

# **Tumor-Targeting: Selektion konditional replizierender Retroviren durch gerichtete Evolution**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Irene Hartl**  
aus Hanau

Frankfurt 2005  
(DF1)

**Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang  
Goethe – Universität als Dissertation angenommen.**

**Dekan:** ..... **Prof. Dr. Schwalbe** .....

**Gutachter:** ..... **Prof. Dr. Ludwig und PD Dr. Buchholz** .....

**Datum der Disputation:** ..... **10.06.2005** .....

**Selbst der längste Weg beginnt mit dem ersten Schritt**

**Lao Tse (~ 600 - 400 v. Chr.)**

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1.1 GENTRANSFER ZUR TUMORBEHANDLUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Viren in der Tumorthherapie	2
1.1.2 Targeting Strategien	3
<b>1.2 KONZEPT DES PROTEASE-TARGETINGS .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Das Virus	5
1.2.2 Die Blockierungsdomäne	7
1.2.3 Die Proteasen und ihre Spaltstellen	8
<b>1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>11</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
<hr/>	
<b>2.1 MATERIAL .....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	12
2.1.2 Enzyme, rekombinante Proteine und Inhibitoren	12
2.1.3 Antikörper und Antiseren	12
2.1.4 Plasmide	13
2.1.5 Oligonukleotide	13
2.1.6 Bakterienstämme	13
2.1.7 Zelllinien	13
2.1.8 Geräte	14
2.1.9 Puffer, Lösungen und Medien	15
2.1.9.1 Allgemeine Puffer	15
2.1.9.2 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	15
2.1.9.3 Bakterienkultur-Lösungen	15
2.1.9.4 Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese	16
2.1.9.5 Puffer für die Zymographie	16
2.1.9.6 Puffer für Westernblot-Analysen	16
2.1.9.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur	17
2.1.9.8 IPA-Lösungen	17
2.1.9.9 Lösungen für die Veterinärmedizin	17
<b>2.2 METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE .....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation	18
2.2.2 Photometrische Messung der DNA-Konzentration	18

2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	18
2.2.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren	19
2.2.4.1	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.2.4.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Enzymreaktionen	19
2.2.4.3	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	19
2.2.5	Arbeiten mit Bakterien	19
2.2.5.1	Kultivierung von Bakterien	19
2.2.5.2	Herstellung kompetenter Bakterien	20
2.2.5.3	Transformation von Bakterien	20
2.2.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	21
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.2.7	Semiquantitative PCR	22
2.2.7.1	Reaktionsansatz des Virus-Nachweises	23
2.2.7.2	Reaktionsansatz des Spezies-Nachweises	23
2.2.8	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	23
2.2.9	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	24
2.2.10	DNA-Sequenzierung	24
<b>2.3</b>	<b>METHODEN DER ZELLBIOLOGIE .....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Kultivierung von Zellen	25
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
2.3.3	Transfektion von Zellen	26
<b>2.4</b>	<b>METHODEN DER VIROLOGIE .....</b>	<b>26</b>
2.4.1	Herstellung und Konzentrierung von Viruspartikeln	26
2.4.2	Infektion von Zellen und Titration von Viren	27
2.4.3	Isolierung viraler RNA	27
2.4.4	Reverse Transkriptase Aktivitäts-Test (RT-Test)	27
2.4.5	Immunperoxidase-Test (IPA)	28
<b>2.5</b>	<b>METHODEN DER PROTEINBIOCHEMIE .....</b>	<b>28</b>
2.5.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.5.2	Zymographie	29
2.5.3	Western Blot-Analyse	29
<b>2.6</b>	<b>METHODEN DER VETERINÄRMEDIZIN.....</b>	<b>30</b>
2.6.1	Haltung der SCID-Mäuse	30
2.6.2	Injektion von Tumorzellen	30

2.6.3	Virusinjektion	31
2.6.4	Tumor- und Organentnahme	31
2.6.5	Isolierung genomischer DNA aus Tumor- und Organproben	31
<b>3 ERGEBNISSE</b>		<b>32</b>
<b>3.1 DIE CX<sub>4</sub>A BIBLIOTHEK.....</b>		<b>32</b>
3.1.1	Herstellung der Plasmidbibliothek	32
3.1.2	Selektion in der Fibrosarkom-Zelllinie HT1080	36
3.1.3	Selektion in der Gliom-Zelllinie U-87 MG	39
<b>3.2 DIE CHARAKTERISIERUNG DER SELEKTIONIERTEN VIREN.....</b>		<b>40</b>
3.2.1	Klonierung der Virusvarianten	40
3.2.2	Analyse der Virus-Partikelbildung nach Transfektion in 293T-Zellen	42
3.2.3	Analyse von in HT1080 Zellen gebildetem Virus	43
3.2.4	<i>In vitro</i> Spaltung mit aktiver MMP-2	43
3.2.5	Inhibition der Aktivierung durch MMPs	44
3.2.6	Aktivierung der Infektiosität	46
<b>3.3 NACHWEIS DER KONDITIONALEN REPLIKATION DER SELEKTIONIERTEN VIREN .....</b>		<b>48</b>
3.3.1	Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in verschiedenen Zelllinien	48
3.3.2	Virus-Wachstum auf verschiedenen Zelllinien	50
3.3.2.1	Verlauf des Anstiegs infizierter Zellen	50
3.3.2.2	Wachstumsverlauf anhand der RT-Aktivität	51
3.3.2.3	Aktivierungszustand der Viren während der Ausbreitung	55
3.3.2.4	Bestimmung der Menge freigesetzter infektiöser Viruspartikel	56
<b>3.4 VIRUS-AUSBREITUNG IN VIVO .....</b>		<b>57</b>
3.4.1	Virusausbreitung im HT1080-Tumor	57
3.4.1.1	Tumoretablierung aus vorinfizierten Zellen	59
3.4.1.2	Virus-Injektion in etablierte Tumore	60
3.4.2	Virusausbreitung im Organismus	62
3.4.2.1	Etablierung der semiquantitativen PCR zum Virus-Nachweis	63
3.4.2.2	Virus-Ausbreitung von Tumor zu Tumor	67
3.4.2.3	Organotropismus MMP-aktivierbarer Viren und des WT-Virus	70
3.4.2.4	Beispielhafte Quantifizierung infizierter Zellen in der Milz	74

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
<hr/>		
4.1	TARGETING VON (RETRO)VIREN MIT HILFE DER MOLEKULAREN EVOLUTION .....	76
4.2	SELEKTIONIERTER PROTEASESUBSTRATE AUS VERSCHIEDENEN METHODEN IM VERGLEICH .....	78
4.3	DIE TUMOR-TARGETING KAPAZITÄT MMP-AKTIVIERBARER VIREN .....	82
4.4	WEGE ZU THERAPEUTISCH NUTZBAREN ANTI-TUMORALEN RETROVIREN .....	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	92
<hr/>		
6	ANHANG	94
<hr/>		
6.1	PLASMIDE KODIEREND FÜR VIREN MIT ALTERNATIVEN BLOCKIERUNGSDOMÄNEN.....	94
6.2	PLASMIDE MIT ZUSÄTZLICHEN (THERAPEUTISCHEN) GENEN .....	94
6.3	ERLEICHTERTER AUSTAUSCH DES LINKERS ÜBER PRIMER-KLONIERUNG .....	95
7	LITERATUR	97
<hr/>		
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND GLOSSAR	102
<hr/>		
8.1	BASEN UND BASENKOMBINATIONEN NACH IUPAC.....	102
8.2	AMINOSÄUREN .....	102
8.3	ANGLIZISMEN .....	102
8.4	SONSTIGE ABKÜRZUNGEN .....	103
9	DANKE	107
<hr/>		
10	LEBENS LAUF	108
<hr/>		

# 1 Einleitung

Eine der größten Herausforderungen in der Medizin stellt immer noch die Therapie solider, metastasierender Organtumore dar. Diese sind chirurgischen Eingriffen und einer Bestrahlungstherapie nur unzureichend zugänglich, und damit einer effektiven Behandlung entzogen. Die systemische Behandlung mit Chemotherapeutika bleibt daher im späten Tumorstadium die bisher einzige Wahl und muss trotz der enormen Nebenwirkungen eingesetzt werden. Obwohl für einige Tumorarten damit die Überlebenszeit des Patienten nicht signifikant verlängert werden kann, wird so zumindest eine Verbesserung seiner Lebensqualität erreicht (Hölzel *et al.*, 1996). Neue Therapieansätze sollen nun die Beschränkungen der bisherigen Behandlungsmethoden überwinden, so z.B. die Impfung des Patienten gegen den eigenen Tumor (Mocellin *et al.*, 2004), die Modulation der Vaskularisierung, um die Versorgung des Tumors zu verhindern oder therapeutisch zu nutzen (Jain, 2005), oder die spezifische Expression von Suizidgenen (Vassaux und Martin-Duque, 2004) in den Tumorzellen.

## 1.1 Gentransfer zur Tumorbehandlung

Dem Prinzip der Gentherapie liegt zu Grunde, zusätzliche Proteine in den Zellen eines Organismus zu produzieren. Dies wird auch in der Forschung zu neuen Formen der Tumorthherapie genutzt. So wird z.B. durch die Expression von Tumormarkern auf Immunzellen versucht, die körpereigene Abwehr auf die Tumorzellen aufmerksam zu machen (Larin *et al.*, 2004), durch die Expression von Inhibitoren der Vaskularisierung soll der Tumor von der Versorgung durch den Blutstrom abgeschnitten und so sein Wachstum gebremst werden (Indraccolo, 2004) und eine besonders attraktive Form, die Tumormasse zu reduzieren, scheint in der Expression von Suizidgenen in Tumor- und Stromazellen zu liegen. Zur Zeit wird in der Behandlung von Gliomen ein adenoviraler Vektor in der klinischen Phase III geprüft (Immonen *et al.*, 2004). Dieser Cerepro™ genannte Vektor bringt nach einer chirurgischen Entfernung des Glioms in die umgebenden Zellen das Gen der Thymidinkinase ein, das durch die Gabe von Ganciclovir™ spezifisch sich teilende Zellen in die Apoptose treibt. So werden verbleibende Tumorzellen abgetötet und die Überlebenszeit des Patienten verlängert.

Zum Einbringen der Gene gibt es verschiedene Methoden, wobei sehr häufig auf der Basis verschiedenster Viren entwickelte replikationsunfähige Vektoren verwendet werden. Diese bestehen aus der Proteinstruktur eines Virus, enthalten aber keine viralen Gene bzw. ihr Genom wurde auf ein notwendiges Minimum reduziert. Dadurch können diese Vektoren als

Genfähren für jedes beliebige Gen dienen, das in Zielzellen eingebracht werden soll. Die Effektivität dieser Vektoren wird in der Tumorthherapie aber immer beschränkt bleiben, da für die Veränderung jeder Zielzelle - hier der Tumorzelle - je ein viraler Vektor erforderlich ist. Wenn nach einer chirurgischen Entfernung des Tumors noch die wenigen verbliebenen Tumorzellen abgetötet werden sollen, können Vektoren also gute Dienste leisten. Selbst mit Eingriff bedarf es enormer Mengen an Vektorpartikeln, die nur schwer applizierbar sind. Um den Aktionsradius der Vektoren zu vergrößern, versucht man über die Entwicklung so genannter *Bystander*-Effekte (von engl. Zuschauer) möglichst viele Zellen in der Nachbarschaft einer durch den Vektor veränderten Zelle in Mitleidenschaft zu ziehen. So werden z.B. fusogene Membranproteine exprimiert, welche Apoptose durch die Bildung von Synzytien (vielkernigen Zellen) auslösen (Higuchi *et al.*, 2000). Die effektivste Erweiterung des Aktionsradius läge allerdings in der Verwendung replikationskompetenter Viren als Genfähren (Peng *et al.*, 1999; Galanis *et al.*, 2001; Kirn *et al.*, 2001). Diese würden idealer Weise das gewünschte Gen in der Zielzellpopulation verbreiten und so nahezu 100% Gentransfereffizienz vermitteln.

### **1.1.1 Viren in der Tumorthherapie**

Geeignet für die Erweiterung der Gentransfereffizienz scheinen Viren, die im Menschen apathogen sind und dadurch ein wesentlich geringeres Risiko einer Verbreitung der Viren mit sich bringen. Attraktiv sind Viren, deren Wirte andere Säugerspezies sind, die aber seit langer Zeit in der Nähe des Menschen leben, ohne dass die Erreger die Speziesbarriere überwunden haben. Dies trifft z.B. auf die murinen Retroviren zu. Besonders die Eigenschaft der Gamma-Retroviren, nur in teilenden Zellen zu replizieren (Miller *et al.*, 1990), ermöglicht der Genthherapie einen Effekt zu nutzen, den auch die Chemotherapeuten verwenden, um die wuchernden Zellen möglichst gezielt zu bekämpfen: Die fatale Eigenschaft der meisten Tumore im Gegensatz zu unveränderten Körperzellen unkontrolliert zu wachsen.

Das Maus Leukämievirus (MLV) gehört z.B. in diese Gruppe sehr einfach strukturierter und damit leicht manipulierbarer Viren. Die natürliche Einschränkung des Tropismus<sup>1</sup> auf teilungsaktive Zellen erhöht die Sicherheit dieser Viren und einige Studien verlassen sich ausschließlich auf diesen Aspekt der Risiko-Minimierung. So veröffentlichte die Gruppe um Nori Kasahara ein Virus, das im Mausmodell das Grünfluoreszierende Protein (GFP) in einem Tumor verbreitete, in anderen Organen war GFP jedoch nicht nachweisbar (Logg *et al.*, 2001b). Da sich jedoch auch verschiedene nicht krankhaft veränderte Körperzellen im

---

<sup>1</sup> Spektrum der infizierbaren Zellen

Teilungsstadium befinden, stellen auch diese Zellen potentielle Zielzellen von MLV dar. Dadurch würde ein gefährlicher Nebeneffekt möglich: die Insertion des Virus in das Genom beinhaltet die Möglichkeit der Insertionsmutagenese und damit der Onkogenese. Dies gilt es unter allen Umständen zu vermeiden. Deshalb befassen sich viele Gruppen mit weiteren Möglichkeiten des viralen Targetings (von engl. *target*, Ziel), also mit der Einschränkung des Tropismus der Viren ausschließlich auf die gewünschten Zielzellen.

### **1.1.2 Targeting Strategien**

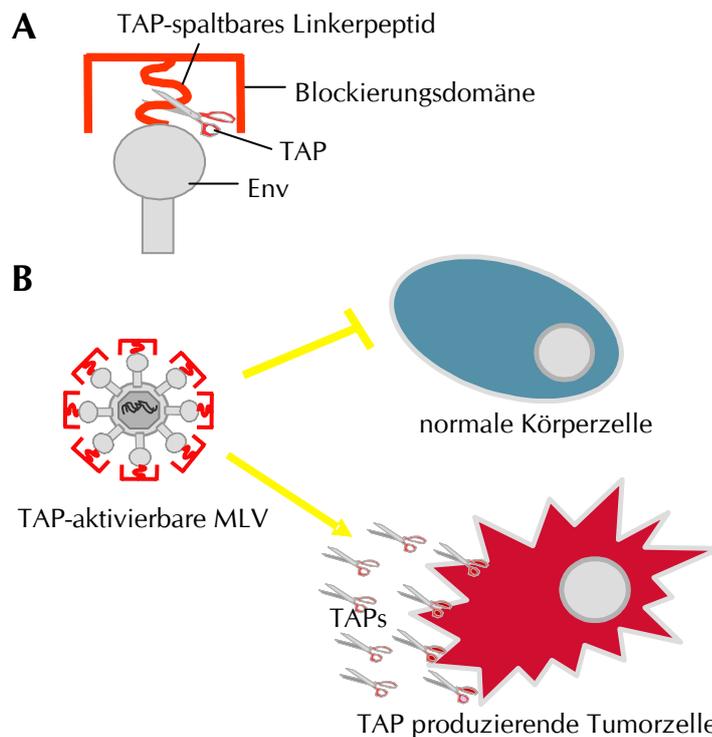
Um Nebenwirkungen einer Therapie möglichst gering zu halten, sollte sie lokal wirken, aber systemisch angewendet werden können. Für die Gentherapie heißt das, die Expression des therapeutischen Gens soll in einer bestimmten Zellpopulation erfolgen, was über verschiedene Wege erreicht werden kann. Das so genannte transkriptionelle Targeting verwendet Gewebe-spezifische Promotoren, um die Transkription des eingebrachten Gens nur in bestimmten Geweben zuzulassen (Saukkonen und Hemminki, 2004). Eleganter ist es allerdings, das Gen nur in die Zielzellpopulation einzubringen. Dazu ist es notwendig, den viralen Zelleintritt zu modifizieren.

Nachdem lange vergeblich versucht wurde, den Tropismus von Viren durch die Präsentation von Antikörpern oder Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche zu erweitern, gelang dies erst in jüngster Zeit durch einen modifizierten Ansatz: durch die unspezifische Inkorporation des Stammzellfaktors (SCF) zusätzlich zum Infektion-vermittelnden Hüllprotein in die Virushülle konnten Zellen, die den Rezeptor von SCF exprimierten, infiziert werden, ohne dass sie den eigentlichen Virusrezeptor auf der Zelloberfläche exprimierten (Chandrashekan et al., 2004). Eine andere Strategie verfolgt die Einschränkung des Tropismus: Die Präsentation von Wachstumshormonen als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein des MLV führt zur Anbindung der Viren an die Zellen über die Bindung des Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor, aber eine Interaktion mit dem Virusrezeptor, der die Fusion des Virus mit der Zelle vermittelt, ist dadurch nicht mehr möglich (Cosset et al., 1995; Chadwick et al., 1999). So war eine Möglichkeit gefunden worden, Viren an Zellen anzubinden, ohne eine Infektion zuzulassen, diese war blockiert. Die gezielte Aktivierung der Viren an der Oberfläche wurde nun zu einem eigenen Feld in der Targeting-Forschung (Buchholz et al., 1999).

Nahe liegend war die Aktivierung des Virus durch Abspaltung des Wachstumsfaktors. Dazu konnte ein spezifisches Merkmal besonders von metastasierenden Tumoren genutzt werden: die starke Expression von Proteasen. Diese Protein-abbauenden Enzyme sind in normalen Körperzellen hochgradig reguliert, und steuern außerhalb der Zelle unter anderem die gewebspezifische Gestaltung und Regulierung der extrazellulären Matrix. Doch in

Tumorzellen sind sie durch eine Störung der Regulation verantwortlich für die Degradierung der einen Tumor umgebenden Matrix, so dass die Wanderung der Tumorzellen im Körper ermöglicht wird.

Diese Proteaseaktivität von Tumoren auszunutzen, um blockierte Viren zu reaktivieren, wurde zuerst von der Arbeitsgruppe von Stephen Russell vorgeschlagen. Dazu sind verschiedene Voraussetzungen erforderlich, die im Folgenden näher vorgestellt werden.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Protease-Targetings.**

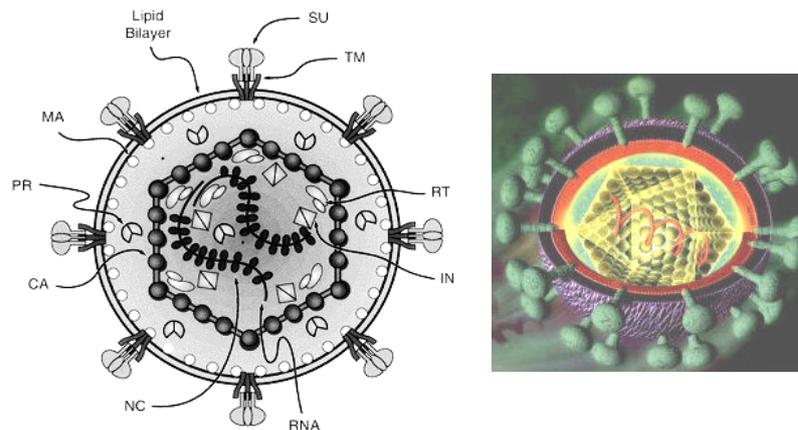
Eine Blockierungsdomäne verhindert die Anbindung des viralen Hüllproteins (Env) an den Virusrezeptor (A). Die Domäne kann durch die proteolytische Aktivität einer Tumor-assoziierten Protease (TAP) entfernt werden, wodurch das Virus infektiös wird. Somit können TAP-exprimierende Zellen durch die aktivierbaren Viren infiziert werden, TAP-negative Zellen jedoch nicht (B).

## 1.2 Konzept des Protease-Targetings

In der vorliegenden Arbeit wird ein Konzept zum Targeting der Viren verwendet und weiterentwickelt, dass initial an Hand von replikationsunfähigen retroviralen Vektoren demonstriert wurde. Dabei wird die Anbindung des Virus an seinen Rezeptor durch eine zusätzliche N-terminale Domäne am Hüllprotein verhindert. In den Linker zwischen dieser so genannten Blockierungsdomäne und dem Hüllprotein Env wird die Erkennungs- und Spaltsequenz einer Protease eingebracht. So kann durch die Aktivität der Protease die

Blockierungsdomäne abgespalten werden und das Hüllprotein seine Aufgabe der Rezeptoranbindung und Membranfusion erfüllen. Dieses Konzept wurde von Buchholz *et al.*, 1998 auf replikationskompetente Retroviren übertragen.

### 1.2.1 Das Virus



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung eines Gamma-Retrovirus.**

Der Aufbau von MLV ist im Text näher beschrieben. Zweidimensionale Darstellung nach Coffin *et al.* (1997).

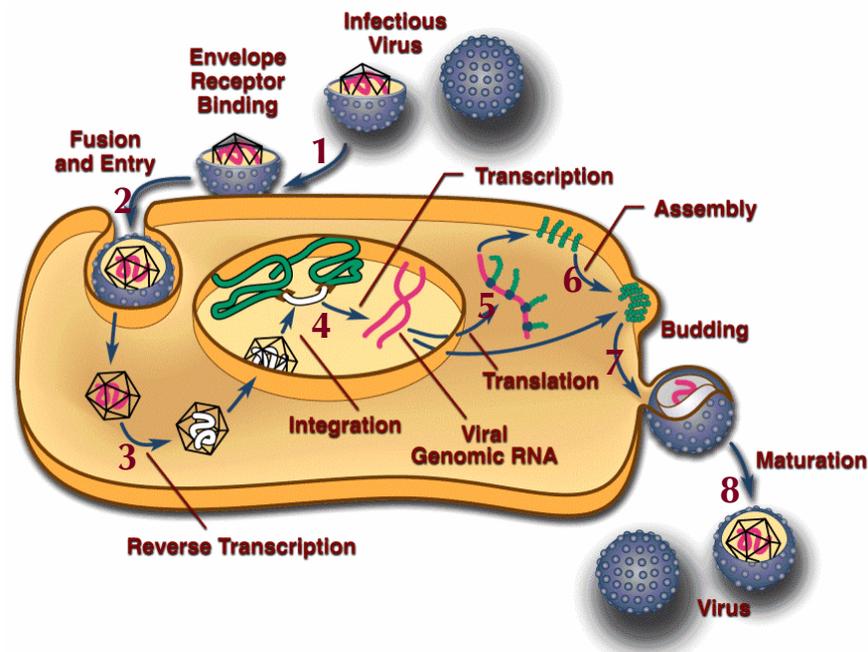
Das für dieses Konzept zu erst verwendete Virus, das MLV, gehört zu den Gamma-Retroviren. Das Genom dieser einfach strukturierten umhüllten Viren besteht aus zwei identischen Minus-Strang mRNA-Molekülen, auf denen die drei Gene gag, pol und env kontinuierlich angeordnet sind. Gag kodiert die Strukturproteine CA (Kapsidprotein), MA (Matrixprotein) und NC (Nukleokapsidprotein). Diese sind am Aufbau des Kapsids und des Kerns beteiligt. Pol kodiert die Enzyme, die das Virus mitbringen muss, um replizieren zu können: die Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die das RNA-Genom des Virus in das DNA-Provirus umschreibt, 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. Es besteht aus zwei im reifen Virus nur über nicht kovalente Wechselwirkungen verbundene Untereinheiten: SU (*surface unit*, Oberflächeneinheit) und TM (Transmembrandomäne).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete MLV trägt das Hüllprotein des amphotropen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> amphotrop: Infektiös auf allen Säugerzellen

4070A Stammes, das den Rezeptor Ram-1, einen Natrium-abhängigen Phosphat-Symporter, auf der Zelloberfläche erkennt. Dieser Rezeptor kommt auf Säugerzellen ubiquitär vor.

Das MLV-Genom ist mit den für die Replikation erforderlichen Elementen  $\Psi$  (gr. Psi, das Signal für die spezifische Verpackung der Virus-RNA in das Kapsid) und den LTRs (*long terminal repeats*, repetitive Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende des Genoms) knapp 9kb groß. Der Replikationszyklus beginnt mit der Anbindung von SU an den Rezeptor Ram-1 an der Zelloberfläche. Dadurch wird eine Konformationsänderung im Hüllprotein eingeleitet, die zur Exposition des Fusionspeptids am N-Terminus von TM führt. Dieses dringt in die Zellmembran ein, wodurch es zur Fusion mit der Virusmembran kommt und das Kapsid ins Zytoplasma gelangt. Dort wird es entpackt und die entlassene RNA in das DNA-Provirus umgeschrieben. Gebunden an einen so genannten Präintegrationskomplex, in dem u.a. auch die Integrase eingebunden ist, wird das Provirus in den Zellkern geschleust und vorwiegend am Startpunkt transkriptioneller Einheiten integriert (Wu et al., 2003).



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Retroviren.**

Nach der Anbindung (1) von MLV an den Rezeptor der Zelle, erfolgt der Zelleintritt durch die Fusion der beiden Membranen (2). In der Zelle wird während der Reversen Transkription (3) die virale RNA in DNA umgeschrieben und anschließend in das Wirtsgenom integriert (4). Die zelleigene Transkriptionsmaschinerie produziert virale mRNA, die translatiert (5) und in die sich zusammenlagernden Virusproteine verpackt wird (6). Anschließend erfolgt die Knospung (7) des Virus an der Zellmembran. Während der Reifung (8) der Viren werden die Polyproteine proteolytisch gespalten und dadurch aktiv.

Über die Promotoraktivität der 5'-LTR wird die Transkription der Gene initiiert. Von der Volllänge-RNA wird Gag und Gag-Pol translatiert, von einer gespleißten Form wird Env synthetisiert. Zwei Stränge transkribierter Volllänge-RNA werden als neues Genom in die entstehenden Viren verpackt. Beim Knospen nehmen die Viren von der Zelle die Membran inklusive Env und anderer Oberflächenproteine mit. Danach werden die viralen Polyproteine während der Reifung gespalten und das Fusionspeptid im Env durch Abspaltung einer inhibitorischen Domäne, dem so genannten R-Peptid, aktiviert, so dass durch die Anbindung an Ram-1 ein neuer Replikationszyklus starten kann. Durch die Expression von Env auf der Zelloberfläche vermindert sich dort die Zugänglichkeit der Ram-1 Moleküle. Dieser als virale Interferenz bekannte Effekt, verhindert die Superinfektion einer bereits MLV-infizierten Zelle durch weitere Viren, die denselben Rezeptor ansteuern (Coffin *et al.*, 1997).

### 1.2.2 Die Blockierungsdomäne

Zwei Typen von Blockierungsdomänen konnten vor Beginn dieser Arbeit unterschieden werden. Die Blockierung durch Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (*epidermal growth factor*, epidermales Wachstumshormon) beruht auf der Bindung von EGF und EGF-Rezeptor, wodurch sterisch verhindert ist, dass Env an Ram-1 binden kann. In Abwesenheit des EGF-Rezeptors kann das Env jedoch nahezu ungehindert an Ram-1 binden. Dadurch ist Targeting mit dieser Blockierungsdomäne nur sehr eingeschränkt möglich, da auf allen EGF-Rezeptor negativen Zellen keine Aktivierung des Virus nötig ist, um eine Virusinfektion zuzulassen.

Um das Spektrum des Targetings zu erweitern und nicht von der Expression eines Rezeptors abhängig zu sein, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Blockierungsdomäne zurückgegriffen, die von Morling *et al.* (1997) beschrieben wurde. Diese ist vom trimerisierenden Typ-2-Transmembranprotein CD40-Ligand (CD40L) abgeleitet, ein dem TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ) verwandtes Zytokin. Am N-Terminus wurden 115 Aminosäuren, welche die Membran-durchspannende Domäne bilden, deletiert. Erhalten wurden die Trimerisierungsdomäne und der C-Terminus des CD40L-Moleküls. Die somit verbleibenden 146 AS wurden C-terminal vom Env-Signalpeptid an den N-Terminus des SU-Proteins fusioniert. So verbleibt nach Abspaltung des Signalpeptids im Endoplasmatischen Retikulum (ER) das verkürzte CD40L Molekül als N-terminale Domäne von Env. Eine Interaktion mit CD40, dem natürlichen Rezeptor von CD40L, ist durch diese „Kopf an Kopf“ Fusion eines Typ-1 (Env) und eines Typ-2-Membranproteins (CD40L) nicht mehr möglich (Peng, 1997). Der Mechanismus der Blockierung beruht wohl auf der Tatsache, dass sowohl Env als auch CD40L als Trimer vorliegen. Dadurch wird die Ram-1 Bindung sterisch verhindert. Somit liegt bei Verwendung von CD40L eine universelle Blockierung vor, die vom Zelltyp unabhängig

ist. Im Gegensatz zu EGF-präsentierenden Viren ist allerdings nicht die räumliche Nähe der Viren und ihrer Zielzellen gegeben. Es kommen also vermutlich vorwiegend lösliche Proteasen als Aktivatoren in Frage.

### 1.2.3 Die Proteasen und ihre Spaltstellen

In der Verbindung zwischen Blockierungsdomäne und Hüllprotein, dem so genannten Linker, liegt der Schlüssel zur Aktivierung CD40L- oder EGF-präsentierender Viren. Hier befindet sich die Spaltstelle für die ausgewählte Protease, die das Hüllprotein von der blockierenden Domäne befreien soll. Doch welche Proteasespaltstelle präsentiert werden muss, um eine optimale Aktivierung der Viren durch einen bestimmten Tumor zu erreichen, hängt von dessen Proteaseprofil ab.

In vielen Tumortypen korreliert eine unkontrollierte proteolytische Aktivität verschiedener Proteasen mit dem Übergang vom soliden zum metastasierenden Stadium: Durch den Abbau der extrazellulären Matrix ermöglichen die Proteasen den Tumorzellen erst die Wanderung in die Blutgefäße und andere Gewebe. Aber auch in der Vaskularisierung des wachsenden Tumors spielen Proteasen eine wichtige Rolle.

Solche Proteasen, zu denen einige Matrix Metalloproteasen (MMP), das uPA-System (Urokinase Plasminogen Activator) oder verschiedene Cathepsine zählen, werden unter dem Begriff tumorassoziierte Proteasen (TAP) zusammengefasst. Unter diesen sind die bedeutendsten die Matrix Metalloproteasen.

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

**Tabelle 1-1: Überblick über die bekannten Spaltmotive<sup>1</sup> von MMP-2 und Furin**

	<b>P3</b>	<b>P2</b>	<b>P1</b>	<b>P1'</b>	<b>P2'</b>	<b>P3'</b>
Spaltstelle in Kollagen <sup>2</sup>	P	L	G	L	W	A
selektionierte Spaltstelle <sup>3</sup> „26“	P	Q	G	L	Q	A
MMP-Konsensus Spaltmotiv	P	X	X	Hy	X	X
Furin-Spaltmotiv	R	X	X	R/K		

<sup>1</sup> Gemäß der internationalen Nomenklatur für Proteasespaltstellen wird die erste AS vor der hydrolysierten Peptid-Bindung mit P1, die zweite P2, die dritte P3 usw. bezeichnet. Die AS nach der hydrolysierten Bindung werden mit P1', P2' und P3' bezeichnet. Die Spaltstelle wird in Text durch einen Pfeil angedeutet (P3-P2-P1 ↓ P1'-P2'-P3').

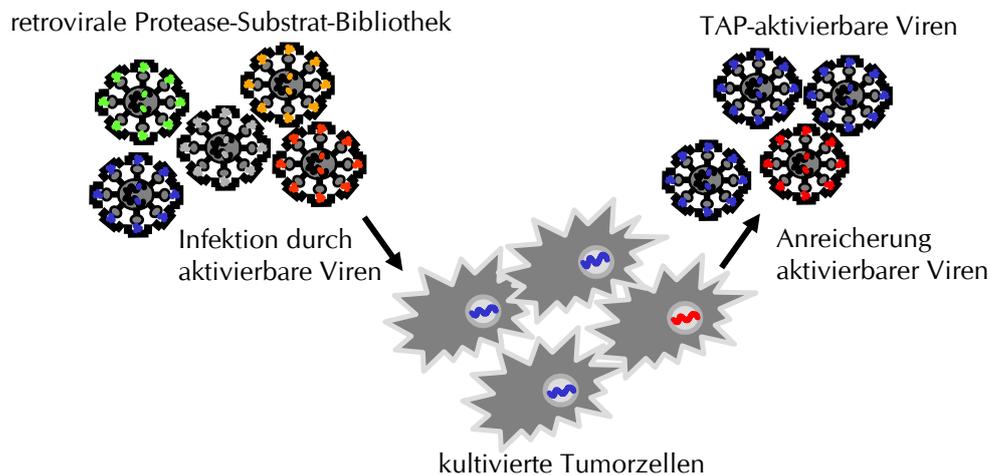
<sup>2</sup> von Upadhye und Ananthanarayanan (1995) beschrieben

<sup>3</sup> von Schneider et al. (2003) beschrieben

Für viele TAPs sind die natürlichen Substrate identifiziert worden. Für manche wurde aus Peptid- oder Phagenbibliotheken das Substratspektrum ermittelt. Aus unterschiedlichen Methoden resultierende Sequenzen stimmen allerdings nicht immer überein und sind zudem vermutlich durch den jeweiligen Kontext, in den das Substratpeptid eingebunden wird, beeinflusst. Für einige Proteasen ist das Substratspektrum auch noch nicht definiert. Wie kann also ein für das Proteaseprofil eines Tumors optimal passender Linker zwischen Blockierungsdomäne und Hüllprotein eines Virus eingefügt werden, wenn weder das Proteaseprofil des Tumors in kurzer Zeit bestimmbar ist, noch für alle Proteasen optimale Spaltsequenzen bekannt sind, noch der Einfluss des viralen Kontextes bekannt ist? Zur Lösung dieses Problems wurde von Buchholz et al. (1998) die retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek vorgeschlagen: die passende Spaltstelle sollte aus einer Bibliothek von auf Retroviren präsentierten Linkerpeptiden direkt auf Tumorzellen selektioniert werden. Ein von den Proteasen dieser Zellen aktivierbares Virus in der Bibliothek, dessen Linkerpeptid also als Substrat einer TAP dient, kann die Tumorzellen infizieren und sich so in der Population auszubreiten. Viren mit nicht-spaltbaren Linkern zwischen Blockierungsdomäne und Env können sich nicht ausbreiten und werden im Laufe der Zeit von den wachsenden Viren verdrängt. Mit steigendem Selektionsdruck nimmt die Stringenz zu: das heißt durch Ausdünnen der infizierten Zellen während der Kultivierung wird der Vorteil, den schnell wachsende Viren mit gut spaltbarem Linker haben, verstärkt. So werden sich in der Selektion die Linker anreichern, die am besten gespalten werden.

Die Verwendung einer retroviralen Bibliothek bringt hier entscheidende Vorteile gegenüber anderen etablierten Selektionsverfahren zur Ermittlung von Proteasesubstratspektren: im

Gegensatz zu Peptid-Bibliotheken sind Genotyp und Phänotyp aneinander gekoppelt, und die Selektion erfolgt einfach durch Ausbreitung des Virus in einer Zellpopulation, nicht wie bei Phagen-Bibliotheken in der aufwändigen Abfolge verschiedener Anbindungs- und Waschschriffe. Zudem wird im eukaryotischen System gearbeitet und ein Wechsel zwischen Prokaryoten und Eukaryoten, wie in der Phagenselektion, wird vermieden.



**Abbildung 1-4: Selektion einer retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek.**

Durch Selektion einer retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek ist es möglich, für bestimmte Tumorzellen spezifische aktivierbare Viren zu selektionieren.

Selektionen von retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken wurden von Buchholz *et al.*, 1998 und von Schneider *et al.*, 2003 beschrieben. In beiden Publikationen wurde die Blockierungsdomäne EGF und als Zielzelle die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 verwendet. Jedoch wurden ganz unterschiedliche Spaltstellen mit dem jeweiligen Protokoll selektioniert. Bei Buchholz *et al.* wurde aus einer an sieben Stellen diversifizierten Bibliothek ohne Einschränkung der Aminosäureauswahl die Erkennungssequenzen von Proprotein-Konvertasen, zu denen beispielsweise Furin gehört, selektioniert. Furin ist eine ubiquitär exprimierte Protease im Golgiapparat, die also EGF schon auf dem Transport des Hüllproteins zur Zellmembran abspaltete. So wurde erstmals gezeigt, dass solche retroviralen Bibliotheken herstellbar und auf Proteasespaltstellen selektionierbar sind. Schneider *et al.*, gelang parallel zur vorliegenden Arbeit die Selektion von MMP-spaltbaren Viren, indem der Aufbau der Bibliothek verändert wurde. Durch die Einschränkung der diversen Positionen und der Aminosäure-Auswahl wurde eine Selektion durch zellinterne Proteasen vermieden und die Wahrscheinlichkeit einer Spaltung durch MMPs erhöht. Jedoch wurde in keiner dieser Arbeiten eine Spezifität der Viren für bestimmte Zellen durch die Proteasespaltung erreicht.

### ***1.3 Zielsetzung der Arbeit***

In dieser Arbeit sollten TAP-aktivierbare MLV aus retroviralen Protease-Substrat-Bibliotheken selektioniert werden, die sich selektiv in TAP-positiven Zellen ausbreiten. Ihre Charakterisierung sollte *in vitro* und *in vivo* erfolgen. Dieses Ziel sollte im Wesentlichen durch die Anwendung von CD40L als Blockierungsdomäne erreicht werden. Im Einzelnen sollten dazu zunächst eine Plasmid-Bibliothek mit möglichst hoher Diversität hergestellt werden, dann daraus eine Virus-Bibliothek hergestellt und diese auf einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie und einer humanen Gliom-Zelllinie selektioniert werden.

Die Analyse der selektionierten Linkerpeptide und Viren sollte folgende Aspekte umfassen: Untersuchung der TAP-Aktivierbarkeit auf proteinbiochemischer Ebene und in Zellkultur, der Nachweis des Zusammenhangs zwischen Spaltung des Linkerpeptids und Ausbreitung des Virus sowie Herausarbeitung der Unterschiede zwischen verschiedenen Linkerpeptiden.

Des Weiteren sollten die Targeting-Eigenschaften der selektionierten Viren untersucht werden. Dazu sollten MMP-positive und MMP-negative Zelllinien verschiedenen Ursprungs auf ihre Infizierbarkeit mit selektionierten Viren getestet werden und die anschließende Ausbreitung dieser Viren in Abhängigkeit des präsentierten Linkerpeptids untereinander und mit dem Wildtyp-MLV verglichen werden.

