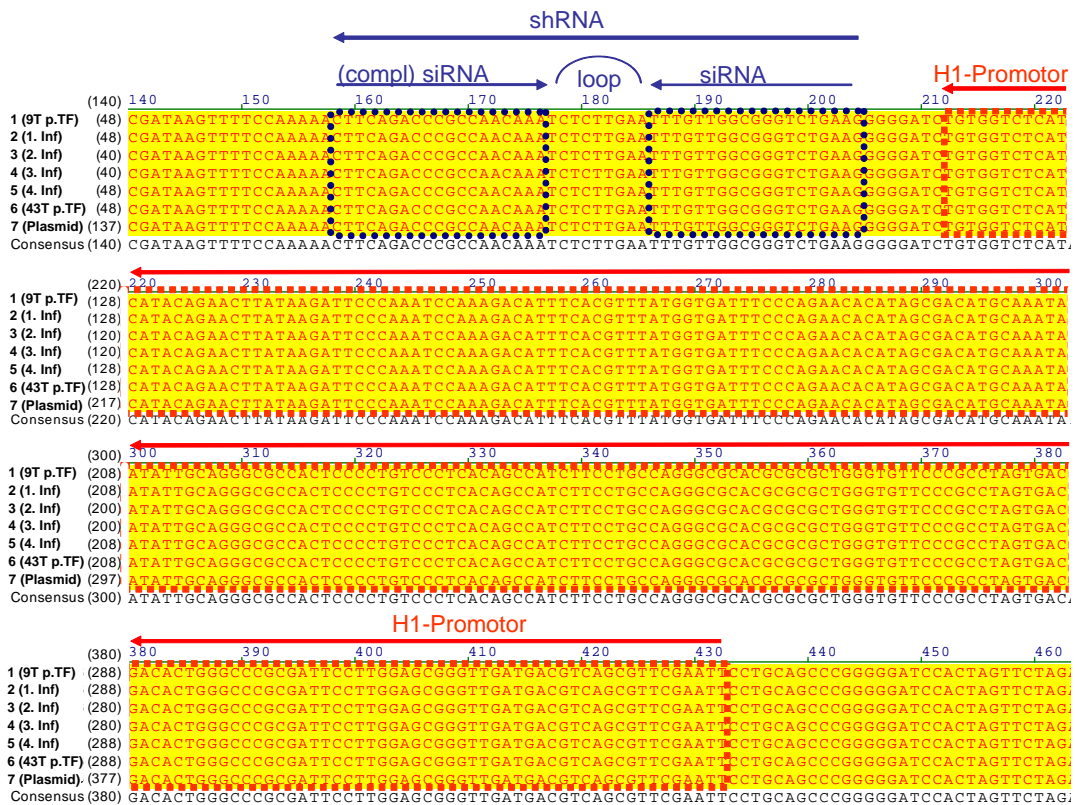


Abbildung 4-68 Abgleich der Sequenzen der Sequenzierungsreaktion der unterschiedlichen PCR-Produkte gegen die Ursprungssequenz.

Die Ergebnisse in den Abbildungen Abbildung 4-67 und Abbildung 4-68 zeigen, dass die inserierte shRNA-Expressionskassette für mindestens vier Infektionsrunden und bei einer Langzeit-Passagierung für mindestens 43 Tage stabil in das Virusgenom integriert bleibt und keine Punktmutationen erfährt, welche die shRNA inaktivieren könnten.

4.5.4 Überprüfung der Interferon-Ausschüttung

Abschließend an alle Untersuchungen wurde die Überstände von Zellen, die mit den beiden shRNA-Expressionskassetten-tragenden Viren infiziert worden waren, mittels eines Interferon- α -ELISAs untersucht. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass die replikationskompetenten shRNA-tragenden MLVs eine unspezifische Interferon-Antwort auf das Vorhandensein der doppelsträngigen Haarnadel-RNA auslösen. Als Positivkontrolle dienten Überstände von Poly I:C-transfiziert NIH3T3 Zellen. Die ausgewerteten ELISA-Daten sind in Abbildung 4-69 dargestellt.

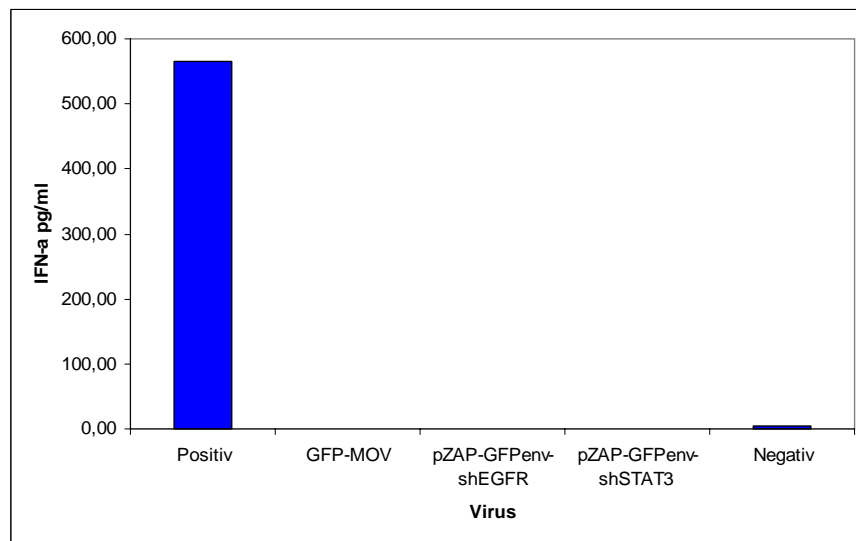


Abbildung 4-69 Interferon- α ELISA Ergebnisse.

Auch diese letzte Kontrolle der Interferon- α -Ausschüttung ist negativ und bestätigt somit, dass alle beobachteten Ergebnisse der Proteinherunterregulierung auf das spezifische Wirken der shRNA und nicht auf eine unspezifische gesamtzelluläre Blockade der Proteinbiosynthese als zelluläre Antwort auf das Vorhandensein doppelsträngiger RNA zurückzuführen sind.

Es konnte somit gezeigt werden, dass replikationskompetente MLVs sich hervorragend eignen, shRNA-Expressionskassetten *in vitro* in Zellkultur zu verteilen, was die Herunterregulierung der Proteinexpression in den infizierten Zellen zur Folge hat.

5 Zusammenfassung

Replizierende Murine Leukämieviren (MLV) können wertvolle Werkzeuge für die humane Krebsgentherapie werden, da sie das Transgen innerhalb des gewünschten Gewebes verteilen, ihr Genom stabil integrieren und einen natürlichen Tumortropismus aufweisen.

In vorliegender Arbeit wurde ein System zur visuellen Analyse der MLV-Replikation sowie der Virusbindung an Zielzellen mittels Einfügung fluoreszierender Proteine etabliert und als Werkzeug für das Design und die Optimierung dieser Viren als Gentherapievektoren benutzt. Zuerst wurde die Kodierungskapazität dieser Retroviren durch Aufteilen der viralen Gene auf zwei semireplikative Vektoren vergrößert. Die Kopplung der Genome mit fluoreszierenden Proteinen ermöglichte ebenfalls in diesem Zusammenhang die Beobachtung der Replikation aber auch die einfache Aufdeckung von Rekombinationsereignissen. Die Ergebnisse zeigten den Bedarf weiterer Optimierungen, stellten allerdings einen Vorreiter auf diesem Forschungsgebiet dar und zeigten das Potential dieses Systems auf (Sliva *et al.*, 2004a).

Zusätzlich zum natürlichen Tumortropismus sollte die Sicherheit von replizierenden Retroviren für die Tumorthherapie erhöht werden. Gezielte Veränderungen des ecotropen Hüllproteins zu EGFR-exprimierenden Zellen mittels gerichteter Evolution sowie der Versuch, den Wirtstropismus des Env mit der Insertion des Liganden SDF-1 α auf humane CXCR4-exprimierende Zellen auszuweiten, sind jedoch gescheitert. Diese Daten müssen sich in die Reihe der erfolglos gebliebenen Versuche, den Wirtstropismus des ecotropen Env auf humane Zellen auszuweiten, einreihen (Sliva *et al.*, 2004b).

Abschließend wurde shRNA als therapeutisches Effektormolekül erfolgreich mittels replikationskompetenter MLV in Zielzellen übertragen, was zur deutlichen Herabsetzung des Proteinlevels des Zielproteins der siRNA führte (Sliva *et al.*, 2006). Diese modifizierten Viren sind ein gutes Werkzeug zur einfachen *in vitro* Untersuchung von Genfunktionen, und könnten auch eine Erleichterung für die Untersuchung von Genfunktionen innerhalb von proliferierendem Tumorgewebe darstellen. Des Weiteren präsentieren die Ergebnisse und Beobachtungen dieser Arbeit einen großen Schritt in Richtung Anwendung dieser Viren für die humane Gentherapie. Denn gekoppelt mit z.B. einer tumorspezifischen Expression der shRNA-Expressions-kassette und der intelligenten Wahl der siRNA-(Ziel)Sequenz, die nach Applikation zum Tod von malignen Tumorzellen führt, wären sie die perfekte Waffe gegen solide Tumoren.

6 Diskussion

6.1 Replikationskompetente MLV als Gentherapievehikel

Die Techniken der Gentherapie haben im Laufe der Jahre immer mehr Fortschritte gemacht, und es wurde eine große Zahl von klinischen Studien angemeldet, die auf der Verwendung verschiedenster therapeutischer Gene basieren (wie z.B. „Selbstmordgene“, immunstimulatorische Gene oder Tumorsuppressorgene). Allerdings ist der Erfolg dieser Strategien abhängig vom effizienten Gentransfer in das Tumorgewebe, was den größten limitierenden Faktor darstellt (Dalba *et al.*, 2005).

Retrovirale Vektoren sind bereits mehrfach als Vehikel für die Gentherapie verwendet und beschrieben worden. Simple Retroviren wie MLV benötigen zur Infektion Zellteilung, was ihnen die einzigartige Eigenschaft einer gegebenen Selektivität für das schnell teilende neoplastische Gewebe verschafft (Miller *et al.*, 1990). Dieser Tumortropismus und die Möglichkeit, mit der retrovirale Vektoren aufgrund ihres einfachen Genoms manipuliert werden können, gaben den Impuls, diese Vektoren in experimentellen und klinischen Krebs-Gentherapiestudien einzusetzen. Die meisten bis heute entwickelten retroviralen Vektoren sind unfähig, sich nach ihrer Applikation im Tumorgewebe auszubreiten (Sinn *et al.*, 2005). Diese Vektoren werden in Verpackungszelllinien produziert, die alle viralen Proteine zur Verfügung stellen. Eine Deletion des Verpackungssignals (Mann *et al.*, 1983) hat zur Folge, dass Vektoren entstehen, die kein virales Genom mehr tragen, was sie replikationsinkompetent macht. Obwohl diese Art von Vektoren zu Beginn viel versprechende Ergebnisse in Tierstudien lieferten (Culver *et al.*, 1992; Ram *et al.*, 1993; Short *et al.*, 1990), haben sie sich aufgrund der geringen Transduktionseffizienzen innerhalb des behandelten Gewebes als inadäquat in klinischen Studien erwiesen (Dalba *et al.*, 2005).

Die Verwendung von replikationskompetenten Viren repräsentiert eine neue Methode mit dem Potential, einen hoch effizienten Gentransfer in Tumoren zu erzielen, da jede

transduzierte Tumorzelle zu einer virusproduzierenden Zelle wird, was zu weiterführenden Transduktionen von neuen Zellen nach initialer Applikation führt.

Im Gegensatz zu onkolytischen Viren haben Retroviren weder einen zytopathischen Effekt auf die Zielzellen noch lösen sie Immunreaktionen aus. Sie stellen also das perfekte Transfervehikel für unterschiedlichste Transgene dar. Allerdings bergen Retroviren aufgrund ihrer integrativen Eigenschaft die Gefahr der Insertionsmutagenese. Dieses Problem wurde spätestens im Zusammenhang der prominenten SCID-X1-Gentherapiestudie neu beleuchtet (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000).

SCID-X1 ("*Severe Combined Immunodeficiency Disease*") ist eine lebensbedrohliche erbliche Immunschwächekrankheit, die mit dem X-Chromosom vererbt und die durch Mutationen einiger Interleukinrezeptoren hervorgerufen wird (Noguchi *et al.*, 1993). Durch den Gendefekt fehlen den betroffenen Patienten sowohl T-Zellen als auch natürliche Killerzellen (NK) und sie besitzen abnormal hohe Level an nicht funktionstüchtigen B-Zellen, die unfähig sind, den Immungobulin-Klassen-*Switch* zu vollziehen und Antikörper zu produzieren (Buckley *et al.*, 1997). Dies hat zur Folge, dass die Patienten so gut wie keine Immunabwehr haben. Bei der Studie wurden retrovirale Vektoren zur Behandlung der SCID-X1-Krankheit verwendet. Zunächst erfolgreich, entdeckten die Forscher drei Jahre später allerdings, dass drei der elf behandelten Kinder Leukämien entwickelt haben, von denen eine bereits zum Tod des Patienten geführt hat. Es wurde aufgedeckt, dass die Insertion des retroviralen Genoms in das LMO2-Gen im Erbgut der modifizierten Blutstammzellen eine leukämieähnliche Vermehrung der weißen Blutzellen verursachte (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Die Beobachtungen machen klar, dass diese Risiken ausgeklammert werden müssen, bevor über den Weg eines replizierenden Retrovirus in die klinische Therapie nachgedacht werden kann. Die Risiken assoziiert mit Insertionsmutagenese treten jedoch vorwiegend bei korrigierendem Langzeit-Genstransfer von Stammzellen für Erbkrankheiten auf und insbesondere dann, wenn Genkorrekturen zu einem selektiven Wachstumsvorteil in einer proliferierenden Zellpopulation im Zusammenhang eines immundefizienten Patienten führen (Dalba *et al.*, 2005). Im Gegenteil ist bei der Verwendung von RCR (replikationskompetenten Retroviren) zur Gentherapie von Krebs heute klar, dass nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit besteht, dass Zellen

außerhalb des proliferierenden Tumorgewebes infiziert werden könnten. Zusätzlich soll die Applikation in das Tumorgewebe mittel- bis langfristig zum Absterben der Zielzellen führen, was somit die Sicherheit unterstützen sollte.

Die eventuell auftretenden Sicherheitsrisiken sind klar umsteckt und müssen durch eine intelligente Manipulation dieser Viren eingeschränkt bzw. umgangen werden.

In dieser Arbeit konnte ein System zur Überwachung der Replikation und Bindung von MLV an Zielzellen erarbeitet werden. Dieses System basiert auf der Insertion von Fluoreszenzmolekülen in das Hüllprotein des MLV. Es konnte gezeigt werden, dass die Insertion von GFP in der prolinreichen Region des ecotropen Env toleriert wird und zur Aufklärung des Replikationsverhaltens des Virus beitragen kann (Sliva *et al.*, 2004a). Solche modifizierten Viren könnten auch dazu beitragen, das *in vivo*-Verhalten eines intratumoral applizierten MLV zu untersuchen und im Vorfeld einer Therapie die Überprüfung der Lokalisation der replizierenden Viren ermöglichen.

Bei Durchsicht der aktuellen wissenschaftlichen Literatur ist ein deutlicher Trend hin zur Verwendung von replikationskompetenten Viren in der Tumorthherapie zu beobachten. Es finden immer mehr replizierende Formen von verschiedensten Virusspezies, darunter Adenoviren (Chu *et al.*, 2004), Herpes-Simplex-Viren (Kuruppu and Tanabe, 2005; Shen and Nemunaitis, 2006), Paramyxoviren (Myers *et al.*, 2005), Vacciniaviren (Shen and Nemunaitis, 2005) und viele mehr, Einsatz als onkolytische Reagenzien in Gentherapieansätzen gegen Krebs. Manche befinden sich bereits in den Phasen I und II der klinischen Studien (Lin and Nemunaitis, 2004). Der onkolytische Virustherapieansatz basiert auf der Methode, dass die Replikation der Viren innerhalb der Zellen zum Absterben eben dieser führt.

Aber auch die Verwendung von replizierenden Viren als Gentransfervektoren (und nicht als onkolytische Viren) ist beschrieben worden. Vor allem die Veröffentlichungen über die Verwendung von replizierenden Retroviren häufen sich. Im November 2005 berichteten Tai *et al.* (Tai *et al.*, 2005) von einer erfolgreichen Behandlung von primären Gliomen mit replizierenden MLVs. Die Retroviren waren so manipuliert, dass sie die Zytosin-Deaminase aus Hefe als Transgen verteilten, was nach Administration des Medikamentes 5-Fluorcytosin

in vivo effizient zum Absterben des Tumorgewebes in Nacktmäusen führte. Ebenfalls konnten sie zeigen, dass die Viren durch das existierende gliale Tumorgewebe replizierten, ohne das umliegenden Gewebe zu erreichen. Im April 2006 konnte die gleiche Arbeitsgruppe diesen Effekt auch in immunkompetenten Mäusen veröffentlichen (Wang *et al.*, 2006). Eine ganz aktuelle Arbeit verwendete HIV-basierte replizierende Vektoren, um shRNA stabil in Zellen zu exprimieren, was den Erfolg einer verlangsamt HIV-1 Replikation hatte (Westerhout *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit etablierten fluoreszenzmarkierten, replikationskompetenten MLVs müssen aber noch im letzten Schritt in einem *in vivo*-Tumormodell auf ihre Verbreitung im Tumorgewebe hin untersucht werden.

6.2 Erweiterung der Insertionskapazität von MLV

Die Insertionskapazität für therapeutische Transgene in das komplette Genom von replikationskompetenten MLV ist streng limitiert, auf etwa 1,3 kb (Logg *et al.*, 2001). Um die Kapazität des retroviralen Genoms zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit das MLV-Genom auf zwei Vektoren aufgeteilt. Gleichzeitig wurden die beiden Genomteile mit Fluoreszenzmarkern versehen, um die Verfolgung der Replikation in Zielzellen zu erleichtern (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-7). Es konnte gezeigt werden, dass die Idee funktioniert, da nach Kotransfektion der beiden Genome in Zellen eine Replikation zu beobachten war (siehe z.B. Abbildung 4-12). Die Replikation war im Vergleich zu einem Virus, welches alle Teile des Genoms auf einem Provirus trägt, stark verlangsamt und gleichzeitig wurden Rekombinationen entdeckt. Die semireplikativen Vektoren erreichten keine Komplettinfektion der transfizierten Zellkultur. Während das GFP-MOV (komplettes MLV-Genom mit GFP-Insertion in der PRR zur Visualisierung der Virusreplikation) nach spätestens vier Tagen nach Transfektion in der exponentiellen Phase der Replikation war und nach sechs Tagen alle Zellen infiziert waren, erfolgte ein Anstieg in den Zellen, die mit den semireplikativen Vektoren transfiziert waren, erst nach elf bis 18 Tagen. Und auch dann fanden sich nur zu maximal 25 % doppelt-positive (RFP und GFP) Zellen, während ein Anstieg von nur GFP-positiven Zellen auf über 75 % zu beobachten war. Gesammelte

Überstände von diesen Zellen wurden auf frische NIH3T3 Zellen gegeben und führten zu der Bildung von wieder 75 % nur GFP-positiver sowie 25 % doppelt-positiver Zellen (Abbildung 4-15). Diese Ergebnisse lassen den Schluss auf die Entstehung von Rekombinationen zu, was auch in PCR-Analysen von genomischer DNA infizierter Zellen bestätigt wurde. Genau zu den Zeitpunkten, in denen die Viren in die exponentielle Phase der Replikation übergegangen sind, konnten Volllängengenome innerhalb der infizierten Zellen identifiziert werden (Abbildung 4-19). Die Ergebnisse der Infektion von neuen Zellen mit den Überständen der transfizierten Zellen lassen die Vermutung aufkommen, dass zwei Arten von Rekombinationen entstanden sein könnten. In der ersten Version scheint das RFP erhalten worden zu sein, während es in der zweiten deletiert worden ist, und der Verlust des RFP früher oder in einem höheren Maße zustande gekommen sein muss.

Die Rekombinationsereignisse haben im Zusammenhang mit dieser Arbeit vorerst zur Einstellung der Forschung geführt, allerdings bietet das System viel Potential für weiterführende Arbeiten. Eine Optimierung der Sequenzen im Hinblick auf Homologie könnte ein erster Schritt sein, die Rekombinationswahrscheinlichkeit geringer zu halten. Des Weiteren könnten die beiden Teile des Genoms mit einem induzierbaren Promotor versehen werden, was eine Optimierung in Richtung Sicherheit darstellen würde. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit dem semireplikationskompetenten System und feilen es für den eventuellen Einsatz in einer Gentherapie aus. Eine ganz aktuell erschienene Arbeit in *Gene Therapy* (Qiao *et al.*, 2006) zum Beispiel ersetzte das MLV-Env mit dem VSV-Glykoprotein. Technisch konnte die Arbeitsgruppe damit eine Stabilität des Systems beweisen, indem bis zu 29 Tage nach intratumoraler Applikation *in vivo* keine Rekombinationsereignisse entdeckt worden sind. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Daten stellen somit einen Vorreiter auf diesem Forschungsgebiet dar und zeigen das Potential dieses Systems auf (Sliva *et al.*, 2004a).

6.3 Targeting und Monitoring von ecotropen Retroviren

Die Anwendbarkeit von replikationskompetenten Retroviren in der Tumorthherapie hängt immens von deren zielgerichteter Übertragung (*Targeting*) ab. Retroviren besitzen einen natürlichen Tumortropismus, da sie nur sich teilende Zellen infizieren können. Die effiziente

Ausbreitung der Viren im Tumorgewebe sollte dementsprechend ohne eine Infektion des umliegenden oder anderen Gewebes im Organismus erreicht werden. Nur unter diesen Voraussetzungen ist ein Einsatz dieser Viren möglich und der Weg in die klinische Studie geebnet. Zur Erhöhung der Sicherheit wurde im Rahmen dieser Arbeit am *Targeting* der replikationskompetenten, ecotropen Viren gearbeitet.

Das *Targeting*-Konzept basierte auf der Insertion von Liganden in das Hüllprotein. Da das ecotrope MLV-Env humane Zellen nicht infizieren kann, ist es besonders geeignet, um Liganden einzufügen, welche den Tropismus auf einen vorherbestimmten, humanen Zelltypen ausweiten. Das ecotrope Hüllprotein hat verschiedene Stellen, die als insertionskompatibel beschrieben worden sind (Sliva *et al.*, 2004b). Der N-Terminus des SU toleriert Insertionen an der Position +1 des reifen Env (Sliva *et al.*, 2004b)(nicht erst hinter die AS sieben des reifen Env, wie ursprünglich beschrieben (Benedict *et al.*, 1999; Cosset *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1993; Schnierle and Groner, 1996a)). Ebenfalls als insertionstolerant wurde die hypervariable prolinreiche Region beschrieben (Kayman *et al.*, 1999; Weimin Wu *et al.*, 1998), die auch besonders große Insertionen wie zum Beispiel die Sequenzen für das GFP annimmt, ohne an Funktionalität zu verlieren (Erlwein *et al.*, 2003). Die prolinreiche Region des Env wurde in dieser Arbeit benutzt, um die Sequenzen für GFP in das komplette Genom von MLV einzufügen und somit die Replikation des Virus und Bindung des Env an Zielzellen zu untersuchen. Es war somit möglich, ein System der optischen Beobachtung dieser Viren zu etablieren. Allerdings ist dieses System nicht ohne Einschränkungen auf das amphotrope Env ausweitbar (siehe unten).

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze des *Targetings* verfolgt, die beide auf der Insertion von Liganden in das ecotrope Env basieren. Im Falle des EGF wurden die Sequenzen an den N-Terminus des Env fusioniert. Der Versuch des *Targetings* zu EGFR-exprimierenden humanen Zellen über die Insertion von EGF-Sequenzen ist bereits mehrfach beschrieben worden (z.B. Cosset *et al.*, 1995). Obwohl eine Bindung der rekombinanten Viren an EGFR-positive Zellen zu beobachten war, konnte keine produktive Infektion erzielt werden. Aufgrund der endosomalen Degradierung der gebundenen EGF-Viren ist die Idee des inversen *Targetings* entstanden. In dieser Arbeit sollte das beschriebene Konzept erneut aufgegriffen werden. Mithilfe der gerichteten Evolution von EGF-tragenden replikationskompetenten Viren (GFP-

EMO siehe Abbildung 4-39) auf EGF-abhängigen Zellen (BaF/ERX) sollte eine Variante isoliert werden, die der endosomalen Degradierung entkommen kann. Nach Zugabe von GFP-EMO-haltigen Überständen zu den EGF-abhängigen BaF/ERX Zellen war ein erster Erfolg zu beobachten. Die Zellen starben im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht ab, sondern die Population stagnierte zunächst in ihrer Proliferation, bevor sie sich nach ungefähr 15 Tagen in Kultur in RPMI-Medium ohne weitere Zusätze wieder aktiv teilte (Abbildung 4-43). Allerdings zeigten die Zellen keine GFP-Expression und nach Inkubation von frischen Zellen im Medium des Versuchsansatzes, welches, hätte die Selektion funktioniert, adaptierte Viren enthalten sollte, konnte keine Infektion weder von NIH3T3 Zellen noch eine Proliferation von BaF Zellen beobachtet werden.