Um die Relevanz der selektionierten Viren in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung zu ermitteln, sollte ein Maus-Tumor-Modell etabliert werden, das Aufschluss über die Ausbreitung der selektionierten Viren im Tumorgewebe geben sollte. Außerdem sollte die Verteilung der TAP-aktivierbaren Viren im Organismus im Vergleich zum Wildtyp-MLV bestimmt werden. Davon wurde erstmalig eine *in vivo* Überprüfung des Protease-Targeting Konzepts erwartet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

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

#### 2.1.2 Enzyme, rekombinante Proteine und Inhibitoren

Enzyme	Bezugsquelle
Expand™ High Fidelity Polymerase-Mix	Roche Molecular Biochemicals
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Reverse Transkriptase Superscript II™ RNase H <sup>-</sup>	Invitrogen
Taq-Polymerase AmpliTaq®	Applied Biosystems
<b>Rekombinante Proteine</b>	
Matrix Metalloprotease 2 (aktiviertes Enzym)	Calbiochem
Matrix Metalloprotease 9 (aktiviertes Enzym)	Calbiochem
<b>Inhibitoren</b>	
Ribonuklease-Inhibitor RNasin®	Promega
MMP-Inhibitor GM6001	Chemicon
MMP-8 Inhibitor I	Calbiochem
MMP-3 Inhibitor II	Calbiochem
MMP-2/MMP-9 Inhibitor II	Calbiochem
Phenanthrolin	Sigma
Pefabloc	Roche
Trypsin Inhibitor. (soybean)	Calbiochem
AZT (3'-Azido-3'-Desoxythymidin)	Sigma
Protease-Inhibitoren-Cocktail Complete™	Roche

#### 2.1.3 Antikörper und Antiseren

Name	Anwendung	Bezugsquelle
Ziegenserum Anti-RLV-p30	1:50000 (WB) 1:1000 (IPA)	Quality Biotech
Ziegenserum Anti-RLV-gp70	1:5000 (WB)	Quality Biotech
Kaninchen-Immunglobulin Anti-Ziege-Meerrettich (HRP)-Peroxidase konjugiert	1:10000 (WB) 1:1000 (IPA)	Dako

## 2.1.4 Plasmide

Name	Bezugsquelle
pM91MS	M. Schweizer (Paul-Ehrlich-Institut, Langen), kloniert aus pCD40LA und pM91 (kodiert das amphotrope MLV 4070A, Dorothee von Lear, Georg-Speyer-Haus) über den Austausch der Env-Region durch SacII und PacI
pCD40LA	C. J. Buchholz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)
pCR-3.1 Topo®	Invitrogen

## 2.1.5 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert.

Name	5'-3' Sequenz
CB6 (+)	CCCCTAATCCCCTTAATTCTTC
EASeq1 (-)	TATAATTTTGGGAAGGCATCTTG
wtCB6 (+)	CCCTTAATAGTCATGGGAGTCC
β-Actin (+)	ATGATATCGCCGCGCTCGTCGTC
β-Actin (-)	TTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGTTCAG
IH3: CD40LX4A(-)	CGAAGCTGCGGCCGCGCNDNRDNCAGTCCNDNRDN GCTGCTAGCGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGAC
IH9: CD40LMMPA(-)	CGAAGCTGCGGCCGCGCCACAGTCCTAGCGG GCTGCTAGCGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGAC
IH10: CD40L26A(-)	CGAAGCTGCGGCCGCGCCTGGTACAGGCCCTGGGG GCTGCTAGCGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGAC
IH11: CD40L(AKGLYK)A(-)	CGAAGCTGCGGCCGCGCCTTGTACAGGCCCTTGGC GCTGCTAGCGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGAC
IH12: CD40L(PSGLYQ)A(-)	CGAAGCTGCGGCCGCGCCTGGTACAGTCCGCTGGG GCTGCTAGCGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGAC

## 2.1.6 Bakterienstämme

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

Name	Genotyp	Bezugsquelle
Top10	F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
Top10F'	F'[lacIq,Tn10(TetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen

## 2.1.7 Zelllinien

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
HT1080	humane Fibrosarkomzelllinie	ATCC CLL-121
HEK-293T	humane embryonale Nierenzelllinie, die durch das <i>large T-Antigen</i> aus SV40 immortalisiert wurde	ATCC CRL-11268
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	Julia Kunz, PEI, Passage 1 oder 2

U-87 MG	Humane Glioblastom-Zelllinie	ATCC HTB-14
A431	Humane epidermoide Karzinomzelllinie	ATCC CRL-1555
Jurkat	Humane lymphoide T-Zelllinie	CRL-2570
MDA-MT-231	Humane Adeno-Brustkarzinomlinie	ECACC 92020424
MDA-MB-468	Humane Adeno-Brustkarzinomlinie	ICLC HTL99024
A3.01	Humane lymphoide T-Zelllinie	(Folks <i>et al.</i> , 1985)
B-Zellen	Eppstein-Barr-Virus immortalisierte Linie	Dr. Sun, PEI
WM981	Melanom-Zelllinie	Dr. Sun, PEI
MDCK	Canine Nierenepithel-Zelllinie	Dr. Chadwick, Biofocus, Cambridge
MT1-MDCK	MMP-14 produzierende MDCK	Dr. Chadwick, Biofocus, Cambridge
PG13	NIH-3T3 abgeleitete GaLV Env / MLV gag-pol Verpackungszelllinie	(Miller <i>et al.</i> , 1991)

## 2.1.8 Geräte

Name	Bezugsquelle
Bakterieninkubatoren Innova 4000 und 4230	New Brunswick Scientific
Blotting-Apparatur Semi-Dry	Biometra
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Gelelektrophoresekammern (horizontal und vertikal)	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschränke: Herafreeze (-80°C) Liebherr Premium (-20°C und 4°C)	Heraeus Liebherr
Lumi-Imager	Roche Diagnostics
Magnetrührer Variomag	Monotherm
Mikroskope: Axiovert 25 Axiovert 200	Zeiss Zeiss
Mikrowellengerät	Bosch
Multifunktions-Reader Multiskan RC	Thermolabsystems
Netzgeräte: Powerpac 200 und 300	Bio-Rad
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
Speed Vak Konzentrator, SC 100	Thermo Savant
Spektralphotometer GeneQuantPro	Amersham Bioscience
Sterilarbeitsbank Sterilgard Advance	The Baker Company
Stickstofftank Chronos	Messer
Taumler Biometra WT12	Biometra
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat
Wasserbad Typ 1800	GFL
Zellinkubator Cytoperm BDD6220	Heraeus
Zentrifugen: Biofuge fresco Multifuge 3 Sorvall R26Plus Ultrazentrifuge Optima L-70K	Heraeus Kendro Sorvall Beckmann

## 2.1.9 Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Puffer, Medien und Lösungen mit Millipore-Wasser angesetzt und 25min bei 120°C und 2bar autoklaviert. Lösungen thermolabiler Verbindungen wurden sterilfiltriert und anderen Medien oder Puffern nach Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt.

### 2.1.9.1 Allgemeine Puffer

#### **PBS**

NaCl, 137mM; KCl, 2,7mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,3mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4mM

### 2.1.9.2 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

#### **TAE**

Tris-Acetat, 40mM; EDTA, 1mM; pH8,3

#### **TBE**

Tris-Borat, 40mM; EDTA, 1mM; pH8,3

#### **6 x DNA-Probenpuffer**

EDTA, 10mM; Bromphenolblau, 0,075% (v/v); Xylencyanol, 0,1% (v/v), Glycerin, 15% (v/v);  
in 6x TAE-Puffer

### 2.1.9.3 Bakterienkultur-Lösungen

#### **LB-Medium (Luria Bertrani)**

Trypton, 1,0% (w/v); Hefeextrakt, 0,5% (w/v); NaCl, 1,0% (w/v)

#### **S.O.C. Medium (Gibco™)**

Trypton, 2,0% (w/v); Hefeextrakt, 0,5% (w/v); NaCl, 10mM, KCl, 2,5mM; MgCl<sub>2</sub>, 10mM;  
MgSO<sub>4</sub>, 10mM; Glukose, 20mM

#### **TFB1**

KAc, 30mM; MnCl<sub>2</sub>, 50mM; RbCl, 100mM; CaCl<sub>2</sub>, 10mM; Glycerin, 15% (v/v); pH5,8 mit  
Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert

#### **TFB2**

MOPS, 10mM; CaCl<sub>2</sub>, 75mM; RbCl, 10mM; Glycerin, 15% (v/v); pH6,5 mit KOH eingestellt  
und sterilfiltriert

#### 2.1.9.4 Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

##### **Sammelgel 5%**

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid, 1,65ml; 1M Tris-HCl pH 6,8, 1,25ml; 10% SDS, 0,1ml; H<sub>2</sub>O, 7ml; 20% APS, 50 $\mu$ l; TEMED, 10 $\mu$ l

##### **Trenngel 10%**

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid, 5ml; 1M Tris-HCl pH 8,8, 5,6ml; 10% SDS, 0,15ml; H<sub>2</sub>O, 1,35ml; 20% APS, 50 $\mu$ l; TEMED, 10 $\mu$ l

##### **Laufpuffer**

Tris, 25mM; Glycin, 150mM; SDS, 0,1% (w/v)

##### **4 x SDS-Protein-Probenpuffer**

Tris/Cl (pH 6.8), 400 mM; DTT, 800 mM; SDS, 16 % (w/v); Bromphenolblau, 0,8% (w/v); Glycerin, 25%;  $\beta$ -Mercaptoethanol, 40% (v/v)

#### 2.1.9.5 Puffer für die Zymographie

##### **Waschpuffer**

Triton X-100, 2,5% (v/v)

##### **Inkubationspuffer**

Tris (pH7,5), 50mM; NaCl, 200mM; CaCl<sub>2</sub>, 5mM; Brij-35, 0,02% (w/v)

##### **Coomassie-Färbelösung**

Methanol, 30% (v/v); Essigsäure, 10% (v/v); Coomassie brilliant blue G-250, 0,5%; filtriert

##### **Entfärber**

Methanol, 30% (v/v); Essigsäure, 10% (v/v)

#### 2.1.9.6 Puffer für Westernblot-Analysen

##### **TBST**

Tris-HCl pH8, 10mM; NaCl, 150mM; Tween20, 0,05% (v/v)

##### **Transferpuffer**

Tris-HCl pH8, 48mM; Glycin, 39mM; Methanol, 20% (v/v); SDS, 0,0375% (w/v)

##### **Blockpuffer**

Pferdeserum (Gibco™), 20% (v/v); in TBST

### 2.1.9.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Bei Bedarf wurden aus den beschriebenen Medien FKS (serumfreies Medium) oder die Antibiotika (Antibiotikum-freies Medium) weggelassen.

#### **Vollmedium (DMEM VZ, RPMI VZ)**

Glukose, 4,5g/l; FKS, 10% (v/v); L-Glutamin, 2mM; Penicillin, 100 Einheiten/ml; Streptomycin, 50mg/ml; in DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) bzw. RPMI 1640

#### **HUVEC-Medium**

FKS, 8%; L-Glutamin, 10mM; rhu EGF, 100ng/l (PromoCell); rhu bFGF, 1 $\mu$ g/l (PromoCell); ECGS/H, 4ml/l (PromoCell); Penicillin, 50 Einheiten/ml; Streptomycin, 50 $\mu$ g/ml; in MCDB 131 (Gibco)

#### **Fibronektinlösung**

Fibronektin (Becton Dickinson), 10 $\mu$ g/ml in HUVEC-Medium

#### **Trypsinlösung**

Trypsin, 0,25% (w/v); EDTA, 1mM; in PBS

#### **Kryo-Medium**

DMSO, 10% (v/v); FKS, 40% (v/v); DMEM, 50% (v/v)

#### **AZT-Medium**

AZT, 10 $\mu$ M; in DMEM-VZ

### 2.1.9.8 IPA-Lösungen

#### **Blockpuffer**

BSA, 2% (w/v), in PBS

#### **Färbelösung**

3-Amino-9-ethylcarbazol, 0,02% (w/v); Dimethylformamid, 5% (v/v); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1% (v/v); in 20 mM NaAc-Puffer pH5; 45 $\mu$ m-filtriert

### 2.1.9.9 Lösungen für die Veterinärmedizin

#### **Narkoselösung**

Ketamin, 10mg/ml; Xylazin, 0,4mg/ml

#### **Kollagenaselösung**

Kollagenase (Calbiochem), 3U/ $\mu$ l; FKS, 5%; in PBS

## 2.2 Methoden der Molekularbiologie

### 2.2.1 Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation

Für Klonierungen wurden die Restriktionen doppelsträngiger DNA mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ligation von Restriktionsfragmenten mit geschnittener Vektor-DNA erfolgte im molaren Verhältnis von 3:1 durch 100U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer (50mM Tris-HCl [pH7,5], 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 1mM ATP, 25µg/ml BSA) in einem Gesamtvolumen von 20µl bei 16°C über Nacht.

### 2.2.2 Photometrische Messung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde mit Ultraviolettabsorptionsspektroskopie gemessen. Dazu wurde die Absorption in H<sub>2</sub>O verdünnter DNA-Lösungen bei 260nm (A<sub>260</sub>) im Spektralphotometer gegen das Lösungsmittel gemessen und die DNA-Konzentration berechnet: DNA-Konzentration (µg/ml) = A<sub>260</sub> x 50 x V (V = Verdünnungsfaktor, 50 = spezifischer Absorptionskoeffizient für DNA). Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

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

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 0,2 und 20kb Größe erfolgte für analytische und präparative Zwecke elektrophoretisch in 0,8 bis 2%igen Agarosegelen in horizontalen Gelelektrophoresekammern. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8 bis 2% (w/v) Agarose (PeqLab) in TAE-Puffer (bei DNA-Fragmenten unter 200bp in TBE-Puffer) durch Aufkochen im Mikrowellengerät gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 50ng/ml) und in einem Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde für die Elektrophorese in der Kammer mit TAE-Puffer bzw. TBE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben beladen, die mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt wurden. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Feldstärke von 5 - 10V/cm. Als DNA-Größenstandard wurde je nach Bedarf eine 1kb-, 100bp-, oder 2-log-DNA-Leiter (New England Biolabs, NEB) verwendet. Die aufgetrennte DNA wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Für eine Klonierung wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt.

## 2.2.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 2.2.4.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, wie PCR-Produkte oder geschnittene Plasmid-DNA, wurden für Klonierungen aus dem Agarosegel aufgereinigt. Dazu wurde die ausgeschnittene Gelmatrix mit den darin enthaltenen DNA-Fragmenten mittels „Jetsorp Gel Extraction Kit“ (Genomed) nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Das Prinzip dieser Aufreinigung basiert auf der Bindung der DNA-Fragmente an eine Silica-Suspension („Glasmilch“) in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Die DNA-Fragmente können, nach dem Waschen mit einer Salz-Ethanol-Lösung, von dem Silica-Material mit H<sub>2</sub>O eluiert werden.

### 2.2.4.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Enzymreaktionen

DNA-Fragmente in Restriktions- und PCR-Ansätzen wurden mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Prinzip dieser Aufreinigungsmethode ist, die DNA-Fragmente an eine Silica-Gel-Membran zu binden, zu waschen und in H<sub>2</sub>O zu eluieren.

### 2.2.4.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die Aufkonzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren erfolgte durch Fällung in Gegenwart von Salz und Alkohol. Die DNA wurde durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 3M Natriumacetat (pH5,2) und des  $2\frac{1}{2}$ fachen Volumen Ethanol absolut (-20°C) für eine Stunde bei -80°C gefällt. Für die Fällung von RNA wurde statt Natriumacetat 8M Lithiumchlorid verwendet. Die gefällten Nukleinsäuren wurde mit 13000rpm (Biofuge, Heraeus) bei 4°C 30min pelletiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 2.2.5 Arbeiten mit Bakterien

### 2.2.5.1 Kultivierung von Bakterien

Das Wachstum der Bakterien erfolgte entweder als Suspension mit 200rpm in LB-Medium oder als Kolonien nach dem Ausstreichen auf LB-Agarplatten bei 37°C oder 30°C im Bakterieninkubator. Für die Selektion transformierter Bakterien waren Antibiotika (50µg/ml Ampicillin) entsprechend der verwendeten Plasmid-DNA im LB-Medium bzw. in LB-Agarplatten vorhanden. Für eine Blau/Weiß-Selektion enthielten die LB-Agarplatten zusätzlich 50µg/ml X-Gal und 10µg/ml IPTG. Die dauerhafte Lagerung von Bakterien erfolgte bei -80°C. Dazu wurde ein Aliquot einer Bakteriensuspension mit 25% (v/v) Glycerin versetzt.

### 2.2.5.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien des *E.coli*-Stammes Top10F' wurden für die chemische Transformation und Elektroporation mit Plasmid-DNA kompetent gemacht (Hanahan und Meselson, 1983; Hanahan *et al.*, 1991). Für die chemische Transformation wurden 100ml LB-Medium mit 1ml einer 5ml üN-Bakterienkultur angeimpft und mit 200rpm bei 37°C im Bakterieninkubator bis zu einer Wachstumsdichte ( $OD_{600}$ ) von 0,55 kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 5min auf Eis gekühlt und mit 4000 x g bei 4°C 15min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 40ml kaltem TFB1 Puffer resuspendiert. Nach 15min Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation bei 4°C und 4000 x g wurde das Bakterienpellet in 4ml kaltem TFB2 aufgenommen, zu je 100µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

Für die Elektroporation wurden 500ml LB-Medium mit 5ml einer 50ml üN-Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C mit 200rpm im Bakterieninkubator bis zu einer Wachstumsdichte ( $OD_{600}$ ) von 0,8 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde für 5min auf Eis gekühlt, mit 4000 x g bei 4°C 15min pelletiert und in 100ml 1mM HEPES (pH7) resuspendiert. Die Suspension wurde auf 400ml mit 1mM HEPES aufgefüllt, erneut pelletiert und in 250ml 1mM HEPES resuspendiert. Die Suspension wurde wiederum pelletiert und in 10ml 10% (v/v) Glycerin in 1mM HEPES resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 4000 x g bei 4°C 10min pelletiert, in 1ml 15%igem Glycerin resuspendiert und zu je 40µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.5.3 Transformation von Bakterien

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

Für die chemische Transformation wurde ein Aliquot (100µl) chemisch kompetenter Bakterien ca. 10min auf Eis aufgetaut, die zu transformierende Plasmid-DNA (1ng pUC18 zur Kontrolle der Transformationseffizienz oder 10µl eines Ligationsansatzes) dazugegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Temperaturschock des Bakterien-DNA-Gemisches von 42°C für 60sec und eine Abkühlung von 2min auf Eis. Die Bakterien wurden mit 400µl SOC-Medium versetzt und 60min bei 37°C bzw. 30°C (bei Transformation von Plasmiden größer 9kb) mit 200rpm im Bakterieninkubator inkubiert. Anschließend wurde entweder eine Verdünnungsreihe des Ansatzes zur Bestimmung der Transformationseffizienz (erwartet: ca.  $10^6$ - $10^7$  Transformanten pro µg DNA) oder der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten, die mit dem geeigneten Antibiotikum supplementiert waren, ausplattiert und bis zum sichtbaren

Kolonienwachstum meist üN bei 37°C bzw. 30°C inkubiert.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot (40µl) elektrokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut, die zu transformierende Plasmid-DNA (10pg pUC18 zur Kontrolle der Transformationseffizienz oder 1 - 2µl eines aufgereinigten Ligationsansatzes) dazugegeben und direkt in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Schichtdicke: 0,1 cm) überführt. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde in einem Elektroporationsgerät einem elektrischen Puls von 1,7kV, 25µF und 200Ω ausgesetzt, mit 960µl SOC-Medium aufgefüllt und in einem Reaktionsgefäß für 60min bei 37°C bzw. 30°C (bei Transformation von Plasmiden größer 9kb) mit 200rpm im Bakterieninkubator inkubiert. Anschließend wurde entweder eine Verdünnungsreihe des Ansatzes zur Bestimmung der Transformationseffizienz (ca. 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> Transformanten pro µg DNA) oder der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten, die mit dem geeigneten Antibiotikum supplementiert waren, ausplattiert und bis zum sichtbaren Kolonienwachstum bei 37°C bzw. 30°C inkubiert.

#### 2.2.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Plasmidpräparations-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Aufreinigung wird die Plasmid-DNA in einem Bakterienlysat an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, anschließend gewaschen und in einem geeigneten Lösungsmittel, beispielsweise H<sub>2</sub>O, eluiert.

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

### 2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Die Synthese der DNA erfolgte durch den Einsatz der hitzestabilen *Taq*-Polymerase, einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*, deren optimale katalytische Aktivität bei 72°C liegt. Unter geeigneten Pufferbedingungen, der Bereitstellung von Desoxynukleotiden (dNTP) und zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, sogenannten Primern, wurden die gewünschten

DNA-Fragmente in zyklischen Wiederholungen amplifiziert. Eine PCR-Standardreaktion von 50µl enthält:

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

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

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

Für die Klonierung der retroviralen Bibliothek CX<sub>4</sub>A und die Klonierung der Virusvarianten wurde die Zyklenzahl zur Herstellung der DNA-Fragmente auf 20 begrenzt, um die Anreicherung von Mutationen zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.2.7 Semiquantitative PCR

Um eine möglichst hohe Sensitivität des Virus-Nachweises und des Spezies-Nachweises zu ermöglichen, wurden optimierte PCR-Bedingungen verwendet. Eingesetzt wurden 500ng genomische DNA als Template (Ausnahme Lunge und Leber, hier wurden 1000ng eingesetzt, da hohe RNA-Mengen in den Proben vorhanden waren), das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 50µl. Die Reaktionsansätze wurden unter Reinraum-Bedingungen pipettiert. Das Zyklusprotokoll war für beide Nachweise identisch.

5	min	95°C	Denaturierung	40 Zyklen
1	min	94°C	Denaturierung	
1	min	61°C	Hybridisierung	
45	sec	72°C	Synthese	
7	min	72°C	Beenden der Synthese	
∞		4°C	Lagerung der Proben	

Die Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte im 2%igen TBE-Agarosegel bei 80V über 6 Stunden. Als Marker diente die 2-log-ladder (NEB).

### 2.2.7.1 Reaktionsansatz des Virus-Nachweises

1x	Taq-PCR-Puffer
1 $\mu$ M	je Primer EAsEq1, CB6 bzw. wtCB6
0,2mM	je dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
2,5U	Taq-Polymerase
500ng	genomische DNA
4mM	Mg <sup>++</sup> (1,5mM im Standardpuffer vorhanden, dazu 5 $\mu$ l 25mM MgCl Puffer)

### 2.2.7.2 Reaktionsansatz des Spezies-Nachweises

1x	Taq-PCR-Puffer
1 $\mu$ M	je Primer $\beta$ -Actin (+), $\beta$ -Actin (-)
0,2mM	je dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
2,5U	Taq-Polymerase
500ng	genomische DNA
10%	Betain (Sigma)
2mM	Mg <sup>++</sup> (1,5mM im Standardpuffer vorhanden, dazu 1 $\mu$ l 25mM MgCl Puffer)

## 2.2.8 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zur Herstellung von DNA-Fragmenten aus RNA, hier aus viraler genomischer RNA, wurde die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei werden RNA-Moleküle in einzelsträngige komplementäre DNA-Moleküle (ss cDNA) mit Hilfe eines sequenz-spezifischen Primers unter geeigneten Pufferbedingungen und der Bereitstellung von Desoxynukleotiden durch die Reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA- Polymerase) umgeschrieben. Die ss cDNA wird anschließend als Matrize in eine PCR eingesetzt, wobei zunächst doppelsträngige cDNA (ds cDNA) entsteht, die dann amplifiziert wird.

Für die RT-PCR von viraler genomischer RNA wurde diese zunächst aus Zellkultur-überständen isoliert und anschließend in ss cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 2 $\mu$ l virale RNA, 1 $\mu$ l 10pmol/ $\mu$ l Primer EAsEq1(-) und 7 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gemischt, für 10min bei 80°C inkubiert und 5min auf Eis abgekühlt, um die RNA zu linearisieren und die Primer zu hybridisieren. Zu diesem Ansatz wurden 10 $\mu$ l Reaktions-Mix gegeben, der die Reverse Transkriptase und einen Ribonuklease-Inhibitor enthielt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 - 10 $\mu$ l des gesamten Ansatzes in die PCR eingesetzt.

Reaktions-Mix	
4 $\mu$ l	Reaktionspuffer Superscript (5x)
1 $\mu$ l	dNTP (20mM)
0,5 $\mu$ l	Ribonuklease-Inhibitor RNasin <sup>®</sup> (40U/ $\mu$ l)
2 $\mu$ l	DTT (0,1 M)
2 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
0,5 $\mu$ l	RT Superscript II <sup>™</sup> (200U/ $\mu$ l)

## 2.2.9 T/A-Klonierung von PCR-Produkten

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

## 2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden für die Bestimmung der Diversitäten und für die Analyse der Substratlinker der nicht selektionierten und selektionierten retroviralen CX<sub>4</sub>A-Bibliotheken von der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Dazu wurden 1 - 2 µg der zu sequenzierenden Plasmide eingedampft und zusammen mit wässrigen Lösungen der benötigten Oligonukleotide (10 pmol) verschickt. Erhaltene Nukleotidsequenzen, sowie Chromatogramme wurden per e-Mail von MWG zur Verfügung gestellt und mit den Programmen VectorNTI (Invitrogen) und Chromas (Technelysium) ausgewertet.

DNA-Sequenzierungen zur Überprüfung einzelner Klonierungen wurden im Paul-Ehrlich-Institut durch Herrn Dipl.-Ing. M. Selbert durchgeführt. Hierfür wurden die DNA-Proben mit der nachfolgenden Methode vorbereitet.

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

Pro 8 µl Reaktionsansatz wurden 2 µl Premix, 0,5 µg DNA und 1 µl 10 µM Primer eingesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: 96°C, 15sec; 50°C, 15sec; 60°C, 4min; 30 Zyklen. Anschließend wurden die DNA-Proben, zur Entfernung überschüssiger Dye-Terminatoren mit dem „DyeEX 2.0 Spin Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, getrocknet, in 2 µl Probenpuffer (0,5 µl Formamid, 0,5 µl Ladepuffer, 25mM EDTA [pH8]) aufgenommen, 2min bei 90°C denaturiert und auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit einem automatischen DNA-Sequenzier.

## 2.3 Methoden der Zellbiologie

### 2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien HT1080, HEK-293T, U-87 MG, A431, MDA-MT-231, MDA-MB-468, WM981, MDCK, MT1-MDCK und PG13 wurden in DMEM VZ kultiviert. Eine Stammhaltung der Kulturen erfolgte in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (mittlere Flasche; T75) mit Filterschraubverschluss bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf Atmosphäre in einem Zellinkubator.

Alle Zellen wurden bei Konfluenz der Kulturen zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurde der Zellüberstand verworfen, die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und anschließend 2ml Trypsinlösung zugegeben. HT1080-Zellen wurden mit 10ml PBS-EDTA-Lösung abgelöst. Nachdem sich die Zellen vollständig vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten, wurden sie vorsichtig resuspendiert und 1/10 der Suspension in eine neue Kulturflasche mit 12ml Medium überführt. Der Rest der Zellsuspension wurde entweder verworfen oder für weitere Arbeiten verwendet.

HUVEC wurden bei Konfluenz der Kultur zweimal wöchentlich 1:2 passagiert. Die Aussaat der Zellen erfolgt auf frisch Fibronectin-beschichteten Kulturschalen (1µg/cm<sup>2</sup> Fibronectinlösung, 30 - 60min Inkubation bei Raumtemperatur).

Die Suspensionszelllinien A3.01, Jurkat und B-Zellen wurden in 20ml RPMI VZ in stehenden T75 Flaschen mit Filterschraubverschluss kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert, d.h. im Kulturmedium suspendiert, 1/10 der Suspension in 18ml frisches Medium überführt und weiterkultiviert.

### 2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die längerfristige Lagerung von Zellen erfolgte bei -160°C über flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Zellen (wenn nötig) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und anschließend bei 1000rpm und 4°C für 5min pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 3ml kaltem Kryo-Medium vorsichtig resuspendiert und in vorgekühlte 2ml Kryo-Röhrchen aliquotiert (pro T75 Zellkulturflasche 2 Aliquots à 1,5ml). Diese wurden für mindestens 24h bei -80°C inkubiert und anschließend zur Lagerung über flüssigem Stickstoff überführt. Um gelagerte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in 12ml vorgewärmtem Medium vorsichtig resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen sowie DMSO-Reste zu entfernen. Auftaute Zellen wurden nach frühestens 3 Tagen in Kultur für Experimente eingesetzt.

Für Tierexperimente bestimmte Zellen wurden erst nach 7 Tagen in Kultur eingesetzt. Diese Zellen wurden außerdem in Antibiotikum freiem Medium gehalten.

### 2.3.3 Transfektion von Zellen

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

Gefäß	Gesamt-DNA ( $\mu\text{g}$ )	Plus Reagenz ( $\mu\text{l}$ )	Lipofectamine ( $\mu\text{l}$ )
6-Loch	3	10	5
T75	18	60	30
T175	36	120	60

Je Transfektionsansatz wurde die DNA in vorgewärmten DMEM mit Plus-Reagenz gemischt (Endvolumen:  $100\mu\text{l}$ ,  $600\mu\text{l}$  oder  $1200\mu\text{l}$ ) und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Lipofectamine in DMEM (Endvolumen:  $100\mu\text{l}$ ,  $600\mu\text{l}$  oder  $1200\mu\text{l}$ ) dazugegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde der Reaktionsansatz mit DMEM aufgefüllt (Endvolumen: 1ml, 5ml oder 10ml). Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und 4h bei  $37^\circ\text{C}$  im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit ausreichend Medium versorgt. Einen Tag nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

## 2.4 Methoden der Virologie

### 2.4.1 Herstellung und Konzentrierung von Viruspartikeln

Zur Herstellung von Viruspartikeln wurden 293T und HT1080 Zellen mit viruskodierenden Plasmiden transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die virusproduzierenden Zellen mit serumfreiem Medium üN im Zellinkubator inkubiert. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden filtriert ( $45\mu\text{m}$ -Filter, Nunc), aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Konzentrierung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Entweder durch Ultrazentrifugation, dazu wurden die Partikel direkt aus 9 - 11ml Zellkulturüberstand mit 30000rpm (SW 41 Rotor, Beckman) bei  $4^\circ\text{C}$  1,5h pelletiert, oder durch *lowspeed* Zentrifugation, wobei die Viren aus bis zu 50ml

Zellkulturüberstand 24h bei 4°C mit 3500rpm (Haereus) pelletiert wurden. Anschließend wurde das Pellet in einem beliebigen kleineren Volumen serumfreien DMEM oder PBS resuspendiert. Für weitere Analysen wurden die Viruspartikel aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **2.4.2 Infektion von Zellen und Titration von Viren**

Für die Infektion mit Retroviren wurden je Infektionsansatz  $1 \times 10^5$  HT1080 Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion der Zellen mit einer bestimmten RT-Aktivität oder m.o.i. (*multiplicity of infection*) in einem Endvolumen von 300µl DMEM. Die m.o.i. wurde zuvor durch Titration virushaltiger Zellkulturüberstände auf HT1080 Zellen ermittelt. Der Infektionsansatz wurde nach 2h Inkubation entfernt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Medium kultiviert. Für den Nachweis infizierter Zellen mittels Immunperoxidase-Test wurden sie 24h später mit Methanol fixiert (s. 2.4.5). Für den Einsatz von Inhibitoren während der Infektion wurden die Zellen 1h mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert und auch nach der Infektion weiter unter Einfluss des Inhibitors kultiviert.

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

### **2.4.3 Isolierung viraler RNA**

Die Isolierung retroviraler RNA aus Viruspartikeln in Zellkulturüberständen erfolgte mit dem „QIAamp Viral RNA Mini Kit“ (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Hierbei wird die virale RNA nach Lyse der viralen Partikel unter denaturierenden Bedingungen zur Inaktivierung von RNasen an einer Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und in einem RNase-freien Puffer eluiert. Das RNA-Eluat wurde anschließend mit DNaseI behandelt, um eine DNA-Kontamination nach Transfektion mit viruskodierender Plasmid-DNA zu entfernen. Dazu wurde das RNase-Free DNase Set (Qiagen) nach Angaben des Herstellers angewendet.

### **2.4.4 Reverse Transkriptase Aktivitäts-Test (RT-Test)**

Mit dem RT-Test „C-type-RT™ Activity Assay“ (Cavidi Tech, Uppsala, Schweden) wurden nach Angaben des Herstellers MLV-abgeleitete Retroviren qualitativ und quantitativ in Zellkulturüberständen nachgewiesen. Bei diesem Verfahren synthetisiert die Reverse Transkriptase (RT) entlang einer immobilisierten RNA (polyA)-Matrize einen DNA-Strang, währenddessen Bromo-Desoxyuridin (BrdUTP) eingebaut wird. Nach der Synthese und dem

Waschen wird ein spezifischer mit alkalische Phosphatase-konjugierter Antikörper dazugegeben, der an BrdUTP bindet. Das anschließend dazugegebene para-Nitrophenolphosphat wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Die Absorption des Produktes para-Nitrophenol wird als Maß der Enzymaktivität bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist proportional zur eingesetzten RT-Aktivität. Die Messung der Absorption einer 1:5-Verdünnungsreihe einer unbekannt Probe und der Vergleich mit dem mitgeführten Standard (MoMLV-RT) erfolgte mit einem Multifunktions-Reader. Die RT-Aktivität der Probe konnte dann anhand der ermittelten Standardkurve von MoMLV-RT (0,083 - 624 mU/ml) und durch die Berücksichtigung der Verdünnungsstufe bestimmt werden.

### **2.4.5 Immunperoxidase-Test (IPA)**

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

Dazu wurde eine adhärenente Zellpopulation nach einmaligem Waschen in PBS mit eiskaltem Methanol für mindestens 30min bei -20°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Zellen mit Blockierungspuffer 30min bei 37°C blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Danach wurden die Zellen mit einem p30-spezifischen Antiserum (s. 2.1.3), verdünnt in Blockierungspuffer, für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (s. 2.1.3), verdünnt in Blockierungspuffer, für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (letzter Waschschrift mit 15min Inkubation bei 37°C), mit Substratlösung gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

## **2.5 Methoden der Proteinbiochemie**

### **2.5.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (modifiziert nach (Laemmli, 1970) können Proteine nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hierbei zeigen Proteine unterschiedlicher Größe durch die Molekularsiebeeigenschaften des Polyacrylamid-Gels verschiedene Laufgeschwindigkeiten in der Gelmatrix. Um eine Auftrennung nur nach Größe der Proteine zu erreichen, werden die

Proteine durch das negativ geladene Detergenz (SDS) mit negativen Ladungen im Überschuss umgeben, so dass deren eigentliche Nettoladung nicht mehr zum Tragen kommt. Die Proteine werden durch SDS und die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol außerdem denaturiert, wodurch auch ihre Form bei der Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit 5%igem Sammelgel und 10%igem Trenngel mit Hilfe eines Gelsystems (Bio-Rad) hergestellt.

Das Viruspellet wurde anschließend direkt in SDS-Probenpuffer oder zuerst in PBS resuspendiert und später mit der entsprechenden Menge 4fach SDS-Probenpuffer versetzt. Die so vorbereiteten Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder für kurze Zeit auch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Um die Proteine vollständig zu denaturieren wurden die Proben vor dem Auftragen für 5min auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Als Größenstandard wurde der Marker RPN800 Full Range Rainbow™ (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet, der vorgefärbte Proteine definierter Größe enthält (250 / 160 / 107 / 77 / 52 / 35 / 30 / 25 / 15 / 10 kDa). Nach Einlauf der Proben für 15min bei 80V, erfolgte die Auftrennung für mindestens 4h bei 100V.

### 2.5.2 Zymographie

Um die Aktivität von Proteasen im Überstand von Zellen beurteilen zu können, wurde die Zelllinie 48h serumfrei gehalten und der so konditionierte Überstand analysiert. Dazu wurden die Proben mit 4x-SDS-Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, 10min bei Raumtemperatur inkubiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. In das PAGE-Gel wurde 0,1% Gelatine kopolymerisiert. Nach der Auftrennung wurde das SDS durch 1h Inkubation des Gels bei Raumtemperatur in der Triton-haltigen Waschlösung entfernt und die Proteasen so renaturiert. Anschließend wurde das Gel  $\ddot{u}\text{N}$  im Inkubationspuffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  sanft geschwenkt, so dass die Proteasen die Gelatine im Gel optimal verdauen konnten. In der darauf folgenden Coomassie-Färbung (mind. 3h) lagert sich der blaue Farbstoff an die verbliebene Gelatine an. Wo die Gelatine durch Proteasen verdaut wurde, werden nach Zugabe des Entfärbers farblose Banden sichtbar.

### 2.5.3 Western Blot-Analyse

Der Transfer von Proteinen auf proteinbindende Membranen (Towbin *et al.*, 1979) wird in Analogie zum Nukleinsäuretransfer Western-Blotting genannt. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im *Semi-Dry*-Verfahren (von engl. halb trocken) auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert.

Hierzu wurden das Gel, die Membran sowie Filterpapier kurz in Transferpuffer äquilibriert.

Der anschließende Proteintransfer auf die Membran erfolgte (zwischen jeweils drei Schichten Filterpapier) für 1h im elektrischen Feld bei  $2\text{mA}/\text{cm}^2$ . Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran nach Beendigung des Transfers zunächst 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss wurden spezifische Antiseren (vgl. 2.1.3) zugesetzt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  leicht geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für je 10min mit TBST wurde die Membran mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper unter leichtem Schwenken für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert.

Der Nachweis der Proteine erfolgte, nach vier weiteren TBST-Waschschritten, mit Hilfe des SuperSignal West Pico Substrate oder bei schwächeren Signalen SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (beides Pierce [Perbio], Bonn). Das hierin enthaltene Luminol-Substrat wird dabei von der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase unter Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert. Die somit angeregte Lichtemission wurde entweder mit Hilfe des Lumi-Imagers (Roche Diagnostics, Mannheim) gemessen und graphisch dargestellt, oder durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einer Entwicklermaschine.

## **2.6 Methoden der Veterinärmedizin**

### **2.6.1 Haltung der SCID-Mäuse**

Es wurden C.B.17 SCID Mäuse von den *Charles River Laboratories* (Wilmington, Massachusetts) verwendet. Auf Grund ihrer geringeren Aggressivität wurden ausschließlich weibliche Mäuse für die Versuche eingesetzt, die gemäß den deutschen Richtlinien für die Tierhaltung immundefizienter Mäuse in pathogenfreien belüfteten Käfigen mit bis zu 8 Tieren gehalten wurden. **Nomenklatur:** CB17/lcr-Prkdc<sup>scid</sup>/Crl Ursprung: SCID Mäuse besitzen eine autosomale rezessive genetische Mutation (*scid*). Diese wurde 1980 von Bosma in C.B-17/lcr Mäusen im Fox Chase Cancer Center entdeckt. SCID Mäuse zeigen eine schwere kombinierte Immundefizienz, die sowohl B- als auch T-Zellen betrifft. NK Zellen, Macrophagen und Granulozyten sind dagegen normal entwickelt. **Fellfarbe:** Weiß (Albino).

### **2.6.2 Injektion von Tumorzellen**

Die Mäuse wurden mit 0,1-0,2ml Narkose-Lösung betäubt, an der Flanke rasiert und anschließend  $5 \times 10^5$  HT1080 bzw. A431 Zellen s.c. an der rasierten Stelle injiziert. Die Zellen entwickelten innerhalb von 7 Tagen einen fühlbaren Tumor ( $\sim 2\text{mm}^3$ ) und innerhalb von 14 -

15 Tagen wurde ein Volumen von etwa 5mm<sup>3</sup> erreicht. Diese Tumorgröße war ausreichend zur Entnahme des Tumors für die Untersuchungen oder für eine intratumorale Virus-Injektion. Die Mäuse wurden bis zu 36 Tage mit den HT1080 Tumoren gehalten und es wurden in diesem Zeitraum keine physischen oder psychischen Auffälligkeiten beobachtet. Bei den anschließenden Autopsien waren keine Metastasen sichtbar. Mäuse mit A431-Tumor zeigten ab Tag 27 deutliche Gewichtsabnahme und wurden daraufhin nicht länger gehalten.