Es hätte sein können, dass EGF-tragende Virusvarianten selektioniert worden waren, die GFP deletiert haben, was sie im *Monitoringsystem* unsichtbar machen würde. Um diesen Verdacht auszuschließen, wurde ein Western-Blot mit Zelllysaten dieser frisch behandelten Zellen durchgeführt. Es waren keine viralen Hüllproteine nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigten die Lysate der ursprünglichen GFP-EMO behandelten BaF/ERX Zellen eine positive Env- sowie GFP-Bande (Abbildung 4-44). Die Zellen schienen infiziert worden zu sein, was auch deren Überleben in RPMI-Medium ohne Proliferationszusätze erklären würde. Das GFP-EMO-Virus war demzufolge nicht sofort in den Endosomen degradiert worden. Allerdings hat dieser Versuchansatz nicht dazu ausgereicht, die Natur der EGFR-Signaltransduktion auszutricksen. Die Zellen haben zwar offenbar einen Weg gefunden, das von den Viren bereitgestellte EGF zum Überleben zu nutzen, indem sie eventuell nur das EGF-Env exprimiert haben, welches ihnen die Proliferation sicherte, während die restlichen Virussequenzen deletiert worden sein können. Letztendlich konnten mittels dieses Versuchansatzes keine adaptierten Viren gewonnen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit mit dem Ziel des *Targetings* von ecotropem Env zu humanen Zellen wurde der Ligand in die rezeptorbindende Domäne (RBD) des ecotropen Env eingefügt. Diese Domäne ist neben der Arbeit von Katane *et al.* (Katane *et al.*, 2002) zuvor bereits von zwei weiteren Arbeiten als tolerant für Insertionen beschrieben worden (Lorimer and Lavictoire, 2000; Wu *et al.*, 2000). Obwohl die Erweiterung des Wirtstropismus des ecotropen Env bisher mit wenig Erfolg gesegnet war, konnte die Arbeitsgruppe um Katane

zum ersten Mal eine Transduktion humaner CXCR4-Rezeptor-exprimierender Zellen zeigen. Bis zu diesem Zeitpunkt führte die Insertion von Liganden zwar zu der Bindung des chimären Env an den neuen Rezeptor, jedoch scheiterte es an der produktiven Infektion der Zelle im Anschluss (Benedict *et al.*, 1999; Cosset and Russell, 1996; Lavillette *et al.*, 2001b; Schnierle *et al.*, 1996a).

Die Verwendung des vielversprechenden SDF-1 α -Ansatzes der Katane-Arbeitsgruppe im Kontext eines replikationskompetenten MLV konnte die Hoffnungen jedoch nicht erfüllen. Obwohl das rekombinante Env funktionstüchtig und das Virus infektiös war, konnte keine Infektion von humanen, CXCR4-positiven Zellen erzielt werden. Kloniert wurden zwei Varianten von replikationskompetenten SDF-1 α -tragenden MLVs. Das pZAP-SDF-IRES-GFP trägt den Liganden in der RBD und eine IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende des Env zur Visualisierung der Replikation (Abbildung 4-32). Das pZAP-GFPenv-SDF trägt ein doppelt-rekombinantes Env, welches sowohl SDF-1 α in der RBD als auch GFP in der PRR inseriert hat (Abbildung 4-29). Die IRES-GFP-Kassette ist deletiert worden. Die Viren wurden zunächst auf humanen CXCR4-exprimierenden Zellen auf Replikation getestet und zeigten keine Replikation (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Replikation auf murinen NIH3T3 Zellen untersucht. Die Viren waren in ihrer Replikation auch hier gestört. Selbst 27 Tage nach Transfektion waren weniger als 30 % der Zellen infiziert mit keinem signifikanten Trend nach oben (Abbildung 4-33). Die Untersuchung der gDNA der transfizierten Zellen zeigte beim doppelt-rekombinanten Env-tragenden pZAP-GFPenv-SDF Deletionen im SDF-Bereich, während das pZAP-SDF-IRES-GFP stabil war (Abbildung 4-38). Dieses Virus erreichte die Infektion von ungefähr 25 % der behandelten Zellen. Allerdings konnten mit den Überständen keine humanen CXCR4-exprimierenden Zellen transduziert bzw. infiziert werden (Abbildung 4-34). Erstaunlicherweise konnten auch keine murinen mCAT-1-exprimierenden Zellen infiziert werden. In diesem Versuchansatz schien das doppelt-rekombinante Env genetisch instabiler zu sein (Abbildung 4-38).

In NIH3T3x4 Zellen, welche zusätzlich zum ecotropen Rezeptor den humanen CXCR4-Rezeptor exprimieren, replizierten beide Viren extrem verlangsamt (ab Tag 15 exponentielle Phase) im Vergleich zu den Ursprungsviren (Tag zwei). Nach 27 Tagen jedoch konnte von beiden Varianten eine Durchinfektion der Zellen erzielt werden (Abbildung 4-35). Allerdings

konnte mit diesen Überständen auf humanen, CXCR4-positiven Zellen keine produktive Infektion erreicht werden (Abbildung 4-36). Auf den murinen, mCAT-1-exprimierenden Zellen konnte eine positive Infektion erzielt werden, jedoch nur in einem sehr geringen Teil der Zellen. Die Untersuchung der gDNA deckte in diesem Fall ein umgekehrtes Verhältnis der Stabilität auf. Während das pZAP-SDF-IRES-GFP eine Deletion im SDF-1 α aufwies, war das doppelt-rekombinanten Env stabil (Abbildung 4-38). Dieses Ergebnis zeigt eine Reproduktion der im Vorfeld der Untersuchungen durchgeführten Bestimmung der Stabilität des doppelt-rekombinanten Env (Abbildung 4-31). Dieses war nach Replikation auf NIH3T3 x4 Zellen nach 33 Tagen stabil. Bei dieser Untersuchung wurde die GFP-Region mit untersucht. Auch diese war stabil im Genom integriert. Eine Deletion der GFP-Sequenzen konnte also nicht die Erklärung der Beobachtungen sein. Abbildung 6-1 fasst die beschriebenen Beobachtungen und Ergebnisse zusammen.

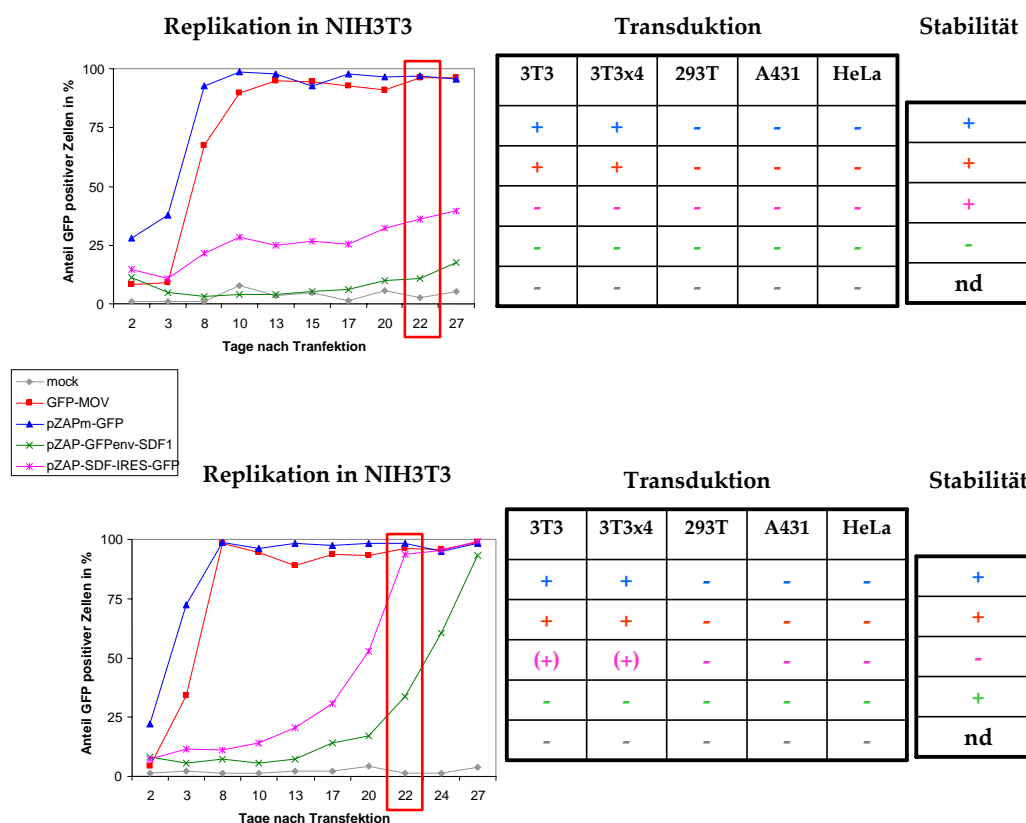


Abbildung 6-1 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der SDF-1 α -tragenden rekombinanten Viren.

Die Daten der Katane-Arbeitsgruppe (Katane *et al.*, 2002) konnten weder reproduziert noch weiterentwickelt werden. Die Arbeitsgruppe beobachtete in ihrer Veröffentlichung geringe Titer und auch einen enormen Unterschied bei der Verwendung von unterschiedlichen Zellen, die unterschiedliche Level an CXCR4 exprimieren. Wir gingen demzufolge davon aus, dass mit der Verwendung von replikationskompetenten Viren die beschriebenen Titerprobleme gelöst werden sollten. Dies ist jedoch nicht gelungen, und von der Arbeitsgruppe liegen ebenfalls keine weiteren und weiterführenden Arbeiten zu dem Thema vor.

Eventuell könnte das rekombinante Env instabil in seiner Struktur sein. Solche Probleme würden anhand von Untersuchungen der gDNA nicht aufgeklärt werden können. Sollte die Insertion der SDF-1 α -Sequenzen in die RBD zu einer Instabilität des Hüllproteins führen, könnte als fortführende Arbeit an diesen Konstrukten versucht werden, die Replikation der Viren bei 32°C durchzuführen. Mehrere Autoren beschrieben eine verbesserte Vektorproduktion von rekombinanten Retroviren bei dieser Temperatur (Lee *et al.*, 1996; McTaggart and Al Rubeai, 2000). Allerdings gehen die Meinungen hier stark auseinander und eventuell beobachtete verbesserte Ausbeuten der Titer schwankten je nach benutzter Zelllinie. Des Weiteren wäre eine Anwendung von SDF-1 α -tragenden replikationskompetenten MLVs für die humane Gentherapie stark eingeschränkt, wäre das rekombinante Hüllprotein bei nur bei 32°C stabil.

6.4 Monitoring von amphotropen Retroviren

Die Methode der Fluoreszenzmarkierung von ecotropen MLVs konnten in dieser Arbeit als wertvolles Werkzeug und Hilfe für die Konstruktion von MLV als Gentherapievehikel etabliert werden. Die Insertion von Sequenzen für das fluoreszierende Protein (GFP) in die PRR des ecotropen Env ermöglichte die direkte Beobachtung der Virusreplikation sowie Untersuchung der Bindung von Viruspartikeln an Zellen. Dieses Prinzip sollte ebenfalls auf das amphotrope Hüllprotein von MLV übertragen werden. Der N-Terminus des amphotropen Hüllproteins ist bereits mehrfach als tolerant für verschiedenste Insertionen (Hartl *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2003) sowie für GFP (Spitzer *et al.*, 2003) beschrieben

worden. Spitzer *et al.* konnten mit den rekombinanten GFP-tragenden Hüllproteinen eine erfolgreiche Transduktion von murinen NIH3T3 Zellen erreichen. Die Sequenzen für GFP sind hinter das Signalpeptid fusioniert und umrahmt von *Spacer*sequenzen.

In dieser Arbeit wurden die Sequenzen für GFP in das Vollängengenom eines replikationskompetenten MLV eingebaut, was zu einem voll infektiösen, replizierenden, GFP-markierten amphotropen MLV auf murinen Zellen führte. Es wurden Viren hergestellt, die die Sequenzen für GFP mit und ohne *Spacer*sequenzen an den N-Terminus fusioniert haben, was keine signifikante Auswirkung auf das Replikationsverhalten in murinen Zellen hatte (Abbildung 4-48). Es konnte in vorliegender Arbeit also gezeigt werden, dass die *Spacer*sequenzen zur Erhaltung der Funktionstüchtigkeit des Env in murinen Zellen nicht notwendig sind.

Allerdings zeigte sich, dass die Replikation auf humanen Zellen gestört zu sein schien. Trotz erfolgreicher Transfektion waren 293T Zellen offenbar nicht fähig, Viruspartikel zu bilden, die wiederum neue humane Zellen infizieren könnten (Abbildung 4-53). Die gesammelten Überstände der durchinfizierten NIH3T3 waren ebenfalls nicht in der Lage, humane Zellen produktiv zu infizieren (Abbildung 4-54). Die verblüffende Beobachtung allerdings war, dass die humanen Zellen jedoch infiziert zu sein schienen und auch Viruspartikel produzierten. Der Western-Blot zeigte das Vorhandensein viraler Proteine in diesen Zellen (Abbildung 4-56). Und auch gesammelte Überstände dieser Zellen waren in der Lage, murine NIH3T3 Zellen zu infizieren, sich auszubreiten und GFP innerhalb der Zellpopulation zu verbreiten. Abbildung 6-2 stellt die beobachteten Ergebnisse schematisch zusammen.

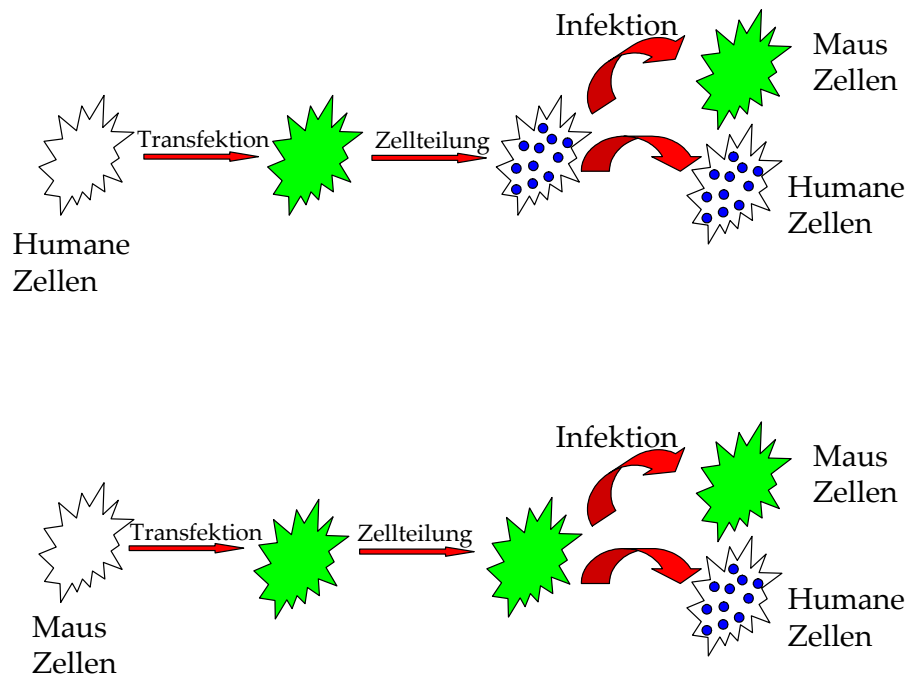


Abbildung 6-2 Schematische Darstellung der Vorgänge nach Transfektion des amphotropen GFP-MLV in humane und murine Zellen.

Die Fusion des GFP an den N-Terminus scheint für die Infektion von murinen Zellen mit anschließender Fusion des Hüllproteins mit der Zellmembran ohne Einschränkungen möglich zu sein, während die Fusion mit Rezeptoren auf humanen Zellen stark gestört zu sein scheint. Einigen wenigen Viren gelingt anscheinend der Zelleintritt, denn sonst wären die Zellen im WB nicht positiv auf virale Proteine. Und diese Zellen scheinen auch Viren zu produzieren, allerdings sind diese nicht fähig, innerhalb der humanen Zellkultur zu replizieren. Erst bei Übertragung der Überstände auf murine Zellen kann die Replikation ungestört stattfinden. Die Insertion scheint das Env in der Art zu stören, dass der Gebrauch des amphotropen Rezeptors auf der Oberfläche von humanen Zellen gestört ist, während der Zugang zum amphotropen Rezeptor auf der murinen Zelloberfläche ohne Probleme verläuft.

6.5 Übertragung von shRNA

Das Potential von si/shRNA für die Aufklärung von Genfunktionen, aber auch als Transgen in der Tumorthherapie, ist von vielen Wissenschaftlern bereits erkannt und anerkannt

worden. Allerdings stellt die effiziente Übertragung der si/shRNA in das gewünschte Gewebe immer noch das größte Hindernis bei dieser Art von Therapie dar. Retrovirale Vektoren können shRNA unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III-Promotors exprimieren (Brummelkamp *et al.*, 2002; Rubinson *et al.*, 2003), allerdings stellen die relativ niedrigen Titer, die mit retroviralen Vektoren erzielt werden können, den begrenzenden Faktor dar. Denn bei der Tumorthherapie müssen so viele Zellen wie möglich transduziert werden, um erfolgversprechende Ergebnisse erzielen zu können. Um diese Probleme aus dem Weg zu schaffen, sollte in dieser Arbeit versucht werden, shRNA als therapeutisches Effektormolekül mittels replikationskompetenter MLV in Zielzellen zu übertragen.

Im Zusammenhang der Entwicklung des perfekten retroviralen Gentransferehikels bietet die Verwendung von shRNA als Transgen den Vorteil, dass es sich um kurze Nukleinsäurenfragmente handelt. Da das MLV-Genom in seiner Kapazität Transgene aufzunehmen stark beschränkt ist, bietet die Insertion von kurzen shRNA-Sequenzen (angetrieben vom H1-Promotor), die innerhalb des kompletten MLV-Virusgenoms Platz finden müssen, einen großen Vorteil.

Nach Entwicklung des rekombinanten MLV sollte untersucht werden, ob ein Virus, welches eine shRNA-Expressionskassette trägt, die shRNA während seiner Replikation im Zielgewebe effizient verteilt. Es bestand die Sorge, dass die Präsenz einer shRNA-Haarnadelstruktur eventuell die Transkription des viralen Genoms stören könnte und somit zur Termination der Transkription führen könnte. Alternativ könnte die Haarnadelstruktur (welche ja aus doppelsträngiger RNA besteht) vom zellulären Enzym *Dicer* erkannt und gespalten werden, was die Replikation des Retrovirus ebenfalls stören würde. Dank der GFP-Insertion in das verwendete Virus konnte eine vergleichende Replikationsanalyse des shRNA-Expressionskassetten-tragenden Virus im Vergleich zum Vorläuferkonstrukt, welches nur die Sequenzen für GFP in der PRR trägt, durchgeführt werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Replikationsverhalten des rekombinanten Virus (Abbildung 4-63) festgestellt werden. Falls *Dicer* die unreife virale RNA spaltet, dann in einem unmerklichen Verhältnis, welches keinen negativen Einfluss auf den viralen Lebenszyklus hat. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die rekombinanten Viren nach bzw. während der Replikation keine Interferonantwort auslösen (Abbildung 4-69), was bezeugt,

dass die beobachteten Unterschiede in der Zielprotein-Expression nicht auf ein generelles Herunterfahren der Proteinsynthese aufgrund des Vorhandenseins von IFN zurückzuführen sind, sondern als spezifischer Effekt der shRNA.

Retroviren sind für ihre Fähigkeit bekannt, schnell auf eine Veränderung ihrer Umgebung einzugehen mittels der Selektion von adaptierten Varianten. Deshalb ist es möglich, dass die zusätzlich in das Genom inserierten, vom Virus fürs Überleben nicht benötigten Sequenzen, deletiert werden. PCR-Analysen jedoch, die die genomische DNA von infizierten Zellen untersucht haben, stellten die Stabilität der Genoms sogar nach vier Infektionsrunden sicher (Abbildung 4-67). Logg *et al.* (Logg *et al.*, 2001) haben gezeigt, dass Insertionen an die 3'-untranslatierte Region von Env bis zu einer Größe von 1,3 kb gut toleriert werden. Die shRNA-Expressionskassette ist nur 360 bp groß und hat keinen negativen Einfluss auf den viralen Lebenszyklus, was die Stabilität weiter unterstützt, denn die Spekulation liegt nahe, dass Insertion von Genen, die sich nachteilig auf die virale Fitness auswirken, schneller deletiert werden (wie beobachtet bei dem EGF-Virus (Erlwein *et al.*, 2002)). Die Untersuchung der genomischen Stabilität zog vier Infektionsrunden ein, was im Hinblick auf die Verwendung dieser modifizierten Viren in der Tumorthherapie mehr als genug zu sein scheint. Die Viren sollen im Tumorgewebe replizieren, die shRNA-Expressionskassette verteilen und die Zellen zum Absterben bringen. Vier Infektionsrunden sollten in einem streng abgesteckten Rahmen eines soliden Tumors ausreichen, um das gesamte Gewebe zu durchdringen.

Eine im Mai 2006 erschienene Arbeit in der Zeitschrift *Nature* (Grimm *et al.*, 2006) ließ zunächst Besorgnis im Hinblick auf die Verwendung von shRNA in der humanen Tumorthherapie aufkommen, da sie zeigte, dass die Behandlung von Mäusen mit einer zu hohen Dosis von shRNA zum Tod dieser Mäuse führte, da die lokale miRNA-Maschinerie überlastet zu sein schien. Es konnte gezeigt werden, dass die Leber, das Gewebe, in welches die shRNA eingebracht worden ist, stark geschädigt worden war was zum Tod der behandelten Mäuse führte. Die Autoren postulierten, dass der zwischen miRNA und shRNA-Prozessierung geteilte Weg heraus aus dem Zellkern in das Zytoplasma über Exportin-5 überlastet zu sein schien. Doch bei Verwendung von shRNA als therapeutisches

bzw. toxisches Gen für die behandelten Zellen, die Tumorzellen, ist auch diese Entwicklung nur von weiterem Vorteil für die Behandlung.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein Modell entwickelt werden, shRNA als Effektormolekül effizient in Zielzellen zu verbreiten. Das replizierende, modifizierte MLV führte zur Verteilung der shRNA-Expressionskassette, was zur deutlichen Herabsetzung des Proteinlevels des Zielproteins der siRNA führte (Abbildung 4-64, Abbildung 4-65). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Vorhandensein der shRNA-Expressionskassette keine Interferonantwort innerhalb der Zellen auslöste. Mit diesen Ergebnissen ist in erster Linie ein gut funktionierendes Werkzeug entwickelt worden, das in unterschiedlichsten Ansätzen seine Verwendung finden kann. Zunächst bietet es die Möglichkeit der einfachen Untersuchung von Genfunktionen, die auch *in vivo* benutzt werden kann. Es bietet eine Möglichkeit, die Genfunktionen in proliferierendem Gewebe von unterschiedlichsten Tumormodellen zu untersuchen. Das zu untersuchende Protein kann mittels siRNA ausgeschaltet werden. Durch die Kopplung mit fluoreszierenden Proteinen wird das Gewebe markiert, und der Phänotyp kann anschließend untersucht werden. Des Weiteren präsentieren die Ergebnisse und Beobachtungen dieser Arbeit einen großen Schritt in Richtung Anwendung dieser modifizierten Viren für die humane Gentherapie. Denn gekoppelt mit z.B. einer tumorspezifischen Expression der shRNA-Expressionskassette und der intelligenten Wahl der siRNA-(Ziel)Sequenzen könnte ein Virus entstehen, das sich aufgrund seiner Replikationsfähigkeit effizient im applizierten Gewebe verteilt, das gesunde umliegende Gewebe aufgrund seiner Unfähigkeit in ruhenden Zellen zu replizieren verschont, das sein Transgen tumorspezifisch exprimiert und die Tumorzellen durch das gezielte tumorspezifische Transgen, die shRNA, effektiv zum Absterben bringt – die perfekte Waffe gegen solide Tumore.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

7.1.1 Basen

A Adenin

G Guanin

C Cytosin

T Thymin

U Uracil

7.1.2 Aminosäuren

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

Hy hydrophobe Aminosäure

7.1.3 Anglizismen

Annealing:	Anlagerung zweier einzelsträngiger DNA-Moleküle zu einem Doppelstrang
Antisense:	Angabe der Richtung des Oligonukleotids (entgegen der Leserichtung)
Assay:	Protokoll oder Versuchsaufbau
Biodistribution:	Verteilung oder Ausbreitung z.B. eines Virus im Körper
Blot:	Methode des Transfers von z.B. Proteinen auf eine Membran
Blunt ends:	gerade Enden nach einem Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA
CAP-Struktur:	Modifizierung des 5'-Endes, die bei allen eukaryotischen mRNAs und dierenden RNAs gefunden wird
Hairpin:	Haarnadel-Struktur
Insert:	Einfügung
Marker:	Größenstandard bei der Auftrennung von Proteinen oder DNA-Fragmenten
Mastermix:	ein Hauptansatz eines Versuchs aus dem verschieden einzelne Ansätze entstehen können
Mock:	Transfektion ohne DNA-Zugabe
Monitoring:	Überwachung der Virusreplikation mittels fluoreszierender Proteine
Pool:	Gesamtheit der Varianten z.B. einer Bibliothek
Primer:	Starter-Oligonukleotide in der PCR
Proof-reading:	Korrekturlesen von z.B. einer Polymerase
Semi-dry Blotting:	Methode des halbtrockenen Transferierens von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen
Sense:	Angabe der Richtung des Oligonukleotids (mit der Leserichtung)
Shift:	Bewegung in eine bestimmte Richtung
Silencing:	Stillegung von z.B. Genexpression
Spacer:	Platzhalter
Split:	Aufteilung/Trennung z.B. eines Genoms
Sticky ends:	„Klebrige“ oder überhängende Enden nach dem Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Stock:	Aliquotierter Vorrat an titriertem Virusüberstand
Strippen:	Entfernen von bereits gebundenen Antikörpern von einer Nitrozellulosemembran, um sie erneut mit anderen Antikörpern inkubieren zu können
Template:	Matrize in der PCR
Targeting:	Lenkung des viralen Tropismus auf bestimmte Zielzellen
Tag:	An ein Protein angefügtes Antikörperepitop zur einfachen Detektion (z.B. FLAG-Tag oder myc-Tag)
Well:	Vertiefung/Loch einer Zellkulturschale

7.1.4 Sonstige Abkürzungen

α - x	anti (gegen), Antikörper gegen x
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AML	akute myeloblastische Leukämie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
as	<i>antisense</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5-triphosphat
AZT	3'-Azido-3'-Desoxythymidin, ein RT-Hemmer
b	Base
bp	Basenpaare
bidest	doppelt destilliert
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	carboxyterminal
°C	Grad Celsius
c	Zenti-
ca.	circa

CD	Cytosindeaminase
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CIP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
CMV	Cytomegalovirus
d	Tag (<i>day</i>) oder Desoxy-
DAPI	4'6-Diamino-2-Phenylindol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
DTT	Dithio-1,4-threithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	erhöhte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemoluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EGFP	<i>enhanced green fluorescence</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-[Aminoethylether]-Tetraacetat
eIF-2	Translations-Initiations-Faktor 2
ELISA	photometrische Immunfärbemethode (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Env	Hüllglykoprotein bestehend aus den Untereinheiten TM und SU (<i>envelope protein</i>)
<i>Env</i>	retrovirales Strukturgen, welches für das Hüllprotein (<i>envelope protein</i>) kodiert
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> , lateinisch: und andere
Fab	antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FACS	fluoreszenzaktivierte Zell-Erkennung (Sortierung) (<i>fluorescent activated cell sorting</i>)