### **2.6.3 Virusinjektion**

Die Mäuse wurden mit 0,1 - 0,2ml Narkose-Lösung betäubt, und 1x10<sup>3</sup> i.E. der Viren in 100µl PBS wurden an einer einzigen Stelle in den ca. 5mm<sup>3</sup> großen Tumor injiziert. Nach Applikation wurde die Nadel für etwa 30sec im Tumor belassen, um ein Herausfließen der injizierten Lösung zu verhindern.

### **2.6.4 Tumor- und Organentnahme**

Die Mäuse wurden nach den Richtlinien des Tierschutzes euthanasiert, in 70% Ethanol äußerlich desinfiziert und anschließend Tumore und Organe präpariert. Die entnommenen Tumore wurden für die verschiedenen Untersuchungen vorbehandelt. Ein Teil des Gewebes wurde zur DNA Isolierung direkt in flüssigem Stickstoff gefroren, ein Teil wurde in -80°C kaltem Methylbutan für spätere Gewebeschnitte eingefroren und ein Teil wurde zur Rekultivierung der Tumorzellen verwendet. Dazu wurde das Tumorstück in kleine Stücke zerteilt und für 3h im Zellinkubator mit 5 - 10% Kollagenaselösung disaggregiert. Anschließend wurden die Zellen durch ein Zellsieb (70µm, Milan) gestrichen, abzentrifugiert (5min, 900rpm) und in frischem Medium aufgenommen. Die Tumorzellen wurden sofort nach der Entnahme des Tumors in Gegenwart von AZT (Azidothymidin, ein Hemmer der Reversen Transkriptase) kultiviert, um eine weitere Ausbreitung der Viren nach Entnahme des Tumorgewebes zu unterbinden. Wenn der entnommene Tumor kleiner als etwa 5mm<sup>3</sup> war, konnte nur genomische DNA isoliert werden.

### **2.6.5 Isolierung genomischer DNA aus Tumor- und Organproben**

Die Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien, Tumorproben und Organen erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Hierbei wird das Gewebe zunächst durch Proteinase K und definierte Pufferbedingungen lysiert, anschließend wird die Zellmembran aufgebrochen und die DNA an eine Silica-Gel-Membran gebunden, gewaschen und mit H<sub>2</sub>O eluiert. Eine separate Prozedur zur Entfernung eventueller RNA-Reste erfolgte nicht.

## 3 Ergebnisse

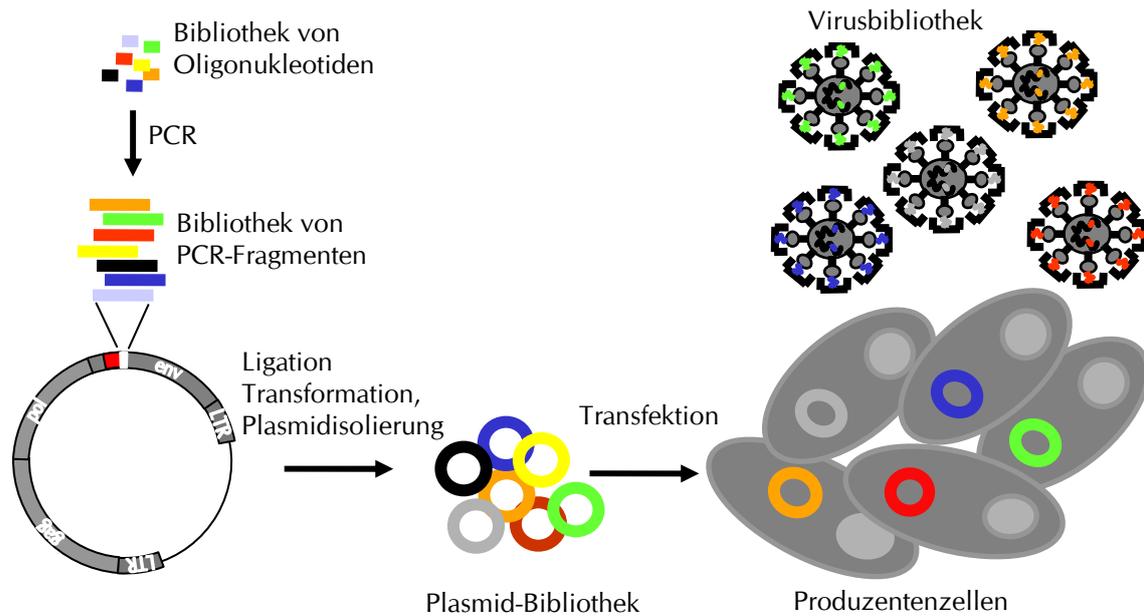
Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Erzeugung von Tumor-spezifischen Retroviren durch gerichtete Molekulare Evolution. Dazu wird zunächst die Herstellung einer mit CD40L blockierten retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek (rPSB) und ihre Selektion auf zwei Tumorzelllinien beschrieben. Danach wird auf die biochemische und virologische Charakterisierung der selektionierten Viren eingegangen und die TAP-Aktivierbarkeit untersucht. Dann folgt die Beschreibung der Targeting-Eigenschaften der selektionierten Viren im Vergleich zu Kontroll-Viren. Diese wurden sowohl in Zellkulturexperimenten als auch im Mausmodell untersucht.

### 3.1 Die CX<sub>4</sub>A Bibliothek

Die Herstellung einer diversen Virusbibliothek ist ein mehrstufiger Prozess (Abbildung 3-1): Von einer Bibliothek von Oligonukleotiden wird per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eine Bibliothek von PCR-Fragmenten hergestellt. Durch Ligation der Fragmente in ein geeignetes MLV-kodierendes Plasmid, Transformation des Ligationsansatzes in Bakterien, Anzucht der Bakterien und anschließende Isolierung der Plasmide entsteht die Plasmidbibliothek. Diese kann wiederum in geeignete Produzentenzellen transfiziert werden, die letztendlich dann die Virusbibliothek herstellen. Diese präsentiert dann die Bibliothek der Protease-Substrat-Linkerpeptide zwischen der Blockierungsdomäne CD40L und Env und kann auf Proteasespaltbarkeit selektioniert werden.

#### 3.1.1 Herstellung der Plasmidbibliothek

Der zwischen Blockierungsdomäne und Hüllprotein inserierte Linker bestand aus einem kurzen Abstandhalter aus den drei Aminosäuren (AS) Alanin - Serin - Serin (ASS), den sechs AS der Proteasespaltstelle und drei Alaninen (AAA), die von der *NotI*-Erkennungssequenz kodiert werden.



**Abbildung 3-1: Überblick über die Erzeugung der Virusbibliothek.**

Über mehrere mit den Pfeilen angedeutete Stufen wird aus einer Bibliothek von diversifizierten Oligonukleotiden eine retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek, die Virusbibliothek, hergestellt. Die verschiedenen Farben deuten die unterschiedlichen Sequenzen an, die sich in den verschiedenen Stufen wieder finden. Im Einzelnen werden die Schritte in Kapitel 3.1.1 beschrieben.

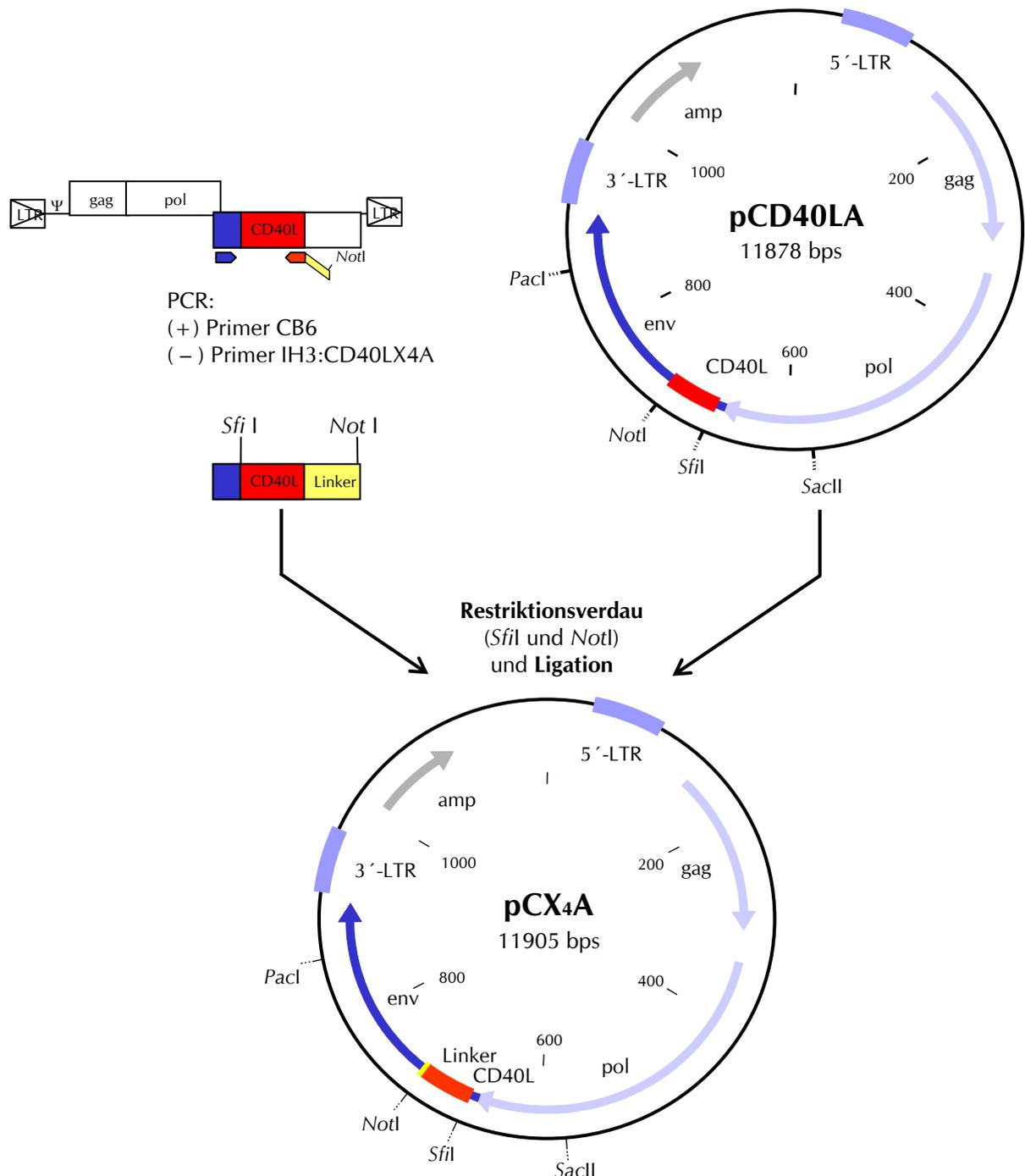
Die Bibliothek der diversen Spaltstellen wurde ausgehend von der MMP-2-Spaltstelle in Kollagen entwickelt. Dieses Substrat wurde von Upadhye und Ananthanarayanan (1995) beschrieben und besteht aus 6 AS: Prolin - Leucin - Glycin - Leucin - Tryptophan - Alanin (PLGLWA). Die Spaltung erfolgt zwischen Glycin und Leucin. Um den Anteil MMP-spaltbarer Linker in der Bibliothek möglichst hoch zu halten, wurden die AS an der Spaltstelle (P1 und P1') fixiert. An P3 und P2' wurden mit dem Kodon NHY<sup>1, 2</sup> und an P2 und P3' mit NHN<sup>3</sup> verschiedene jedoch nicht alle AS zugelassen. Diese eingeschränkt diversen Kodons wurden verwendet, um die sechs Kodons auszuschließen, die den Einbau von Arginin in den Linker erlauben. Das Vorkommen von Arginin in einer Bibliothek begünstigt die Selektion von Substraten der ubiquitären Proprotein-Konvertasen, wie z.B. Furin (Buchholz *et al.*, 1998). Zudem wurden durch die Verwendung von NHY alle, durch NHN zumindest zwei Stopp-Kodons eliminiert. Damit entsprach die Diversität  $1,33 \times 10^6$  möglichen Kombinationen auf DNA Ebene und  $4,16 \times 10^4$  Kombinationen auf AS Ebene.

<sup>1</sup> IUPAC Kode: N=A+T+G+C, H=C+A+T, Y=T+C, D=G+T+A, R=A+G

<sup>2</sup> mit NHY mögliche AS: A N D H I L F P S T Y V

<sup>3</sup> mit NHN mögliche AS: A N D Q E H I L K M F P S T Y V und Stopp

Dieses Linker-Design wurde durch das Oligonukleotid IH3:CD40LX4A realisiert: Bei der Synthese dieses Primers wurden an den Nukleotidpositionen, welche die vier diversen AS-Positionen im Linker kodieren, statt eines Nukleotids bestimmte Kombinationen von Nukleotiden zum Aufbau des Strangs angeboten. Dadurch wurde die kombinatorische Vielfalt der Sequenzen erhalten.



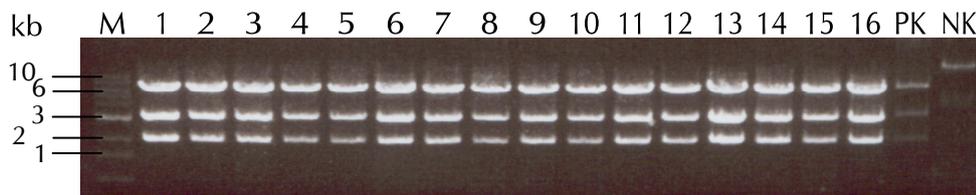
**Abbildung 3-2: Die Entstehung der Plasmidbibliothek pCX4A.**

Dargestellt sind die Generierung der Bibliothek von PCR-Fragmenten, das Ausgangsplasmid pCD40LA, sowie das Produkt pCX4A.

Da IH3:CD40LX4A als Rückwärtsprimer fungierte, lauteten die degenerierten Kodons entsprechend NDN und RDN. Damit und mit dem Plus-Strang Primer CB6 wurden, wie in Abbildung 3-2 dargestellt, durch eine Polymerase-Kettenreaktion auf der Matrize pCD40LA die diversifizierte DNA-Sequenz an die kodierende Region der Blockierungsdomäne CD40L anfügt. Diese Bibliothek von PCR-Fragmenten wurde dann mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* geschnitten.

Als Plasmid für die Insertion der PCR-Fragmente wurde pCD40LA (Schneider *et al.*, 2003) gewählt, welches das CD40L-blockierte amphotrope MLV ohne spaltbaren Linker kodiert. So ist eine Kontamination der Plasmid-Bibliothek mit pCD40LA z.B. durch einen unvollständigen *SfiI/NotI*-Verdau unproblematisch, da das resultierende Virus nicht proteolytisch aktiviert werden kann.

pCD40LA wurde mit den Enzymen *SfiI* und *NotI* geöffnet und die *SfiI/NotI*-geschnittene PCR-Fragment-Bibliothek in das geöffnete Plasmid ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* wurden  $1 \times 10^6$  unabhängige Bakterienkolonien erhalten. Davon wurden 16 Klone zufällig ausgewählt und deren Plasmid-DNA präpariert. Alle Klone zeigten nach *NheI*-Restriktionsverdau die erwarteten Banden im Agarosegel und bestätigen so die korrekte Insertion der Linker (Abbildung 3-3). Damit konnte davon ausgegangen werden, dass über 90% der Klone rekombinant waren und die Anzahl der Bakterienklone die theoretische Diversität der Bibliothek abdeckte. Zur Aufreinigung der Plasmidbibliothek wurden alle erhaltenen Klone gepoolt, verdünnt und über Nacht kultiviert.



**Abbildung 3-3: Test auf korrekte Ligation der CX4A-Bibliothek.**

Aus zufällig ausgewählten Bakterienklonen (1-16) der Bibliothek wurde DNA präpariert und mit *NheI* verdaut. Eine zusätzliche Schnittstelle im kodierenden Bereich des Linkers der Plasmidbibliothek und von pCMA (PK) ermöglichte die Unterscheidung von pCD40LA (NK), dem Ausgangsplasmid, nach Auftrennung der Fragmente im Agarosegel. Als Größenmarker wurde die 1kb-Ladder (M) verwendet.

### 3.1.2 Selektion in der Fibrosarkom-Zelllinie HT1080

Um optimal wachsende Viren aus der CX<sub>4</sub>A-Bibliothek zu selektionieren, musste eine Zelllinie verwendet werden, die in hohem Maß MMPs exprimiert. Die Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 ist bekannt für ihre hohe Expression von MMP-2 und MMP-9, und wurde deshalb für eine erste Selektion ausgewählt. Da sich diese Zelllinie jedoch schlecht durch Lipofektion mit Plasmiden transfizieren lässt und die Diversität der pCX<sub>4</sub>A Bibliothek mit  $4 \times 10^4$  Linker-Varianten auch auf Virus Ebene abgedeckt werden sollte, musste die Methode des Selektionsstarts optimiert werden. Dies wurde durch die Verwendung eines Kokultivierungssystems erreicht.

Dazu wurden zunächst HEK-293T Zellen (*human embryonic kidney*, 293T) mit der Plasmidbibliothek transfiziert. Am Tag danach wurde die Selektions-Zelllinie HT1080 mit den transfizierten 293T Zellen auf einer Virus-durchlässigen Membran (Transwell™) für 24 Stunden kokultiviert, um durch die kontinuierliche Freisetzung und Infektion eine möglichst hohe Infektionsrate zu erreichen. Danach wurden die HT1080 in Zellkulturflaschen überführt und für 12 Tage passagiert. An Tag 6 und 9 wurden die Zellen geteilt und jeweils 10% der Zellen weiter kultiviert. An Tag 9 wurde die gleiche Menge uninfizierter Zellen zugemischt, um den Selektionsdruck zu erhöhen. Zellüberstände wurden an Tag 5 und 12 geerntet und mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) auf ihren Virus-RNA Gehalt hin untersucht. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in *E.coli* kloniert, einzelne Klone zufällig ausgewählt und die enthaltene kodierende Sequenz für das Linkerpeptid sequenziert. Dabei wurden an Tag 5 unter 28 Klonen keine identischen Linker-Sequenzen gefunden. Auch ließ sich noch keine Anreicherung von bestimmten AS an einzelnen Positionen feststellen.

In den zur Sequenzierung ausgewählten Klonen, die von der an Tag 12 präparierten RNA hergestellt wurden, konnten zwei Typen von Linkerpeptiden besonders häufig nachgewiesen werden: PSGLYQ (6 von 50 sequenzierten Klonen) und AKGLYK (8/50) bzw. AKGLYH (2/50). Alle weiteren Linkersequenzen sind in Abbildung 3-4 gezeigt.

Betrachtete man die Häufigkeiten aller möglichen AS an einer bestimmten Position über die Zeit (Abbildung 3-5), so wurde die Anreicherung bestimmter AS an den diversifizierten Linkerpositionen P1, P2, P2' und P3' deutlich.

A Häufigkeit							B AS Gruppen an P3 und P2							C Ähnliche Linker zusammengefasst						
P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Anzahl	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Anzahl	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Anzahl
A	K	G	L	Y	K	8	P	N	G	L	Y	A		A	K	G	L	Y	K/H	10/50
P	S	G	L	Y	Q	6	P	S	G	L	Y	Q	6	P	S/T	G	L	Y/N	Q/K	8/50
D	T	G	L	F	Q	3	P	S	G	L	N	K		D	T/I	G	L	F	Q	4/50
P	D	G	L	I	L	3	P	T	G	L	N	Q		P	D	G	L	I	L	3/50
S	Y	G	L	F	I	3	P	A	G	L	H	K		S	Y	G	L	F	I	3/50
A	K	G	L	Y	H	2	P	A	G	L	N	Y								
D	Q	G	L	I	P		P	I	G	L	T	P								
D	I	G	L	F	Q		P	P	G	L	T	L								
I	T	G	L	V	L		P	D	G	L	I	L	3							
I	P	G	L	D	T		A	K	G	L	Y	K	8							
I	P	G	L	D	P		A	K	G	L	Y	H	2							
I	N	G	L	P	D		I	N	G	L	P	D								
L	T	G	L	N	V		I	T	G	L	V	L								
L	T	G	L	A	S		I	P	G	L	D	P								
L	S	G	L	A	M		I	P	G	L	D	T								
L	H	G	L	A	T		L	H	G	L	A	T								
N	P	G	L	L	Y		L	S	G	L	A	M								
N	A	G	L	P	I		L	T	G	L	A	S								
P	S	G	L	N	K		L	T	G	L	N	V								
P	T	G	L	N	Q		Y	S	G	L	F	L								
P	P	G	L	T	L		Y	F	G	P	T	S								
P	I	G	L	T	P		S	Y	G	L	F	I	3							
P	A	G	L	N	Y		S	V	G	L	T	V								
P	A	G	L	H	K		S	L	G	L	N	T								
P	N	G	L	Y	A		S	I	G	L	L	S								
S	V	G	L	T	V		T	A	G	L	P	H								
S	I	G	L	L	S		N	A	G	L	P	I								
S	L	G	L	N	T		N	P	G	L	L	Y								
T	A	G	L	P	H		D	Q	G	L	I	P								
Y	S	G	L	F	L		D	T	G	L	F	Q	3							
Y	F	G	P	T	S		D	I	G	L	F	Q								

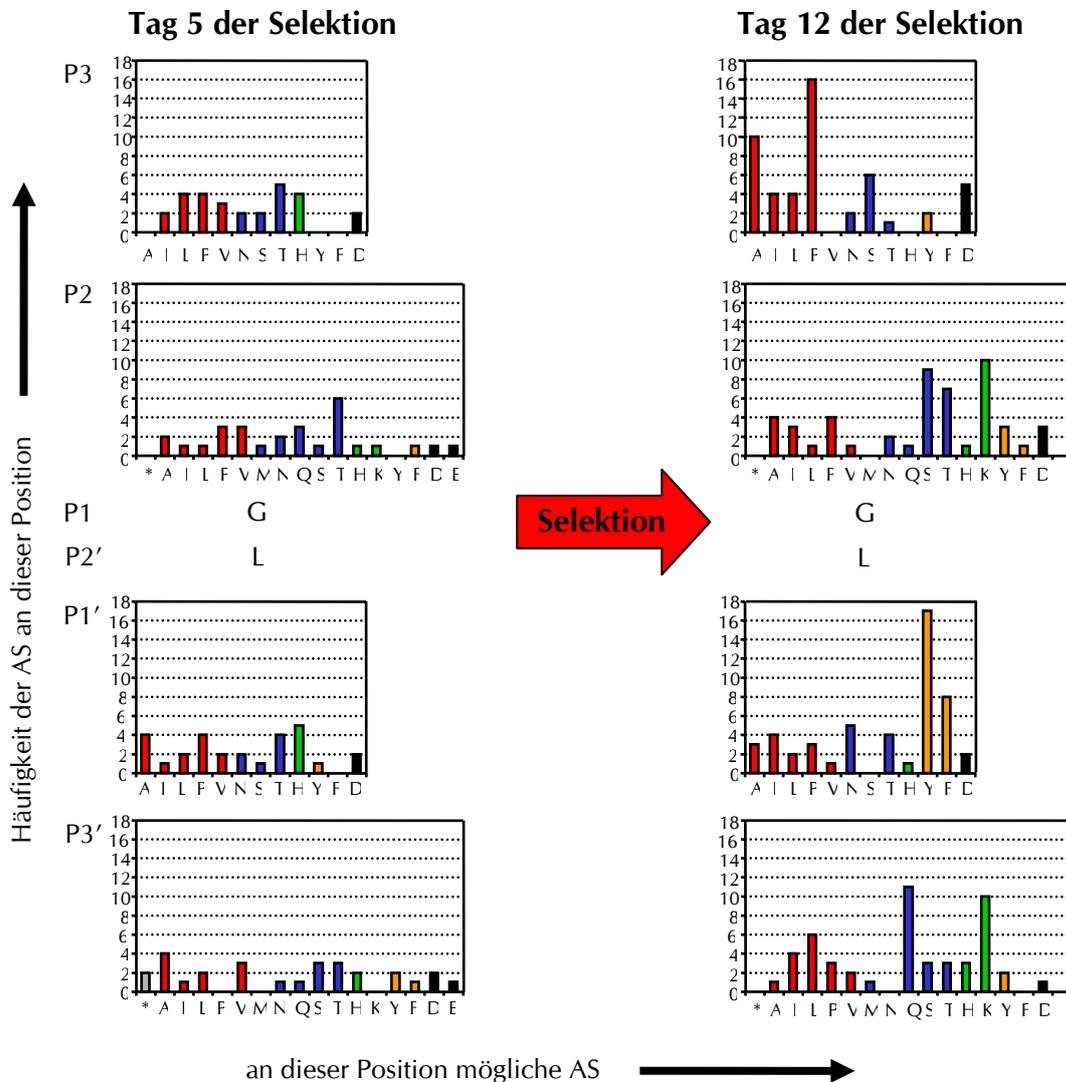
**Abbildung 3-4: Überblick über alle selektierten Linker nach 12 Tagen.**

Die nach 12 Tagen Selektion erhaltenen Peptidlinker werden hier sortiert nach ihrer Häufigkeit unter den 50 sequenzierten Klonen (A) und nach Auftreten von AS-Gruppen an P3 und P2 (B) dargestellt. Durch Zusammenfassen ähnlicher Linker konnten mit fünf Motiven fast 60% der Linker beschrieben werden (C). Gleiche Buchstabenfarben bedeuten gleiche AS-Gruppe: PAILV: unpolare AS (rot), STNMQ: polare AS (blau), YF: aromatische AS (gelb), HK: positiv geladene AS (grün).

Im Verlauf der Selektion von Tag 5 bis Tag 12 (Abbildung 3-5) haben sich an P3 unpolare AS besonders Alanin (A) und Prolin (P) angereichert, wobei Alanin ausschließlich im AKGLYK-Motiv auftrat.

An P2 traten besonders Serin (S) und Threonin (T) auf, beide aus der Gruppe der polaren AS. Die an dieser Position und an P3' häufig vorkommende AS Lysin (K) gehörte wiederum zur

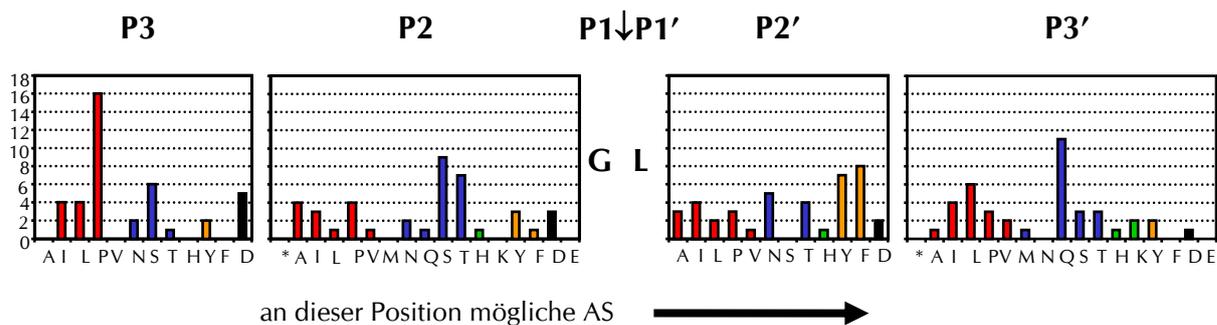
AK-Linker Gruppe. Nach den AS der Spaltstelle Glycin (G) und Leucin (L) fanden sich an P2' Tyrosin (Y) und Phenylalanin (F), beides aromatische AS, am häufigsten. An P3' dominierte Glutamin (Q).



**Abbildung 3-5: Anreicherung bestimmter AS im Verlauf der Selektion.**

An den diversifizierten Positionen P3, P2, P2' und P3' wurde die Häufigkeit bestimmter AS an Tag 5 und Tag 12 der Selektion in Diagrammen aufgetragen. Gleiche Balkenfarben bedeuten gleiche AS-Gruppe: unpolare AS (rot), polare AS (blau), aromatische AS (gelb), positiv geladene AS (grün), negativ geladene AS (schwarz), Stopp-Kodons (grau).

Trennt man die AS aus dem AKGLYK-Motiv (AK-Motiv) von den übrigen Sequenzen (Abbildung 3-6), lässt sich ein Konsensusmotiv, das P S/T G L Y/F Q lautet, ablesen. Scheinbar konnten sich zwei verschiedene Motive besonders gut ausbreiten: Das AK-Motiv und ein Konsensusmotiv, dem der zweithäufigste Klon PSGLYQ entspricht.



**Abbildung 3-6: Ermittlung eines Konsensusmotivs ohne AKGLYK.**

Im Pool der Linker von Tag 12 der Selektion wurde in dieser Darstellung das prominenteste Motiv der Selektion AKGLYK nicht berücksichtigt. Dadurch kann ein Konsensusmotiv<sup>1</sup> in den übrigen Spaltstellen herausgelesen werden.

Dass sich aus einer Bibliothek mit  $4 \times 10^4$  Kombinationen im Verlauf einer Selektion auf einer MMP-reichen Zelllinie Linkerpeptid-Motive angereichert haben, deutet darauf hin, dass der Selektionsdruck tatsächlich auf die Spaltung der Linker ausgerichtet war. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass im beobachteten Zeitraum keine Deletionen innerhalb des für die Blockierungsdomäne kodierenden Bereichs des Virusgenoms auftraten. In der Sequenzierung der Linker wurde auch die Sequenzumgebung innerhalb von ca. 350 Nukleotiden untersucht. Dabei wurden wenige gestreute Nukleotid-Austausche gefunden. Da diese nie an der gleichen Position und sowohl in den Sequenzen von Tag 5 als auch von Tag 12 zu beobachten waren, ist davon auszugehen, dass daraus kein Vorteil für das Viruswachstum entstand.

Ob die selektionierten Viren ihren Wachstums-Vorteil tatsächlich durch die Spaltbarkeit ihrer Linkerpeptide durch MMPs erhielten, musste durch die Charakterisierung der Linker in einem definierten viralen Kontext bestätigt werden. Diese Untersuchungen sind im Kapitel 3.2 beschrieben.

### 3.1.3 Selektion in der Gliom-Zelllinie U-87 MG

Das MMP-Spektrum verschiedener Tumorzelllinien unterscheidet sich erheblich (Giambarnardi *et al.*, 1998). Es sollte daher untersucht werden, ob die Selektion der CX<sub>4</sub>A-Bibliothek auf einer anderen MMP-positiven Zelllinie zu anderen Linkerpeptid-Motiven führen würde.

Daher wurde die Gliom Zelllinie U-87 MG zu einer weiteren Selektion der CX<sub>4</sub>A-Bibliothek

<sup>1</sup> Konsensus-Motiv: gemeinsames Motiv, das aus einer Gruppe ähnlicher Motive abgeleitet werden kann

ausgewählt. Auf Grund ihres im Vergleich zu HT1080 Zellen langsameren Wachstums wurde das in 3.1.2 verwendete Protokoll leicht verändert. Die Kokultivierung mit den pCX4A transfizierten 293T Zellen wurde auf vier Tage ausgedehnt, um möglichst viele initiale Infektionserreignisse zu erlauben. Dann wurden die U-87 MG Zellen in Zellkulturflaschen für weitere 45 Tage passagiert. Dieser verlängerte Zeitraum sollte auch Aufschluss darüber geben, ob es möglich ist, durch lange Selektionszeiten einige wenige dafür aber hocheffektive Virusklone zu erhalten. Nach 38 Tagen konnte ein klares Signal in der RT-PCR erhalten werden, das auf die Anreicherung von Viren im Überstand schließen ließ, während eine Überprüfung am Tag 28 noch kein RT-PCR Signal ergeben hatte. An Tag 38 und an Tag 45 wurde Virus-RNA präpariert, davon RT-PCR-Fragmente synthetisiert und in Standard-Plasmide ligiert. Nach Transformation wurden von zufällig ausgesuchten Bakterien-Klonen DNA präpariert und der kodierende Bereich des Linkers sequenziert. Bereits am Tag 38 waren überraschender Weise 3 von 4 Linker-Sequenzen identisch (3x PAGLHV, 1x TSGLTN). Am Tag 45 befand sich in 28 sequenzierten Klonen tatsächlich ausschließlich das Linkerpeptid PAGLHV. Dieser klare Gewinner der Selektion in U-87 MG sollte in den folgenden Charakterisierungen mit den aus der HT1080-Selektion erhaltenen Viren verglichen werden.

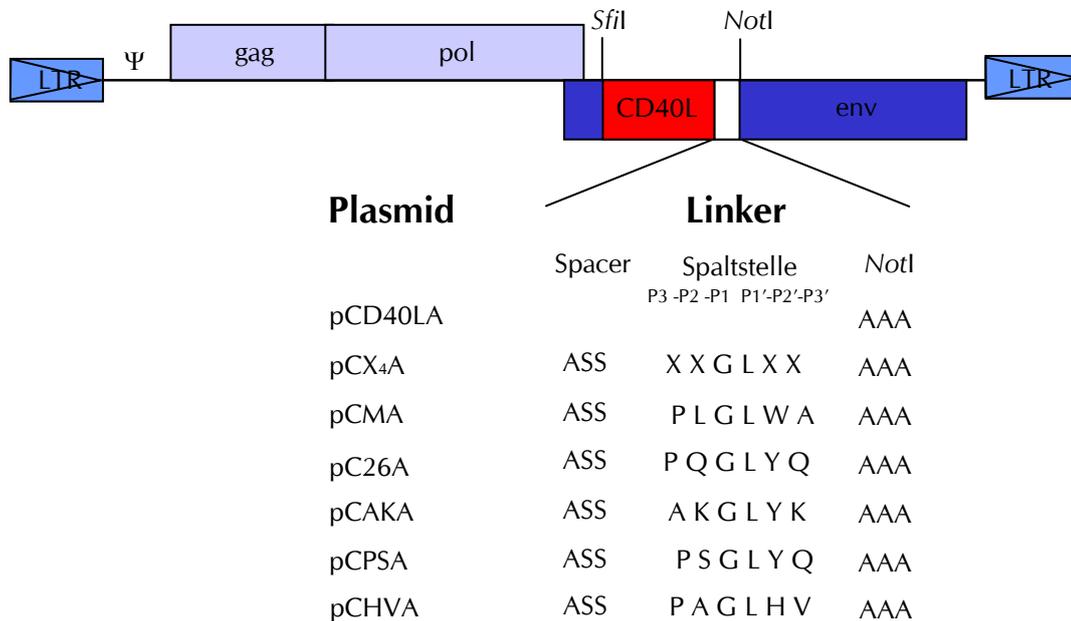
## **3.2 Die Charakterisierung der selektionierten Viren**

Im Folgenden werden die Untersuchungen erläutert, die zur Charakterisierung der Viren unternommen wurden. Dazu gehören die Analyse der Integrität der viralen Partikel und die Suche nach der für die Selektion der Viren verantwortlichen Protease. Dazu wurden virale Partikel *in vitro* mit MMP-2 gespalten und die Infektiosität der Viren in Zellkultur unter dem Einfluss von MMP-Inhibitoren einerseits und während der Expression von MMPs in MMP-negativen Zellen andererseits untersucht. Doch zunächst wird beschrieben, wie die selektionierten Viren kloniert wurden, und es wird ein Überblick über alle verwendeten Varianten gegeben.

### **3.2.1 Klonierung der Virusvarianten**

Wie im letzten Absatz unter 3.1.2 beschrieben, ereigneten sich in der Sequenzumgebung der Linker im Verlauf des Viruswachstums Sequenzveränderungen. Um einen Einfluss dieser Veränderungen ausschließen und die selektionierten Linker in einem identischen viralen Kontext vergleichen zu können, wurden die kodierenden Sequenzen der beiden prominentesten Linkerpeptide aus der Selektion auf den HT1080 Zellen, PSGLYQ und AKGLYK, mittels PCR mit den Oligonukleotiden IH11:CD40L(AKGLYK)A(-) bzw. IH12:CD40L(PSGLYQ)A(-) und CB6 auf der Matrize pCD40LA hergestellt. Das PCR-Fragment

wurde an den eingefügten Spaltsequenzen für die Restriktionsendonukleasen *SfiI* und *NotI* geschnitten und in das *SfiI/NotI*-geöffnete Plasmid pCD40LA eingefügt. Die resultierenden Virus-Plasmide wurden pCPSA und pCAKA benannt (Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7: Überblick über den Aufbau der verwendeten Viren.**

Die Plasmidnamen ergeben sich aus der Blockierungsdomäne (C = CD40L), dem Linkerpeptid und dem Hüllprotein (A = amphotropes Env). Dargestellt ist neben den unterschiedlichen Linkerpeptiden auch deren direkte AS Umgebung. Die Viren wurden analog zu den Plasmiden benannt, z.B. kodiert das Plasmid pCMA das Virus CMA. Davon wurde nur bei der Benennung des nicht-spaltbaren blockierten Virus abgewichen: pCD40LA kodiert das Virus CA.

Auf die gleiche Weise wurden die Plasmide der Kontrollviren mit dem Standardsubstrat für MMP-2 (PLGLWA, pCMA)<sup>1</sup> und mit einem aus einer EGF-blockierten Bibliothek selektierten Linker (PQGLYQ, pC26A)<sup>2</sup> hergestellt (Schneider *et al.*, 2003). Diese dienen zusammen mit dem nicht spaltbaren Virus CA (kein Linker zwischen CD40L und Env, pCD40LA) und dem unblockierten Wildtyp (WT)-Virus (pM91MS) als Vergleichsgrößen. Die Identität der durch PCR hergestellten Plasmide wurde durch Sequenzierung bestätigt.

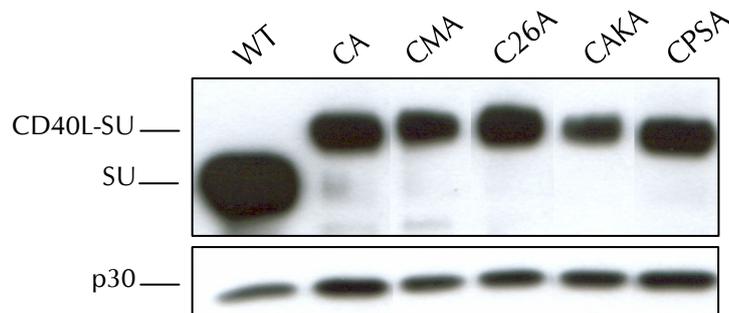
Das Linkerpeptid PAGLHV aus der Selektion in der Gliom-Zelllinie U-87 MG wurde im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Linkerpeptiden aus einem der sequenzierten Klone mittels *SfiI* und *NotI* Verdau ausgeschnitten und in das *SfiI/NotI*-geöffnete Plasmid pCD40LA eingefügt.

<sup>1</sup> Primer IH9: CD40LMMPA(-)

<sup>2</sup> Primer IH10: CD40L26A(-)

### 3.2.2 Analyse der Virus-Partikelbildung nach Transfektion in 293T-Zellen

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Virusplasmide unterscheiden sich nur in der Sequenz des Linkers. Da sich auch dadurch Veränderungen in der Faltung und Oberflächenexpression der jeweiligen Env-Proteine ergeben könnten, wurde die Integrität der Viren auf Proteinebene mit der Westernblot-Analyse untersucht. Zur Virusproduktion wurden die Plasmide der Virusvarianten in 293T Zellen durch Lipofektion eingebracht und die serumfreien Virusüberstände nach 48 Stunden geerntet. Die Viruspartikel wurden konzentriert, zur Konzentrationsbestimmung im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine im Western Blot-Verfahren auf eine Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Danach erfolgte die normalisierte Auftragung der Proben in einem weiteren Western Blot (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8: Western Blot von 293T hergestellten Viruspartikeln.**

Virus wurde nach Transfektion der entsprechenden Plasmide in 293T Zellen aus dem Kulturmedium geerntet und per Ultrazentrifugation konzentriert. Aufgetragen wurden auf das p30 Signal normalisierte Proteinmengen. Die Hüllproteine wurden mit  $\alpha$ -RLV-SU Serum, das p30-Kapsidprotein mit  $\alpha$ -RLV-p30-Serum spezifisch detektiert.