FKS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm oder Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
Gag	gruppenspezifisches Antigen (<i>group specific antigen</i>)
<i>gag</i>	retrovirales Strukturgen, welches für die gruppenspezifischen Proteine (<i>group specific antigens</i>) des Viruskapsids und des Viruskerns kodiert
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunde oder human
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
H.T.	Hybridisierungstemperatur
i.E.	infektiöse Einheit
IL	Interleukin
IRES	interne Ribosomenbindestelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
JAK	Janus Kinase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Lauri Bertani
log	Logarithmus
LTR	Endsequenzen des retroviralen Genoms (<i>Long Terminal Repeat</i>)
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	Klonierungsstelle im Vektor, charakterisiert durch das Vorhandensein einzigartiger Restriktionsschnittstellen (<i>Multiple Cloning Site</i>)

m.o.i.	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
min	Minute(n)
mg	Milligramm
NK	natürliche Killerzellen (<i>natural killer cells</i>)
ml	Milliliter
MLV	Murines Leukämievirus
mM	Millimol
MMP	Matrix Metalloprotease
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
ng	Nanogramm
NEB	New England Biolabs
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NP40	Nonidet-P 40
OD	optische Dichte
p	Piko
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Phycoerthrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PKR	Protein-Kinase R
pmol	picomol
POL	Polymerase-Protein
<i>pol</i>	retrovirales Gen, welches für die viralen Proteine mit enzymatischer Aktivität kodiert (<i>polymerase</i>)
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
Poly I:C	<i>polyinosinic polycytidylic acid</i>
PTGS	post-transkriptionelles Gen <i>silencing</i> (bei Pflanzen)
rPIT-1	zellulärer Rezeptor des amphotropen MLV
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

RNAi	RNA <i>interference</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Kulturmedium aus dem „ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “
RT	reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SA	Spleiss-Akzeptor
SD	Spleiss-Donor
s. Kap.	siehe Kapitel
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> ; schwere, kombinierte Immundefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
sec	Sekunde(n)
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
shRNA	kurze Haarnadel-Struktur RNA (<i>short hairpin RNA</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SU	Oberflächenhüllprotein (<i>surface protein</i>)
SV40	simianes Virus 40
TAE	Trisacetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
TFB	Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien (<i>transformation buffer</i>)
Tm	Schmelztemperatur
TM	Transmembranprotein des Hüllproteins Env
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-triphosphat
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
u.a.	unter anderem
U3/U5	Regionen in der LTR
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt

v	Volumen (<i>volume</i>)
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
VSV	Vesticular Stomatitis Virus
VSV-G	Vesticular Stomatitis Virus Glycoprotein G
w	Gewicht (<i>weight</i>)
WB	Western-Blot-Analyse
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Ψ	Verpackungssignal der viralen genomischen RNA Psi
μ	Mikro-

7.2 Literaturverzeichnis

1. Ager,S., Nilson,B.H., Morling,F.J., Peng,K.W., Cosset,F.L., and Russell,S.J. (1996). Retroviral display of antibody fragments; interdomain spacing strongly influences vector infectivity. *Hum Gene Ther*, 7, 2157-64.
2. Albritton,L.M., Tseng,L., Scadden,D., and Cunningham,J.M. (1989). A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell*, 57, 659-66.
3. Ambros,V., Lee,R.C., Lavanway,A., Williams,P.T., and Jewell,D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, 13, 807-818.
4. Azemar,M., Djahansouzi,S., Jager,E., Solbach,C., Schmidt,M., Maurer,A.B., Mross,K., Unger,C., von Minckwitz,G., Dall,P., Groner,B., and Wels,W.S. (2003). Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res. Treat.*, 82, 155-164.
5. Bachmann,B.J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.*, 54, 130-197.
6. Bae,Y., Kingsman,S.M., and Kingsman,A.J. (1997). Functional dissection of the Moloney murine leukemia virus envelope protein gp70. *J. Virol.*, 71, 2092-2099.
7. Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
8. Battini,J.L., Danos,O., and Heard,J.M. (1995). Receptor-binding domain of murine leukemia virus envelope glycoproteins. *J Virol*, 69, 713-9.
9. Battini,J.-L., Heard,J.-M., and Danos,O. (1992). Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic and polytropic murine leukemia virus. *J. Virol.*, 66, 1468-1475.
10. Baus,D. and Pfitzner,E. (2006). Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int. J. Cancer*, 118, 1404-1413.
11. Benedict,C.A., Tun,R.Y., Rubinstein,D.B., Guillaume,T., Cannon,P.M., and Anderson,W.F. (1999). Targeting retroviral vectors to CD34-expressing cells: binding to CD34 does not catalyze virus-cell fusion. *Hum Gene Ther*, 10, 545-57.

12. Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M., and Jeang, K.T. (2005). Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, 22, 607-619.
13. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.*, 11, 50-55.
14. 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.
15. Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.
16. Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science*, 296, 550-3.
17. Bucher, E., Hemmes, H., de Haan, P., Goldbach, R., and Prins, M. (2004). The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J. Gen. Virol.*, 85, 983-991.
18. Buckley, R.H., Schiff, R.I., Schiff, S.E., Markert, M.L., Williams, L.W., Harville, T.O., Roberts, J.L., and Puck, J.M. (1997). Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J. Pediatr.*, 130, 378-387.
19. Burger, J.A. and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107, 1761-1767.
20. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8033-7.
21. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L., and Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288, 669-72.
22. Chu, R.L., Post, D.E., Khuri, F.R., and Van Meir, E.G. (2004). Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10, 5299-5312.
23. Chung, Y.S., Breidt, F., and Dubnau, D. (1998). Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 29, 905-913.

24. Clevenger,C.V. (2004). Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 165, 1449-1460.
25. Coffin,J.M., Hughes,S.H., and Varmus,H.E. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Press.
26. Cosset,F.L., Morling,F.J., Takeuchi,Y., Weiss,R.A., Collins,M.K., and Russell,S.J. (1995). Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J Virol*, 69, 6314-22.
27. Cosset,F.L. and Russell,S.J. (1996). Targeting retrovirus entry. *Gene Ther*, 3, 946-56.
28. Couzin,J. (2002). Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science*, 298, 2296-7.
29. Crump,M.P., Gong,J.H., Loetscher,P., Rajarathnam,K., Amara,A., Arenzana-Seisdedos,F., Virelizier,J.L., Baggiolini,M., Sykes,B.D., and Clark-Lewis,I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.*, 16, 6996-7007.
30. Cullen,B.R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell*, 16, 861-865.
31. Cullen,B.R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nat. Genet.*, 38 Suppl 1, S25-S30.
32. Culver,K.W. and Blaese,R.M. (1994). Gene therapy for cancer. *Trends Genet.*, 10, 174-178.
33. Culver,K.W., Ram,Z., Wallbridge,S., Ishii,H., Oldfield,E.H., and Blaese,R.M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256, 1550-1552.
34. Dalba,C., Klatzmann,D., Logg,C.R., and Kasahara,N. (2005). Beyond oncolytic virotherapy: replication-competent retrovirus vectors for selective and stable transduction of tumors. *Curr. Gene Ther.*, 5, 655-667.
35. de Bono,J.S. and Rowinsky,E.K. (2002). The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol. Med.*, 8, S19-S26.
36. Delgadillo,M.O., Saenz,P., Salvador,B., Garcia,J.A., and Simon-Mateo,C. (2004). Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J. Gen. Virol.*, 85, 993-999.

37. Deng,H.K., Unutmaz,D., KewalRamani,V.N., and Littman,D.R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*, 388, 296-300.
38. Dinev,D., Jordan,B.W., Neufeld,B., Lee,J.D., Lindemann,D., Rapp,U.R., and Ludwig,S. (2001). Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. *EMBO Rep.*, 2, 829-834.
39. Doench,J.G., Petersen,C.P., and Sharp,P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, 17, 438-442.
40. Dorn,G., Patel,S., Wotherspoon,G., Hemmings-Mieszczak,M., Barclay,J., Natt,F.J., Martin,P., Bevan,S., Fox,A., Ganju,P., Wishart,W., and Hall,J. (2004). siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res.*, 32, e49.
41. Doyle,A., Morris,C.B., and Armitage,W.J. (1988). Cryopreservation of animal cells. *Adv. Biotechnol. Processes*, 7, 1-17.
42. Duxbury,M.S., Matros,E., Ito,H., Zinner,M.J., Ashley,S.W., and Whang,E.E. (2004). Systemic siRNA-mediated gene silencing: a new approach to targeted therapy of cancer. *Ann. Surg.*, 240, 667-674.
43. Dykxhoorn,D.M., Novina,C.D., and Sharp,P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 457-467.
44. Erlwein,O., Buchholz,C.J., and Schnierle,B.S. (2003). The proline-rich region of the ecotropic Moloney murine leukaemia virus envelope protein tolerates the insertion of the green fluorescent protein and allows the generation of replication-competent virus. *J Gen Virol*, 84, 369-73.
45. Erlwein,O., Wels,W., and Schnierle,B.S. (2002). Chimeric ecotropic MLV envelope proteins that carry EGF receptor-specific ligands and the Pseudomonas exotoxin A translocation domain to target gene transfer to human cancer cells. *Virology*, 302, 333-41.
46. Fearon,E.R. and Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
47. Fielding,A.K., Maurice,M., Morling,F.J., Cosset,F.L., and Russell,S.J. (1998). Inverse targeting of retroviral vectors: selective gene transfer in a mixed population of hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood*, 91, 1802-9.
48. Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.

49. Ge,Q., Filip,L., Bai,A., Nguyen,T., Eisen,H.N., and Chen,J. (2004). Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 8676-8681.
50. Gewirtz,D.A. (2000). Overview. A new discovery phase for antitumor drugs? *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 1, 508-510.
51. Giladi,H., Ketzinel-Gilad,M., Rivkin,L., Felig,Y., Nussbaum,O., and Galun,E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol. Ther.*, 8, 769-776.
52. Gouilleux-Gruart,V., Gouilleux,F., Desaint,C., Claisse,J.F., Capiod,J.C., Delobel,J., Weber-Nordt,R., Dusanter-Fourt,I., Dreyfus,F., Groner,B., and Prin,L. (1996). STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*, 87, 1692-1697.
53. Graham,F.L. and van der Eb,A.J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54, 536-539.
54. Grimm,D., Streetz,K.L., Jopling,C.L., Storm,T.A., Pandey,K., Davis,C.R., Marion,P., Salazar,F., and Kay,M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441, 537-541.
55. Hacein-Bey-Abina,S., von Kalle,C., Schmidt,M., McCormack,M.P., Wulffraat,N., Leboulch,P., Lim,A., Osborne,C.S., Pawliuk,R., Morillon,E., Sorensen,R., Forster,A., Fraser,P., Cohen,J.I., de Saint,B.G., Alexander,I., Wintergerst,U., Frebourg,T., Aurias,A., Stoppa-Lyonnet,D., Romana,S., Radford-Weiss,I., Gross,F., Valensi,F., Delabesse,E., Macintyre,E., Sigaux,F., Soulier,J., Leiva,L.E., Wissler,M., Prinz,C., Rabbitts,T.H., Le Deist,F., Fischer,A., and Cavazzana-Calvo,M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415-419.
56. Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W., and Weinberg,R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 464-468.
57. Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
58. Harari,P.M. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat Cancer*, 11, 689-708.
59. Harbers,K., Schnieke,A., Stuhlmann,H., Jahner,D., and Jaenisch,R. (1981). DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7609-13.

60. Hartl,I., Schneider,R.M., Sun,Y., Medvedovska,J., Chadwick,M.P., Russell,S.J., Cichutek,K., and Buchholz,C.J. (2005). Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells. *Gene Ther.*, 12, 918-926.
61. Hunter,E. and Swanstrom,R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 157, 187-253.
62. Jackson,A.L. and Loeb,L.A. (1998). The mutation rate and cancer. *Genetics*, 148, 1483-1490.
63. Katane,M., Fujita,R., Takao,E., Kubo,Y., Aoki,Y., and Amanuma,H. (2004). An essential role for the His-8 residue of the SDF-1alpha-chimeric, tropism-redirceted Env protein of the Moloney murine leukemia virus in regulating postbinding fusion events. *J Gene Med*, 6, 260-7.
64. Katane,M., Takao,E., Kubo,Y., Fujita,R., and Amanuma,H. (2002). Factors affecting the direct targeting of murine leukemia virus vectors containing peptide ligands in the envelope protein. *EMBO Rep*, 3, 899-904.
65. Kayman,S.C., Park,H., Saxon,M., and Pinter,A. (1999). The hypervariable domain of the murine leukemia virus surface protein tolerates large insertions and deletions, enabling development of a retroviral particle display system. *J Virol*, 73, 1802-8.
66. Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-170.
67. Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386, 761, 763.
68. Klein,C., Bock,C.T., Wedemeyer,H., Wustefeld,T., Locarnini,S., Dienes,H.P., Kubicka,S., Manns,M.P., and Trautwein,C. (2003). Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology*, 125, 9-18.
69. Knudson,A.G., Jr. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.*, 45, 1437-1443.
70. Konnikova,L., Kotecki,M., Kruger,M.M., and Cochran,B.H. (2003). Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC. Cancer*, 3, 23.
71. Kuruppu,D. and Tanabe,K.K. (2005). Viral oncolysis by herpes simplex virus and other viruses. *Cancer Biol. Ther.*, 4, 524-531.

72. Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10, 203-209.
73. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
74. Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Olivero, W.C., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2004). Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, 23, 4681-4689.
75. Lavillette, D., Boson, B., Russell, S.J., and Cosset, F.L. (2001a). Activation of membrane fusion by murine leukemia viruses is controlled in cis or in trans by interactions between the receptor-binding domain and a conserved disulfide loop of the carboxy terminus of the surface glycoprotein. *J Virol*, 75, 3685-95.
76. Lavillette, D., Russell, S.J., and Cosset, F.L. (2001b). Retargeting gene delivery using surface-engineered retroviral vector particles. *Curr Opin Biotechnol*, 12, 461-6.
77. Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A., and Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 308, 557-560.
78. Lee, S.G., Kim, S., Robbins, P.D., and Kim, B.G. (1996). Optimization of environmental factors for the production and handling of recombinant retrovirus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 477-483.
79. Lee, S.O., Lou, W., Qureshi, K.M., Mehraein-Ghomi, F., Trump, D.L., and Gao, A.C. (2004). RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate*, 60, 303-309.
80. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415-419.
81. Leonard, W.J. (2001). Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 1, 200-208.
82. Li, W.X., Li, H., Lu, R., Li, F., Dus, M., Atkinson, P., Brydon, E.W., Johnson, K.L., Garcia-Sastre, A., Ball, L.A., Palese, P., and Ding, S.W. (2004). Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 101, 1350-1355.

83. Lin,E. and Nemunaitis,J. (2004). Oncolytic viral therapies. *Cancer Gene Ther.*, 11, 643-664.
84. Lindemann,D., Bock,M., Schweizer,M., and Rethwilm,A. (1997). Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J Virol*, 71, 4815-20.
85. Lippman,Z., Gendrel,A.V., Black,M., Vaughn,M.W., Dedhia,N., McCombie,W.R., Lavine,K., Mittal,V., May,B., Kasschau,K.D., Carrington,J.C., Doerge,R.W., Colot,V., and Martienssen,R. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430, 471-476.
86. Logg,C.R., Logg,A., Tai,C.K., Cannon,P.M., and Kasahara,N. (2001). Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary. *J Virol*, 75, 6989-98.
87. Lorimer,I.A. (2002). Mutant epidermal growth factor receptors as targets for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2, 91-102.
88. Lorimer,I.A. and Lavictoire,S.J. (2000). Targeting retrovirus to cancer cells expressing a mutant EGF receptor by insertion of a single chain antibody variable domain in the envelope glycoprotein receptor binding lobe. *J Immunol Methods*, 237, 147-57.
89. MacKrell,A.J., Soong,N.W., Curtis,C.M., and Anderson,W.F. (1996). Identification of a subdomain in the Moloney murine leukemia virus envelope protein involved in receptor binding. *J. Virol.*, 70, 1768-1774.
90. Mann,R., Mulligan,R.C., and Baltimore,D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, 33, 153-159.
91. Markowitz,D., Goff,S., and Bank,A. (1988). A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol*, 62, 1120-4.
92. Marmor,M.D., Skaria,K.B., and Yarden,Y. (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 58, 903-913.
93. Martin,F., Chowdhury,S., Neil,S., Phillipps,N., and Collins,M.K. (2002). Envelope-targeted retrovirus vectors transduce melanoma xenografts but not spleen or liver. *Mol Ther*, 5, 269-74.
94. McTaggart,S. and Al Rubeai,M. (2000). Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line. *Biotechnol. Prog.*, 16, 859-865.

95. Meister,G. and Tuschl,T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-349.
96. Mette,M.F., Aufsatz,W., van der,W.J., Matzke,M.A., and Matzke,A.J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.*, 19, 5194-5201.
97. Miller,A.D. and Rosman,G.J. (1989). Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 7, 980-2.
98. Miller,D.G., Adam,M.A., and Miller,A.D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell Biol.*, 10, 4239-4242.
99. Minakuchi,Y., Takeshita,F., Kosaka,N., Sasaki,H., Yamamoto,Y., Kouno,M., Honma,K., Nagahara,S., Hanai,K., Sano,A., Kato,T., Terada,M., and Ochiya,T. (2004). Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.*, 32, e109.
100. Montgomery,M.K. (2004). RNA interference: historical overview and significance. *Methods Mol. Biol.*, 265, 3-21.
101. Morgan,R., Nussbaum,O., Muenchau,D., Shu,L., Couture,L., and Anderson,F.W. (1993). Analysis of the Functional and Host Range-Determining Regions of the Murine Ecotropic and Amphotropic Retrovirus Envelope Proteins. *J. Virol.*, 67, 4712-4721.
102. Morling,F.J., Peng,K.W., Cosset,F.L., and Russell,S.J. (1997). Masking of retroviral envelope functions by oligomerizing polypeptide adaptors. *Virology*, 234, 51-61.
103. Mullen,C.A., Coale,M.M., Lowe,R., and Blaese,R.M. (1994). Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor. *Cancer Res.*, 54, 1503-1506.
104. Myers,R., Greiner,S., Harvey,M., Soeffker,D., Frenzke,M., Abraham,K., Shaw,A., Rozenblatt,S., Federspiel,M.J., Russell,S.J., and Peng,K.W. (2005). Oncolytic activities of approved mumps and measles vaccines for therapy of ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.*, 12, 593-599.
105. Nabel,G.J. (1999). Development of optimized vectors for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 324-326.
106. Nabel,G.J. (2004). Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. *Nat. Med.*, 10, 135-141.

107. Nicholson,R.I., Gee,J.M., and Harper,M.E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer*, 37 Suppl 4, S9-15.
108. Nielsen,M., Kaltoft,K., Nordahl,M., Ropke,C., Geisler,C., Mustelin,T., Dobson,P., Svejgaard,A., and Odum,N. (1997). Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides: tyrphostin AG490 inhibits Stat3 activation and growth of mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 6764-9.
109. Noguchi,M., Yi,H., Rosenblatt,H.M., Filipovich,A.H., Adelstein,S., Modi,W.S., McBride,O.W., and Leonard,W.J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*, 73, 147-157.
110. Olumi,A.F., Grossfeld,G.D., Hayward,S.W., Carroll,P.R., Tlsty,T.D., and Cunha,G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.*, 59, 5002-5011.
111. Opalinska,J.B. and Gewirtz,A.M. (2002). Nucleic acid therapeutics: a work in progress. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3, 928-933.
112. Ott,D. and Rein,A. (1992). Basis for Receptor Specificity of Nonectropic Murine Leukemia Virus Surface Glycoprotein gp70^{su}. *J. Virol.*, 66, 4632-4638.
113. Peng,K.W., Morling,F.J., Cosset,F.L., Murphy,G., and Russell,S.J. (1997). A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases. *Hum Gene Ther*, 8, 729-38.
114. Peng,K.W., Pham,L., Ye,H., Zufferey,R., Trono,D., Cosset,F.L., and Russell,S.J. (2001). Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Ther*, 8, 1456-63.
115. Prats,A.C., Roy,C., Wang,P.A., Erard,M., Housset,V., Gabus,C., Paoletti,C., and Darlix,J.L. (1990). cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J. Virol.*, 64, 774-783.
116. Qiao,J., Moreno,J., Sanchez-Perez,L., Kottke,T., Thompson,J., Caruso,M., Diaz,R.M., and Vile,R. (2006). VSV-G pseudotyped, MuLV-based, semi-replication-competent retrovirus for cancer treatment. *Gene Ther.*
117. Ram,Z., Culver,K.W., Oshiro,E.M., Viola,J.J., DeVroom,H.L., Otto,E., Long,Z., Chiang,Y., McGarrity,G.J., Muul,L.M., Katz,D., Blaese,R.M., and Oldfield,E.H. (1997). Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.*, 3, 1354-1361.

118. Ram,Z., Culver,K.W., Walbridge,S., Blaese,R.M., and Oldfield,E.H. (1993). In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.*, 53, 83-88.
119. Reich,S.J., Fosnot,J., Kuroki,A., Tang,W., Yang,X., Maguire,A.M., Bennett,J., and Tolentino,M.J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.*, 9, 210-216.
120. Richard,C.L., Tan,E.Y., and Blay,J. (2006). Adenosine upregulates CXCR4 and enhances the proliferative and migratory responses of human carcinoma cells to CXCL12/SDF-1alpha. *Int. J. Cancer*.
121. Rodriguez-Frade,J.M., Mellado,M., and Martinez,A. (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol.*, 22, 612-617.
122. Roth,J.A. and Cristiano,R.J. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.*, 89, 21-39.
123. Rubinson,D.A., Dillon,C.P., Kwiatkowski,A.V., Sievers,C., Yang,L., Kopinja,J., Rooney,D.L., Ihrig,M.M., McManus,M.T., Gertler,F.B., Scott,M.L., and Van Parijs,L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.*, 33, 401-406.
124. Russell,S.J., Hawkins,R.E., and Winter,G. (1993). Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res*, 21, 1081-5.
125. Russell,W.C., Newman,C., and Williamson,D.H. (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*, 253, 461-462.
126. Salomon,D.S., Normanno,N., Ciardiello,F., Brandt,R., Shoyab,M., and Todaro,G.J. (1995). The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 33, 103-114.
127. Schmidt,M., Reiser,P., Hills,D., Gullick,W.J., and Wels,W. (1998). Expression of an oncogenic mutant EGF receptor markedly increases the sensitivity of cells to an EGF-receptor-specific antibody-toxin. *Int. J. Cancer*, 75, 878-884.
128. 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 Ther.*, 10, 1370-1380.
129. Schnierle,B.S. and Groner,B. (1996a). Retroviral targeted delivery. *Gene Ther*, 3, 1069-73.

130. Schnierle,B.S., Moritz,D., Jeschke,M., and Groner,B. (1996b). Expression of chimeric envelope proteins in helper cell lines and integration into Moloney murine leukemia virus particles. *Gene Ther*, 3, 334-42.
131. Shankar,P., Manjunath,N., and Lieberman,J. (2005). The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA*, 293, 1367-1373.
132. Shen,Y. and Nemunaitis,J. (2005). Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol. Ther.*, 11, 180-195.
133. Shen,Y. and Nemunaitis,J. (2006). Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther.*.
134. Short,M.P., Choi,B.C., Lee,J.K., Malick,A., Breakefield,X.O., and Martuza,R.L. (1990). Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J. Neurosci. Res.*, 27, 427-439.
135. Sinn,P.L., Sauter,S.L., and McCray,P.B., Jr. (2005). Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther.*, 12, 1089-1098.
136. Sizova,D.V., Kolupaeva,V.G., Pestova,T.V., Shatsky,I.N., and Hellen,C.U. (1998). Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J. Virol.*, 72, 4775-4782.
137. Skobe,M. and Fusenig,N.E. (1998). Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 95, 1050-1055.
138. Sliva,K., Erlwein,O., Bittner,A., and Schnierle,B.S. (2004a). Murine leukemia virus (MLV) replication monitored with fluorescent proteins. *Viol. J.*, 1, 14.
139. Sliva, K. and Schnierle, BS. Targeting retroviral vector entry by host range extension. *Gen Ther Mol Biol* 8, 335-342. 2004b.
140. Sliva,K. and Schnierle,BS. (2006). Stable integration of a functional shRNA expression cassette into the murine leukemia virus genome. *Virology*.
141. Spitzer,D., Dittmar,K.E., Rohde,M., Hauser,H., and Wirth,D. (2003). Green fluorescent protein-tagged retroviral envelope protein for analysis of virus-cell interactions. *J Virol*, 77, 6070-5.
142. Stass,S.A. and Mixson,J. (1997). Oncogenes and tumor suppressor genes: therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.*, 3, 2687-2695.

143. Statistisches Bundesamt Deutschland. 2004.
144. Tabara,H., Sarkissian,M., Kelly,W.G., Fleenor,J., Grishok,A., Timmons,L., Fire,A., and Mello,C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99, 123-132.
145. Tai,C.K., Wang,W.J., Chen,T.C., and Kasahara,N. (2005). Single-shot, multicycle suicide gene therapy by replication-competent retrovirus vectors achieves long-term survival benefit in experimental glioma. *Mol. Ther.*, 12, 842-851.
146. Tang,G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.*, 30, 106-114.
147. Temin,H.M. and Mizutani,S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-1213.
148. Tomari,Y., Matranga,C., Haley,B., Martinez,N., and Zamore,P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306, 1377-1380.
149. Tompkins,S.M., Lo,C.Y., Tumpey,T.M., and Epstein,S.L. (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 8682-8686.
150. Tuschl,T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol*, 20, 446-8.
151. Varmus,H.E. and Swanström,R. (1982). Replication of retroviruses. *RNA tumor viruses*, . Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, pp. 369-512.
152. Vile,R.G., Russell,S.J., and Lemoine,N.R. (2000). Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.*, 7, 2-8.
153. Voinnet,O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, 17, 449-459.
154. Walker,F., Hibbs,M.L., Zhang,H.H., Gonez,L.J., and Burgess,A.W. (1998). Biochemical characterization of mutant EGF receptors expressed in the hemopoietic cell line BaF/3. *Growth Factors*, 16, 53-67.
155. Wang,Q. and Carmichael,G.G. (2004). Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 432-452.
156. Wang,W., Tai,C.K., Kershaw,A.D., Solly,S.K., Klatzmann,D., Kasahara,N., and Chen,T.C. (2006). Use of replication-competent retroviral vectors in an immunocompetent intracranial glioma model. *Neurosurg. Focus.*, 20, E25.

157. Waterhouse,P.M. (2006). Defense and counterdefense in the plant world. *Nat. Genet.*, 38, 138-139.
158. Waterhouse,P.M. and Helliwell,C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.*, 4, 29-38.
159. Weimin Wu,B., Cannon,P.M., Gordon,E.M., Hall,F.L., and Anderson,W.F. (1998). Characterization of the proline-rich region of murine leukemia virus envelope protein. *J Virol*, 72, 5383-91.
160. Weinberg RA. (1994). Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin.*, 44, 160-170.
161. Weinberg,R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science*, 254, 1138-1146.
162. Wells,A. (1999). EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31, 637-643.
163. Westerhout,E.M., Vink,M., Joost Haasnoot,P.C., Das,A.T., and Berkhout,B. (2006). A conditionally replicating HIV-based vector that stably expresses an antiviral shRNA against HIV-1 replication. *Mol. Ther.*.
164. Wikstrand,C.J., Cokgor,I., Sampson,J.H., and Bigner,D.D. (1999). Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. *Cancer Metastasis Rev.*, 18, 451-464.
165. Wikstrand,C.J., McLendon,R.E., Friedman,A.H., and Bigner,D.D. (1997). Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res.*, 57, 4130-4140.
166. Wikstrand,C.J., Reist,C.J., Archer,G.E., Zalutsky,M.R., and Bigner,D.D. (1998). The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4, 148-158.
167. Woodburn,J.R. (1999). The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.*, 82, 241-250.
168. Wu,B.W., Lu,J., Gallaher,T.K., Anderson,W.F., and Cannon,P.M. (2000). Identification of regions in the Moloney murine leukemia virus SU protein that tolerate the insertion of an integrin-binding peptide. *Virology*, 269, 7-17.
169. Wu,X., Li,Y., Crise,B., and Burgess,S.M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 300, 1749-1751.

-
170. Xia,H., Mao,Q., Eliason,S.L., Harper,S.Q., Martins,I.H., Orr,H.T., Paulson,H.L., Yang,L., Kotin,R.M., and Davidson,B.L. (2004). RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.*, 10, 816-820.
 171. Yarden,Y. and Sliwkowski,M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 127-137.
 172. Zavada,J. (1982). The pseudotypic paradox. *J. Gen. Virol.*, 63 (Pt 1), 15-24.
 173. Zhang,Y., Zhang,Y.F., Bryant,J., Charles,A., Boado,R.J., and Pardridge,W.M. (2004). Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.*, 10, 3667-3677.

7.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1 BEHANDLUNGSZIELE ALLER WELTWEIT ANGEMELDETEN KLINISCHEN STUDIEN DER GENTHERAPIE.....	2
ABBILDUNG 1-2 ERWORBENE FÄHIGKEITEN VON KREBSZELLEN.	3
ABBILDUNG 1-3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES EGF-REZEPTORS UND DER EINZELNEN DOMÄNEN.	5
ABBILDUNG 1-4 ÜBERBLICK DER SIGNALKASKADEN NACH LIGANDENBINDUNG AN DEN EGFR.....	6
ABBILDUNG 1-5 SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER FOLGEN DER SIGNALKASKADEN NACH LIGANDENBINDUNG.....	7
ABBILDUNG 1-6 FUNKTION DER STAT-MOLEKÜLE NACH AKTIVIERUNG.....	10
ABBILDUNG 1-7 VERWENDETE GENTRANSFERSYSTEME ALLER WELTWEIT ANGEMELDETEN KLINISCHEN STUDIEN.	12
ABBILDUNG 1-8 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES GAMMA-RETROVIRUS.	12
ABBILDUNG 1-9 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RETROVIRALEN GENOMS UND EINES VIRUSPARTIKELS.	13
ABBILDUNG 1-10 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RETROVIRALEN LEBENSZYKLUS.	14
ABBILDUNG 1-11 REZEPTOR FÜR ECOTROPE MLVs.....	17
ABBILDUNG 1-12 STRUKTUR UND FUNKTION VON MLV-ENV-PROTEINEN.	18
ABBILDUNG 1-13 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERTEILUNG EINES REPLIKATIONSKOMPETENTEN VIRUS IN ZELLEN IM VERGLEICH ZU EINEM NICHTREPLIZIERENDEN VEKTOR.	20
ABBILDUNG 1-14 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ERWEITERUNG DES WIRTSTROPISMUS VON ECOTROPEM MLV-ENV AUF SPEZIFISCHE HUMANE (TUMOR-)ZELLEN.....	21
ABBILDUNG 1-15 ENDOSOMEN-DEGRADIERUNG VON EGF-TRAGENDEN RETROVIREN NACH REZEPTORBINDUNG.	22
ABBILDUNG 1-16 DIREKTES <i>TARGETING</i>	24
ABBILDUNG 1-17 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES CHEMOKINREZEPTORS CXCR4.....	25
ABBILDUNG 1-18 <i>DICER</i> -PROTEINKOMPLEX GEBUNDEN AN ZIEL MRNA.	28
ABBILDUNG 1-19 MECHANISMUS DES RNAI.	29
ABBILDUNG 1-20 BIOGENESE UND FUNKTION VON HUMANEN MIRNAS.....	31
ABBILDUNG 1-21 PSUPER shRNA.....	35
ABBILDUNG 3-1 SCHEMATISCHE ZEICHNUNG DES BLOT-AUFBAUS.....	62
ABBILDUNG 4-1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES GFP-MOV.....	67
ABBILDUNG 4-2 REPLIKATIONSKINETIK DES GFP-MOV NACH TRANSFEKTION IN NIH3T3.	68
ABBILDUNG 4-3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES pZAPM-GFP-GENOMS.	69
ABBILDUNG 4-4 REPLIKATIONSKINETIK DER VIREN GFP-MOV UND pZAPM-GFP AUF NIH3T3 ZELLEN. ...	69
ABBILDUNG 4-5 ZELLULÄRE VERTEILUNG VON IRES-GFP (A) UND GFP-ENV (B) IN INFIZIERTEN NIH3T3 ZELLEN.	70
ABBILDUNG 4-6 BINDUNG DES GFP-MOV AN ZELLEN	71

ABBILDUNG 4-7 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RETROVIRALEN VEKTORS pKAΔENVRFP	74
ABBILDUNG 4-8 KLONIERUNGSSHEMA DES RETROVIRALEN VEKTORS pCZCF-MLV-GFP-ENV.	75
ABBILDUNG 4-9 A: GFP-ENV-EXPRIMIERENDE NIH3T3 ZELLEN.....	76
ABBILDUNG 4-10 REPLIKATIONSKINETIK DER SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN NACH KOTRANSFEKTION IM VERHÄLTNIS 1GAG/POL : 1ENV.....	77
ABBILDUNG 4-11 REPLIKATIONSKINETIK DER SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN NACH KOTRANSFEKTION IM VERHÄLTNIS 1 GAG/POL : 10 ENV.	78
ABBILDUNG 4-12 REPLIKATIONSKINETIK DER SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN NACH KOTRANSFEKTION IM VERHÄLTNIS 10 GAG/POL : 1 ENV.	79
ABBILDUNG 4-13 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VORGÄNGE IN DER ZELLKULTURSCHALE NACH KOTRANSFEKTION DER BEIDEN SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN.....	80
ABBILDUNG 4-14 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WEITEREN VORGÄNGE NACH DER ERSTEN BILDUNG VON VEKTOREN.....	81
ABBILDUNG 4-15 REPLIKATIONSKINETIK NACH TRANSDUKTION MIT VEKTORÜBERSTÄNDEN..	83
ABBILDUNG 4-16 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SEMIREPLIKATIVEN VEKTORS GFP-ENV.....	84
ABBILDUNG 4-17 PCR-ANALYSE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER GENETISCHEN STABILITÄT DES GFP-ENV.....	85
ABBILDUNG 4-18 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FLUORESCENZMARKIERTEN, SEMIREPLIKATIVEN VEKTOREN UND LAGE DER <i>PRIMER</i>	87
ABBILDUNG 4-19 PCR-ANALYSE ZUR ÜBERPRÜFUNG VON REKOMBINATIONSEREIGNISSEN.....	87
ABBILDUNG 4-20 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VORGÄNGE NACH TRANSEKTION DER DREI EXPRESSIONSPLASMIDE UND TRANSDUKTION VON ZIELZELLEN MIT DEN GENERIERTEN VEKTOREN.	91
ABBILDUNG 4-21 ERGEBNISSE ZWEI TAGE NACH TRANSDUKTION DER UNTERSCHIEDLICHEN ZELLEN MIT VEKTORPARTIKELN, WELCHE UNTERSCHIEDLICHE HÜLLPROTEINE TRAGEN.....	93
ABBILDUNG 4-23 SCHEMATISCHE KLONIERUNG DES pSG-wtENV-GFP-SDF-1 α	95
ABBILDUNG 4-24 WESTERN-BLOT VON ZELLYSATEN DER TRANSFIZIERTEN 293T ZELLEN.	96
ABBILDUNG 4-25 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER TRANSDUZIERTEN NIH3T3x4 ZELLEN MIT VEKTOREN WELCHE DAS GFP-ENV, DAS SDF-1 α -ENV ODER GAR KEIN ENV TRUGEN.	97
ABBILDUNG 4-26 FACS-ERGEBNISSE ZWEI TAGE NACH TRANSDUKTION.....	98
ABBILDUNG 4-27 UNTERSUCHUNG DER TRANSDUKTIONSTITER.....	99
ABBILDUNG 4-28 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLONIERUNG DES pZAP-GFP-ENV-SDF-1 α -IRES-GFP.....	100
ABBILDUNG 4-29 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES pZAP-GFP-ENV-SDF-1 α -PLASMIDS.	100
ABBILDUNG 4-30 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LAGE DER ZUR PCR VERWENDETEN PRIMER.	101
ABBILDUNG 4-31 UNTERSUCHUNG DER GENOMISCHEN STABILITÄT DES SDF-1 α -GFP-ENV.	101
ABBILDUNG 4-32 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLONIERUNG DES pZAP-SDF-1 α -IRES-GFP.....	102
ABBILDUNG 4-33 REPLIKATIONSKINETIK DER VIREN IN NIH3T3 ZELLEN.....	103
ABBILDUNG 4-34 TRANSDUKTION / INFESTION DER VIRUSÜBERSTÄNDE DER TRANSFIZIERTEN NIH3T3 IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLEN.....	104

ABBILDUNG 4-35 REPLIKATIONSKINETIK DER VIREN IN NIH3T3x4 ZELLEN.....	105
ABBILDUNG 4-36 TRANSDUKTION / INFEKTION DER VIRUSÜBERSTÄNDE DER TRANSFIZIERTEN NIH3T3x4 IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLEN.....	106
ABBILDUNG 4-37 LAGE DER ZUR PCR VERWENDETEN PRIMER.....	107
ABBILDUNG 4-38 PCR-ANALYSE DER SDF-1 α -SEQUENZEN IN DEN REKOMBINANTEN VIREN WÄHREND DEREN REPLIKATION AUF NIH3T3 UND NIH3T3x4 ZELLEN.	107
ABBILDUNG 4-39 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES GFP-EMO.	109
ABBILDUNG 4-40 REPLIKATIONSKINETIK DER REKOMBINANTEN VIREN GFP-MOV UND GFP-EMO AUF NIH3T3 ZELLEN.	110
ABBILDUNG 4-41 BINDUNGSASSAY DER ÜBERSTÄNDE VON GFP-EMO UND GFP-MOV	111
ABBILDUNG 4-42 LEBENDZELLZAHLBESTIMMUNG DER BAF/wTEGFR UND BAF/ERX ZELLEN	112
ABBILDUNG 4-43 LEBENDZELLZAHLBESTIMMUNG DER BAF/wTEGFR UND BAF/ERX-ZELLEN.....	113
ABBILDUNG 4-44 ANALYSE DER EXPRESSION DES VIRALEN HÜLLPROTEINS ENV IN BAF/wTEGFR UND BAF/ERX ZELLEN.	114
ABBILDUNG 4-45 DURCHFLUßZYTOMETRISCHE ANALYSE VON NIH3T3, HeLa UND A431 ZELLEN MIT UND OHNE BEHANDLUNG MIT ÜBERSTÄNDEN DER GFP-EMO-INFIZIERTEN BAF ZELLEN.	115
ABBILDUNG 4-46 ZUR AMPLIFIKATION DES GFP VERWENDETE <i>PRIMER</i> ZUR KLONIERUNG DES PC-GFP- AiCD.	117
ABBILDUNG 4-47 ZUR AMPLIFIKATION DES GFP UND DER <i>SPACER</i> SEQUENZEN VERWENDETE <i>PRIMER</i> ZUR KLONIERUNG DES PC-GFP-AiCD- <i>SPACER</i>	118
ABBILDUNG 4-48 SCHEMATISCHE KLONIERUNG DER VIREN PC-GFP-AiCD UND PC-GFP-AiCD- <i>SPACER</i> ..	118
ABBILDUNG 4-49 REPLIKATIONSKINETIK DER REKOMBINANTEN AMPHOTROPEN MLVs MIT GFP ALS FUSION AM N-TERMINUS MIT UND OHNE <i>SPACER</i> IN NIH3T3 ZELLEN.....	119
ABBILDUNG 4-50 SCHEMATISCHE KLONIERUNG DES PC-GFP- Δ CD- <i>SPACER</i>	120
ABBILDUNG 4-51 REPLIKATIONSKINETIK DER AMPHOTROPEN MLVs MIT GFP ALS FUSION AM N-TERMINUS UND <i>SPACER</i> MIT ODER OHNE CD-REGION AUF NIH3T3 ZELLEN.	120
ABBILDUNG 4-52 REPLIKATIONSKINETIK DER REKOMBINANTEN ECOTROPEN UND AMPHOTROPEN MLVs MIT GFP ALS FUSION IN DER PRR BZW. AM N-TERMINUS MIT <i>SPACER</i> AUF NIH3T3 ZELLEN.	121
ABBILDUNG 4-53 REPLIKATIONSKINETIK DER VIREN PC-GFP-AiCD- <i>SPACER</i> UND PC-GFP- Δ CD- <i>SPACER</i> NACH TRANSFEKTION AUF 293T ZELLEN.	122
ABBILDUNG 4-54 INFEKTIONSTITER DER REKOMBINANTEN VIREN AUF UNTERSCHIEDLICHEN ZELLEN.	123
ABBILDUNG 4-55 TRANSDUKTIONSTITER DER REKOMBINANTEN VIREN AUF NIH3T3.	124
ABBILDUNG 4-56 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DES VIRALEN HÜLLPROTEINS ENV IN UNTERSCHIEDLICHEN INFIZIERTEN/TRANSDUZIERTEN ZELLEN.....	125
ABBILDUNG 4-57 DARSTELLUNG DER ABGLEICHUNG DER HUMANEN, PUBLIZIERTEN siRNA-SEQUENZEN MIT DEN MAUSSEQUENZEN.....	127