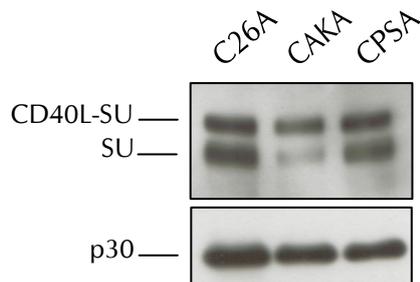
Detektiert wurden das SU-Protein (gp70; *surface unit*) und das Kapsid-Protein p30. Bei annähernd gleicher Virusmenge, die über das p30-Signal abgeschätzt werden konnte, unterschieden sich die Viren im Signal des Env-Proteins nur geringfügig. Allein das WT-Virus wies ein deutlich stärkeres SU-Signal bei gleichzeitig schwächerem p30-Signal auf. Das heißt, das Verhältnis von SU zu p30 ist bei den aktivierbaren Viren schlechter als beim WT-Virus. Das deutet darauf hin, dass das Env ohne Blockierungsdomäne besser in die Virushülle eingebaut wird, als CD40L-tragende Envs.

Auch nach Überexpression des Films ließ sich für keines der CD40L-tragenden Env-Proteine eine Bande auf Höhe von SU nachweisen. Die CD40L-Domänen waren demnach auch nach Freisetzung der Viruspartikel kovalent mit den Env-Molekülen verbunden. Das heißt,

ubiquitär exprimierte intrazelluläre Proteasen, wie z.B. Furin, waren nicht in der Lage die selektionierten Linkerpeptide zu spalten. Welche Proteasen für die Aktivierung der in dieser Arbeit selektionierten Viren verantwortlich waren, sollte nun im Weiteren untersucht werden.

### 3.2.3 Analyse von in HT1080 Zellen gebildetem Virus

Es sollte nun untersucht werden, ob nach der Produktion der Viren in HT1080 Zellen eine Abspaltung der Blockierungsdomäne nachweisbar war. Hierzu wurden HT1080 Zellen mit den Plasmiden transfiziert, die serumfreien Überstände geerntet, konzentriert und mittels Westernblot analysiert.



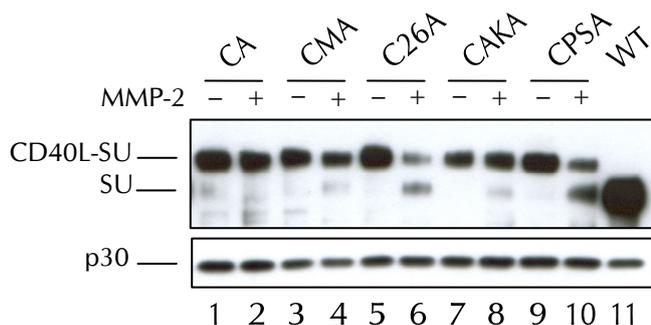
**Abbildung 3-9: Westernblot von HT1080 produzierten Partikeln.**

Virus wurde 48 Stunden nach Transfektion der entsprechenden Plasmide in HT1080 Zellen aus serumfreiem Kulturüberstand geerntet und per Ultrazentrifugation konzentriert. Zunächst erfolgte die Normalisierung der Proteine auf das p30 Signal, dann wurden die ermittelten Mengen für die Untersuchung hier aufgetragen. Die Hüllproteine wurden mit  $\alpha$ -RLV-SU Serum, das p30-Kapsidprotein mit  $\alpha$ -RLV-p30-Serum spezifisch detektiert.

Bei den selektionierten Viren CAKA, CPSA und der spaltbaren Kontrolle C26A fällt in Abbildung 3-9 eine zweite Bande auf Höhe der Bande des SU-Proteins auf. Dies heißt, dass die Viren im Überstand der HT1080 Zellen teilweise aktiviert vorlagen. Das Hüllprotein von CAKA scheint im Überstand von HT1080 zu einem geringeren Prozentsatz gespalten vorzuliegen, als das von CPSA. Prinzipiell könnten die Linker während der Knospung oder durch lösliche Proteasen nach der Freisetzung gespalten werden. Dies ist hier nicht unterscheidbar.

### 3.2.4 *In vitro* Spaltung mit aktiver MMP-2

Die Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 exprimiert einen hohen Level MMP-2 RNA (Giambernardi *et al.*, 1998), daher liegt die Vermutung nahe, dass MMP-2 in die Spaltung der selektionierten Linker in den Viren CAKA und CPSA involviert sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Viruspartikel in 293T Zellen produziert und mit aktiver MMP-2 oder als Kontrolle nur mit dem Reaktionspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der SU-Signale wiederum mit der Westernblot-Methode.



**Abbildung 3-10: *In vitro* Spaltung der Hüllproteine mit MMP-2.**

293T produziertes Virus wurde mit aktiver MMP-2 (+) oder Reaktionspuffer (-) 45min inkubiert und anschließend im Westernblot auf Abspaltung der CD40L-Domäne untersucht.

Eine Spaltung des Linkers durch MMP-2 konnte so für die Viren C26A und CPSA bestätigt werden: In Abbildung 3-10 ist in Spur 6 und 10 eine deutliche Abnahme der Signalintensität des CD40L-SU-Proteins im Vergleich zu dem Signal ohne MMP-2 in Spur 5 und 9 zu erkennen. Gleichzeitig taucht eine etwa genauso intensive weitere Bande auf Höhe des SU-Proteins für diese beiden Viren auf. Die Spaltung erfolgte also nicht vollständig, sondern zu etwa 50 - 55%. CAKA zeigte nur eine sehr schwache Bande auf Höhe des SU-Proteins: MMP-2 scheint daher nicht die Protease zu sein, die für die Selektion dieses Linkers verantwortlich war. Auch das parentale MMP-2 Spaltnotiv PLGLWA im Virus CMA wurde nicht effizient gespalten. Die densitometrische Bestimmung ergab, dass für CAKA und CMA nur etwa 6 - 7% der Hüllproteine gespalten vorlagen.

### 3.2.5 Inhibition der Aktivierung durch MMPs

Mit dem direkten Spaltungsnachweis durch MMP-2 *in vitro* können noch keine abschließenden Rückschlüsse auf die Aktivierung der Viren in Zellkultur gezogen werden. Darum sollte durch verschiedene Inhibitoren die Aktivität von MMPs blockiert werden, damit die Spaltung der Linker verhindert und so die Infektiosität der Viren herabgesetzt werden. Als Inhibitoren wurden zum Teil spezifisch an eine Protease bindende chemische Verbindungen eingesetzt, zum Teil solche mit breiterer Bindungsaffinität, die verschiedene Proteasen inhibierten. Darunter waren sowohl reversibel als auch irreversibel bindende Inhibitoren. Einen Überblick über die Inhibitoren und ihren Effekt auf die Zellen bzw. die Infektiosität der Viren gibt Tabelle 3-1.

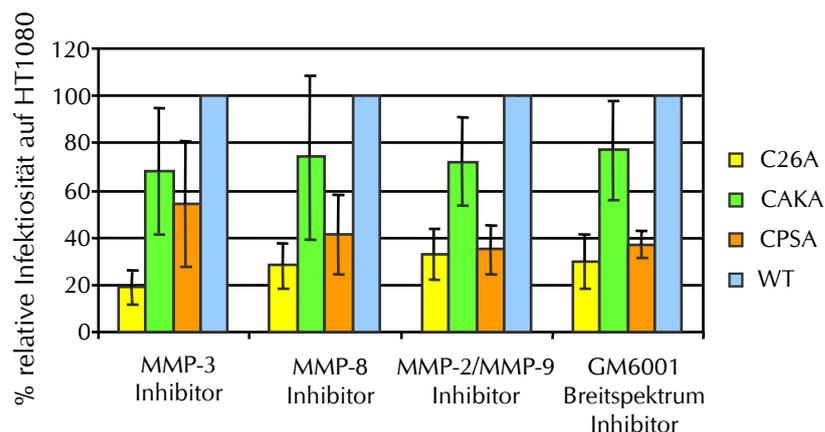
Tabelle 3-1: Überblick über die verwendeten Inhibitoren

Name des Inhibitors	Chemischer Name	Inhibierte Proteasen	Eingesetzte Konz.	Wirkung
GM6001 <sup>1</sup>	N-[(2R)-2-(hydroxamidocarbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methylamide	0,4nM MMP-1 0,5nM MMP-2 20µM MMP-3 100nM MMP-8 0,2nM MMP-9	a) 10µM b) 100µM	a) Siehe Abbildung 3-11 b) CAKA bei etwa 50%
MMP-8 Inhibitor I <sup>1</sup>	(3R)-(+)-[2-(4-Methoxybenzenesulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-hydroxamat	IC50: 4nM MMP-8	10µM	Siehe Abbildung 3-11
MMP-3 Inhibitor II <sup>1</sup>	N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic Acid	130nM MMP-3	10µM	Siehe Abbildung 3-11
MMP-2/MMP-9 Inhibitor II <sup>1</sup>	(2R)-[4-Biphenylsulfonylamino]-N-hydroxy.3.phenylpropionamide	IC50: 17nM MMP-2 30nM MMP-9	10µM	Siehe Abbildung 3-11
Phenanthrolin <sup>3</sup>	1, 10 Phenanthroline	Metalloprotease Inhibitor	12,5µM <sup>4</sup>	WT inhibiert
Complete <sup>2</sup>	Mischung verschiedener Proteaseinhibitoren	Chymotrypsin, Thermolysin, Papain, Pronase, Pankreatischer Extrakt, Trypsin	(1 Tab in 500µl) 0,5µl, 1µl <sup>4</sup>	Kein Effekt
Pefabloc <sup>2</sup>	4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl-flouride, hydrochloride	Irreversibel: Serinproteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Plasma Kallikrein, Thrombin)	0,1mg/ml 1mg/ml <sup>4</sup>	Zytotoxisch
Trypsin Inhib. (soybean) <sup>1</sup>		Trypsin	10µg/ml 100µg/ml <sup>4</sup>	Kein Effekt

<sup>1</sup> Calbiochem    <sup>2</sup> Roche    <sup>3</sup> Sigma

<sup>4</sup> Vorinkubation der Zellen mit Inhibitor für eine Stunde

Es wurden  $3 \times 10^3$  infektiöse Einheiten (i.E.) der Viren CAKA, CHVA, CPSA und WT, die in 293T Zellen hergestellt worden waren, unter Zugabe von Inhibitor zur Infektion auf HT1080 eingesetzt und der Einfluss der Inhibitoren auf die Zahl der infizierten Zellen gemessen. Nach vier Stunden Infektionszeit wurde frisches Medium wiederum mit Inhibitor auf die Zellen gegeben und nach weiteren 30 Stunden Kultivierung konnten die infizierten Zellen immunhistochemisch (vgl. Kap. 2.4.5) angefärbt werden. Durch die kurze Kultivierungszeit werden nur die initial infizierten Zellen gefärbt, die Ausbreitung der Viren wird nicht berücksichtigt. Teilweise wurden die Zellen mit Inhibitor vorinkubiert. Die genauen Konzentrationen, inhibierten Proteasen und beobachteten Effekte wurden in Tabelle 3-1 zusammengestellt.



**Abbildung 3-11: MMP-Inhibitoren und ihr Einfluss auf die Infektiosität.**

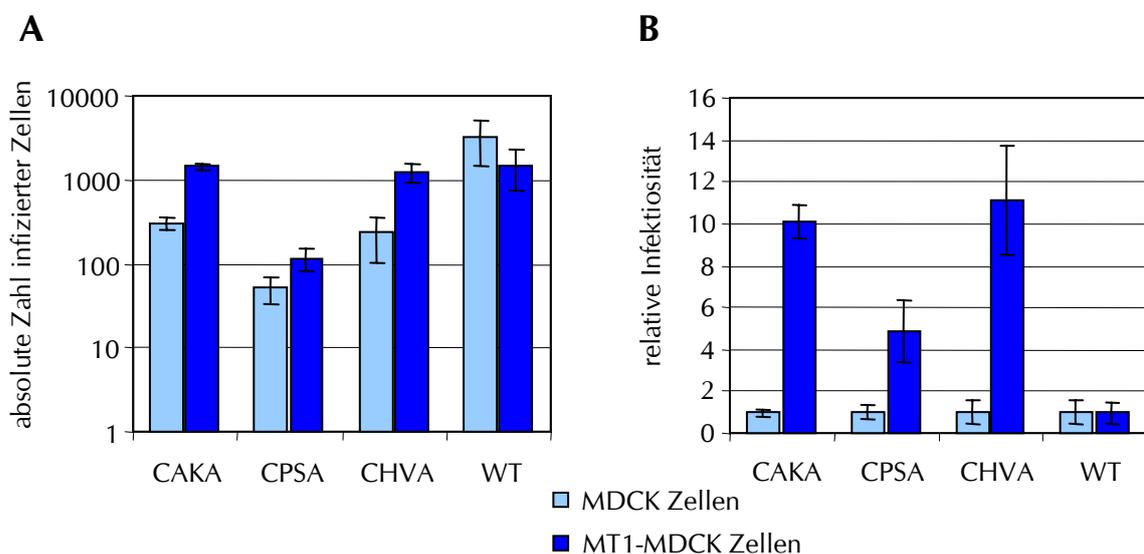
Es wurden HT1080 Zellen mit und ohne Inhibitor infiziert und nach 30 Stunden mittels IPA (Immunperoxidase Assay) angefärbt. Der Mittelwert der Zahl infizierter Zellen unter dem Einfluss des jeweiligen Inhibitors wurde aus drei Experimenten ermittelt und auf die Infektiosität des WT-Virus normalisiert.

Die Werte dreier unabhängiger Versuche wurden jeweils auf die Infektiosität des WT-Virus normalisiert, um Effekte, die der Inhibitor auf die prinzipielle Virusreplikation hat, auszugleichen. Die Aktivierung von CPSA wird durch fast alle MMP-Inhibitoren blockiert (Abbildung 3-11). Diese lag etwa auf dem Niveau von C26A: die Inhibition der Aktivierung dieses Linkers durch GM6001 wurde bereits beschrieben (Schneider *et al.*, 2003), so dass C26A hier als Positivkontrolle angesehen werden kann. Interessant ist der Unterschied in der Inhibition durch den MMP-3-Inhibitor, der auf die Infektiosität von C26A einen wesentlich stärkeren Einfluss hatte, als auf die von CPSA. Da sich die beiden Linker in nur einer AS unterscheiden, (S bzw. Q an P2) könnte die stärkere Affinität von MMP-3 zum C26A-Linker genau mit diesem Austausch zusammenhängen. CAKA wurde dagegen nahezu nicht inhibiert und erreichte mit allen Inhibitoren eine Infektiosität von um die 70%. Da auch eine Reihe weiterer Inhibitoren keinen spezifischen Effekt auf CAKA hatten (Tabelle 3-1), blieb weiterhin unklar, welche Protease(n) für die Selektion von CAKA verantwortlich war(en). Für CPSA dagegen konnte nach der Spaltbarkeit der Partikel mit MMP-2 *in vitro* und der Inhibition der Aktivierung durch MMP-2 Inhibitoren davon ausgegangen werden, dass MMP-2 für die Aktivierung der Viren verantwortlich war.

### 3.2.6 Aktivierung der Infektiosität

In Ergänzung zum im vorigen Kapitel beschriebenen „negativen“ Nachweis der MMP-Abhängigkeit sollte auch positiv gezeigt werden, dass die Aktivierung der selektionierten Viren durch MMPs erfolgt. Das ist durch die Verwendung von Zellen möglich, welche auf

Grund ihrer geringen Expression von MMPs nur geringe Suszeptibilität für die aktivierbaren Viren zeigen. Nach Transfektion solcher Zellen mit MMP cDNA sollte folglich die Infektiosität MMP-aktivierbarer Viren ansteigen. Verwendet wurden MDCK (*madin darby canin kidney*) Zellen, welche mit MMP-14 (alte Nomenklatur: MT1-MMP „membran type“ 1-MMP) stabil transfiziert worden waren. Diese wichtige Protease ist in die Aktivierung verschiedener weiterer MMPs involviert, darunter auch MMP-2. Vergleicht man die Suszeptibilität der ursprünglichen Zelllinie MDCK mit den MMP-14 exprimierenden MDCK (MT1-MDCK) lässt sich der Einfluss von MMP-14 auf die Aktivierung der Viren ableiten. Die MMP-14 exprimierende und die untransfizierte MDCK Zelllinie wurden freundlicherweise von Mark Chadwick (Biofocus, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 3-12: Aktivierung der Infektiosität durch MT1-MMP Expression.**

MMP-14 stabil exprimierende MDCK Zellen (dunkelblaue Balken) wurden im Vergleich zu unveränderten MDCK Zellen (hellblaue Balken) mit selektionierten Viren und dem WT-Virus infiziert. Die Ergebnisse dreier Experimente mit einer eingesetzten m.o.i. von  $3 \times 10^3$  (CPSA  $1,25 \times 10^3$ ) wurden gemittelt (A) oder auf den WT normalisiert und relativ zur Infektiosität der unveränderten MDCK-Zelllinie dargestellt (B).

Die Infektion der ~70% konfluenten Zellen wurde mit  $3 \times 10^3$  i.E. der Viren CAKA, CHVA und WT und  $1,25 \times 10^3$  i.E. von CPSA vorgenommen. Nach 3 Stunden wurde die initiale Infektion durch einen Medienwechsel beendet. Durch eine weitere Kultivierung über 60 Stunden wurde den Viren Gelegenheit gegeben, sich in den Zellen auszubreiten. Dann wurden die infizierten Zellen durch IPA (Immunperoxidase Assay) quantifiziert und die Zahlen aus drei unabhängigen Experimenten in die Berechnung der Verbesserung der Suszeptibilität einbezogen. Den größten positiven Effekt hatte die Expression von MMP-14 auf

CHVA (Abbildung 3-12). Hier war eine Verbesserung der Infektiosität etwa um den Faktor 11 zu beobachten. Für CAKA konnte die Suszeptibilität um den Faktor 10 gesteigert werden, damit war die Verbesserung fast genauso groß, wie für CHVA. Auf CPSA war der Einfluss der MMP-14 Expression am geringsten, doch auch hier konnte ein signifikanter Effekt erzielt werden. Damit ist für alle Viren die Aktivierung durch MMPs wahrscheinlich. Dies ist besonders für CAKA und CHVA ein wichtiger Befund, da die zuvor beschriebenen Methoden zur Bestimmung der aktivierenden Protease hier keine schlüssigen Ergebnisse erbracht hatten.

### ***3.3 Nachweis der konditionalen Replikation der selektionierten Viren***

Die CX<sub>4</sub>A-Virus-Bibliothek wurde selektioniert, um Viren zu erhalten, die sich selektiv in MMP-positiven Zellen ausbreiten. Durch die in den nächsten Kapiteln beschriebenen Wachstumskinetiken auf Zellen, die in unterschiedlichem Maße MMPs exprimieren, sollte überprüft werden, ob die selektionierten Viren tatsächlich in der Lage sind, konditional zu replizieren.

Das MMP Expressionsprofil einer Zelle ist im Prinzip auf RNA- oder Proteinebene bestimmbar. Jedoch wird dadurch nicht berücksichtigt, welche MMPs auch wirklich aktiv vorliegen, da das Geflecht von Inhibitoren und aktivierenden Proteasen unberücksichtigt bleibt. Daher wurde die im anschließenden beschriebene Zymographie verwendet, um das MMP-2 und MMP-9-Profil der in den Wachstumskinetiken verwendeten Zellen zu bestimmen.

#### **3.3.1 Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in verschiedenen Zelllinien**

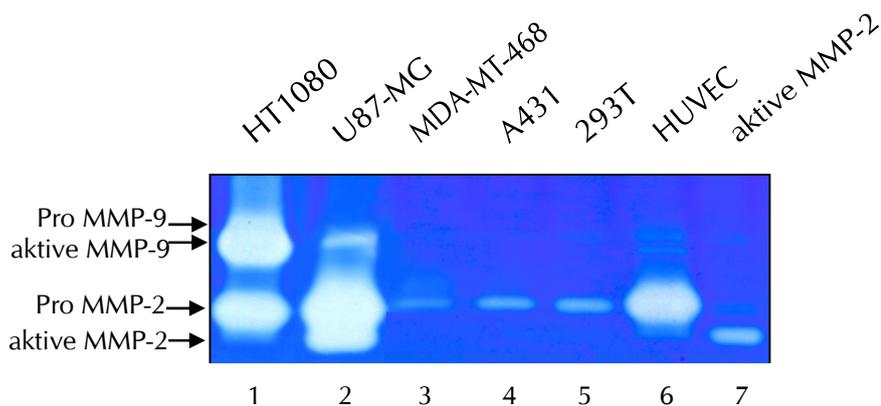
Durch die Zymographie ist es möglich aktive MMPs von nicht aktivierten Proformen auf Grund des unterschiedlichen Molekulargewichtes zu unterscheiden (Heussen und Dowdle, 1980). Dazu wird in einem SDS-Polyacrylamidgel, in dem als Substrat für MMP-2 und MMP-9 Gelatine kopolymerisiert wird, unter nicht reduzierenden<sup>1</sup> Bedingungen der konditionierte<sup>2</sup> Überstand von Zellen nach dem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die Proteasen im Gel renaturiert und können unter geeigneten Bedingungen die Gelatine lokal abbauen. Durch die nachfolgende Proteinfärbung im Gel mit Coomassie wird die verbleibende Gelatine blau gefärbt und an den Stellen, wo MMPs die

---

<sup>1</sup> PAGE (Polyacrylamid - Gelelektrophorese) ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol

<sup>2</sup> konditioniertes Medium = Medium, in das Zellen ihre spezifischen Marker und Proteine sekretiert haben

Gelatine verdaut haben, werden farblose Banden sichtbar. Da das Peptid, das *in vivo* die Aktivität der MMP unterbindet, nach der Neufaltung der MMP seine Funktion nicht mehr wahrnehmen kann, zeigen auch die Proformen der MMPs Signale im Zymogramm. So sind Doppelbanden für MMP-2 (Pro-Form bei 72kD und aktiv bei 64kD) und für MMP-9 (Pro-Form bei 92kD und aktiv bei 82kD) zu detektieren. Auf diese Weise wurde das konditionierte Medium verschiedener humaner Tumorzelllinien, Produzentenzellen und Primärzellen untersucht: Neben HT1080, 293T und U-87 MG wurden MDA-MB-468, eine Brustkarzinom-Zelllinie, A431, eine epidermoide Karzinom Zelllinie und HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnur verwendet.



**Abbildung 3-13: Zymographie zur Bestimmung der MMP-2 und MMP-9 Aktivitäten.**

Es wurden jeweils 25µl konditioniertes Medium der angegebenen Zelltypen auf ein Gelatine-PAGE-Gel geladen. Nach Inkubation über Nacht wurde die Gelatine angefärbt. Die Intensität einer ungefärbten Bande entspricht dem Vorkommen der jeweiligen MMP-Form im konditionierten Medium dieser Zelllinie (1-6). Als Größenvergleich wurden 100pg aktive rekombinante MMP-2 (7) auf das Gel geladen.

So konnten in allen Zelllinien Signale detektiert werden, die sich jedoch in ihrer Intensität stark unterschieden. Die Zelllinien HT1080 (Abbildung 3-13, Spur 1) und U-87 MG (Spur 2), die für die Selektion der CX4A Virusbibliothek ausgewählt worden waren, zeigten tatsächlich intensive Banden sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9. Die U-87 MG Zellen sezernierten die größte Menge aktiver MMP-2 in den Überstand. Aktive MMP-9 war nur im Überstand der HT1080 Zellen in größerer Menge nachweisbar. Auch HUVEC (Spur 6) exprimierten in beträchtlichem Maß MMP-2, jedoch war nur ein kleiner Teil davon auch aktiv. Das Verhältnis zwischen aktiver Form und Proform war hier dem von HT1080 sehr ähnlich. Außerdem zeigten HUVEC schwache Signale sowohl für die Proform der MMP-9 als auch für die aktive Form. Dagegen konnte in den U-87 MG Zellen nur ein relativ starkes Proform-Signal detektiert werden. In den anderen Zelllinien (Spur 3, 4, 5) konnte nur die MMP-2 Proform

detektiert werden, allerdings in viel schwächerem Ausmaß, als in den drei vorher beschriebenen Zelllinien. Damit sollten sie als MMP-negative Zellen für die geplante Wachstumsstudie geeignet sein.

### 3.3.2 Virus-Wachstum auf verschiedenen Zelllinien

Das Wachstumsverhalten der selektierten Viren CAKA, CPSA und CHVA wurde mit dem des WT-Virus und dem der Kontrollviren C26A, CMA und CA verglichen. Es wurde auf zwei verschiedene Arten verfolgt: zum einen über die Anzahl infizierter Zellen, zum anderen über die RT-Aktivität im Überstand der Zellen. Zusätzlich wurden am Ende der Kinetik die Virusproteine im Überstand mit der Western-Blot Analyse nachgewiesen.

#### 3.3.2.1 Verlauf des Anstiegs infizierter Zellen

Um zu Beginn des Viruswachstums vergleichbare Virusmengen einzusetzen, wurden die zur Infektion verwendeten Virusüberstände auf ihre RT-Aktivität normalisiert. Eine Normalisierung auf i.E. war durch die hohe Effizienz der Blockierungsdomäne CD40L nicht möglich, da auch CA in den Kinetiken berücksichtigt werden sollte. Neben den zuvor per Zymographie analysierten Zellen wurden zwei humane T-Zelllinien (Jurkat und A3.01) und eine mit Epstein-Barr-Virus immortalisierte humane B-Zelllinie als weitere MMP-negative Zelltypen verwendet. Um den geringeren Anteil infektiöser Partikel in Stocks CD40L-präsentierender Viren zumindest teilweise zu kompensieren, wurden die Zellen mit 300mU RT-Aktivität der Viren CAKA, CPSA, CMA und nur mit 30mU RT-Aktivität des WT infiziert. Dann wurden die Zellen kultiviert, das Medium täglich gewechselt und alle 3 - 4 Tage die Zellen passagiert, sowie der Prozentsatz infizierter Zellen bestimmt. Außerdem wurde mittels RT-PCR regelmäßig überprüft, ob Deletionen in der kodierenden Region der Blockierungsdomäne auftraten.

Erwartungsgemäß konnte das WT-Virus in fast allen verwendeten Zelllinien replizieren. Eine Ausnahme bildeten nur die B-Zellen. Hier konnte kein gesicherter Anstieg der infizierten Zellen nachgewiesen werden; sie wurden deshalb im Weiteren nicht berücksichtigt. Durch die Ausbreitung des WT-Virus war erwiesen, dass auch die Replikation der blockierten MLV in diesen Zellen nicht prinzipiell verhindert war. Die blockierten und aktivierbaren Viren zeigten jedoch große Unterschiede in ihrer Replikationsfähigkeit (Tabelle 3-2): Das nicht spaltbar blockierte Virus CA war in keiner der Zelllinien in der Lage sich auszubreiten, die Blockierung ist somit universell und nicht von bestimmten Bedingungen der Zelle abhängig. Dagegen zeigten die selektierten Viren und C26A ein konditionales Replikationsverhalten: in den MMP-exprimierenden Zellen HT1080, U-87 MG und HUVEC konnten diese Viren innerhalb von zwei bis vier Wochen die Kultur vollständig infizieren. Auf den MMP-

negativen Zellen waren auch hier initial infizierte Zellen detektierbar, jedoch blieb diese Zahl höchstens konstant (293T) oder nahm ab. Das heißt, die infizierten Zellen wurden durch die Passagierung der Kultur ausgedünnt. Das CMA Virus mit parentalem Linker dagegen erwies sich zwar auf den U-87 MG Zellen als ausreichend replikationsfähig, um die Kultur vollständig zu infizieren, in HT1080 erreichte es jedoch auch nach 3 Wochen weniger als 10% infizierte Zellen. In HUVEC und allen anderen Zellen zeigte es keine Ausbreitung. Damit wiesen die selektionierten Viren auf MMP-positiven Zellen gegenüber dem parentalen Virus einen deutlichen Wachstumsvorteil auf. Dieser wurde im Folgenden anhand der RT-Aktivität genauer quantifiziert.

**Tabelle 3-2: Ausbreitung der Viren in verschiedenen Zelllinien <sup>1</sup>**

Virus	CA			CMA			C26A			CAKA			CPSA			aMLV WT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Wochen p.i.																		
Jurkat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
A3.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+++	+++
A431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-/+	++	+++
293T	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-	+	+	+	-/+	-/+	-/+	+	+++	+++
MDA-MB-468	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	+	-/+	-/+	-/+	-	-	++	+++	+++
HUVEC	-	-	-	-	-	-	-	-/+	++ <sup>2</sup>	-	-	++ <sup>2</sup>	-	-/+	++ <sup>2</sup>	++	+++	+++
HT1080	-	-	-	-	-/+	+	-	++	+++	+	+++	+++	-/+	++	+++	+++	+++	+++
U87-MG	-	-	-	-	-/+	+++	-/+	++	+++	+	+++	+++	-/+	++	+++	++	+++	+++

<sup>1</sup> „-“ < 0,1% infizierte Zellen; „-/+“ 0,1 - 1% infizierte Zellen; „+“ 1 - 10% infizierte Zellen; „++“ 10 - 50% infizierte Zellen; „+++“ 100% infizierte Zellen

<sup>2</sup> 100% infizierte Zellen wurden in der 4. Woche erreicht

### 3.3.2.2 Wachstumsverlauf anhand der RT-Aktivität

Während der Kultivierung der Zellen für das im vorhergehenden Kapitel beschriebene Experiment, wurden regelmäßig Proben für eine Bestimmung der RT-Aktivität im Überstand der Zellen entnommen, um das Wachstum der Viren mit mehr Messpunkten genauer vergleichen zu können.

Die so ermittelten RT-Werte wurden in Graphen zusammengefasst, so dass der Zeitpunkt des schnellsten Anstiegs und der Plateauphase der Replikation vergleichbar waren.

Das WT-Virus erreichte in den meisten Zelllinien nach etwa 5 - 10 Tagen die höchsten RT-Werte, die dann auf dem erreichten Plateau stabil blieben (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15). Das CA Virus zeigte hingegen weder in MMP-positiven Zellen (Abbildung 3-14) noch in den MMP-negativen Zellen (Abbildung 3-15) einen Anstieg der RT-Werte. Ebenso konnte in den schwach MMP-exprimierenden Zellen weder für die selektionierten Viren CPSA oder CAKA,

noch für C26A oder CMA (Abbildung 3-15) ein Anstieg der RT-Aktivität nachgewiesen werden.

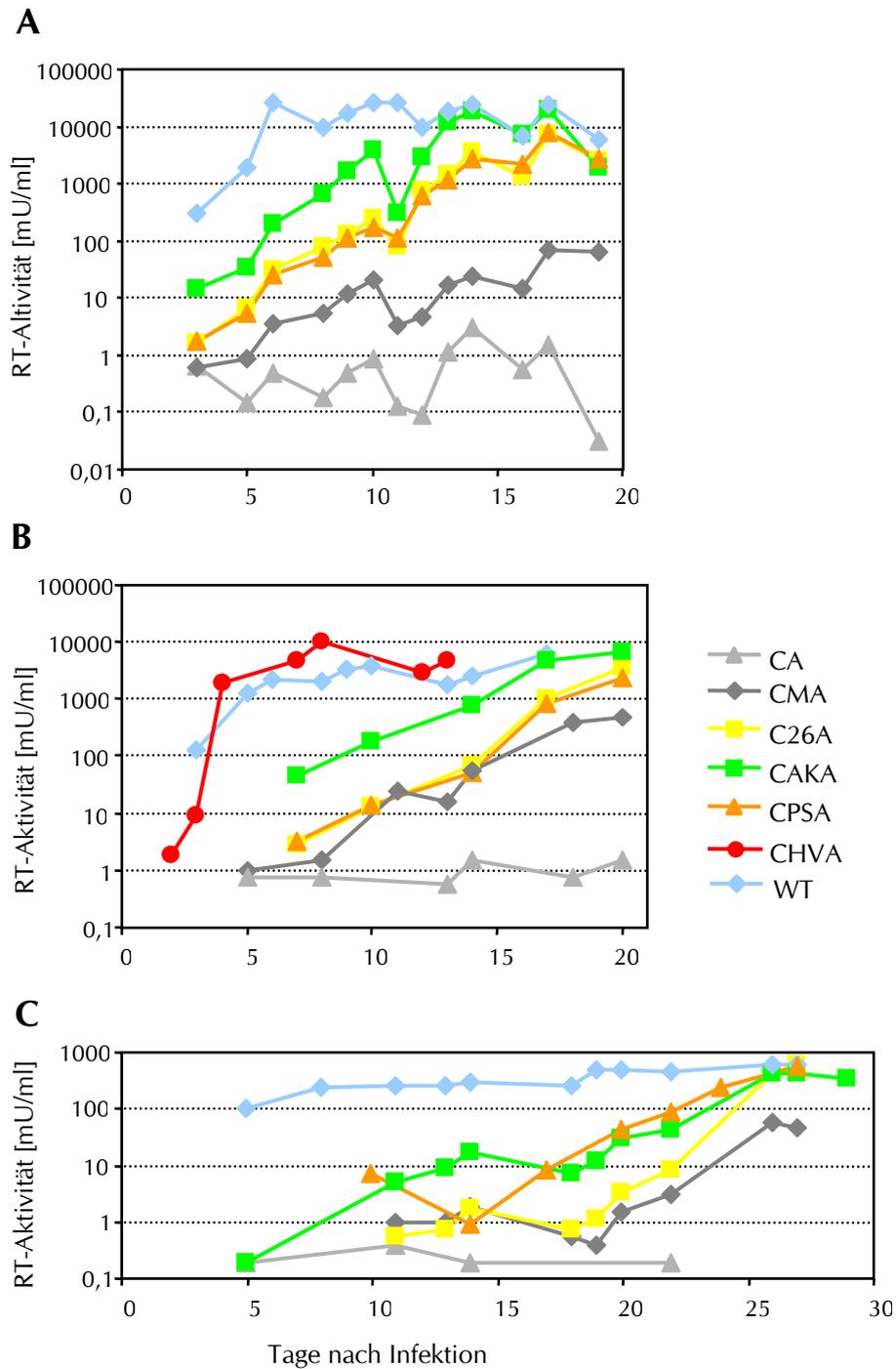
In den MMP-positiven Zellen HT1080, HUVEC und U-87 MG konnte ein Anstieg der RT-Aktivität für alle aktivierbaren Viren beobachtet werden. Doch unterschied sich der Anstieg je nach präsentiertem Linker (Abbildung 3-14): Die Viren CPSA und C26A erreichten in HT1080 und U-87 MG Zellen innerhalb von 20 Tagen die RT-Level des WT-Virus und glichen einander im Verlauf (A, B), in HUVEC war die Ausbreitung von C26A geringfügig langsamer als die von CPSA (C). Die Kinetik des CAKA Virus zeigte zwar in den HUVEC einen ähnlichen Verlauf wie die von CPSA (C), doch war die Ausbreitung dieses Virus in den HT1080 und den U-87 MG Zellen schneller als CPSA oder C26A (A, B): die maximalen RT-Werte wurden bereits nach 12 Tagen erreicht.

Das Virus CHVA war auf den U-87 MG Zellen (B), auf denen es selektioniert worden war, klar im Vorteil gegenüber den auf den HT1080 Zellen selektionierten Viren. Erstaunlicherweise war die CHVA-Kinetik sogar der des WT-Virus sehr ähnlich und erreichte 13 Tage früher als CAKA und CPSA das RT-Wert Plateau. Dabei ist besonders zu beachten, dass hier statt 300mU nur 80mU RT-Aktivität zur Infektion eingesetzt wurden, und somit der beobachtete Effekt noch höher zu bewerten ist.

Für CMA, das Virus mit parentalem Linker, ergaben sich in den HT1080 Zellen RT-Level, die 100fach unter denen des WT-Virus lagen (A), in U-87 MG, welche den höchsten Gehalt an MMP-2 aufwiesen, erreichte CMA höhere RT-Werte, die etwa 10fach unter denen des WT-Virus lagen (B). Damit ist besonders in den beiden Selektionszelllinien der Vorteil, den die selektionierten Linkerpeptide gegenüber dem parental Linker für die Ausbreitung der Viren bieten, deutlich herausgearbeitet.

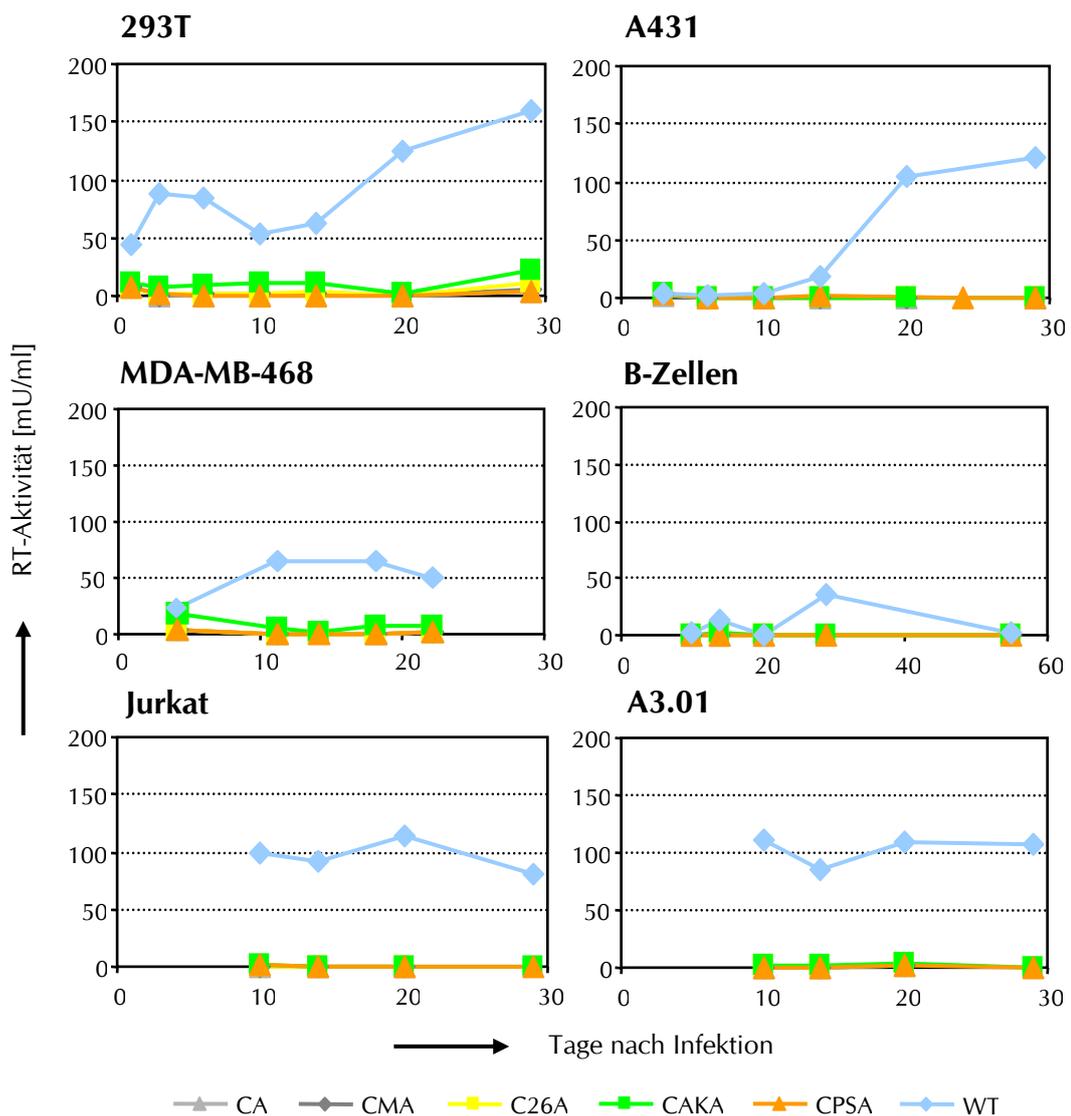
In HUVEC waren die RT-Level aller Viruskinetiken etwa eine log-Stufe niedriger als in den anderen beiden Zelllinien (C). Jedoch ist auch auf dieser Primärzelllinie die Ausbreitung der aktivierbaren Viren in Abhängigkeit von der Expression von MMPs deutlich.