ABBILDUNG 4-58 IDENTIFIZIERUNG FUNKTIONELLER shRNAs GEGEN STAT3.....	128
ABBILDUNG 4-59 TESTUNG DER shRNA GEGEN DEN EGF-REZEPTOR AUF EFFIZIENZ IN DER HERUNTERREGULATION DES EGFR PROTEINS.....	129
ABBILDUNG 4-60 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLONIERUNG DES pZAP-GFP-ENV-IRES-GFP.....	131
ABBILDUNG 4-61 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KLONIERUNG DES pZAP-GFP-ENV-shRNA.....	131
ABBILDUNG 4-62 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REKOMBINANTEN VIREN.....	132
ABBILDUNG 4-63 REPLIKATIONSKINETIK DER REKOMBINANTEN VIREN AUF NIH3T3 ZELLEN.....	132
ABBILDUNG 4-64 WESTERN-BLOT-ANALYSE VON GESAMTZELLYSATEN VON pZAP-GFPENV-shEGFR INFIZIERTEN DHAE ZELLEN.....	133
ABBILDUNG 4-65 WESTERN-BLOT-ANALYSE VON GESAMTZELLYSATEN VON pZAP-GFPENV-shSTAT3-INFIZIERTEN NIH3T3 ZELLEN.....	134
ABBILDUNG 4-66 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LAGE DER PRIMER ZUR UNTERSUCHUNG DER GENOMISCHEN STABILITÄT DES pZAP-GFPENV-shSTAT3.....	136
ABBILDUNG 4-67 GENOMISCHE STABILITÄT DER shRNA-EXPRESSIONSKASSETTEN.....	137
ABBILDUNG 4-68 ABGLEICH DER SEQUENZEN DER SEQUENZIERUNGSREAKTION DER UNTERSCHIEDLICHEN PCR-PRODUKTE GEGEN DIE URSPRUNGSSEQUENZ.....	138
ABBILDUNG 4-69 INTERFERON- α ELISA ERGEBNISSE.....	139
ABBILDUNG 6-1 ZUSAMMENFASSENDER DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER SDF-1 α TRAGENDEN REKOMBINANTEN VIREN.....	149
ABBILDUNG 6-2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VORGÄNGE NACH TRANSFEKTION DES AMPHOTROPEN GFP-MLV IN HUMANE UND MURINE ZELLEN.....	152

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Georg-Speyer-Haus in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Schnierle und im letzten Teil der Arbeit am Paul-Ehrlich-Institut im Sachbereich 2/01 durchgeführt.

Ich danke Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz für das entgegengebrachte Interesse an dieser Arbeit, die Übernahme der Zweitbetreuung und die Unterstützung in Form eines Probevortrages in ihrer Arbeitsgruppe.

Ich danke den Herren Prof. Dr. Groner und Prof. Dr. Löwer für die Bereitstellung der Arbeitsplätze und Verbrauchsmaterialien und ihre Zusammenarbeit, die mir eine sorgenfreie und erfolgreiche Vollendung meiner Promotion ermöglichte.

Ganz besonders herzlich möchte ich Frau PD Dr. Barbara Schnierle für die freundliche Betreuung und stetige Bereitschaft zur Erörterung und Lösung von Problemen danken. Während der gesamten Promotionszeit hat sie mir immer mit wertvollen Ratschlägen zur Seite gestanden. Ohne ihre immerwährende Unterstützung und Geduld wäre ich heute nicht dort, wo ich bin. Nicht nur mit den vielen wissenschaftlichen Diskussionen, sondern auch als Hilfe in allen Lebenslagen hat sie mich durch meine Promotionszeit begleitet.

Der nächste Wegbegleiter meiner gesamten Promotionszeit war Thomas Schulz, bei dem ich mich ebenfalls für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken möchte. Wenn auch nicht immer gleicher Meinung, so warst Du mir sehr oft eine große Hilfe und hast immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden!

Für die freundliche Durchführung des Interferon- α -ELISAs danke ich Dr. Zoe Weibler.

Frau Dr. Francesca Walker danke ich für die Kooperation und Überlassung der BaF/wt EGFR und BaF/ERX Zellen sowie die freundliche Hilfestellung bei allen diesbezüglichen Fragen.

Mein nächster Dank geht an alle, die mir den Laboralltag versüßt haben. Hierzu gehören Melanie Albrecht, Sandra Krause, Alexandra Pinczolits, Claudia Schopper, Marco Lodrini, Markus Lantermann und Holger Ludwig. Bei Melanie möchte ich mich für ihre Freundschaft und ihre Gelduld beim Korrekturlesen bedanken. Weiter danke ich Sandra, die mich schon über den einen oder anderen Tag gerettet hat, immer für gute Laune sorgte und für jedes Wehwehchen ein offenes Ohr hatte. Ebenfalls ein Dank geht an Alexandra Pinczolits, die mir nicht nur beruflich jeden Tag ein Lächeln auf die Lippen gezaubert hat. Und ganz besonders Claudia, die mit ihrer positiven Einstellung und ihrer liebevollen Art eine gute Freundin für

mich geworden ist. Und natürlich Lantermännchen, der für jeden Spass zu haben ist und mich immer zum Lachen gebracht hat.

Ich danke Dr. Holger Ludwig für seine immerwährende Ruhe und Geduld und Hilfe bei allen fachlichen Fragen.

Ich danke den Praktikantinnen und Praktikanten, meinen „P's“, für Ihre leidenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit und Ihr Interesse. Ganz besonders danke ich Joachim Zwilling, dem „Klonator“, Tica Pichulik „*the brain*“ und Youridies Vattakuzhi. Sie alle haben mich einen Teil meines Weges begleitet und einen kleinen Teil zum erfolgreichen Gelingen meiner Arbeit beigetragen!

Ich danke allen Kollegen am Georg-Speyer-Haus für die wundervolle Atmosphäre und die gegenseitige Unterstützung, die dort herrscht.

Ich danke Yolanda Martinez-Fernandez, die mir in der stressigen Endphase des Zusammenschreibens eine Unterstützung bei der Laborarbeit war.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe 2/01 des Paul-Ehrlich-Institutes für ihre Unterstützung im Laboralltag und das sehr angenehme Arbeitsklima: PD Dr. Gerd Sutter, Dr. Astrid Schwantes, Melanie Krämer, Yasemin Süzer, Karin Sperling, Christopher Pöhlmann, Martin Liebel, Yolanda Martinez-Fernandez, Daniela Müller, Ruth Aschberger und Brigitte Gatzki.

Mein herzlicher Dank geht an alle meine Freunden, die mich in allen Lebenslagen begleitet haben, immer für mich da sind und mich besonders in der stressigen Zeit der Promotion so liebevoll unterstützt haben, ganz besonders Ann-Catherine Hoffmann und Evelin Kleinbub für das geduldige Korrekturlesen.

Mein größter Dank geht an meine Familie, meinen Bruder und meine Eltern Zdenka und Dalibor Sliva, die mir mein Studium ermöglicht haben und ohne deren Liebe und Unterstützung ich dieses Ziel niemals erreicht hätte. Meiner Mutter danke ich außerdem für das geduldige Korrekturlesen der Arbeit.

Danke Julian, für alles, was Du für mich bist.

Wissenschaftliche Publikationen

- Sliva K. and Schnierle BS (2004). Targeting retroviral vector entry by host range extension. *Gene Ther Mol Biol* 8: 335-342.
- Sliva K., Erlwein O., Bittner A., Schnierle BS (2004). Murine leukemia virus (MLV) replication monitored with fluorescent proteins. *Virology* 1, 14.
- Sliva K. and Schnierle BS (2006). Stable integration of a functional shRNA expression cassette into the murine leukaemia virus genome. *Virology in press*.
- Lantermann M., Schwantes A., Sliva K., Sutter G., Schnierle BS (2006). Vaccinia virus double-stranded RNA-binding protein E3 does not interfere with siRNA mediated gene silencing, making RNA interference a tool for gene function analysis of poxviruses. Manuskript eingereicht.

Vorträge

- 2. Jahrestagung des Arbeitskreises für Virale Vektoren der Gesellschaft für Virologie GfV 2004 in Frankfurt am Main
"Replication competent retroviruses as transport vehicles for siRNA: A tool to investigate tumor-development and as a possible tumor therapy"
Katja Sliva
- 3. Jahrestagung des Arbeitskreises für Virale Vektoren der Gesellschaft für Virologie GfV 2005 in Würzburg
"Replication competent MLV as *in vivo* transfer vehicle for siRNA: Tools for functional genomics and cancer therapy"
Katja Sliva

Posterpräsentationen

- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie GfV 2004 in Tübingen
„Fluorescent proteins as tool to monitor retrovirus entry and replication“
Katja Sliva, Otto Erlwein, Alexandra Bittner, Barbara Schnierle

- Jährliche Begutachtung der Forschungsarbeiten am Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main 2004
„Replication competent retroviral vectors carrying siRNA as tool to investigate tumor development and as potential tumor“
Katja Sliva und Barbara Schnierle

„MLV/HIV pseudotypes: Generation of viruses and vectors for HIV vaccine development.“
Alexandra Bittner, Ursula Nack, Katja Sliva, Melanie Kremer, Barbara Schnierle
- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie GfV 2005 in Hannover
“Murine leukaemia virus (MLV) replication monitored with fluorescent proteins“
Katja Sliva, Otto Erlwein, Alexandra Bittner, Barbara Schnierle
- 5. Internationale Tagung “Target Definition & Vector Design for molecular Medicine” 2005 in Cold Spring Harbour, New York, USA
“Replication Competent Murine Leukemia Virus as *in vivo* Transfer Vehicle for siRNA for Functional Genomics and Cancer Therapy“
Katja Sliva und Barbara Schnierle
- Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie GfV 2006 in München
„Stable integration of a functional shRNA expression cassette into the murine leukemia virus genome“
Katja Sliva und Barbara Schnierle

Besondere Ehrungen

- **Reisestipendium der Deutschen Forschungsgesellschaft DFG**
für die 5. Internationale Tagung “Target Definition & Vector Design for molecular Medicine” 2005 in Cold Spring Harbour, New York, USA

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Dipl. Biol. Katja Sliva

Adresse: Jahnstrasse 4b, 64347 Griesheim
Telefon 0178-8997765
E-Mail katja.sliva@googlemail.com
Staatsangehörigkeit deutsch
Geburtsdatum 08. Februar 1976
Geburtsort Frýdek-Místek, Tschechische Republik
Familienstand ledig

SCHULBILDUNG

1987 - 1996 EDITH-STEIN SCHULE (Gymnasium) in DARMSTADT
Abschluß: Abitur

1983 - 1987 FRANKENSTEIN SCHULE (Grundschule) in DARMSTADT

1982 - 1983 VORSCHULKLASSE der FRANKENSTEIN SCHULE in DARMSTADT

AKADEMISCHER WERDEGANG

2003 - 2006 PROMOTION durchgeführt am GEORG-SPEYER-HAUS FRANKFURT a.M.
Betreut durch die JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT

1998 - 2002 JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT a. M.
Hauptstudium Anthropologie und Humangenetik
Abschluß: Diplom

1996 - 1998 TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT
Grundstudium Biologie
Abschluß: Vordiplom

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden.

Griesheim, den

Katja Sliva