Aus den Überständen wurde zusätzlich virale RNA präpariert, um per RT-PCR die Größe des Bereichs, der für die Blockierungsdomäne kodiert, zu kontrollieren. Dabei wurden keine Deletionen festgestellt. Das heißt, die Ausbreitung der Viren erfolgte durch die Spaltung der Linker und die daraus resultierende Aktivierung von Env, nicht durch eine Entfernung der Blockierungsdomäne bereits auf genomischer Ebene.



**Abbildung 3-14: Wachstumskinetiken auf MMP-positiven Zellen.**

HT1080 Zellen (A), U-87 MG (B) oder HUVEC (C) wurden mit 300mU RT-Aktivität der jeweiligen Viren (WT 30mU, CHVA 80mU) infiziert und anschließend der Anstieg der RT-Aktivität im Kulturüberstand über die Zeit verfolgt.



**Abbildung 3-15: Wachstumskinetiken auf MMP-negativen Zellen.**

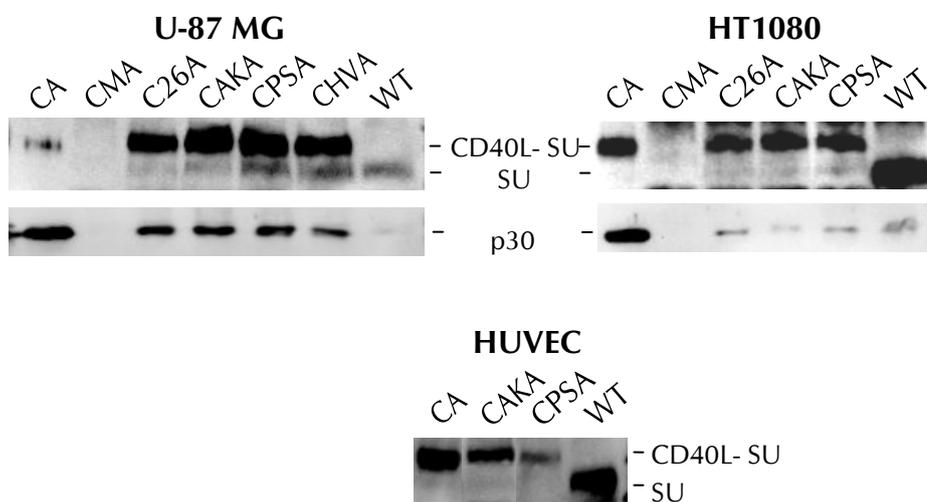
Entwicklung der RT-Aktivität im Kulturüberstand nach Infektion der angegebenen MMP-negativen Zellen mit 300mU der blockierten Viren und 30mU des WT-Virus.

Damit entsprechen die Daten der RT-Kinetik denen, der Infektiositätsmessungen. In den MMP-negativen Zellen war die Ausbreitung der Viren nicht prinzipiell behindert, trotzdem konnten sich die aktivierbaren Viren sowie das blockierte Virus nicht ausbreiten. In den MMP-positiven Zelltypen zeigten die selektionierten Viren ein gegenüber dem parentalen Virus enorm gesteigertes Replikationsverhalten. Somit wird aus den beiden vorangegangenen Experimenten zur Kinetik des Virus-Wachstums deutlich, dass die Linker zwischen Blockierungsdomäne und Hüllprotein tatsächlich verantwortlich für die Ausbreitung der Viren auf den MMP-positiven Zellen sind und sich Unterschiede in der Selektion von Linkern auf verschiedenen Zelltypen auf deren jeweiliges MMP-Profil zurückführen lassen.

### 3.3.2.3 Aktivierungszustand der Viren während der Ausbreitung

Bisher blieb unklar, ob die aktivierbaren Viren im Kulturüberstand oder unmittelbar vor dem Zelleintritt oder bereits beim Knospen gespalten werden. Da es schwierig ist, dies zellbiologisch zu beantworten, wurde versucht, etwas über den Aktivierungsstatus der Viren in einer vollständig infizierten Kultur herauszufinden. Daraus ließe sich ableiten, ob wenige von CD40L befreite Hüllproteine genügen, um Infektiosität zu vermitteln, oder ob ein großer Anteil der Hüllproteine gespalten vorliegen muss.

Wie schon beschrieben (Kapitel 3.2.4) lässt sich die proteolytische Abspaltung der Blockierungsdomäne anhand des Laufverhaltens der SU-Proteine in der PAGE überprüfen. Als Größenmarker für die CD40L-SU Proteine wurden von 293T Zellen nach Transfektion produzierte CA Viruspartikel eingesetzt.



**Abbildung 3-16: Westernblot von Zellkulturüberständen der Kinetiken.**

An den Endpunkten der in Abbildung 3-14 gezeigten Kinetiken wurden 30µl Zellkulturüberstand mittels PAGE aufgetrennt und auf die Expression der viralen Proteine SU und p30 im Western Blot untersucht. Als Größenstandard diente von 293T Zellen hergestelltes CA Virus (CA).

Aus Abbildung 3-16 lässt sich unmittelbar ablesen, dass bei allen Virustypen und unabhängig von der Zelllinie der überwiegende Anteil der SU-Moleküle kovalent an CD40L gebunden vorliegt. Aktivierung der Hüllproteine durch teilweise Abspaltung der Blockierungsdomäne wurde insbesondere für die MMP-2-reiche U-87 MG Zelllinie nachgewiesen: hier konnte vor allem für CPSA und CHVA ein erhöhter Anteil gespaltenen Envs detektiert werden. Auch bei C26A und CAKA aus den U-87 MG Zellen und CPSA aus den HT1080 Zellen lassen sich schwache Banden nachweisen, doch scheint hier ein sehr geringer Anteil der Viren gespalten vorzuliegen, obwohl die Ausbreitung in den Zellen hoch effektiv war. Das parentale CMA

Virus konnte erstaunlicherweise weder im Überstand der HT1080 Zellen noch in dem der U-87 MG Zellen nachgewiesen werden, obwohl in letzteren die vollständige Infektion der Kultur mit CMA möglich war. Die freigesetzte Menge an Viruspartikeln schien für eine Detektion trotzdem nicht auszureichen.

### 3.3.2.4 Bestimmung der Menge freigesetzter infektiöser Viruspartikel

Der Befund, dass CHVA bei ungefähr gleichen eingesetzten RT-Einheiten ähnlich schnell wie das WT-Virus wachsen kann, führte zu der Annahme, dass hier gegenüber den anderen aktivierbaren Viren die Menge an freigesetztem infektiösem Virus erhöht war. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde eine weitere Kinetik in U-87 MG Zellen gestartet, in deren Verlauf an zwei Punkten die i.E. im Kulturmedium quantifiziert wurden. Die Viren wurden parallel auf HT1080 und U-87 MG titriert.

**Tabelle 3-3: Menge freigesetzter i.E. nach Infektion von U-87 MG<sup>1</sup>**

Titrationszelllinie <sup>2</sup>	HT1080 i.E./ml		U-87 MG i.E./ml	
	Tag 3	Tag 7	Tag 3	Tag 7
WT-Virus	1,6x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>
CHVA	1,0x10 <sup>3</sup>	4,4x10 <sup>5</sup>	8,0x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>
CAKA	1,6x10 <sup>2</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>	3,6x10 <sup>1</sup>	6,0x10 <sup>3</sup>
CMA	2,0x10 <sup>1</sup>	1,6x10 <sup>1</sup>	4,0x10 <sup>0</sup>	1,6x10 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Infektion wurde mit einer m.o.i. von 0,002 (2x10<sup>2</sup> i.E. auf 1x10<sup>5</sup> Zellen) vorgenommen.

<sup>2</sup> Die Titration der i.E. im Überstand der infizierten U-87 MG Zellen erfolgte parallel auf HT1080 und U-87 MG.

Die auf den HT1080 Zellen und den U-87 MG Zellen parallel ermittelten Titer blieben durchweg in derselben Größenordnung und unterschieden sich maximal um den Faktor 5 (Tabelle 3-3). Die WT-Werte zeigten auf beiden Zelllinien den gleichen 1000fachen Anstieg der i.E. von Tag 3 auf Tag 7. Ein prinzipieller Unterschied in den Titrationswerten auf Grund der gewählten Zelllinie ist daher unwahrscheinlich.

Zwischen CAKA und CHVA ließen sich trotzdem deutliche Unterschiede nachweisen: während sich auf den HT1080 Zellen die Werte für das WT-Virus und CHVA an den einzelnen Tagen nur etwa um den Faktor 0,6 (Tag 3) bzw. 4,5 (Tag 7) unterschieden, lag der Unterschied zwischen CAKA und WT bei 10fach (Tag 3) bzw. 66fach (Tag 7). Im Vergleich zum WT produzierte CHVA also wesentlich mehr infektiöse Partikel als CAKA. Außerdem lagen die freigesetzten i.E. von CHVA mehr als 10<sup>4</sup>mal über denen von CMA.

Damit sind die Werte aus der Infektionskinetik, die sowohl über die Zahl der infizierten Zellen als auch über die Zunahme der RT-Aktivität gewonnen wurden, durch die Messung

der freigesetzten i.E. bestätigt. Es konnte also gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität einer Zelllinie aktivierbaren Viren die Ausbreitung ermöglichte, diese jedoch auf MMP-negativen Zellen blockiert war, die Replikation also konditional erfolgt. Dazu war lediglich ein kleiner Teil aktivierter Hüllproteine erforderlich.

Zudem wurde deutlich, dass selektionierte Linker gegenüber konventionell entworfenen Linkern die Ausbreitungsgeschwindigkeit und die Menge freigesetzter infektiöser Viren, um mehrere Größenordnungen verbessern können.

### **3.4 Virus-Ausbreitung in vivo**

Nach den zuvor beschriebenen Ergebnissen zu den Targeting-Eigenschaften der selektionierten Viren in kultivierten Zelllinien standen als nächstes Untersuchungen zur Ausbreitung der Viren in der dicht gepackten Umgebung eines soliden Tumors an. Dabei stand insbesondere die Frage im Vordergrund, ob sich auch hier ein deutlicher Vorteil der selektionierten Viren nachweisen lässt.

In einem weiteren Schritt sollte der Organotropismus der Viren untersucht werden. So sollte die Verbreitung der selektionierten Viren und des WT-Virus im Mausmodell ermittelt werden. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Targeting-Effizienz der MMP-aktivierbaren Viren abgeleitet werden.

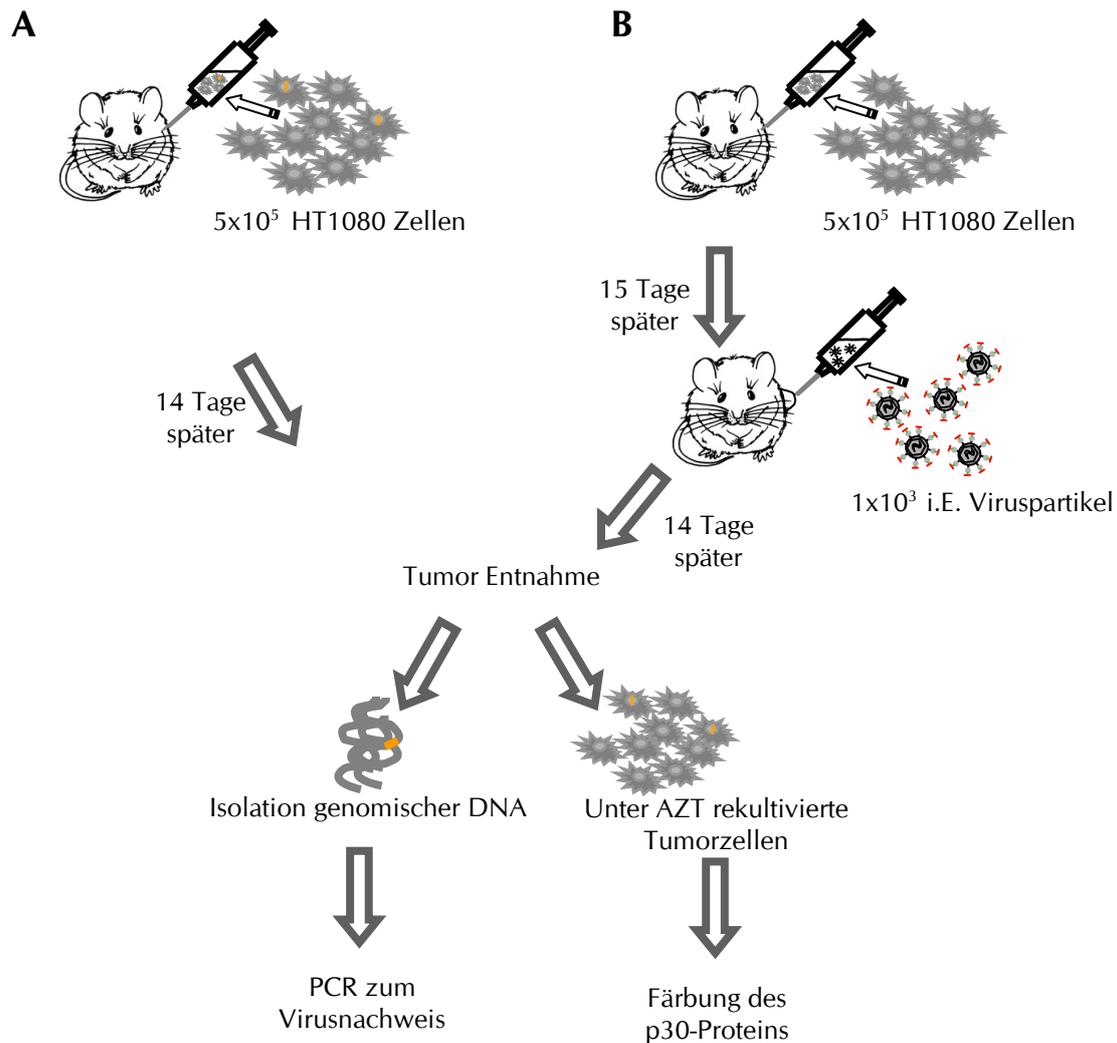
#### **3.4.1 Virusausbreitung im HT1080-Tumor**

Um die Ausbreitung der Viren in einem soliden HT1080-Tumor verfolgen zu können, musste ein Maus-Modell gewählt werden, das humane Tumore toleriert. Es wurden deshalb SCID-Mäuse (*severe combined immunodeficiency*, schwere kombinierte Immundefizienz) für die Versuche ausgewählt, deren B- und T-Zell-Entwicklung durch einen Gendefekt verhindert ist. Das adaptive<sup>1</sup> Immunsystem ist somit nicht vorhanden, das native<sup>2</sup> aber funktionell.

---

<sup>1</sup> erworbene Immunität durch Erkennen von „fremd“ und „eigen“ über B- und T-Zellen

<sup>2</sup> angeborene Immunität über Erkennen von bestimmten Mustern (nicht-methylierte DNA, doppelsträngige RNA, RNA-DNA-Hybride, Glykosilierungen etc.) über Myeloide Zellen (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten) und Lymphozyten (Natürliche Killer (NK) -Zellen)



**Abbildung 3-17: Design der *in vivo* Experimente zur Virusausbreitung im Tumor.**

Zwei unterschiedliche Arten der Applikation von Viren in einen Tumor wurden angewendet, nämlich die Etablierung des Tumors aus einem definierten Gemisch von infizierten und uninfizierten Zellen (A) oder die direkte Injektion von Viren in den Tumor (B). Die anschließenden Untersuchungen der Tumore unterschieden sich nicht.

Die Frage nach der Ausbreitungsgeschwindigkeit kann nur hinreichend beantwortet werden, wenn zu Beginn identische Ausbreitungsbedingungen für alle Viren gewährleistet sind. Dies kann erreicht werden, indem bereits bei der Etablierung des Tumors für jeden Virustyp die gleiche Menge infizierter Zellen vorliegen (Abbildung 3-17, A). Dazu wurden uninfizierte und infizierte Zellen zu einem definierten Verhältnis gemischt und in SCID-Mäuse injiziert (Kapitel 2.6.2). Um näher an einer möglichen klinischen Anwendung zu sein, wurden alternativ die Viren in bereits etablierte Tumore injiziert (Abbildung 3-17, B; Kapitel 2.6.3). Da auf diesem Weg nur sehr begrenzte Virusmengen appliziert werden können, und Infektionen bevorzugt an der Einstichstelle auftreten (Ram *et al.*, 1997; Rainov, 2000), muss

die Ausbreitung der Viren über das gesamte solide Tumorgewebe erfolgen, um eine vollständige Infektion zu erreichen. Im Gegensatz dazu erfolgt die Ausbreitung bei der Etablierung des Tumors mit vorinfizierten Zellen von vielen gleichmäßig verteilten Infektionsherden aus, was eine vollständige Infektion des Tumors deutlich leichter machen sollte.

Um die Zahl der infizierten Zellen nach Tumorentnahme möglichst genau quantifizieren zu können, wurden verschiedene Methoden angewendet: Zum einen wurde die genomische DNA des Tumors per PCR auf integrierte Virusgenome untersucht, zum anderen wurden Tumorzellen rekultiviert und mit Antikörpern gegen das virale p30-Protein angefärbt, um den Anteil infizierter Zellen zum Zeitpunkt der Tumorentnahme zu ermitteln.

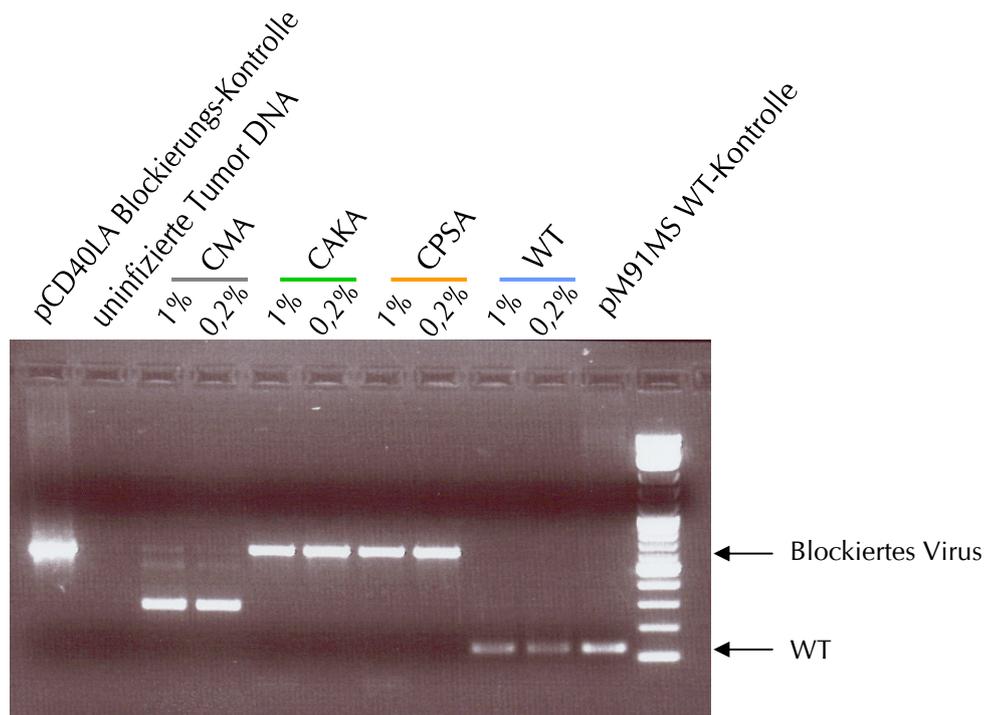
#### 3.4.1.1 Tumoretablierung aus vorinfizierten Zellen

In der Vorbereitung zur Tumoretablierung in den Mäusen wurden HT1080 Kulturen jeweils mit einer m.o.i. (*multiplicity of infection*) zwischen 0,05 und 0,5 der Viren CMA, CAKA, CPSA und WT infiziert. Durch Expansion der Zellen und Kultivierung über ein bis zwei Wochen wurden 100% infizierte Kulturen erhalten, wie durch IPA bestätigt werden konnte. Die Identität der Viren im Überstand wurde mit Hilfe der RT-PCR (Primer: EAsq1 und CB6/wtCB6) nachgewiesen.

Zur Etablierung eines teilweise infizierten Tumors wurden diese infizierten HT1080 Zellen zu einem Anteil von 1% bzw. 0,2% direkt vor der Applikation mit uninfizierten HT1080 Zellen gemischt. Insgesamt wurden davon  $5 \times 10^5$  Zellen *subcutan* (s.c., unter der Haut) in die Flanke einer Maus appliziert. Pro Virus wurden jeweils ein Tumor mit 1% und einer mit 0,2% vorinfizierten Zellen etabliert.

Nach 14 Tagen wurden die Tumore entnommen und rekultiviert. Der Prozentsatz infizierter Zellen wurde dann mittels IPA in den rekultivierten Zellen ermittelt. Alle Tumore zeigten dabei 100% infizierte Zellen. Damit war die Ausbreitung aller in dieser Untersuchung enthaltenen Viren im HT1080-Tumor zunächst bestätigt.

Die Untersuchung der genomischen Integrität der Viren per PCR in der genomischen DNA der Tumore zeigte jedoch, dass sich Unterschiede in der genetischen Stabilität ergeben hatten: CMA zeigte sowohl im initial 1% infizierten Tumor als auch im initial 0,2% infizierten Tumor Deletionen im kodierenden Bereich der Blockierungsdomäne CD40L (Abbildung 3-18). Offenbar konnte das CMA Virus nur so zu einer 100%igen Infektion des Tumors kommen. Alle anderen Viren erwiesen sich im Gegensatz dazu als genomisch stabil. Das heißt, die selektionierten MMP-aktivierbaren Viren konnten sich genetisch stabil in soliden MMP-positiven Tumoren ausbreiten.



**Abbildung 3-18: Die genomische Stabilität der Viren während der Ausbreitung im Tumor.**

Ausgehend von 1% oder 0,2% initial infizierter Zellen wurde nach 14 Tagen per PCR mit den Primern CB6/wtCB6(+) und EAseq1(-) die Ausbreitung der Viren im Tumor untersucht. Die Stabilität der Viren konnte anhand des Laufverhaltens der PCR-Fragmente im 2%igen TAE-Agarosegel untersucht werden. Zur Kontrolle der erwarteten Bandengröße wurden die Fragmente der entsprechenden PCR auf den Plasmiden für blockiertes Virus (pCD40LA) und WT (pM91MS) ebenfalls aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde die PCR auf genomischer DNA aus einem uninifizierten Tumor durchgeführt.

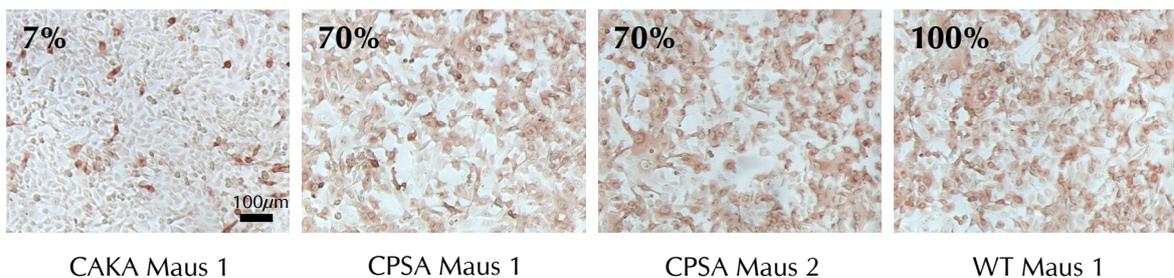
### 3.4.1.2 Virus-Injektion in etablierte Tumore

Im nächsten Experiment wurden die Viren CAKA, CPSA und WT in etablierte HT1080-Tumore injiziert. Dazu wurden Viren von durchinfizierten HT1080 Zellen geerntet (vgl. 3.4.1.1), per *lowspeed*-Zentrifugation konzentriert und in PBS aufgenommen und aliquotiert. Die Titration der Stocks erfolgt auf HT1080 Zellen und resultierte in Titern von  $1 \times 10^4$  (CAKA),  $2 \times 10^5$  (CPSA) und  $3 \times 10^6$  (WT) i.E./ml. Die Tumore wurden wie vorher beschrieben aus uninifizierten HT1080 Zellen etabliert und nach 14 Tagen durch eine intratumorale Injektion von  $1 \times 10^3$  i.E in  $100 \mu\text{l}$  PBS mit CAKA, CPSA oder WT infiziert. Die Injektion wurde an einer einzigen Stelle im Tumor vorgenommen. Somit lag im Vergleich zum vorangegangenen Experiment eine um mehrere Größenordnungen geringere m.o.i. vor, wenn man von etwa  $1 \times 10^8$  Zellen im Tumor ausgeht.

14 Tage später wurden die infizierten Tumore entnommen, die Zellen rekultiviert und

genomische DNA isoliert, um die genetische Stabilität der Viren zu überprüfen, bzw. die Anzahl infizierter Zellen zu bestimmen. Durch die Kultivierung in AZT-haltigem Medium wurde eine weitere Ausbreitung der Viren im Verlauf der Kultivierung verhindert.

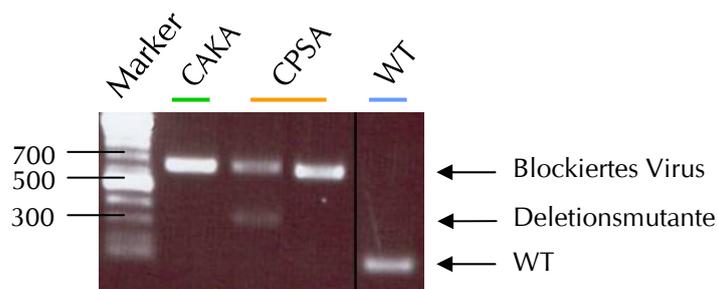
Während das WT-Virus 100% der Zellen infizierte (Abbildung 3-19), reichte die Replikationsgeschwindigkeit von CAKA und CPSA nicht aus, um im gegebenen Zeitraum alle Zellen im Tumor zu infizieren. Allerdings waren im CAKA infizierten Tumor immerhin ~7% der rekultivierten Zellen positiv, im Fall von CPSA in zwei unabhängigen Mäusen sogar jeweils ~70%.



**Abbildung 3-19: Anteil infizierte Tumorzellen nach Rekultivierung.**

14 Tage nach Injektion von  $10^3$  i.E. der Viren in zuvor etablierte Tumore wurden diese entnommen, die Zellen rekultiviert und der Prozentsatz infizierter Zellen mittels IPA bestimmt. Von den CAKA und WT-Virus infizierten Tumoren konnte jeweils einer (CKAK Maus 1, WT Maus 1) rekultiviert werden, von den CPSA infizierten Tumoren wurden zwei Tumore rekultiviert (CPSA Maus 1, CPSA Maus 2). Die Prozentsätze wurden durch Auszählen eines zufällig ausgewählten Bildausschnittes ( $\sim 1\text{mm}^2$ ) ermittelt.

In der sich anschließenden PCR-Analyse der genomischen DNA des Tumorgewebes zeigte sich dass CAKA und das WT-Virus stabil repliziert hatten. Allerdings zeigte sich auch, dass in einem der CPSA injizierten Tumore, eine Deletionsmutante (zusätzliche Bande in der PCR-Analyse bei etwa 300bp) aufgetreten war (Abbildung 3-20). Diese war jedoch in geringerem Maß als die unveränderte Form von CPSA vorhanden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses veränderte Virus zu einem recht späten Zeitpunkt in der Replikation entstanden war und das unveränderte Virus zum Zeitpunkt der Tumor-Entnahme noch den größeren Anteil an der Viruspopulation ausmachte. Auch denkbar wäre, dass diese Deletionsmutante keinen entscheidenden Wachstumsvorteil gegenüber dem unveränderten Virus aufwies.



**Abbildung 3-20: Überprüfung der genetischen Stabilität der Viren nach Injektion in Tumore.**

Aus den virusinfizierten Tumoren von vier Mäusen (1xCAKA, 2xCPSA, 1xWT) wurde genomische DNA präpariert und diese in einer PCR über den kodierenden Bereich der Blockierungsdomäne untersucht. Die im 1%igen Agarosegel aufgetrennten Fragmente konnten anhand des Markers zugeordnet werden.

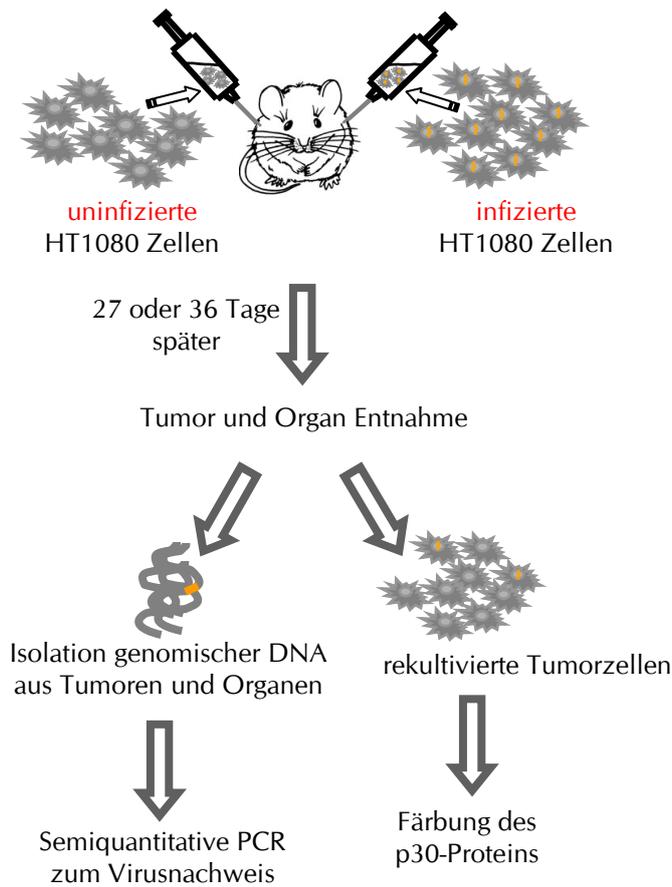
Insgesamt demonstrierten diese Ergebnisse eine sehr effiziente Ausbreitung der Viren im soliden Tumor. Trotz der niedrigen initialen m.o.i. von etwa  $10^{-5}$  konnten innerhalb von 14 Tagen die Tumore vom WT vollständig infiziert werden und die MMP-aktivierbaren Viren erreichten einen erheblichen Anteil der Tumorzellen. Eine Anwendung der selektionierten Viren mittels intratumoraler Injektion ist somit vorstellbar.

### 3.4.2 Virusausbreitung im Organismus

Da durch die vorangegangenen Experimente gezeigt werden konnte, dass sich die aktivierbaren Viren in MMP-positiven Tumoren ausbreiten können, musste nun die Frage nach der Verbreitung dieser Viren im Organismus (Biodistribution) gestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Virus sollten sie sich hauptsächlich im Tumorgewebe nachweisen lassen.

Um dies zu überprüfen, sollte nicht nur der Organotropismus untersucht werden, sondern auch die Virusausbreitung in einen zweiten Tumor analysiert werden (Abbildung 3-21). Dazu wurden zwei Tumore pro Maus-Individuum etabliert, einer aus 100% infizierten Zellen an der einen Flanke und an der anderen Flanke ein Tumor aus uninfizierten Zellen. So sollte untersucht werden, ob aus dem infizierten Tumor Viren entlassen werden, die einen weiteren Tumor im selben Organismus infizieren können.

Zum Nachweis der Virusinfektionen wurde eine semiquantitative PCR entwickelt, die eine Aussage über die Menge infizierter Zellen im untersuchten Organ erlauben sollte. Diese wird zunächst beschrieben, bevor auf die Ergebnisse der Biodistributions-Experimente eingegangen wird.



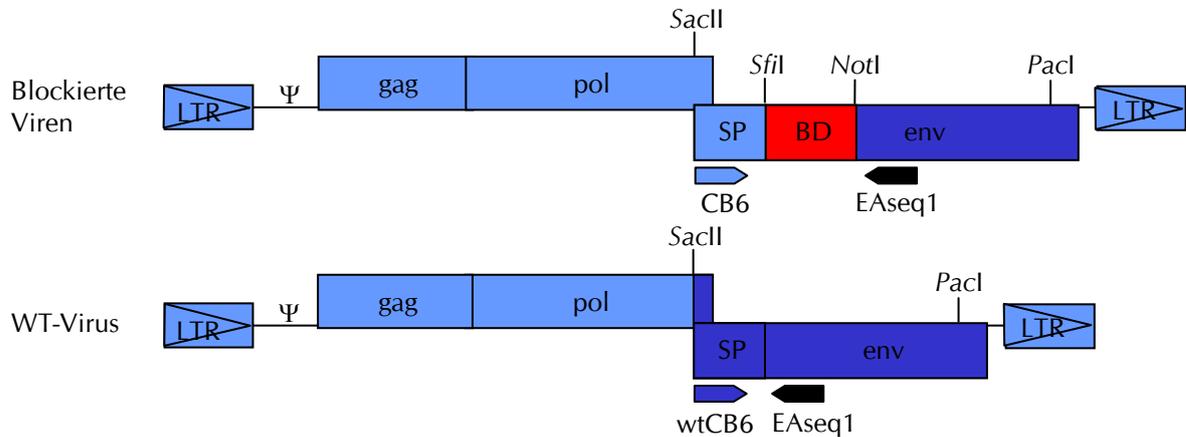
**Abbildung 3-21: Überblick über die Experimente zur Bestimmung des Organotropismus.**

Pro SCID-Maus wurden zwei Tumore etabliert, einer aus infizierten Zellen, einer aus uninfizierten Zellen. An zwei Zeitpunkten wurde die Verbreitung der Viren in verschiedenen Organen und im ursprünglich uninfizierten Tumor untersucht.

### 3.4.2.1 Etablierung der semiquantitativen PCR zum Virus-Nachweis

In dieser Arbeit wurde vielfach eine PCR über die kodierende Sequenz des Bereichs zwischen Signalpeptid und Hüllprotein durchgeführt (Abbildung 3-22). Um beim Nachweis der Viren im Maus-Organismus nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde die Sensitivität dieser PCR mit zwei Methoden bestimmt. Zum einen wurde auf der Ebene von genomischer DNA der kleinstmögliche noch zu detektierende Anteil infizierter genomischer DNA bestimmt, und zum anderen wurde die geringste noch nachweisbare Plasmid-Kopienzahl im Hintergrund uninfizierter genomischer DNA ermittelt. Da eine MMP-positive humane Tumorzelllinie im Maus-Modell verwendet wurde, bestand die Möglichkeit, dass Viren nicht als Partikel vom Primärtumor in andere Gewebe gelangen, sondern mit Hilfe von Tumorzellen (Metastasen) verbreitet werden. Um diese Möglichkeit nachweisen zu können, wurde eine PCR entwickelt, die ein Teil des humanen bzw. des

murinen  $\beta$ -Actin-Gens amplifiziert. Dabei können anhand der entstehenden unterschiedlichen Fragmentlängen beide Gene unterschieden werden. Auch hierfür sollte die Nachweisgrenze ermittelt werden, um damit den Anteil an eventuell eingewanderten HT1080 Zellen ins Mausgewebe bestimmen zu können.



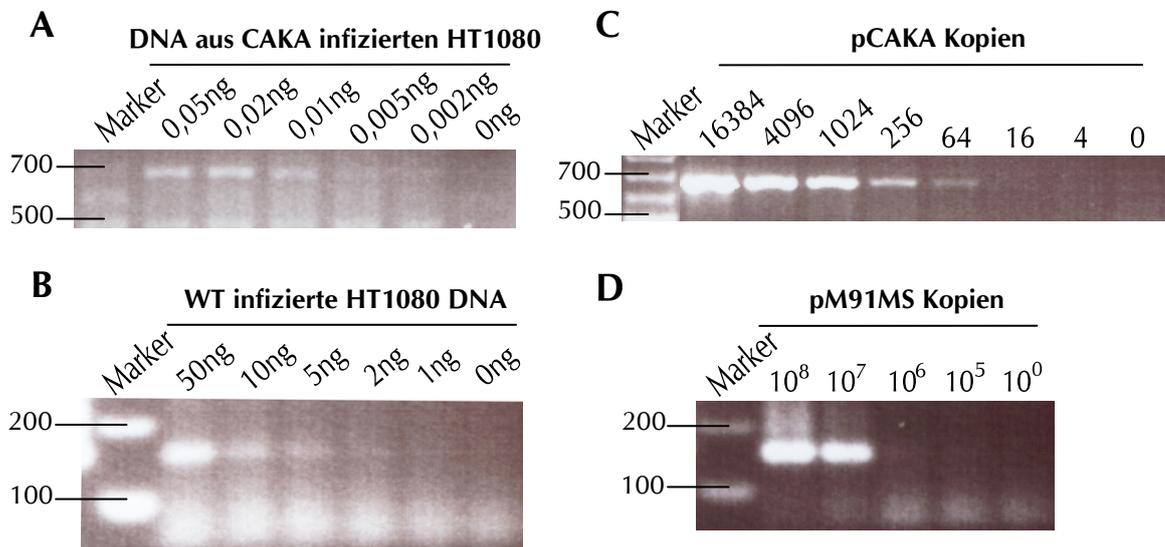
**Abbildung 3-22: Übersicht über die in der semiquantitativen PCR verwendeten Primer.**

Durch verschiedene Klonierungsstrategien (vgl. 2.1.4) unterschieden sich die Genome der aktivierbaren Viren und des WT-Virus nicht nur in der Blockierungsdomäne, sondern auch am 3'-Ende des pol-Gens und in der Signalpeptid (SP) kodierenden Sequenz. Dargestellt sind hier die Anteile des ecotropen MLV (hellblau) und des amphotropen MLV (dunkelblau). Da die vorwärtsgerichteten Primer im Signalpeptid greifen sollten, wurde die Sequenz von CB6 an die Sequenz des WT-Virus an der gleichen Stelle angepasst. So greifen die Primerpaare CB6/EAseq1 und wtCB6/EAseq1 mit unterschiedlichen Sequenzen an den identischen Positionen im Virusgenom, doch überspannt das erstere die Blockierungsdomäne (BD) und resultiert daher in einem um 500bp größeren PCR-Fragment. Die Fragmentlängen betragen für CB6/EAseq1 656bp und für wtCB6/EAseq1 158bp.

### 3.4.2.1.1 Sensitivität des Virusnachweises

Es wurden aus 100% CAKA infizierten bzw. aus WT-Virus infizierten HT1080 Zellen und aus uninfizierten HT1080 Zellen genomische DNA präpariert und diese in einer Verdünnungsreihe miteinander gemischt, so dass der kleinste noch detektierbare Anteil von DNA aus infizierten Zellen ermittelt werden konnte. Da sich CAKA und CPSA nur in drei AS im Linker unterscheiden und die Primer-Bindungsstellen identisch sind, wurde angenommen, dass sich die Sensitivität des Nachweises dieser beiden aktivierbaren Viren nicht unterscheidet, und diese nur für CAKA bestimmt. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen konnten mit dem Primerpaar CB6 und EAseq1 noch zwischen 0,005ng und 0,002ng DNA

aus CAKA-infizierten Zellen in insgesamt 500ng DNA nachgewiesen werden (Abbildung 3-23, A). Dagegen wurde mit dem Primerpaar wtCB6 und Easeq1, welches das WT-Virus erkennt, die Nachweisgrenze bereits bei 2ng erreicht (Abbildung 3-23, B). Diese optimierten Bedingungen werden unter Kap. 2.2.7 als Standard-PCR für den Virus-Nachweis beschrieben.



**Abbildung 3-23: Sensitivitätsbestimmung der semiquantitativen PCR.**

Verdünnungsreihen von genomischer DNA aus infizierten Zellen (A, B) und Plasmidverdünnungsreihen (C, D) wurden der PCR über den kodierenden Bereich zwischen Signalpeptid und Env unterzogen. Als Hintergrund wurde in allen Proben 500ng genomische DNA aus uninfizierten HT1080 eingesetzt. Der Nachweis von genomischer DNA aus CAKA infizierten Zellen (A) und des Plasmids pCAKA (C) erfolgte mit dem Primerpaar CB6 und Easeq1, der von genomischer DNA aus WT-Virus infizierten Zellen (B) und des Plasmids pM91MS (D) mit dem Primerpaar wtCB6 und Easeq1.

In einem alternativen Ansatz wurden definierte Mengen der CAKA bzw. WT kodierenden Plasmide pCAKA bzw. pM91MS unter 500ng uninfizierte genomische HT1080 DNA gegeben. Wie ebenso in Abbildung 3-23 zu sehen, war es möglich, zwischen 64 und 16 Kopien des Plasmids pCAKA (C) zu detektieren. Das WT Plasmid pM91MS (D) dagegen konnte auch hier nur mit der wesentlich schlechteren Sensitivität von  $10^6$  Kopien in 500ng genomischer HT1080 DNA nachgewiesen werden.

Wenn man von einem Molargewicht einer Base von 330g/Mol ausgeht, wiegt das humane Genom mit  $3 \times 10^9$  Basenpaaren etwa 3pg. Dies entspricht ziemlich exakt der Detektionsgrenze der aktivierbaren Viren im Genom. Da zwischen 16 und 64 Kopien des Plasmids pCAKA noch detektiert werden konnten, passen die Detektionsgrenzen von genomischer DNA und Plasmid gut zusammen. Für das WT-Virus ergibt sich ein anderes Bild:

2ng entsprechen etwa 1000 Genomkopien, die noch detektiert werden können, jedoch werden erst  $10^6$  pM91MS Plasmide nachgewiesen, d.h. in genomischer DNA scheint der Nachweis ca. 1000fach sensitiver zu sein. Die Gründe dafür sind derzeit unklar.

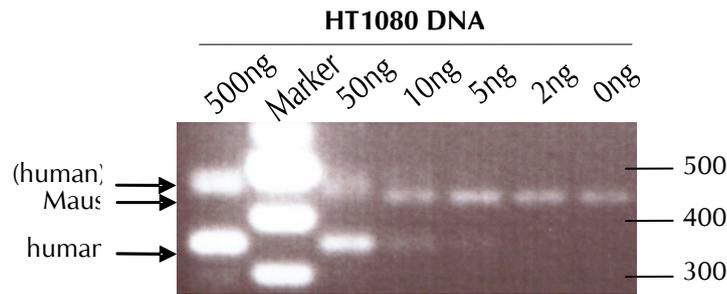
Die Möglichkeit, CAKA Viren bzw. das WT-Virus nachzuweisen, unterschied sich also erheblich. Bezieht man die mit der DNA aus infizierten Zellen gewonnenen Daten auf prozentuale Anteile im Gewebe, so kann eine WT-Infektion erst ab einem Anteil von über 0,4% infizierten Zellen detektiert werden, während in CAKA infiziertem Gewebe bereits 0,001% infizierte Zellen nachweisbar sein sollten. Dieser 400fache Unterschied in der Sensitivität kann mit der unterschiedlichen Größe der PCR-Produkte zusammen hängen, hat aber vermutlich noch weitere Gründe. Da die beiden Primer CB6 und wtCB6 nur 50% Sequenzhomologie aufweisen, unterscheiden sich vermutlich die Bindungseigenschaften und die Zahl möglicher unspezifischer Bindungsstellen im Genom.

#### 3.4.2.1.2 Sensitivität des Speziesnachweises

Da verschiedene Organe der Mäuse auf eine Invasion der humanen Tumorzellen untersucht werden sollten, wurde ein Primerpaar ausgewählt, das sowohl auf der murinen als auch auf der humanen Gensequenz des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin greift, jedoch in unterschiedlich großen PCR-Fragmenten resultiert. Mit humaner DNA wurde ein Fragment in der Größe von 350bp und auf muriner DNA ein Fragment von etwa 450bp erwartet. So kann gleichzeitig die Menge eingesetzter genomischer DNA überprüft und DNA eingewanderter humaner Zellen detektiert werden.

Durch eine Verdünnungsreihe humaner in muriner DNA (präpariert aus der Zelllinie PG13) wurde die Sensitivität des Nachweises ermittelt (Abbildung 3-24). Es stellte sich heraus, dass die Primer auf der humanen DNA zwei spezifische Banden ergaben: die erwartete Bande bei 350bp und eine unerwartete bei 470bp. Durch eine Auftrennung der PCR-Produkte in 2%igen TBE-Agarosegelen konnte dennoch zwischen dem von murinem  $\beta$ -Aktin entstandenen PCR-Fragment (450bp) und dem unerwarteten Begleitprodukt von 470bp unterschieden werden.

Trotz Optimierung der PCR konnte nur eine Sensitivität von 5ng humaner DNA in 500ng muriner DNA erreicht werden. Das heißt sekundäre Tumore (Metastasen) können erst detektiert werden, wenn sie ca. 1% des Gewebes ausmachen aus dem die DNA isoliert wird. Da diese Sensitivität in etwa der entsprach, mit der das WT-Virus detektiert werden konnte, wurde sie für die in dieser Arbeit angestrebten ersten Untersuchungen zur Verteilung von MMP-aktivierbaren Viren im Organismus als ausreichend erachtet.



**Abbildung 3-24: Sensitivität des Spezies-Nachweis.**

Es wurde eine Verdünnungsreihe von humaner DNA in muriner DNA in die PCR zum Nachweis des  $\beta$ -Aktinens eingesetzt. Insgesamt wurden 500ng DNA als Matrize untersucht. Die erwarteten Banden liegen für das Fragment auf humaner DNA bei 350bp auf muriner DNA bei 450bp. Das unerwartete PCR-Signal bei 470bp, das durch die eingesetzten  $\beta$ -Actin-Primer spezifisch auf humaner DNA nachgewiesen wurde, ist markiert ((human))

### 3.4.2.2 Virus-Ausbreitung von Tumor zu Tumor

Um die Ausbreitung der Viren im Organismus von einem Tumor zu einem anderen zu verfolgen, wurden zwei Tumore pro Maus etabliert. An der linken Flanke wurde ein Tumor aus infizierten HT1080 Zellen gesetzt und an der rechten Flanke ein Tumor aus uninfizierten Zellen. Nach 27 oder 36 Tagen wurde der sekundäre (ursprünglich uninfizierte) Tumor per IPA und PCR auf infizierte Zellen untersucht.

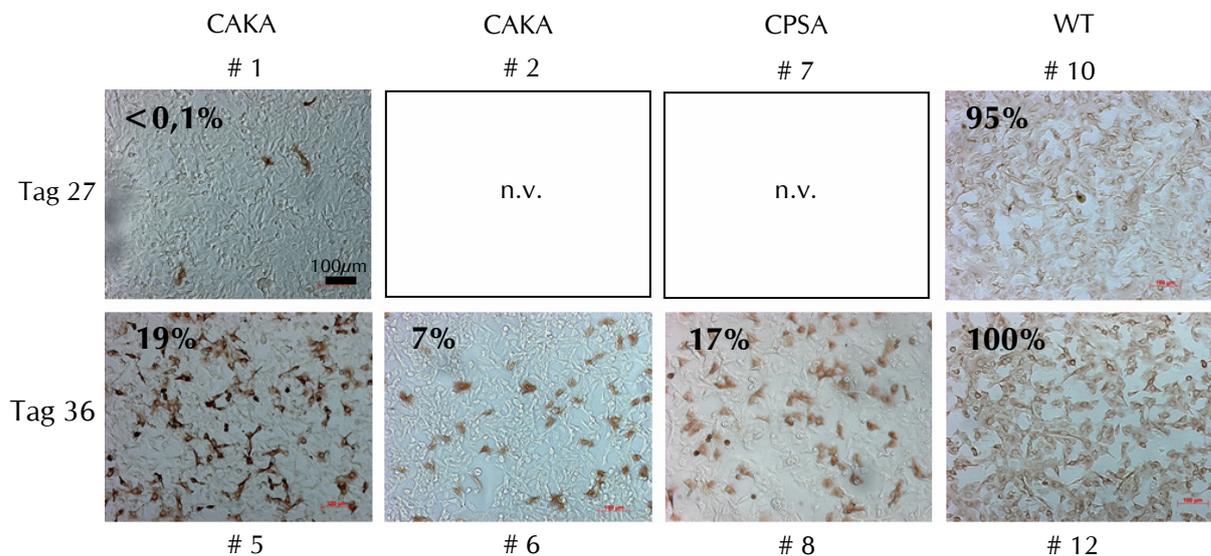
**Tabelle 3-4: Überblick über die Biodistributions Experimente.**

Maus Nr.	Primärer Tumor	Sekundärer Tumor	Tage Inkubation
#1	CAKA infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	27
#2	CAKA infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	27
#3	CAKA infizierte HT1080	Uninfizierte A431	27
#4	CAKA infizierte HT1080	Uninfizierte A431	27
#5	CAKA infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	36
#6	CAKA infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	36
#7	CPSA infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	27
#8	CPSA infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	36
#9	WT infizierte HT1080	Uninfizierte A431	27
#10	WT infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	27
#11	WT infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	27
#12	WT infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	36
#13	WT infizierte HT1080	Uninfizierte HT1080	36

Es wurden für die beiden Zeitpunkte jeweils für das CAKA und das WT Virus zwei Mäuse im Experiment untersucht, für das CPSA Virus konnte nur eine Maus pro Zeitpunkt analysiert werden. In einem Pilotexperiment wurde in drei Mäuse statt des sekundären HT1080 Tumors

ein Tumor aus MMP-negativen A431 Zellen injiziert. So sollte durch Unterschiede in der Infizierbarkeit durch WT-Virus und MMP-aktivierbare Viren eine MMP-abhängige Infektion des sekundären Tumors nachgewiesen werden. Zunächst wird jedoch ausschließlich auf die sekundären HT1080 Tumore eingegangen.

Überraschenderweise konnten bereits nach 27 Tagen Tumorstadium infizierte Zellen im sekundären Tumor nachgewiesen werden. Das WT-Virus befand sich zu diesem Zeitpunkt bereits in 95% der rekultivierten HT1080 Zellen. Das selektierte Virus CAKA zeigte in einer der untersuchten Mäuse erste infizierte Zellen, der Anteil lag aber noch weit unter 0,1%. 36 Tage nach Etablierung wurden 100% infizierte Zellen in den WT-infizierten sekundären Tumoren nachgewiesen. In den Mäusen, deren Primärtumor mit MMP-aktivierbaren Viren infiziert war, konnten zu diesem Zeitpunkt zwischen 7% und 19% infizierte Zellen in den Sekundärtumoren detektiert werden. Der Anteil infizierter Zellen war also im Vergleich zum Tag 27 deutlich gestiegen.

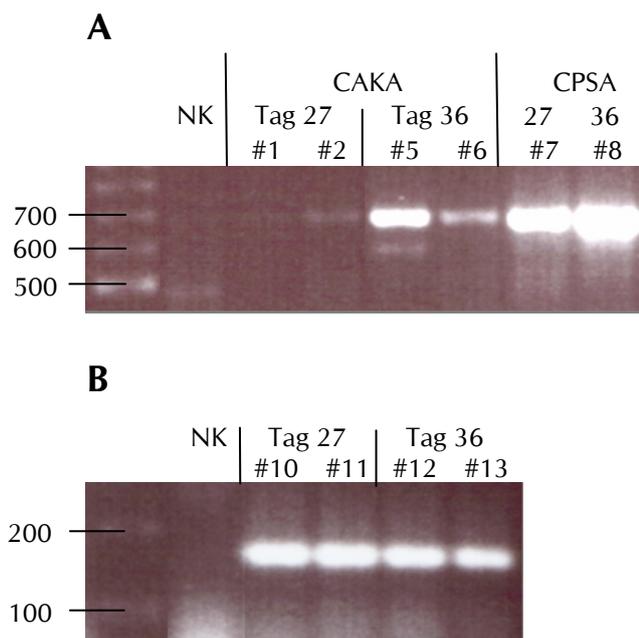


**Abbildung 3-25: Ausbreitung der Viren von Tumor zu Tumor.**

In jeder Maus (#1 - #12) wurden ein vollständig mit CAKA, CPSA oder WT infizierter sowie ein uninfizierter Tumor je an einer der beiden Flanken etabliert. 27 und 36 Tage später wurden die initial uninfizierten Tumore entnommen und daraus HT1080 Zellen rekultiviert. Per IPA wurde der Anteil Virus-infizierter Zellen bestimmt. Die Nummerierung der Mäuse entspricht Tabelle 3-4.

In der anschließenden PCR-Analyse aller Tumor-DNA-Proben wurde die genomische Integrität der Viren untersucht und ebenfalls eine quantitative Abschätzung der Virusmenge vorgenommen, die durch die standardisierten PCR- und Auftrennungsmethoden möglich war. Es konnten außer in der Tumor-Probe einer Maus mit CAKA-infiziertem Primärtumor vom Tag 27 in jeder Probe Infektionen nachgewiesen werden (Abbildung 3-26). Deletionen im für die Blockierungsdomäne kodierenden Bereich waren nicht detektierbar. Die Signalintensitäten

der Proben unterschieden sich erheblich: Während für CPSA bereits an Tag 27 ein starkes Signal (#7) detektiert werden konnte, dass etwa 2% infizierten Zellen entsprach, wurde für CAKA (#1 und #2) am Tag 27 lediglich in einer von zwei Proben ein Signal detektiert, das weniger als 0,1% infizierten Zellen entsprach. Für beide Viren konnte ein deutlicher Anstieg der infizierten Zellen bis zum Tag 36 beobachtet werden. CPSA zeigte ein Signal, das einem Anteil von deutlich über 10% infizierten Zellen entsprach (#8). CAKA zeigte Signale die etwa 1% (#5) bzw. 0,1% (#6) entsprachen. Das WT-Virus zeigte schon ab Tag 27 in allen Proben mehr als 10% infizierte Zellen.



**Abbildung 3-26: Genomische Integrität der Viren in den sekundären Tumoren.**

Mäusen mit CAKA oder CPSA (A) oder WT-infizierten (B) Primärtumor wurde an Tag 27 oder 36 der sekundäre HT1080 Tumor entnommen und daraus genomische DNA isoliert. Auf dieser wurde über den kodierenden Bereich zwischen Signalpeptid und Env mit den Primern CB6/Easeq1 (A) und wtCB6/Easeq1 (B) per PCR die Integrität der Viren überprüft. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt in standardisierten Agarosegeln. Als Negativkontrolle (NK) diente die PCR auf uninfizierten HT1080 Zellen. Die Nummerierung der Mäuse (#1 - #13) entspricht Tabelle 3-4. Über die genormt eingesetzt Menge von 500ng DNA in der PCR und die standardisierten Gelbedingungen konnten relative Abschätzungen über die Menge infizierter Zellen getroffen werden.

Ebenso wurde das WT-Virus nach 27 Tagen im A431 Tumor mit der gleichen Intensität nachgewiesen (#9) wie in den HT1080-Tumoren (nicht gezeigt), jedoch war das CAKA Virus (#3, #4) nicht detektierbar. Da zu diesem Zeitpunkt in einem HT1080 Tumor CAKA per PCR detektiert werden konnte (#2) und in einem zweiten sogar per IPA (#1), konnte dies als ein erster Hinweis für eine MMP-abhängige Ausbreitung *in vivo* angesehen werden.

Die per PCR ermittelten Werte korrelierten gut mit den zuvor per IPA bestimmten Prozentsätzen (Abbildung 3-25). Damit ist gezeigt, dass sich sowohl das WT-Virus als auch die MMP-aktivierbaren Viren in einen vom Primärtumor räumlich getrennten sekundären HT1080 Tumor ausbreiten können. Zudem erscheint eine systemische Verbreitung der Viren in den Mäusen möglich und wird daher im folgenden Kapitel genauer untersucht. Das verzögerte Auftreten der aktivierbaren Viren in den sekundären Tumoren im Vergleich zum WT spricht eher gegen die Einwanderung infizierter Zellen aus dem Primärtumor und für eine Ausbreitung von Viruspartikeln.

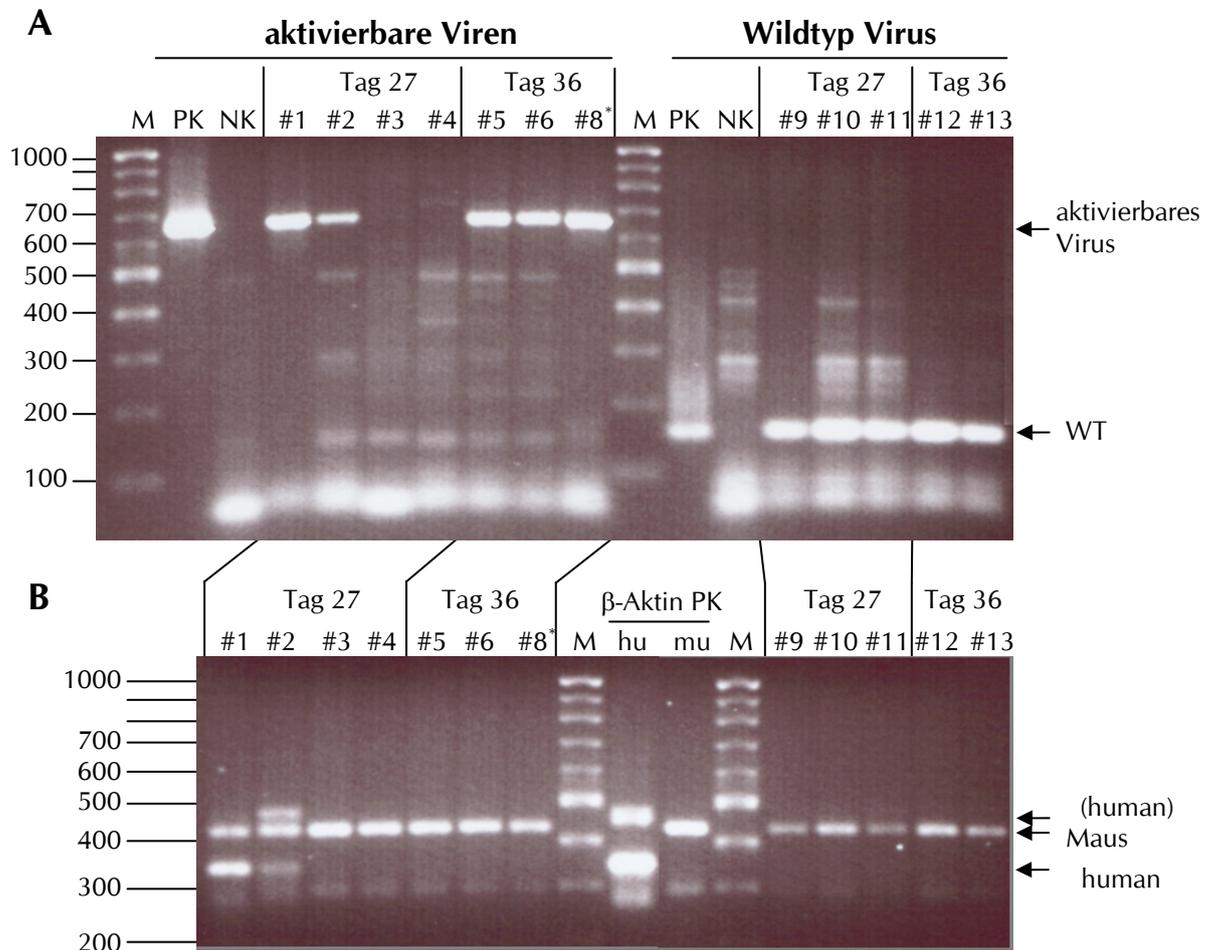
#### 3.4.2.3 Organotropismus MMP-aktivierbarer Viren und des WT-Virus

Da sowohl aktivierbare Viren als auch WT-Virus in den sekundären Tumoren zu finden waren, besteht die Möglichkeit, dass weitere Organe infiziert wurden. Um dies zu untersuchen wurden die Organe der zuvor beschriebenen Mäuse untersucht. Da diese Mäuse jeweils einen komplett infizierten Tumor getragen hatten, war sichergestellt, dass die Mäuse zu Beginn des Experiments - unabhängig von der Ausbreitungsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Virustypen - der gleichen viralen Last ausgesetzt waren.

Nach 27 und nach 36 Tagen wurden folgende Organe präpariert und daraus genomische DNA isoliert: Niere, Milz, Leber, Knochenmark, Herz, Lunge und Gehirn. Diese wurden der standardisierten PCR zum Virusnachweis (Abbildung 3-22 und Kapitel 2.2.7) unterzogen. So sollten infizierte Zellen in den Organen nachgewiesen werden. An Hand der Signalintensität bei positivem Nachweis wurde die Menge durch den Vergleich mit der Standard-PCR (Abbildung 3-23 A und B) abgeschätzt und in Gruppen eingeteilt. So entsprach kein detektierbares Signal weniger als 0,002ng DNA aus infizierten Zellen in der zur PCR eingesetzten Template-Menge für aktivierbares Virus und weniger als 1ng DNA für das WT-Virus. Ein sehr schwaches Signal hieß für aktivierbare Viren, etwa 0,005ng der eingesetzten DNA entstammen aus infizierten Zellen, für WT-Virus etwa 2ng. Ein eindeutiges Signal entspricht zwischen 0,01ng und 0,1ng DNA aus mit aktivierbarem Virus bzw. 2ng - 5ng DNA aus WT-Virus infizierten Zellen. Starke Signale wurden von 0,2ng bis 2ng DNA aus mit aktivierbarem Virus bzw. 10-20ng DNA aus mit WT-Virus infizierten Zellen detektiert. Sehr starke Signale entsprachen mehr als 5ng DNA aus Zellen infiziert mit aktivierbarem Virus bzw. mehr als 50ng DNA aus WT-infizierten Zellen. Diese abgeschätzten Mengen wurden in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Um zwischen der DNA aus eingewanderten humanen HT1080 Zellen und muriner DNA zu unterscheiden, wurde außerdem eine PCR zum Nachweis der murinen und humanen  $\beta$ -Aktin-Gene durchgeführt (vgl. 3.4.2.1.2).

Zunächst konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Milz, die stark durchblutet wird, und auch in SCID-Mäusen noch reich an Zellen des Immunsystems ist, welche die natürlichen Wirtszellen von MLV darstellen. Tatsächlich konnten in fast allen Tieren in der Milz Virus nachgewiesen werden (Abbildung 3-27).



**Abbildung 3-27: Virusnachweis in der Milz.**

In SCID-Mäuse wurden CAKA- (#1 - #6), CPSA- (#8) oder WT-infizierte (#9 - #13) HT1080 Zellen injiziert. Nach 27 oder 36 Tagen wurden die Milzen präpariert und daraus genomische DNA isoliert. Per Standard-PCR wurden die aktivierbaren Viren und das WT-Virus (A) nachgewiesen. Als Positivkontrolle (PK) diente das auf pCAKA (blockierte Viren) bzw. pM91MS (WT-Virus) erhaltene PCR-Produkt. Als Negativkontrolle (NK) diente die entsprechende PCR auf uninfierten Milzen. Ebenso per PCR wurde mit einem für das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin spezifischen Primerpaar die Invasion von HT1080 Zellen in die Milz nachgewiesen (B). Die Signale für humane DNA ( $\beta$ -Aktin PK hu) liegen bei 350bp und 470bp, für murine DNA ( $\beta$ -Aktin PK mu) bei 450bp. Die Nummerierung der Mäuse (#1 - #13) entspricht Tabelle 3-4.

Das WT-Virus wurde in allen untersuchten Milzen sowohl an Tag 27 als auch an Tag 36

detektiert (#9 - #13). Nach 27 Tagen konnte das Virus CAKA in von zwei von vier untersuchten Milzen nachgewiesen werden (#1 und #2). An Tag 36 waren die Milzen beider CAKA-infizierter Mäuse (#5 und #6) und der einzigen im Experiment vorhandenen mit CPSA-infizierten Maus (#8, in Abbildung 3-27 mit \* gekennzeichnet) deutlich positiv. Der Nachweis für humanes  $\beta$ -Aktin erwies sich in den Milzen der Mäuse #1 und #2 als positiv. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Virus-PCR-Signale in diesen Milzen von eingewanderten infizierten HT1080 Zellen herrührten. In allen anderen Proben konnte kein humanes  $\beta$ -Aktin nachgewiesen werden, der Anteil eingewanderter Zellen lag also unter 1% des Gewebes. Betrachtet man das Vorkommen von WT-Virus und CAKA in den Milzen an Tag 27, ist durch das verzögerte Auftreten von CAKA gegenüber dem WT-Virus ein weiterer Hinweis auf das verbesserte Targeting der aktivierbaren Viren zu erkennen. Die weiteren präparierten Organe wurden analog zu den Milzen per PCR untersucht. Dabei wurden in fast allen Organen infizierte Zellen gefunden, sowohl für die MMP-aktivierbaren Viren, als auch für das WT-Virus (Tabelle 3-5). Im Knochenmark und der Milz der WT-infizierten Mäuse waren durchweg starke bis sehr starke Signale detektierbar. Auch in den Lungen dieser Mäuse wurden eindeutige bis starke WT-Signale nachgewiesen. In den anderen untersuchten Organen wurden, wenn überhaupt, weniger WT-Virus infizierte Zellen nachgewiesen. Nach Infektion mit aktivierbaren Viren waren ebenfalls die Milzen am stärksten infiziert. In den anderen Organen wurden, wenn überhaupt, nur sehr schwache bis gerade eindeutige Signale detektiert. Auch zeigen die aktivierbaren Viren kaum einen Anstieg der Signalintensität von Tag 27 zu Tag 36. Das einzige in jedem Fall uninfizierte Organ war das Gehirn. Hier schien durch die Blut-Hirn-Schranke eine wirksame Barriere für Viren vorzuliegen.

Schon ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen Nachweis-Sensitivität von aktivierbarem Virus und WT-Virus zeigte sich durch diese Untersuchung ein deutlicher Unterschied in der Targeting-Kapazität, der gut aus der Tabelle 3-5 abzulesen ist. Um diesen nicht nur qualitativ, sondern quantitativ zu beschreiben waren weitere Untersuchungen per PCR notwendig.

---

**Tabelle 3-5: Verteilung der Viren in verschiedenen Organen.** <sup>1</sup>

Virus im Primärtumor	CAKA						CPSA		WT				
	27				36		27	36	27			36	
Tage Tumorwachstum	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13
Maus Nr.													
Hirn	-	-	-	-	-	-	n.v. <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-
Milz	++ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	-	-	++	++	n.v.	++	++	+++	+++ <sup>2</sup>	+++	+++
Lunge	+ <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	+/-	-	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	n.v.	+ <sup>2</sup>	+	++	++ <sup>2</sup>	+	+ <sup>2</sup>
Knochenmark	+/-	+/- <sup>2</sup>	+/-	+/-	+ <sup>2</sup>	+/-	n.v.	+/-	++ <sup>2</sup>	+++	+++	+++	++ <sup>2</sup>
Leber	+/- <sup>2</sup>	-	+/-	-	+	+	n.v.	+	-	+	+ <sup>2</sup>	-	-
Niere	-	-	n.v.	-	+	- <sup>2</sup>	n.v.	+	-	+	- <sup>2</sup>	-	-
Herz	-	-	- <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	+/- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	n.v.	+ <sup>2</sup>	-	+ <sup>2</sup>	+/-	-	-
Sekundärtumor	-	+	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>	++	+	+++	+++	+++ <sup>3</sup>	+++	+++	+++	+++

- <sup>1</sup> „-“ nicht detektierbar (aktivierbares Virus: <0,002ng; WT: <1ng)
  - „-/+“ sehr schwaches Signal (aktivierbares Virus: 0,005ng; WT: 1ng)
  - „+“ eindeutiges Signal (aktivierbares Virus: 0,01ng; WT: 2ng)
  - „++“ starkes Signal (aktivierbares Virus: 0,5ng; WT: 10 ng)
  - „+++“ sehr starkes Signal (aktivierbares Virus: über 5ng; WT: über 50ng)
- Die PCR-Signal-Intensität wurde mit der bei der Detektion genomischer DNA aus infizierten Zellen verglichen und die Werte in ng beziehen sich darauf.
- <sup>2</sup> humane DNA im Maus-Gewebe detektierbar
  - <sup>3</sup> sekundärer Tumor besteht aus MMP-negativen A431 Zellen
  - <sup>4</sup> n.v. nicht verfügbar

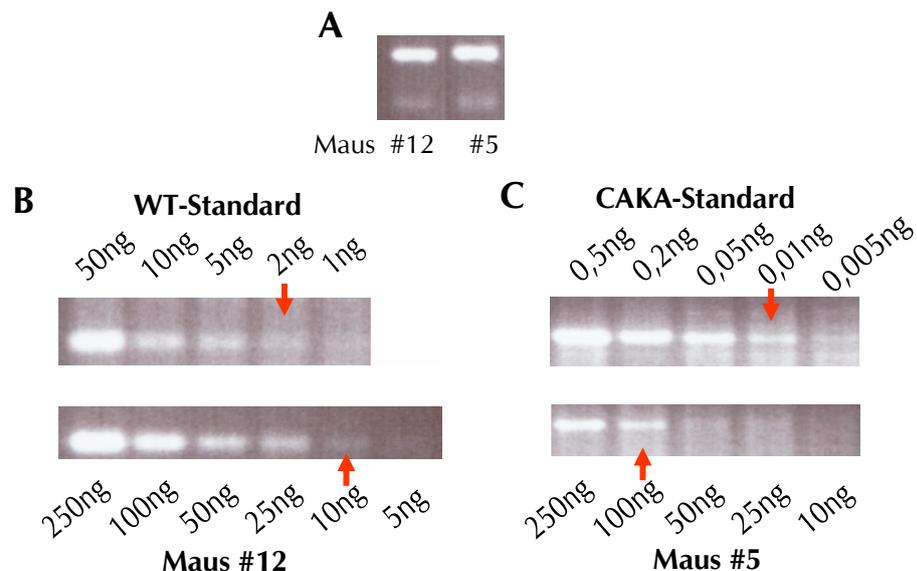
In mehreren Organen unterschiedlicher Individuen wurden durch die  $\beta$ -Aktin-PCR eingewanderte humane Zellen detektiert. In einigen dieser Fälle zeigte der Virus-Nachweis allerdings keine PCR-Signale, das heißt, es müssen Zellen aus dem uninfizierten Sekundärtumor eingewandert sein. Durch die höhere Sensitivität des Nachweises für aktivierbare Viren gegenüber der  $\beta$ -Aktin-PCR bestehen also mehrere Möglichkeiten, wie es zu dem Nachweis von aktivierbaren Viren in den Organen kommen kann: 1. In den Organen wurden tatsächlich Zellen infiziert, entweder wegen einer MMP-Expression vor Ort oder durch im Tumor aktivierte Viren; 2. uninfizierte HT1080 Zellen aus dem Sekundärtumor waren eingewandert (auch unter der  $\beta$ -Aktin-Nachweisgrenze) und wurden infiziert; 3. infizierte HT1080 Zellen aus dem Primärtumor waren eingewandert (auch unter der  $\beta$ -Aktin-Nachweisgrenze). Durch die gewählte Versuchsanordnung konnte nicht zwischen diesen Möglichkeiten unterschieden werden. Dies wird in der Diskussion unter Kap. 4.3 genauer besprochen.

Trotzdem konnte mit diesen *in vivo* Experimenten klar gezeigt werden, dass aktivierbare

Viren in der Lage sind, sich in soliden Tumoren auszubreiten und ihr großes Potential in der Infektion von Metastasen liegen könnte. Der deutliche Unterschied in der Biodistribution der aktivierbaren Viren und des WT-Virus ist ein klarer Hinweis auf die guten Targeting Eigenschaften durch die MMP-Aktivierung.

#### 3.4.2.4 Beispielhafte Quantifizierung infizierter Zellen in der Milz

Da sich die Sensitivität für den Nachweis von aktivierbaren Viren und das WT-Virus per PCR stark unterschied und die Signalintensität besonders in der PCR auf DNA aus Milz sehr hoch war, sollte abschließend nicht nur qualitativ sondern quantitativ bestimmt werden, wie hoch der Anteil infizierter Zellen in der Milz von WT-Virus infizierten bzw. CAKA infizierten Mäusen war. Dazu wurden zwei Mäuse von Tag 36 exemplarisch ausgewählt, Maus #5 als CAKA-infizierte Maus und Maus #12 als WT-infizierte Maus. In beiden Milzen konnten keine eingewanderten Zellen nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Signalintensität der zur PCR eingesetzten Verdünnungsreihen der Template-DNA aus den Milzen und der Standard-Verdünnungsreihe konnte der Anteil infizierter DNA quantifiziert werden (Abbildung 3-28).



**Abbildung 3-28: Quantifizierung der Virus-Integrate exemplarisch an der Milz zweier Mäuse.**

Es wurden Verdünnungsreihen des Standards (B und C, oberer Teil) und der Milz-DNA (B und C, unterer Teil) der PCR unterworfen und anschließend die Signalintensitäten verglichen, um die Menge an Virus-positiver genomischer DNA zu bestimmen. Bei gleicher Intensität des  $\beta$ -Aktin-Signals aus den Milzen der Mäuse #5 und #12 (A) konnte auch tatsächlich von gleicher Matrizen-Menge ausgegangen werden. Die roten Pfeile zeigen die Banden gleicher Intensität für die WT-infizierte Maus #12 (B) und die CAKA-infizierte Maus #5 (C) an.

So wurde ermittelt, dass in der WT-infizierten Milz von Maus #12 in 10ng genomischer DNA

2ng infizierte DNA enthalten waren (B), das heißt, etwa jede fünfte Zelle war positiv für das WT-Virus. In der CAKA-infizierten Milz dagegen konnten in 100ng DNA nur 0,01ng infizierte DNA detektiert werden (C), was etwa einer Rate von einer CAKA-positiven Zelle in 10.000 Zellen entsprach.

Vergleicht man das Auftreten des WT-Virus in der Milz mit einer Prävalenz von 20% mit dem des CAKA Virus mit einer Prävalenz von 0,01% und berücksichtigt, dass CAKA im Schnitt in 13% (Abbildung 3-25) der rekultivierten Zellen des sekundären Tumors auftrat, während das WT-Virus in diesem Zeitraum 100% der Zellen infiziert hatte, lässt sich mit der folgenden Formel ein „Targetingfaktor“ von 260 errechnen.

$$\text{Targetingfaktor} = \frac{\text{CAKA} \frac{\text{Tumor}}{\text{Milz}}}{\text{WT - Virus} \frac{\text{Tumor}}{\text{Milz}}} \Rightarrow \frac{\frac{13\%}{0,01\%}}{\frac{100\%}{20\%}} = \frac{1300}{5} = 260$$

Das bedeutet, in den beiden untersuchten Mäusen besaß CAKA einen um das 260fache stärkeren Tropismus für MMP-positive Zellen, als das WT-Virus.

So konnte durch die Selektion einer retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek nicht nur ein Vorteil gegenüber herkömmlich entworfenen Linkern bestätigt werden, sondern auch die enorm verbesserte Ausbreitungsgeschwindigkeit unter Beibehaltung der Targeting-eigenschaften der MMP-aktivierbaren Viren gegenüber dem WT-Virus *in vivo* gezeigt werden.

## 4 Diskussion

Für die Anwendbarkeit replikationskompetenter Retroviren in der Tumorthherapie spielt das Targeting dieser Viren eine essentielle Rolle. Ihre effiziente Ausbreitung im Tumorgewebe soll möglichst ohne eine Infektion anderer Gewebe im Organismus erreicht werden. Das Targetingkonzept dieser Arbeit stützt sich auf die verstärkte Expression Tumor-abhängiger Proteasen (TAP) in metastasierenden Tumoren. Eine Blockierungsdomäne verhindert die Anbindung der Viren an ihren Rezeptor. Erst eine Aktivierung der Viren im Bereich der Tumorzellen durch TAPs, welche die Blockierungsdomäne proteolytisch entfernen, lässt sie infektiös werden.

Auf dem Weg zur Verwirklichung dieses Konzepts wurden in dieser Arbeit grundlegende Fragestellungen zur molekularen Evolution von Retroviren und zur Tumor-Spezifität MMP-aktivierbarer Viren beantwortet.

### ***4.1 Targeting von (Retro)viren mit Hilfe der Molekularen Evolution***

In der Tumorthherapie werden mittlerweile verschiedene Viren in klinischen Prüfungen getestet, um die Zellen eines Tumors zu infizieren. Neben onkolytischen Viren, die eine Fusion der Tumorzellen einleiten und diese dadurch in die Apoptose treiben, sind auch nicht-lytische Viren von Interesse, welche als Transportvehikel für anti-tumorale Gene dienen können. Der Tropismus all dieser Viren muss auf die Tumorzellen beschränkt werden. Es wurde beobachtet, dass z.B. das *Newcastle Disease Virus* (Reichard *et al.*, 1992) und das Vesikuläre Stomatitis Virus (Stojdl *et al.*, 2003) spezifisch Tumorzellen lysieren, ohne jedoch auf der Ebene des Zelleintritts einen spezifischen Tropismus aufzuweisen. Dies gilt auch für attenuierte Adenoviren (Onyx015), die selektiv Zellen mit mutiertem p53 lysieren können (Cohen und Rudin, 2001; Dobbstein, 2004). p53 ist ein Tumorsuppressor, der die Teilung der Zelle kontrolliert und bei DNA-Schäden die Zelle in die Apoptose treibt. Mutationen in p53 werden in ca. 60% aller Tumore gefunden.

Für andere Viren wird versucht, durch Modifikationen in den Hüllproteinen eine Veränderung des Tropismus hin zu einer selektiven Infektion der Tumorzellen zu erreichen. In verschiedenen Arbeiten wurden Targeting-Konzepte mit Methoden der molekularen Evolution kombiniert. Die Veränderungen werden dabei nicht gezielt herbeigeführt, sondern aus Virus-Bibliotheken Varianten mit der gewünschten Eigenschaft selektioniert. So wurde z.B. das *Gen-Shuffling* eingesetzt, um durch zufällige Neukombination der Genfragmente

zweier Hüllproteine per PCR ein neues Hüllprotein mit einem neuen Tropismus zu generieren (Powell *et al.*, 2000). Die theoretische Diversität einer solchen Bibliothek ist schwer abzuschätzen, da hier über das komplette Gen zufällig neu kombiniert wird. Dadurch liegt vermutlich auch die Zahl der funktionsuntüchtigen Varianten sehr hoch. Eine weitere Methode, den Tropismus eines Virus zu verändern, wurde am Beispiel des Adeno-assoziierten Virus (AAV) gezeigt (Muller *et al.*, 2003; Perabo *et al.*, 2003). Hier wurden an exponierten Stellen im Kapsid, die für die Anbindung des Virus an die Zelloberfläche verantwortlich sind, diversifizierte Peptide eingefügt. Diese Bibliothek mit einer Diversität von  $1 \times 10^7$  wurde für die Anbindung an eine für das WT-Virus schwer infizierbare Zelllinie selektioniert. So konnten Klone angereichert werden, deren Tropismus für diesen Zelltyp optimiert war.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Tropismus von MLV für Tumorzellen nicht über einen Rezeptorwechsel verändert oder eingeschränkt werden, sondern durch die spezifische Entfernung der Blockierungsdomäne CD40L durch TAPs. Daher wurde die Proteasespaltstelle zwischen Blockierungsdomäne und Env an vier AS-Positionen diversifiziert. Die hergestellte Bibliothek deckte das komplette Spektrum der  $10^4$  kombinatorischen Varianten ab. Auch in kürzlich erschienenen Arbeiten wurden Proteasespaltstellen in Viren diversifiziert. So wurde im GaLV (Gibbonaffen Leukämie Virus) Env die Spaltstelle zwischen TM und R-Peptid diversifiziert, um einen Einbau dieser Hüllproteine in HIV (Humanes Immundefizienz Virus) Partikel zu erlauben und die Infektiosität dieser Partikel zu erreichen (Merten *et al.*, 2005). Tatsächlich gelang dies, indem Hüllproteine selektioniert wurden, die effizient von der HIV Protease gespalten werden konnten. Ein weiteres publiziertes Protease-Substrat-Selektionssystem beruht auf dem Sindbisvirus (Pacini *et al.*, 2000). In dessen Hüllprotein befinden sich zwei Spaltstellen, die vollständig diversifiziert wurden. Durch die Expression dieses Proteins als Fusionsprotein mit der Protease des Hepatitis C-Virus konnten für diese unterschiedliche Präferenzen gezeigt werden: die Protease spaltete unterschiedliche Motive, je nachdem, ob sie *cis* (noch Teil des Polyproteins) oder *trans* (aus dem Polyprotein herausgelöst) spalten muss.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden in diesen Systemen keine replikationskompetenten Viren, sondern Vektoren eingesetzt und die nötigen viralen Gene wurden von den Zelllinien, in denen selektioniert wurde, bereitgestellt. Dies schränkt die Auswahl der Selektionszelllinie stark ein. Durch Verwendung von replikationskompetenten Viren, wie in dieser Arbeit, kann auf beliebigen TAP-exprimierenden Zellen selektioniert werden, wie durch die Selektion auf HT1080 und U-87 MG, zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien, gezeigt werden konnte.

Vorarbeiten zur Etablierung dieses Konzepts (Buchholz *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2003) zeigten bereits das Potential der Selektion einer retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek. Da mit der damals verwendeten Blockierungsdomäne EGF jedoch nur bei Überexpression des EGF-Rezeptors der Zelleintritt des Virus verhindert war, konnte mit den dort selektionierten Spaltstellen kein Targeting gezeigt werden. Es war lediglich möglich zu zeigen, dass die Aktivierung der Viren von der Expression von MMP-2 abhängig war. In der hier vorliegenden Arbeit ist durch die Verwendung der Blockierungsdomäne CD40L zum ersten Mal eine rezeptorunabhängige Blockierung eines replikationskompetenten Virus gelungen. Durch die Selektion der so blockierten Bibliothek CX<sub>4</sub>A konnten verschiedene Viren angereichert werden (Abbildung 3-4). Die Aktivierbarkeit durch TAPs, die selektive Ausbreitung in MMP-positiven Zellen und die hohe Spezifität für Tumorzellen im Mausmodell konnten für die Viren CAKA, CPSA und CHVA nachgewiesen werden. Diese traten mit der größten Häufigkeit nach Beendigung der Selektion in der Viruspopulation auf.

Drei weitere Viren mit Linkern, die mindestens mit einer Häufigkeit von 3/50 in der Selektion aufgetreten waren, wurden ebenfalls auf ihre Replikationskompetenz getestet. Es zeigte sich, dass diese Viren ausgehend von einer infizierten Zelle in 48 Stunden genauso viele weitere Zellen infizieren konnten wie das Virus CPSA (Daten nicht gezeigt). Somit stehen weitere aktivierbare Viren mit noch nicht charakterisierten Eigenschaften für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung.

## **4.2 Selektionierte Proteasesubstrate aus verschiedenen Methoden im Vergleich**

Proteasespaltstellen lassen sich durch verschiedene kombinatorische Methoden charakterisieren. Bisher konnte unterschieden werden zwischen Display-Bibliotheken, in denen randomisierte Peptide von Phagen präsentiert wurden, oder in einem Array immobilisiert waren und Peptid-Bibliotheken, die durch kombinatorische Chemie in Lösung erzeugt wurden. Die Peptide mit gewünschten Eigenschaften können aus letzteren an Hand einer Markierung des N- oder des C-Terminus isoliert werden. So konnten durch Inkubation mit der Protease, deren Spaltstelle ermittelt werden soll, in der anschließenden Sequenzierung der Fragmente die AS der Erkennungsstelle als auch die genaue Spaltstelle identifiziert werden (Turk und Cantley, 2003). Hier kann nur die Inkubationsdauer der Protease variiert werden, da Selektionszyklen wie in Display-Bibliotheken nicht möglich sind. Optimal passende Substrate sollten innerhalb kürzester Inkubationsdauer gespalten werden, nach längerer Inkubation werden auch weniger optimale Substrate gespalten. So kann die Affinität einer Protease zu bestimmten Substraten bestimmt werden. Allerdings ist es so nicht

möglich einzelne Peptide zu sequenzieren, sondern nur das Gemisch der isolierten Peptide kann analysiert werden und daraus ein Konsensusmotiv abgeleitet werden.

Die Präsentation einer Bibliothek von Substratpeptiden in einer Phagenbibliothek erlaubt dagegen eine Analyse definierter Peptide. Hier wird die Bibliothek in ein Phagemid inseriert, so dass nach Expression der Phagen mit Hilfe eines Helferphagen die diversifizierten Substrate von Phagen präsentiert werden (Deperthes, 2002). Auch hier wird die Bibliothek mit der zu charakterisierenden Protease inkubiert. Dadurch wird eine Antikörper-epitop-Markierung (z.B. FLAG-Tag) entfernt. Die ungespaltenen Phagen werden durch Immunfällung über diese Markierung aus dem Pool der Varianten entfernt. Die verbleibenden gespaltenen Phagen werden zur Infektion von *E.coli* herangezogen und so amplifiziert. Durch die Kopplung von Genotyp und Phenotyp können in diesem System mehrere Selektionsrunden durchgeführt werden. Dadurch kann die Stringenz der Selektion variiert werden.

Die Phagen-Substrat-Bibliothek ist am ehesten mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Strategie der retroviralen Protease-Substrat-Bibliothek (rPSB) vergleichbar. Allerdings erfolgen Expression, Selektion und Amplifikation im eukaryotischen System. Damit werden in diesem System die Substrate unter physiologischen Bedingungen, also z.B. in Gegenwart von natürlichen Inhibitoren, Aktivatoren und anderen Proteasen, selektiert. Damit ist es möglich, Peptide zu identifizieren, die verschiedenen Proteasen als Substrat dienen können. Also z.B. Substrate, die optimal von dem Proteasespektrum einer bestimmten Tumormlinie gespalten werden.

Dieses System wurde zuerst von Buchholz *et al.* beschrieben. In dieser Selektion wurde aus einer an sieben Stellen diversifizierten Bibliothek von EGF-blockierten Virusvarianten verschiedene Spaltstellen für Furin und andere Proprotein-Konvertasen selektiert, die die Aktivierung der Viren schon auf dem Weg des Hüllproteins durch den Golgiapparat an die Zelloberfläche ermöglichte. In der vorliegenden Arbeit wurde dies verhindert, indem Arginin, als wesentliche AS in Proprotein-Konvertase-Spaltstellen, von den diversen Positionen der Spaltstelle ausgeschlossen wurde. Zudem wurden nur vier Positionen in der aus sechs AS bestehenden Spaltstelle diversifiziert: In Anlehnung an die zu Beginn der Arbeit bekannte MMP-2 Spaltstelle im Kollagen PLGLWA (Upadhye und Ananthanarayanan, 1995) und das aus Phagenbibliotheken identifizierte Konsensusmotiv einer allgemeinen MMP-Spaltstelle PXX↓Hy (Smith *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 2000; Kridel *et al.*, 2001) wurde in der CX4A-Bibliothek die Spaltstelle XXGLXX präsentiert. Durch die relativ kurze Selektionsdauer von 12 Tagen auf HT1080 Zellen wurde eine Reihe von Viren mit unterschiedlichen Linkern angereichert. Diese erfüllten zum größten Teil das Konsensusmotiv PXX↓Hy. Der prominenteste Linker AKGLYK in der Viruspopulation erfüllt zwar nicht das Konsensusmotiv,

da aber Alanin ebenso wie Prolin hydrophobe Eigenschaften besitzt, gehört dieser Linker in dieselbe Gruppe. Aus den restlichen selektionierten Linkern ließ sich ein Konsensusmotiv ableiten, das P - S/T - G - L - Y/F - Q lautet. Der zweithäufigste Linker PSGLYQ entspricht diesem Konsensusmotiv.

Während der Arbeit wurde die Selektion einer Phagenbibliothek veröffentlicht, die speziell das Substratprofil von MMP-2 untersucht hatte (Chen *et al.*, 2002). Hier zeigte sich wieder das schon früher bestimmte Motiv PXX↓Hy, jedoch wurden auch weitere Konsensusmotive charakterisiert. So entspricht das PSGLYQ Motiv exakt dem Motiv HySX↓L, das von MMP-2 10-20fach besser gespalten wird, als von MMP-9, MMP-7 oder MMP-13. Ein weiteres Motiv aus der Phagenbibliothek lautet L/IXX↓Hy, diesem entsprechen 8 von 50 Linkern aus der Selektion der CX<sub>4</sub>A-Bibliothek (Abbildung 3-4). Auch der Linker des Virus, das auf der Gliom-Zelllinie selektioniert wurde, erfüllt mit PAGLHV das MMP-Konsensusmotiv. Durch lange Selektionszeiten von 45 Tagen konnte das Virus mit diesem Linker alle anderen verdrängen und sich als Gewinner in der Selektion durchsetzen. Da sich dieses Virus fast ebenso schnell in U-87 MG Zellen ausbreiten konnte wie das WT-Virus und damit etwa um das 10fache schneller als die auf HT1080 selektionierten Varianten, scheint es zukünftig angeraten, die Selektionsdauer auszudehnen und die Stringenz der Selektion zu erhöhen, um wenige, dafür aber hoch effiziente Klone zu erhalten. Durch kürzere Selektionszeiten erhält man dagegen eher ein breites Spektrum möglicher Spaltstellen.

Die Ähnlichkeit der Linker aus einer MMP-2 selektionierten Phagenbibliothek und der auf der stark MMP-2 positiven Zelllinie HT1080 selektionierten rPSB lassen den Schluss zu, dass durch den Ausschluss von Argininresten im Linkerpeptid das Spektrum der Proteasen, die für die Spaltung verantwortlich waren, auf MMPs fokussiert werden konnte. Erstmals war dieser Ansatz von Schneider *et al.* gewählt worden. Doch waren hier nur drei der sechs AS in der Spaltstelle unter Ausschluss von Arginin diversifiziert worden. Zudem entsprach das rigide Gerüst PXGLXX der Bibliothek von vornherein dem MMP-Konsensusmotiv PXX↓Hy.

Der prominenteste Virusklon aus der Selektion von Schneider *et al.* trägt die Linkersequenz PQGLYQ, ist also dem Linker des zweithäufigsten Klons aus der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Selektion PSGLYQ sehr ähnlich. Da PQGLYQ im Kontext der EGF-Blockierung selektioniert wurde, konnte über den Vergleich von C26A, das den PQGLYQ Linker trägt, mit den in dieser Arbeit selektionierten Viren der Einfluss der Blockierungsdomäne auf den Linker untersucht werden. Da in den Charakterisierungen kein signifikanter Unterschied zu CPSA festgestellt werden konnte, scheint während der Selektion der Einfluss der Blockierungsdomäne auf den Linker sehr gering gewesen zu sein.

Um zu bestimmen, welche Proteasen für die Aktivierung der selektionierten Viren

verantwortlich waren, wurden unterschiedliche Methoden angewendet. Zum einen wurden gereinigte Viruspartikel mit aktiver MMP-2 inkubiert und der Anteil gespaltener Hüllproteine bestimmt. So konnte deutlich gezeigt werden, dass der parentale PLGLWA Linker, der aus der MMP-2 Schnittstelle in Kollagen abgeleitet ist, im viralen Kontext von MMP-2 nur zu etwa 6% gespalten wurde. Dagegen zeigten PSGLYQ und PQGLYQ unter den gleichen Bedingungen einen Anteil von 50-55% gespaltenem Hüllprotein (Abbildung 3-10). Aus zwei unabhängigen Bibliotheken [pEX<sub>3</sub>A (Schneider *et al.*, 2003) und pCX<sub>4</sub>A] konnten so mit den Linkern PQGLYQ (in C26A) und PSGLYQ (in CPSA) bessere Erkennungssequenzen als in Kollagen vorhanden für die MMP-2 selektioniert werden.

Für den Linker AKGLYK im Virus CAKA hingegen ist die Lage weniger eindeutig. Dieses Peptid wurde wie der parentale Linker von MMP-2 nur schlecht gespalten. Ubiquitär aktive intrazelluläre Proteasen schieden als Aktivatoren aus, da die CAKA-Viren von den Produzentenzellen 293T ungespalten entlassen wurden. Ein breites Spektrum an aktiven MMPs wurde zur Spaltung von CAKA im Vergleich zum blockierten Virus CA eingesetzt, jedoch ohne deutliches Ergebnis. Zwar konnte für MMP-3 und MMP-14 eine leicht verstärkte Spaltung gegenüber dem CA Virus detektiert werden, jedoch nicht in einer Größenordnung, die den Schluss zulässt, dass eine dieser Proteasen für die Selektion hauptsächlich verantwortlich gewesen wäre (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der Proteasen während des Infektionsvorgangs zu untersuchen, wurden verschiedene Protease-Inhibitoren eingesetzt, die während der Infektion die Aktivierung der Viren verhindern sollten. Hier zeigte sich eine gute Korrelation der Aktivierung der selektionierten Viren C26A und CPSA und des parentalen Virus CMA mit dem Vorhandensein aktiver MMP-2. Für CAKA dagegen wurde keine deutliche Korrelation gefunden; viele der spezifischen Inhibitoren hatten zwar leichte Effekte auf die Infektiosität, allerdings waren diese nie signifikant. Bei sehr hoher Dosierung des Breitband-Inhibitors GM6001 zeigte sich eine etwa 50%ige Inhibition des CAKA Virus, was für eine kumulative Spaltung des Linkers durch verschiedene Proteasen spricht (Tabelle 3-1).

Da die Inhibition der Aktivierung von CAKA nur ungenügend gelang, wurde umgekehrt versucht, dieses Virus durch die gezielte Expression von humaner MMP-14 in MMP-negativen MDCK Zellen zu aktivieren. Diese Membran-verankerte Protease hat eine Schlüsselstellung in der Aktivierung vieler anderer MMPs, daher sollte ihre Expression Einfluss auf die Aktivierung der Infektiosität haben, wenn MMPs an der Aktivierung beteiligt sind (Kadono *et al.*, 1998; Noritake *et al.*, 1999). Da die MMPs verschiedener Säuger hochgradig homolog sind, war es unproblematisch, die in einer caninen Zelllinie vorhandenen MMPs durch humane MMP-14 zu aktivieren (Coughlan *et al.*, 1998). Es zeigte sich, dass sowohl für CAKA als auch CHVA,

das auf U-87 MG Zellen selektionierte Virus, einen über 10fachen Anstieg der Infektiosität auf MMP-14 exprimierenden MDCK gegenüber den parentalen MDCK Zellen verzeichnet werden konnte, während das durch MMP-2 aktivierbare CPSA nur einen etwa 5fachen Anstieg der Infektiosität zeigte. Das erhärtet die Vermutung, dass verschiedene MMPs für die Aktivierung von CAKA verantwortlich sind, jedoch nicht eine einzelne Protease das Motiv besonders gut spalten kann. AKGLYK scheint daher ein Querschnittsmotiv für mehrere Proteasen darzustellen. Solch ein Proteasesubstrat ist somit ausschließlich in einer rPSB selektionierbar, da nur hier das gesamte Proteasespektrum einer Zelllinie berücksichtigt wird.

### **4.3 Die Tumor-Targeting Kapazität MMP-aktivierbarer Viren**

Die Verwendung replikationskompetenter Viren in der Tumorthherapie wird diskutiert, seit deutlich wurde, dass eine ausreichend große Verteilung von Vektoren im Tumorgewebe schwer zu erreichen ist (Galanis *et al.*, 2001; Kirn *et al.*, 2001). In zuvor beschriebenen Modellen zum Targeting onkolytischer Viren erfolgt der Zelleintritt unspezifisch und erst in der Zelle entscheidet sich, ob das Virus replizieren kann bzw. ein therapeutisches Protein exprimiert wird. Das ist z.B. für das transkriptionelle Targeting der Fall, bei dem ein gewebespezifischer Promotor das Ablesen der therapeutischen Gene nur in bestimmten Geweben zulässt, oder für die Onyx015 Viren, deren lytische Aktivität auf Zellen mit mutiertem p53 beschränkt ist.

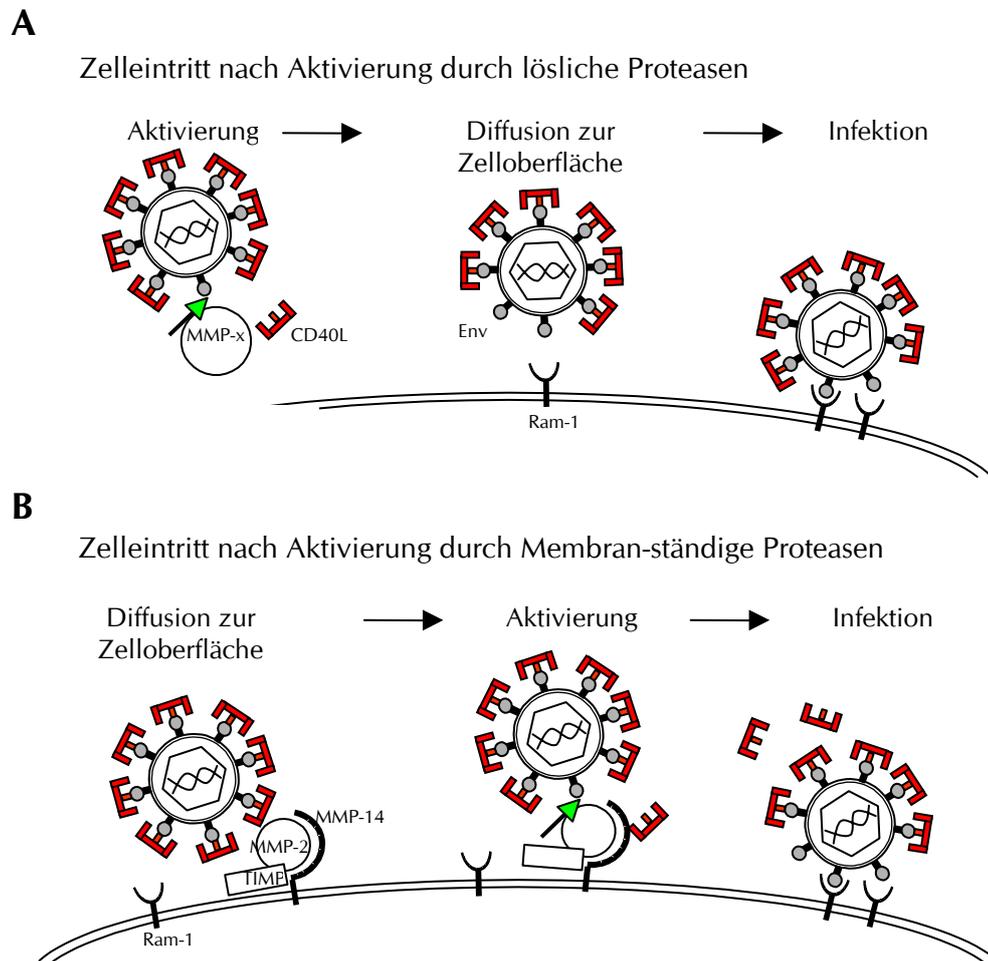
Erstrebenswerter scheint jedoch eine Einschränkung der Infektion bereits auf der Ebene des Zelleintritts. Dieses Konzept verfolgt das Proteasetargeting. Neben der zellulären Expression der Proteasen zur Aktivierung des Virus müssen für die Ausbreitung weitere Faktoren erfüllt sein: die Zellen müssen den viralen Rezeptor exprimieren, sie dürfen keinen internen Inhibitor der Virus-Replikation aufweisen und im vorliegenden Fall von Gamma-Retroviren müssen sich die Zellen zusätzlich im Teilungsstadium befinden (Miller *et al.*, 1990). Die konditionale Replikation der in dieser Arbeit selektierten Viren wurde zunächst in Zellkultur untersucht, um einige dieser Faktoren kontrollieren zu können. So konnte sich das WT-Virus in allen untersuchten humanen Zelllinien ausbreiten, das nichtspaltbare Virus CA hingegen war nicht in der Lage zu wachsen, die Blockierung durch CD40L erfüllte also auch im Kontext eines Volllänge-Virus ihren Zweck. Die selektierten Viren dagegen zeigten einen deutlichen konditionalen Phänotyp, der von der MMP-Aktivität der Zelllinie abhängig war: So war in den MMP-negativen Zellen für kein aktivierbares Virus eine Ausbreitung detektierbar (Abbildung 3-15), in den MMP-positiven Zellen konnten die selektierten Viren die Kulturen jedoch vollständig infizieren (Abbildung 3-14). Unterschiede ergaben sich in den Ausbreitungsgeschwindigkeiten, die zumindest teilweise mit der Spaltbarkeit des Linkers

korrelierten: das Virus CAKA erreichte vier Tage früher als CPSA und C26A und sieben Tage später als das WT-Virus die vollständige Infektion von HT1080 Zellen. Dies könnte die etwas höhere Anzahl an CAKA Klonen gegenüber CPSA Klonen nach Beendigung der Selektion erklären. In den Gliomzellen (U-87 MG) verliefen die Replikationskurven von CPSA, CAKA und C26A um etwa drei Tage gegenüber den HT1080 Zellen verlangsamt. Erstaunlicherweise erreichte das auf diesen Zellen selektionierte Virus CHVA die Replikationsgeschwindigkeit des WT-Virus und konnte die U-87 MG Kultur innerhalb von nur vier Tagen vollständig infizieren. Das parentale Virus CMA mit der aus Kollagen abgeleiteten Spaltstelle PLGLWA konnte sich zwar in der stark MMP-2 exprimierenden U-87 MG Linie in alle Zellen ausbreiten, doch war die vollständige Infektion um etwa 6 Tage verzögert. In HT1080 Zellen stieg der Anteil CMA-infizierter Zellen in der Population auch nach drei Wochen nicht über 10% an. Damit wird die Potenz des Selektionsverfahrens deutlich: die Verwendung einer natürlichen MMP-Spaltstelle führt nicht zum bestmöglichen Ergebnis, die Selektion einer geeigneten Bibliothek hingegen resultiert in Viren, die sich schnell und selektiv in MMP-positiven Zellen ausbreiten können.

Die im Vergleich zu den anderen Viren schnellere Ausbreitung des CHVA und des WT-Virus und die wesentlich höhere Menge freigesetzter infektiöser Partikel (Tabelle 3-3) könnte prinzipiell durch eine effektivere Env-Protein Inkorporation erklärbar sein. Für das WT-Virus konnte dieser Mechanismus durch die Analyse der Partikel an den Endpunkten der Kinetik mittels Western Blot bestätigt werden, für CHVA jedoch gibt es darauf keinen eindeutigen Hinweis (Abbildung 3-16). Vermutlich sind weitere Mechanismen an der Zelloberfläche dafür verantwortlich: z.B. wäre eine im Vergleich zu den anderen selektionierten Viren optimierte Spaltung an der Zelloberfläche denkbar, die durch eine Untersuchung der Partikel im Medium nicht nachweisbar ist (Abbildung 4-1). Dass in der Western Blot-Analyse von Überständen einer vollständig infizierten Zellkultur nur geringe Anteile an Viren aktiviert vorlagen, spricht nicht gegen diese Theorie, da bereits geringe Mengen an SU in der Virushülle ausreichend sind, um Infektiosität zu vermitteln (Bachrach *et al.*, 2000).

Auch möglich wäre eine verbesserte Präsentation des Linkerpeptids oder ein Einfluss des Peptids auf die Aminosäuren der Umgebung, die an der Fusion beteiligt sind. So befindet sich an Position 5 des N-Terminus von amphotropem Env die für die Membranfusion kritische AS Histidin (H5) (Bae *et al.*, 1997). Eventuell hat das Histidin des Peptids PAG↓LHV in unmittelbarer Nähe dazu einen positiven Einfluss auf die Fusogenität der Hüllproteine. So konnte die Infektiosität von Viren, in denen H5 deletiert worden war, durch lösliche SU-Untereinheiten oder nur die Rezeptorbindungsdomäne von SU kompetitiert werden (Lavillette *et al.*, 2000). Da also Proteine, die nicht kovalent mit Env verbunden sind, den

Fusionsvorgang beeinflussen, könnte auch einem in der Nähe liegenden Histidin Bedeutung zukommen. Durch Einfügen eines Histidins in die Umgebung der Linker anderer aktivierbarer Viren ließe sich diese Hypothese überprüfen.



**Abbildung 4-1: Mögliche Wege der Infektion mit MMP-aktivierbaren Viren**

Da keine Anbindung an einen Rezeptor möglich ist, können CD40L-präsentierende Viren sowohl durch (A) lösliche Proteasen (durch MMP-x gekennzeichnet) als auch durch (B) Membran-ständige Proteasen aktiviert werden (durch grünen Pfeil angedeutet). Da bei A die Aktivierung nicht zwingend in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche erfolgt, kann das aktivierte Virus benachbarte MMP-negative Zellen infizieren. Durch die direkte räumliche Nähe von Virus und Zelloberfläche bei der Aktivierung durch Membran-ständige Proteasen (z.B. MMP-2 oder MMP-14, die in einem Komplex mit TIMP vorliegen) ist der Zelleintritt in die aktivierende Zelle (B) viel wahrscheinlicher. In einigen Publikationen wird auf die Rezeptor-unabhängige Anbindung von MLV an Heparin und Heparin-ähnliche Bestandteile der ECM hingewiesen (Guibinga *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2002). Dies könnte durch die höhere Verweildauer der Viren in räumlicher Nähe zur Zelloberfläche die direkte Infektion der MMP-positiven Zellen nach Aktivierung auch *in vivo* begünstigen.

---

Die konditionale Ausbreitung der Protease-aktivierbaren Viren in verschiedenen Zelllinien ermöglichte die Untersuchung des Targetings in murinen Tumormodellen. Dabei stellten sich zwei wesentliche Fragen:

i) Sind die aktivierbaren Viren in der Lage, sich in einem soliden Tumor auszubreiten ohne die Blockierungsdomäne auf genetischer Ebene zu deletieren und ii) wie verteilen sich die Viren im Organismus?

i) Die Ausbreitung der selektierten Viren erfolgte zwar wie *in vitro* langsamer als die des WT-Virus, dennoch konnte ein Großteil des Tumorgewebes infiziert werden, wenn lediglich  $1 \times 10^3$  i.E. CAKA Virus intratumoral appliziert wurden (Abbildung 3-19). Damit erscheint das *in vivo* Ausbreitungspotential MMP-aktivierbarer Retroviren ausreichend für therapeutische Anwendungen in Patienten. Hervorzuheben ist, dass die selektierten Viren zum größten Teil genetisch stabil blieben (Abbildung 3-18 Abbildung 3-20). Dagegen konnte sich das parentale CMA Virus nur ausbreiten, nachdem Deletionen im Bereich der Blockierungsdomäne erfolgt waren und damit die MMP-Aktivierbarkeit aufgehoben war. Das Risiko einer Reversion zum WT-Virus scheint damit in den selektierten Virusvarianten deutlich vermindert zu sein.

Die genetische Stabilität der aktivierbaren Viren ist mit der Stabilität gut untersuchter anderer modifizierter Viren, z.B. einem MLV das zusätzlich am 3'-Ende des *env*-Gens ein über eine IRES<sup>1</sup> getriebenes *gfp*-Gen (grünfluoreszierendes Protein) trägt (Logg *et al.*, 2001b), schwer vergleichbar, da diese zusätzlichen DNA-Sequenzen keinen Einfluss auf die Infektiosität hatten. Eine Deletion der IRES-*gfp* Kasette würde also nicht zu einer Verbreiterung des Tropismus wie bei der Deletion der Blockierungsdomäne führen, sondern nur zur Verkleinerung des Genoms. Die IRES-*gfp* Kasette konnte somit über acht Passagen stabil im Virusgenom nachgewiesen werden (Logg *et al.*, 2001a). Wurde allerdings die IRES-*gfp* Kasette in die in dieser Arbeit verwendeten aktivierbaren Viren eingefügt, überschritt die Größe der genomischen mRNA die Verpackungskapazität der Viren. Die Viren mussten einen Teil ihres Genoms deletieren, um zu replizieren. So wurde innerhalb der ersten Passage die IRES-*gfp* Kasette deletiert, nicht aber die Blockierungsdomäne (Daten nicht gezeigt). Die Deletion der Blockierungsdomäne scheint also schwieriger zu sein.

Die Sicherheit MMP-aktivierbarer Viren ließe sich weiter erhöhen, wenn die Möglichkeit zur Reversion durch Deletion ausgeschlossen werden könnte. Dazu müsste die Spaltstelle, welche die konditionale Replikation bedingt, sich im Hüllprotein selbst und nicht zwischen Blockierungsdomäne und Env befinden, z.B. zwischen SU und TM. Ersetzte man hier die

---

<sup>1</sup> IRES: interne Ribosomen-Eintrittsstelle

Furin-Spaltstelle durch eine auf das Proteasespektrum der Zielzelle optimierte Spaltstelle, könnte eine unerwünschte Aktivierung nicht durch Deletion einer Blockierungsdomäne, sondern nur durch mehrere Mutation der Spaltstelle auftreten. Dies ist unwahrscheinlicher als die häufiger auftretenden Deletionen im MLV-Genom, die durch Rekombination der beiden verpackten viralen RNAs möglich sind (Rasmussen und Pedersen, 2004).

Veröffentlicht wurde dieses Konzept am Beispiel des onkolytischen Sendai-Virus. Das fusogene Hüllprotein dieses Virus wird normalerweise durch eine Trypsin-ähnliche Protease aktiviert. Diese interne Spaltstelle wurde gegen ein MMP-spaltbares Motiv ausgetauscht, und es konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung dadurch auf MMP-positive Tumorzellen beschränkt blieb (Kinoh *et al.*, 2004). Durch Deletion des M-Proteins, das für das Knospen reifer Partikel verantwortlich ist, konnte die Ausbreitung des Virus auf die benachbarten Zellen nur durch Synzytienbildung stattfinden. So wurde ein vermindertes Tumorwachstum von HT1080 Zellen detektiert, wenn in  $\sim 5\text{mm}^3$  große Tumore  $5 \times 10^7$  i.E. dieser Viren injiziert wurden. Auch in andere Organe wurde eine Applikation vorgenommen, ohne dass dort eine Ausbreitung der Viren festgestellt werden konnte. Dieses Konzept könnte möglicherweise auf die Furin-Spaltstelle zwischen SU und TM im MLV-Genom übertragen werden.

ii) Die Analyse der Biodistribution des CAKA und des CPSA Virus zeigte, dass diese sich bevorzugt im Tumorgewebe ausbreiten und im Vergleich zum WT-Virus in deutlich geringerem Maße andere Organe infizieren. Dazu wurde ein Maus-Modell etabliert, in dem pro Maus zwei Tumore (je einer pro Flanke) erzeugt wurden: Ein Primärtumor, der aus infizierten Zellen bestand, entließ Viren in den Organismus, deren Ausbreitung in einem aus uninfizierten Zellen etablierten Sekundärtumor nachgewiesen wurde. So zeigte das WT-Virus innerhalb von 27 Tagen die fast vollständige Infektion des sekundären Tumors. Nach 36 Tagen konnten auch für das CAKA Virus bis zu 19% infizierte Zellen im sekundären Tumor nachgewiesen werden (Abbildung 3-25). Sowohl aktivierbare als auch WT-Viren konnten also einen Tumor in räumlicher Distanz erreichen.

Auch in verschiedenen Organen war Virus nachweisbar (Tabelle 3-5): Das WT-Virus fand sich in erheblichem Maß in Milz, Lunge und Knochenmark. In Herz, Niere und Leber war es nur vereinzelt nachweisbar. Das aktivierbare Virus CAKA infizierte im Schnitt weniger als 0,002% des untersuchten Gewebes. Dieser Unterschied zwischen WT und aktivierbaren Viren wurde exemplarisch an den Milzen zweier Mäuse genauer quantifiziert (Abbildung 3-27). Aus diesen Daten und den Prozentsätzen infizierter rekultivierter Tumorzellen wurde ein Targetingfaktor<sup>1</sup> für CAKA von 260 errechnet. Da beschriebene Versuche zum Tumortargeting

---

<sup>1</sup> Verhältnis der Virusverteilung im Tumor zu anderen Geweben, normalisiert auf das WT-Virus

von Retroviren mit replikationsinkompetenen Viren durchgeführt wurden, gibt es für diesen Faktor bisher keine Vergleichsmöglichkeit. Eine Erhöhung des Faktors durch Reduzierung der infizierten Zellen in den Organen ist für die Sicherheit einer Therapie sicher notwendig. Allerdings gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie es zur Infektion MMP-negativen Gewebes gekommen sein könnte:

- a) Die Tumorzelle HT1080 produziert in großen Mengen MMPs. Dadurch wurde den selektierten Viren zwar die optimale Ausbreitung im Tumor ermöglicht, die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung des Primärtumors war aber sehr hoch. Um möglichst genau zwischen durch die Verbreitung des Virus infizierten Mäusen und eingewanderten infizierten HT1080 Zellen zu unterscheiden, wurde eine PCR etabliert, die in einem Fragment unterschiedlicher Größe auf dem humanen oder dem murinen  $\beta$ -Aktin resultiert. Die Sensitivität ließ allerdings einen Nachweis von Metastasen erst zu, wenn sie etwa 1% des untersuchten Gewebes ausmachten. D.h. alle beobachteten Infektionen unter 1% könnten durch eingewanderte infizierte Zellen zustande gekommen sein. Da dies für alle Untersuchungen mit den MMP-aktivierbaren Viren gilt, könnte der tatsächliche Targetingfaktor also wesentlich höher liegen. Durch Verminderung/Vermeidung der Metastasierung z.B. durch die Expression anti-tumoraler Gene ließe sich dieser Effekt ausgleichen.
- b) Eine weitere Möglichkeit, die zum Nachweis von Virus-infiziertem Gewebe führte, besteht in der Infektion von Blutbestandteilen. Da die Mäuse vor der Organentnahme nicht perfundiert wurden, könnten Blutreste in den Organen zu den Virussignalen in der PCR geführt haben. Da der Anteil von Blutresten in allen Organen jedoch relativ ähnlich sein sollte, sprechen die z.T. beträchtlichen Unterschiede in den Anteilen infizierter Zellen gegen diese Erklärung. Der geringe Anteil der mit aktivierbaren Viren infizierten Zellen in den Organen könnte aber daher rühren.
- c) Wie bereits beschrieben, erfolgt die Aktivierung der Viren nicht zwingend an der Zelloberfläche (Abbildung 4-1, A). Daher ist es möglich, dass aktivierte Viren aus dem Tumor entlassen werden und in den Organen Zellen unabhängig von deren MMP-Expression infizieren.
- d) Zudem werden in den Organen murine MMPs exprimiert und die Aktivierung der Viren könnte darüber erfolgen. Genaue Studien über das Substratspektrum muriner MMPs sind zwar nicht veröffentlicht, doch scheinen ähnliche Peptide gespalten werden zu können.

Der Nachweis von WT-Virus in verschiedenen Organen nach der Applikation eines Tumors aus infizierten Zellen steht im Widerspruch zu Veröffentlichungen aus der Arbeitsgruppe von Nori Kasahara. Trotz Ausbreitung im Tumor konnte dort MLV nicht in Organen nachgewiesen

werden (Logg *et al.*, 2001b). Per PCR<sup>1</sup> wurde die genomische DNA der Organe auf die Integration des GFP-Gens untersucht. Die Zeiträume der Untersuchungen unterscheiden sich in der vorliegenden Arbeit nicht wesentlich von denen in der Arbeit von Logg *et al.* Jedoch wurde der Organismus durch die Applikation eines vollständig infizierten Tumors in der vorliegenden Arbeit einer deutlich höheren viralen Last ausgesetzt. Dies war bei Logg *et al.* nicht der Fall. Hier wurden geringe Mengen Virus in etablierte Tumore injiziert, so dass sich die Virusausbreitung zunächst auf den Tumor beschränken konnte. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit die PCR auf einem viralen Gen etabliert, nicht auf einem zusätzlichen Gen, dessen Deletion keinen Einfluss auf die Replikation, sondern nur auf die Nachweisbarkeit der Viren hat. Unterstützt werden die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit durch die Daten aus der Gruppe um Francisco Martín und Mary Collins. Diese Autoren nutzen für das Targeting von Vektoren die Anbindung eines Tumor-Antigen spezifischen scFv (Antikörperfragment) an die Tumorzelle. Die zusätzliche Präsentation eines Teils der prolinreichen Domäne aus dem amphotropen Env (PRR) als Blockierungsdomäne und der MMP-Spaltstelle aus Kollagen bewirkt eine Aktivierung des Virus auf Antigen-präsentierenden MMP-positiven Zellen. Im Mausmodell konnten für dieses Modell sehr gute Targetingeffizienzen für CEA<sup>2</sup>-positive Tumore (Chowdhury *et al.*, 2004) und Melanome gezeigt werden (Martin *et al.*, 2003). Der unveränderte Vektor war jedoch wie das WT-Virus in der vorliegenden Arbeit in der Lage, Milz-, Leber- und Nierenzellen zu infizieren. Das heißt eine Anbindung an die Zielzellen erhöht die Sicherheit der eingesetzten Viren oder Vektoren um ein vielfaches (siehe auch Abbildung 4-1).

#### **4.4 Wege zu therapeutisch nutzbaren anti-tumoralen Retroviren**

Welche negativen Folgen durch MLV-Infektionen von nicht-Tumorgewebe zu erwarten wären, ist auf Grund verschiedener Indizien abschätzbar. Jede Infektion mit MLV ist durch mögliche Insertionsmutagenese potentiell kanzerogen, wie durch mit MLV kontaminiertes und in Rhesus-Makaken transplantiertes Knochenmark gezeigt wurde (Donahue *et al.*, 1992). In 3 von 10 Tieren entwickelten sich T-Zell-Lymphome. Auch in der Studie von Alain Fischer in der Therapie von SCID-kranken Kindern entwickelten sich in mittlerweile 3 von 11 behandelten Kindern Leukämien durch Insertionsmutagenese des verwendeten retroviralen Vektors (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003; www.pei.de, 2005). Diese Studien der Pathogenität

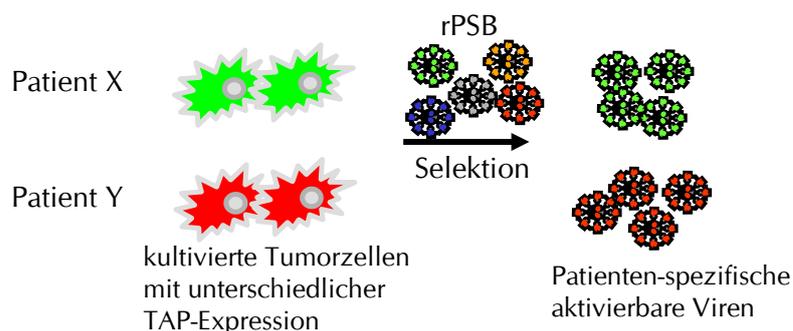
<sup>1</sup> Sensitivität: 35 Plasmidkopien in 600ng genomischer DNA

<sup>2</sup> Carcinoembryonic Antigen (Embriomalkarzinom-Antigen)

von MLV beziehen sich allerdings auf immundefiziente Wirte bzw. Patienten, nicht auf Tumorkranken. In immunkompetenten oder immunsupprimierten Rhesusaffen konnte keine Pathogenität festgestellt werden (Cornetta *et al.*, 1990; Cornetta *et al.*, 1991). Da in den meisten Fällen zur Tumorbekämpfung ein Suizidgen transferiert werden würde, sterben auch infizierte gesunde Zellen durch die Expression des Gens vermutlich ab. Das Risiko der Karzinogenität könnte dadurch abgemildert werden.

Zudem wurde nachgewiesen, dass die Replikation von MLV in humanen Immunzellen durch die Expression des antiviralen Gens APOBEC3G stark eingeschränkt ist (Mangeat *et al.*, 2003). Dadurch war das Überwinden der Speziesbarriere von MLV verhindert: Mensch und Maus leben seit Jahrmillionen nebeneinander und ein Überspringen von MLV auf den Menschen wurde nie nachgewiesen. Da MLV auch nur neugeborene Mäuse, deren adaptives Immunsystem noch nicht ausgebildet ist, effektiv infiziert, ist die Eliminierung der Viren in einem immunkompetenten Patienten wahrscheinlich. Im Tumorgewebe dagegen könnte durch die immunsuppressiven Eigenschaften von Tumoren die Ausbreitung trotzdem gewährleistet sein (Yang und Carbone, 2004).

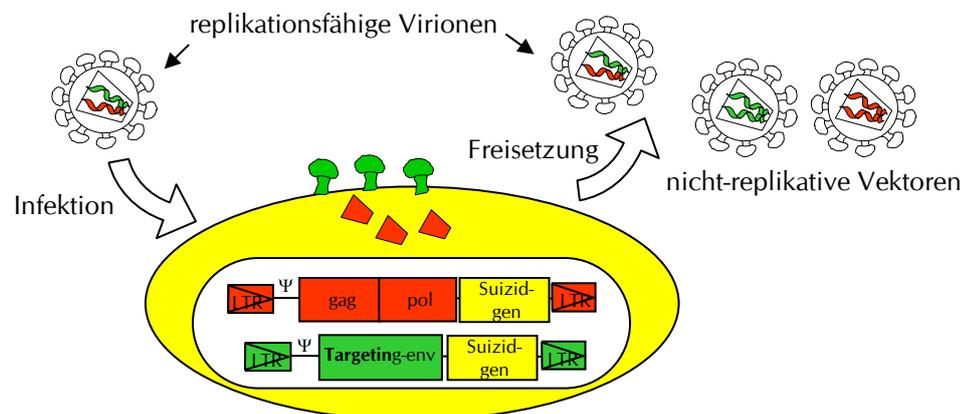
Ein anderes Risiko bei der Anwendung therapeutischer Retroviren besteht in der Aktivierung endogener Retroviren. So wird spekuliert, dass Sequenzhomologien zwischen dem Env von MLV und HTLV (humanes T-Zell Leukämie Virus) trotz der phylogenetischen Entfernung der beiden Viren durch Env-Capture (von engl. erobern, fangen) von HTLV entstanden sein könnten. Durch die Gentherapie wäre es möglich, dass neue Virusarten mit erweiterten/veränderten Tropismen entstehen (Kim *et al.*, 2004). Jedoch ist zumeist das Env-Gen der endogenen Viren funktionsuntüchtig. Also müssten auch hier einige Mutationsschritte zur Aktivierung und Entstehung unbekannter neuer Viren erfolgen.



#### Abbildung 4-2: Patientenspezifische Therapie.

Durch Selektion einer rPSB auf Tumorzellen, die aus Patienten isoliert wurden, könnten optimal für das Proteasespektrum eines Tumors passende Spaltstellen evolviert werden. So würde eine individualisierte Tumorthherapie möglich.

Strategien zur spezifischen Infektion eines Tumors könnten nach einer intratumoralen Applikation systemisch wirken und damit nicht nur den Primärtumor, sondern auch Metastasen bekämpfen. Dass die räumliche Entfernung zum Primärtumor keine Rolle spielt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Nach den gezeigten Daten kann davon ausgegangen werden, dass MLV in der Tumorthherapie nicht ohne hoch effizientes Targeting angewendet werden kann. Kombinationen verschiedener Strategien könnten hier Erfolg versprechend sein. Die Verbindung aus Anbindung der Viren an die Tumorzellen über ein spezifisches Tumorantigen und eine hocheffiziente speziell auf den Tumor zugeschnittene Aktivierung vor Ort durch Entfernung einer Blockierungsdomäne könnte die Effizienz des bisherigen Targetings noch steigern. Dazu müsste die Selektion einer rPSB auf primärem Tumormaterial etabliert werden, um die in dieser Arbeit vorgestellte Optimierung der Spaltsequenz für verschiedene Tumorarten zu ermöglichen. Durch Kombinationen verschiedener Ansätze mit einer auf die Tumorzellen des Patienten optimierten MMP-Aktivierung, wären eine hoch spezifische Infektion von Tumorzellen und die konditionale Replikation der Viren möglich (Abbildung 4-2). So könnte die Sicherheit einer solchen Therapie enorm erhöht werden. Kleinere Blockierungsdomänen z.B. Teile der Prolin-reichen Region (PRR) des 4070A SU-Proteins wurden bereits beschrieben (Martin *et al.*, 2003). So bliebe mehr Raum im Genom für die Expression therapeutischer Gene. Auch das Konzept der Semireplikation (Hartl, 2000; Trajceviski *et al.*, 2004) könnte hier Anwendung finden: sowohl das Platzproblem würde so gelöst, als auch ein zusätzliches Maß an Sicherheit gewonnen (Abbildung 4-3).



**Abbildung 4-3: Semireplikation als Chance in der selektiven Tumorthherapie.**

Die für die Replikation erforderlichen viralen Gene sind auf zwei verpackbare RNA-Moleküle verteilt. Die Infektion einer Zelle mit Virionen, die beide RNAs verpackt haben, resultiert in der Entstehung einer neuerlichen Verpackungszelle. Virionen, die zwei gleiche RNAs verpackt haben, sind infektiös, resultieren aber nicht neuen Verpackungszellen. Der therapeutische Effekt wird durch beide RNAs vermittelt. Die Ausbreitung im Tumor erfolgt zwar langsamer als für herkömmliche replikationskompetente Viren, dafür ist die Sicherheit der Vektoren stark erhöht.

Als therapeutische Gene wurden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen. Zum einen Angiogenesehemmer, die eine weitere Versorgung des Tumors unterbinden, oder immunstimulatorische Proteine, wie das Cytokin GM-CSF (Finger *et al.*, 2005). Zum anderen besteht die Möglichkeit fusogene Hüllproteine zu verwenden, die Synzytien der infizierten Zelle mit ihren Nachbarzellen induzieren und dadurch das Absterben der Zellen erwirken (Bateman *et al.*, 2000). Z.B. durch die Deletion des R-Peptids in retroviralen Envs wird deren Fusogenität nicht erst bei der Reifung der Partikel aktiviert, sondern bereits die infizierte Zelle fusioniert mit ihren Nachbarzellen. Erste Untersuchungen hierzu wurden bereits in der Gruppe von Christian Buchholz unternommen (Eckhardt, 2004). Auch wurde die Aktivierung der Fusogenität durch MMPs veröffentlicht (Allen *et al.*, 2004).

Besonders sicher wäre die Verwendung eines Suizidgens, das erst nach Gabe eines Pharmakons in den Zellen, in denen es exprimiert wird, die Apoptose auslöst. Hierzu bietet sich ein kleines Enzym an, das eine relativ untoxische Vorstufe in ein toxisches Produkt umwandelt. Hier könnte die bereits beschriebene Cytosin Deaminase (CD) aus Hefe verwendet werden (Mullen *et al.*, 1994). In einer Untersuchung mit replikationskompetenten MLV mit einer IRES-CD-Kassette zwischen *env*-Gen und 3'-LTR konnte gezeigt werden, dass ihre Expression in einem Mausmodell mit intrakranialen Gliomen zu hochsignifikant längerem Überleben der Mäuse führte (Wang *et al.*, 2003).

Damit erscheint die Infektion von Tumoren mit hoch spezifischen konditional replizierenden Viren eine echte Option für neue Wege in der Tumorthherapie darzustellen. Die Anwendung solcher Tumor-Gentherapie bliebe wohl auf weite Sicht die *ultima ratio*, aber viele Therapien arbeiten mit einer Risiko-Nutzen-Abwägung. Sofern eine systemische Ausbreitung der Viren im Menschen ausgeschlossen werden kann (oder hoch unwahrscheinlich ist) und damit auch die Übertragung von Mensch zu Mensch, sollte diese Chance der Tumorthherapie nicht leichtfertig als zu gefährlich abgetan werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Formen der Tumorthherapie bleibt notwendig, solange die Heilung verschiedener solider metastasierender Tumore nicht möglich ist. Solch ein neuer Ansatz besteht in der Infektion des Tumors mit replikationskompetenten (retroviralen) Vektoren oder Viren. Um die Spezifität dieser Viren für die Tumorzellen zu erhöhen, wird in dieser Arbeit ein Konzept vorgestellt, dass die Tumor-spezifische Expression von Proteasen, im Besonderen von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), zur Aktivierung des Maus Leukämievirus (MLV) ausnutzt (Protease-Targeting). Dazu wurde durch eine Blockierungsdomäne (CD40L) N-terminal vom infektionsvermittelnden MLV-Hüllprotein Env die Bindung an die Zelleintrittsrezeptoren verhindert. Eine Spaltstelle zwischen CD40L und Env ermöglicht die Entfernung der Blockierungsdomäne und damit die Aktivierung des Virus.

Um eine Spaltstelle zu finden, die optimal auf das Proteasespektrum eines Tumors passt, wurde das zwischen CD40L und Env befindliche Linkerpeptid kombinatorisch diversifiziert und so eine Bibliothek von Retroviren erzeugt. Die Selektion dieser Bibliothek auf zwei unterschiedlichen Tumorlinien (HT1080, Fibrosarkom und U-87 MG, malignes Gliom) führte zur Anreicherung MMP-aktivierbarer Viren.

Drei der mehr als 10 identifizierten Linkerpeptide (AKGLYK, PSGLYQ und PAGLHV) wurden im viralen Kontext näher charakterisiert. Für das Spaltnmotiv PSGLYQ konnte MMP-2 als aktivierende Protease nachgewiesen werden. Für die Motive AKGLYK und PAGLHV erwies sich eine kummulative Spaltung durch eine Reihe von MMPs als wahrscheinlich.

Um die Ausbreitung der Viren in Abhängigkeit der MMP-Expression zu zeigen, wurden verschiedene Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von MMP-2 und MMP-9 charakterisiert und in MMP-positive und MMP-negative Zelllinien eingeteilt. Durch Infektion dieser Zelllinien und anschließende Verfolgung der Virus-Ausbreitung konnte die konditionale Replikation der aktivierbaren Viren ausschließlich auf MMP-positiven Zellen nachgewiesen werden.

Daher erreichten die Viren mit selektionierten Spaltnmotiven im Gegensatz zum Parental-Virus, welches ein in der Literatur beschriebenes MMP-2-Spaltnmotiv aus Kollagen (PLGLWA) präsentierte, die vollständige Infektion der Kulturen. Auch die Titer lagen etwa um das 1000fache höher. Die Replikationsgeschwindigkeit der aktivierbaren Viren mit AKGLYK und PSGLYQ Motiv erreichte annähernd die des unveränderten MLV, das Virus mit PAGLHV Motiv zeigte sogar eine identische Replikationskurve.

In einem Tumor-Maus-Modell konnte die Ausbreitung der proteolytisch aktivierbaren Viren auch in der Umgebung eines soliden Tumors gezeigt werden. Sowohl nach Etablierung des

Tumors aus zum Teil vorinfizierten Zellen, als auch nach Injektion von Viren in zuvor etablierte Tumore erfolgte sie für die selektionierten Viren genetisch stabil. Um die Verteilung der Viren im Organismus zu bestimmen, wurde ein Modell entwickelt, in dem ein vollständig infizierter Tumor als Virusquelle diente, und nach bestimmten Zeiträumen verschiedene Organe der Maus und ein zweiter aus uninfizierten Zellen etablierter Tumor per PCR auf Infektionen untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass WT-MLV bis zu 20.000fach mehr Zellen in den Organen infizierte als die aktivierbaren Viren. Dagegen wurden Zellen in einem sekundären uninfiziert etablierten Tumor vom WT-MLV nur etwa 5fach besser infiziert als durch die aktivierbaren Viren. Das heißt, die selektionierten Viren erreichten ein hohes Maß an Tumortargeting.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch molekulare Evolution zum ersten Mal replizierende Retroviren hergestellt, die einen eingeschränkten und für Protease-positive Zellen spezifischen Tropismus aufwiesen. Die selektionierten Substrate glichen anderen, mit Hilfe von Peptid-Bibliotheken für MMPs identifizierten Motiven, jedoch konnten durch die Berücksichtigung des gesamten Proteasespektrums einer Zelllinie weitere Motive selektioniert werden, die durch bisherige Systeme nicht ermittelt werden konnten.

Damit ergibt sich für die selektionierten MMP-aktivierbaren Viren durch die Kombination aus Targeting beim Zelleintritt und Replikation in der Targetzellpopulation, die für andere beschriebene Targetingsysteme nicht gegeben ist, eine echte Option für neue Wege in der Tumorthherapie.

#### **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

I. Hartl, R.M. Schneider, Y. Sun, J. Medvedovska, M.P. Chadwick, S.J. Russell, K. Cichutek and C.J. Buchholz (2005). *Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells*. Gene Therapy. Feb 17, online publiziert

## 6 Anhang

Im Zug der vorliegenden Arbeit wurden weitere Plasmide hergestellt, die durch die nötige Fokussierung im Ergebnis-Teil nicht näher beschrieben werden konnten. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die weiteren vorhandenen Plasmide gegeben.

### 6.1 Plasmide kodierend für Viren mit alternativen Blockierungsdomänen

Ein weiteres Zytokin (*migration inducing factor*, MIF) wurde in der Gruppe von Stephen Russell (Rochester, USA) als Blockierungsdomäne vorgeschlagen. Aus den freundlicherweise zur Verfügung gestellten Plasmiden pMoMLV-Furin-MIF<sup>1</sup>, pMoMLV-Xa-MIF, pMoMLV-MMP-MIF und pMoMLV-G<sub>4</sub>S-MIF wurden durch *SfiI*-*NotI*-Austausch in den Backbone von pCD40LA folgende Plasmide hergestellt:

pMG <sub>4</sub> SA	(Blockierungsdomäne (BD) murines MIF, nicht-spaltbarer Glycin-Serin Linker, amphotropes Env (aEnv))
pM-MMP-A	(BD murines MIF, parentaler Linker: PQGLWA, aEnv)
pMAKA	(BD murines MIF, Linker AKGLYK, aEnv)
pM-Furin-A	(BD murines MIF, Linker mit Furinspaltstelle, aEnv)
pMXaA	(BD murines MIF, Linker mit Faktor Xa-Spaltstelle, aEnv)

### 6.2 Plasmide mit zusätzlichen (therapeutischen) Genen

Analog zu den bei Logg *et al.* beschriebenen Viren, wurden am 3'-Ende des Env-Gens über eine IRES getrieben zusätzliche Gene in die Virus-klodierende Sequenz eingefügt. Die Plasmide pAZE (Translation von GFP wird über eine IRES aus dem Encephalomyocarditis Virus (EMCV) initiiert) und pACE-CD (Translation von Cytosin Deaminase wird über die EMCV-IRES initiiert) wurden freundlicherweise von Nori Kasahara (Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt. Nach Deletion der *NotI*-Schnittstelle vor der 3'-LTR durch Mung Bean Exonuklease-Verdau wurde das *SphI* - *PacI* Fragment aus pCD40LA in den Backbone von pAZE eingefügt. Anschließend konnten Blockierungsdomäne und Linker getauscht werden.

---

<sup>1</sup> Mo steht für Moloney MLV, d.h. die Plasmide enthalten ecotropes Env

So entstanden folgende Plasmide:

pCD40LAZE	(BD CD40L, kein Linker, aEnv, IRES- <i>gfp</i> ) Klon #1 + #2
pEMAZE	(BD EGF, parentaler Linker, aEnv, IRES- <i>gfp</i> )
pE26AZE	(BD EGF, Linker 26, aEnv, IRES- <i>gfp</i> )
pCMAZE	(BD CD40L, parentaler Linker, aEnv, IRES- <i>gfp</i> )
pC26AZE	(BD CD40L, Linker 26, aEnv, IRES- <i>gfp</i> ) Klon #1 + #6
pCAKAZE	(BD CD40L, Linker AKGLYK, aEnv, IRES- <i>gfp</i> )
pCPSAZE	(BD CD40L, Linker PSGLYQ, aEnv, IRES- <i>gfp</i> )

Durch Austausch des *SacII* - *PacI* - Fragments aus pACE-CD gegen das analoge BD-Env-Fragment aus pM...A Plasmiden entstanden die folgenden Plasmide:

pMAKAiCD	(BD MIF, Linker AKGLYK, aEnv, IRES-CD)
pMG4SAiCD	(BD MIF, nicht-spaltb. Glycin-Serin Link., aEnv, IRES-CD) Klon #3 + #4
pM26AiCD	(BD MIF, Linker PQGLYQ, aEnv, IRES-CD)

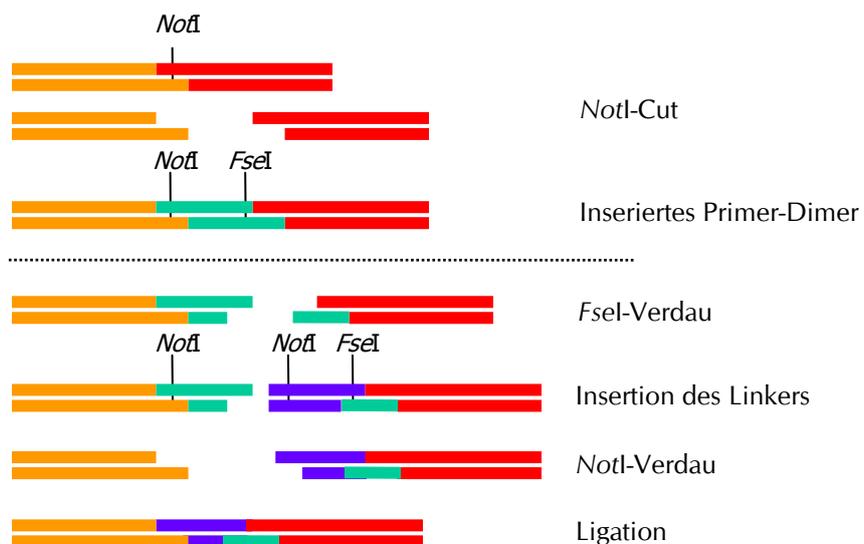
Um eine zusätzliche Schnittstelle nach der IRES-Kassette zu erhalten, wurde die Erkennungssequenz für *MluI* mittels einer Fusions-PCR auf dem Template pACE-CD in das Fragment von IRES-Kassette bis 3'-LTR inseriert und über *BsiWI* - *NheI* (Partial-) Verdau in den Backbone von pCAKAZE eingefügt:

pCAKAiCD	( <i>SfiI</i> - BD CD40L - AKGLYK - <i>NotI</i> - aEnv - <i>BsiWI</i> - IRES-CD - <i>MluI</i> )
----------	---

Dieses Plasmid kann also als Ausgangsplasmid für den Austausch aller auf der Env mRNA kodierten Sequenzen dienen. Eine genaue Beschreibung dieser Klonierung findet sich im Laborbuch des Praktikums von Manon Eckhardt.

### 6.3 Erleichterter Austausch des Linkers über Primer-Klonierung

Um einen Austausch der Linker ohne gleichzeitige PCR über den Bereich der Blockierungsdomäne sondern über das Einfügen eines Oligonukleotids zu ermöglichen, wurde eine weitere Schnittstelle im Linker eingeführt. Der Austausch der Blockierungsdomäne bleibt über die *SfiI* / *NotI* - Klonierung möglich, der Austausch des Linkers erfolgt über Oligonukleotide (Worthington *et al.*, 2001; Merten *et al.*, 2005) mit flankierenden *NotI* / *FseI* -Erkennungssequenzen in das *NotI* / *FseI* - geöffnete Plasmid. Die Sequenz des Linkers (grau hinterlegt) ändert sich von **K L A S S XXXXXX A A M A E S P** zu **K L A A A S S XXXXXX P L A A M A E S P** wobei K L die letzten Aminosäuren der Blockierungsdomäne und P L die durch die eingefügte *FseI* - Schnittstelle kodierten Aminosäuren sind. Mit dem Methionin (M) startet das Env.



**Abbildung 6-1: Strategie der Primer-Klonierung.**

Zwischen der kodierenden Region von Blockierungsdomäne (gelb) und Env (rot) im Plasmid pCD40LA wurde zunächst ein Dimer (grün) inseriert, dass die *FseI*-Schnittstelle einfügt, so entstand das Plasmid pCA-Fse. Der Linker (blau) konnte anschließend durch die Insertion eines weiteren Primerdimers eingefügt werden.

Vorhandene Plasmide:

pCA-Fse	(BD CD40L, inseriertes Dimer, aEnv)
pEA-FSE	(BD EGF, inseriertes Dimer, aEnv)
pCAZE-Fse	(BD CD40L, inseriertes Dimer, aEnv, IRES- <i>gfp</i> )
pEAZE-FSE	(BD EGF, inseriertes Dimer, aEnv, IRES- <i>gfp</i> ) Klon #1 + #2
pC+MAZE	(BD CD40L, <i>NotI</i> - parentaler Link. - <i>FseI</i> , aEnv, IRES- <i>gfp</i> ) Klon #1 + #2

## 7 Literatur

- Allen, C., C. McDonald, C. Giannini, K. W. Peng, G. Rosales, S. J. Russell und E. Galanis (2004). "Adenoviral vectors expressing fusogenic membrane glycoproteins activated via matrix metalloproteinase cleavable linkers have significant antitumor potential in the gene therapy of gliomas." J Gene Med **6**(11): 1216-27.
- Bachrach, E., M. Marin, M. Pelegrin, G. Karavanas und M. Piechaczyk (2000). "Efficient cell infection by Moloney murine leukemia virus-derived particles requires minimal amounts of envelope glycoprotein." J Virol **74**(18): 8480-6.
- Bae, Y., S. M. Kingsman und A. J. Kingsman (1997). "Functional dissection of the Moloney murine leukemia virus envelope protein gp70." J Virol **71**(3): 2092-9.
- Bateman, A., F. Bullough, S. Murphy, L. Emilusen, D. Lavillette, F. L. Cosset, R. Cattaneo, S. J. Russell und R. G. Vile (2000). "Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth." Cancer Res **60**(6): 1492-7.
- Buchholz, C. J., K. W. Peng, F. J. Morling, J. Zhang, F. L. Cosset und S. J. Russell (1998). "In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus display libraries." Nat Biotechnol **16**(10): 951-4.
- Buchholz, C. J., J. Stitz und K. Cichutek (1999). "Retroviral cell targeting vectors." Curr Opin Mol Ther **1**(5): 613-21.
- Chadwick, M. P., F. J. Morling, F. L. Cosset und S. J. Russell (1999). "Modification of retroviral tropism by display of IGF-I." J Mol Biol **285**(2): 485-94.
- Chandrashekan, A., M. Y. Gordon und C. Casimir (2004). "Targeted retroviral transduction of c-kit<sup>+</sup> hematopoietic cells using novel ligand display technology." Blood **104**(9): 2697-703.
- Chen, E. I., S. J. Kridel, E. W. Howard, W. Li, A. Godzik und J. W. Smith (2002). "A unique substrate recognition profile for matrix metalloproteinase-2." J Biol Chem **277**(6): 4485-91.
- Chowdhury, S., K. A. Chester, J. Bridgewater, M. K. Collins und F. Martin (2004). "Efficient retroviral vector targeting of carcinoembryonic antigen-positive tumors." Mol Ther **9**(1): 85-92.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes und H. E. Varmus (1997). Retroviruses. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Cohen, E. E. und C. M. Rudin (2001). "ONYX-015. Onyx Pharmaceuticals." Curr Opin Investig Drugs **2**(12): 1770-5.
- Cornetta, K., R. C. Moen, K. Culver, R. A. Morgan, J. R. McLachlin, S. Sturm, J. Selegue, W. London, R. M. Blaese und W. F. Anderson (1990). "Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates." Hum Gene Ther **1**(1): 15-30.
- Cornetta, K., R. A. Morgan und W. F. Anderson (1991). "Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans." Hum Gene Ther **2**(1): 5-14.
- Cosset, F. L., F. J. Morling, Y. Takeuchi, R. A. Weiss, M. K. Collins und S. J. Russell (1995). "Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain." J Virol **69**(10): 6314-22.
- Coughlan, A. R., D. H. Robertson, R. Burke, R. J. Beynon und S. D. Carter (1998). "Isolation and identification of canine matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)." Vet J **155**(3): 231-7.
- Deng, S. J., D. M. Bickett, J. L. Mitchell, M. H. Lambert, R. K. Blackburn, H. L. Carter, 3rd, J. Neugebauer, G. Pahel, M. P. Weiner und M. L. Moss (2000). "Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library." J Biol Chem **275**(40): 31422-7.
- Deperthes, D. (2002). "Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity." Biol Chem **383**(7-8): 1107-12.

- Dobbelstein, M. (2004). "Replicating adenoviruses in cancer therapy." Curr Top Microbiol Immunol **273**: 291-334.
- Donahue, R. E., S. W. Kessler, D. Bodine, K. McDonagh, C. Dunbar, S. Goodman, B. Agricola, E. Byrne, M. Raffeld, R. Moen und et al. (1992). "Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer." J Exp Med **176**(4): 1125-35.
- Eckhardt, M. (2004). Charakterisierung replikationskompetenter Retroviren mit herterologen, in der zytoplasmatischen Domäne veränderten Hüllproteinen. Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften. Frankfurt, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität. Diplomarbeit
- Finger, C., Y. Sun, L. Sanz, L. Alvarez-Vallina, C. J. Buchholz und K. Cichutek (2005). "Replicating retroviral vectors mediating continuous production and secretion of therapeutic gene products from cancer cells." Cancer Gene Ther.
- Folks, T., S. Benn, A. Rabson, T. Theodore, M. D. Hoggan, M. Martin, M. Lightfoote und K. Sell (1985). "Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(13): 4539-43.
- Galanis, E., R. Vile und S. J. Russell (2001). "Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors." Crit Rev Oncol Hematol **38**(3): 177-92.
- Guibinga, G. H., A. Miyanohara, J. D. Esko und T. Friedmann (2002). "Cell surface heparan sulfate is a receptor for attachment of envelope protein-free retrovirus-like particles and VSV-G pseudotyped MLV-derived retrovirus vectors to target cells." Mol Ther **5**(5 Pt 1): 538-46.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer und M. Cavazzana-Calvo (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Hanahan, D., J. Jessee und F. R. Bloom (1991). "Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria." Methods Enzymol **204**: 63-113.
- Hanahan, D. und M. Meselson (1983). "Plasmid screening at high colony density." Methods Enzymol **100**: 333-42.
- Hartl, I. (2000). Charakterisierung retroviraler Vektorsysteme. Fachbereich 14 Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften. Frankfurt, Johann-Wolfgang-Goethe Universität. Diplomarbeit
- Higuchi, H., S. F. Bronk, A. Bateman, K. Harrington, R. G. Vile und G. J. Gores (2000). "Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy." Cancer Res **60**(22): 6396-402.
- Hölzel, D., A. Klamert und M. Schmidt (1996). Krebs: Häufigkeiten, Befunde und Behandlungsergebnisse. Perspektiven für die Krebsregisterdiskussion und für eine quantitative klinisch-epidemiologische Onkologie aus dem Tumorregister München. München, W. Zuckschwerdt.
- Immonen, A., M. Vapalahti, K. Tynnela, H. Hurskainen, A. Sandmair, R. Vanninen, G. Langford, N. Murray und S. Yla-Herttuala (2004). "AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study." Mol Ther **10**(5): 967-72.
- Indraccolo, S. (2004). "Undermining tumor angiogenesis by gene therapy: an emerging field." Curr Gene Ther **4**(3): 297-308.

- Jain, R. K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." *Science* **307**(5706): 58-62.
- Kadono, Y., K. Shibahara, M. Namiki, Y. Watanabe, M. Seiki und H. Sato (1998). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in the formation of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching tubules in madin-darby canine kidney epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3): 681-7.
- Kim, F. J., J. L. Battini, N. Manel und M. Sitbon (2004). "Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture." *Virology* **318**(1): 183-91.
- Kinoh, H., M. Inoue, K. Washizawa, T. Yamamoto, S. Fujikawa, Y. Tokusumi, A. Iida, Y. Nagai und M. Hasegawa (2004). "Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases." *Gene Ther* **11**(14): 1137-45.
- Kirn, D., R. L. Martuza und J. Zwiebel (2001). "Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions." *Nat Med* **7**(7): 781-7.
- Kridel, S. J., E. Chen, L. P. Kotra, E. W. Howard, S. Mobashery und J. W. Smith (2001). "Substrate hydrolysis by matrix metalloproteinase-9." *J Biol Chem* **276**(23): 20572-8.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Larin, S. S., G. P. Georgiev und S. L. Kiselev (2004). "Gene transfer approaches in cancer immunotherapy." *Gene Ther* **11 Suppl 1**: S18-25.
- Lavillette, D., A. Ruggieri, S. J. Russell und F. L. Cosset (2000). "Activation of a cell entry pathway common to type C mammalian retroviruses by soluble envelope fragments." *J Virol* **74**(1): 295-304.
- Logg, C. R., A. Logg, C. K. Tai, P. M. Cannon und N. Kasahara (2001a). "Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary." *J Virol* **75**(15): 6989-98.
- Logg, C. R., C. K. Tai, A. Logg, W. F. Anderson und N. Kasahara (2001b). "A uniquely stable replication-competent retrovirus vector achieves efficient gene delivery in vitro and in solid tumors." *Hum Gene Ther* **12**(8): 921-32.
- Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin und D. Trono (2003). "Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts." *Nature* **424**(6944): 99-103.
- Martin, F., S. Chowdhury, S. J. Neil, K. A. Chester, F. L. Cosset und M. K. Collins (2003). "Targeted retroviral infection of tumor cells by receptor cooperation." *J Virol* **77**(4): 2753-6.
- Merten, C. A., J. Stitz, G. Braun, E. M. Poeschla, K. Cichutek und C. J. Buchholz (2005). "Directed evolution of retrovirus envelope protein cytoplasmic tails guided by functional incorporation into lentivirus particles." *J Virol* **79**(2): 834-40.
- Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson und M. V. Eiden (1991). "Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus." *J Virol* **65**(5): 2220-4.
- Miller, D. G., M. A. Adam und A. D. Miller (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4239-42.
- Mocellin, S., S. Mandruzzato, V. Bronte, M. Lise und D. Nitti (2004). "Part I: Vaccines for solid tumours." *Lancet Oncol* **5**(11): 681-9.
- Mullen, C. A., M. M. Coale, R. Lowe und R. M. Blaese (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**(6): 1503-6.
- Muller, O. J., F. Kaul, M. D. Weitzman, R. Pasqualini, W. Arap, J. A. Kleinschmidt und M. Trepel (2003). "Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors." *Nat Biotechnol* **21**(9): 1040-6.

- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Nagase, H., A. J. Barrett und J. F. Woessner, Jr. (1992). "Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases." Matrix Suppl **1**: 421-4.
- Noritake, H., H. Miyamori, C. Goto, M. Seiki und H. Sato (1999). "Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) in metastatic MDCK cells transformed by v-src." Clin Exp Metastasis **17**(2): 105-10.
- Overall, C. M. (2002). "Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites." Mol Biotechnol **22**(1): 51-86.
- Pacini, L., A. Vitelli, G. Filocamo, L. Bartholomew, M. Brunetti, A. Tramontano, C. Steinkuhler und G. Migliaccio (2000). "In vivo selection of protease cleavage sites by using chimeric Sindbis virus libraries." J Virol **74**(22): 10563-70.
- Peng, K. (1997). Protease-activatable targeted retroviral vectors, University of Cambridge: Pages 187-189. PhD Thesis
- Peng, K. W., R. Vile, F. L. Cosset und S. Russell (1999). "Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vectors." Gene Ther **6**(9): 1552-7.
- Perabo, L., H. Buning, D. M. Kofler, M. U. Ried, A. Girod, C. M. Wendtner, J. Enssle und M. Hallek (2003). "In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display." Mol Ther **8**(1): 151-7.
- Powell, S. K., M. A. Kaloss, A. Pinkstaff, R. McKee, I. Burimski, M. Pensiero, E. Otto, W. P. Stemmer und N. W. Soong (2000). "Breeding of retroviruses by DNA shuffling for improved stability and processing yields." Nat Biotechnol **18**(12): 1279-82.
- Rao, J. S. (2003). "Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases." Nat Rev Cancer **3**(7): 489-501.
- Rasmussen, S. und F. S. Pedersen (2004). "Complementarity between RNA dimerization elements favors formation of functional heterozygous murine leukemia viruses." Virology **329**(2): 440-53.
- Reichard, K. W., R. M. Lorence, C. J. Cascino, M. E. Peebles, R. J. Walter, M. B. Fernando, H. M. Reyes und J. A. Greager (1992). "Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells." J Surg Res **52**(5): 448-53.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Saukkonen, K. und A. Hemminki (2004). "Tissue-specific promoters for cancer gene therapy." Expert Opin Biol Ther **4**(5): 683-96.
- Schneider, R. M., Y. Medvedovska, I. Hartl, B. Voelker, M. P. Chadwick, S. J. Russell, K. Cichutek und C. J. Buchholz (2003). "Directed evolution of retroviruses activatable by tumour-associated matrix metalloproteases." Gene Ther **10**(16): 1370-80.
- Shuman, S. (1994). "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase." J Biol Chem **269**(51): 32678-84.
- Smith, M. M., L. Shi und M. Navre (1995). "Rapid identification of highly active and selective substrates for stromelysin and matrilysin using bacteriophage peptide display libraries." J Biol Chem **270**(12): 6440-9.
- Stojdl, D. F., B. D. Lichty, B. R. tenOever, J. M. Paterson, A. T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E. G. Brown, R. K. Durbin, J. E. Durbin, J. Hiscott und J. C. Bell (2003). "VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents." Cancer Cell **4**(4): 263-75.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

- Trajcevski, S., S. K. Solly, C. Frisen, A. Trenado, F. L. Cosset und D. Klatzmann (2004). "Characterization of a semi-replicative gene delivery system allowing propagation of complementary defective retroviral vectors." J Gene Med.
- Turk, B. E. und L. C. Cantley (2003). "Peptide libraries: at the crossroads of proteomics and bioinformatics." Curr Opin Chem Biol **7**(1): 84-90.
- Upadhye, S. und V. S. Ananthanarayanan (1995). "Interaction of peptide substrates of fibroblast collagenase with divalent cations: Ca<sup>2+</sup> binding by substrate as a suggested recognition signal for collagenase action." Biochem Biophys Res Commun **215**(2): 474-82.
- Vassaux, G. und P. Martin-Duque (2004). "Use of suicide genes for cancer gene therapy: study of the different approaches." Expert Opin Biol Ther **4**(4): 519-30.
- Vu, T. H. und Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-33.
- Walker, S. J., M. Pizzato, Y. Takeuchi und S. Devereux (2002). "Heparin binds to murine leukemia virus and inhibits Env-independent attachment and infection." J Virol **76**(14): 6909-18.
- Wang, W. J., C. K. Tai, N. Kasahara und T. C. Chen (2003). "Highly efficient and tumor-restricted gene transfer to malignant gliomas by replication-competent retroviral vectors." Hum Gene Ther **14**(2): 117-27.
- Woessner, J. F. und H. Nagase (2000). "Matrix Metalloproteinases and TIMPs." Oxford University Press, UK.
- Worthington, M. T., J. Pelo und R. Q. Lo (2001). "Cloning of random oligonucleotides to create single-insert plasmid libraries." Anal Biochem **294**(2): 169-75.
- Wu, X., Y. Li, B. Crise und S. M. Burgess (2003). "Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration." Science **300**(5626): 1749-51.
- [www.pei.de](http://www.pei.de) (2005). Dritter Tumorfall nach SCID-Gentherapie, PEI.
- Yang, L. und D. P. Carbone (2004). "Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction." Adv Cancer Res **92**: 13-27.

## 8 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

### 8.1 Basen und Basenkombinationen nach IUPAC

A	Adenin	N	A+T+G+C
G	Guanin	H	C+A+T
C	Cytosin	Y	T+C
T	Thymin	D	G+T+A
U	Uracil	R	A+G

### 8.2 Aminosäuren

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

### 8.3 Anglizismen

Biodistribution	Verteilung oder Ausbreitung z.B. eines Virus im Körper
Display	Präsentation von Proteinen oder Peptiden auf Viren oder Zellen
Escape-Mutante	Eine Mutante, die z.B. dem Selektionsdruck entkommt
Marker	Größenstandard bei der Auftrennung von Proteinen oder DNA-Fragmenten
Stock	Aliquotierter Vorrat an titriertem Virusüberstand
Template	Matritze in der PCR
Targeting	Einschränkung des viralen Tropismus auf bestimmte Zielzellen
Tag	an ein Protein angefügtes Antikörperepitop zur einfachen Detektion (z.B. FLAG-Tag oder His-Tag)
Primer	Starter-Oligonukleotide in der PCR
Pool	Gesamtheit der Varianten z.B. einer Bibliothek

## 8.4 Sonstige Abkürzungen

$\mu$	Mikro-
A	Absorption oder Ampere
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
AZT	3'-Azido-3'-Desoxythymidin, ein RT-Hemmer
b	Base
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
c	Zenti-
ca.	circa
CD	Cytosindeaminase
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
CTP	Cytidin-triphosphat
d	Tag ( <i>day</i> ) oder Desoxy-
d.h.	dass heißt
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
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>	Escherichia coli
ECL	erhöhte Chemolumineszenz ( <i>enhanced chemoluminescence</i> )
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	photometrische Immunfärbemethode ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )

Env	Hüllprotein, bestehend aus den Untereinheiten TM und SU
env	retrovirales Strukturgen, welches für das Hüllprotein ( <i>envelope protein</i> ) kodiert
ER	Endoplasmatische Retikulum
et al.	und andere
F	Farad
FACS	fluoreszenzaktivierte Zell-Erkennung (Sortierung)
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
Gag	Genprodukte des gag-Gens
gag	retrovirales Strukturgen, welches für die gruppenspezifischen Proteine ( <i>group-specific antigen</i> ) des Viruskapsids und des Viruskerns kodiert
GalV	Gibbonaffen Leukämie Virus, das Hüllprotein wird in der Gentherapie verwendet
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
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)
Hy	hydrophobe AS
i.E.	infektiöse Einheit
IPA	Immunperoxidase-Assay
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IUB	International Union of Biochemistry
k	Kilo-
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
lacZ	bakterielles Gen, welches für die $\beta$ -Galaktosidase kodiert
LB	Lauri Bertani
log	Logarithmus
LTR	Endsequenzen des retroviralen Genoms ( <i>long terminal repeat</i> )
m	Milli- oder Meter
M	Molar

m.o.i.	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
MDCK	<i>madin darby canine kidney</i> Zelllinie
min	Minute(n)
MLV	Murines Leukämievirus
MMP	Matrix Metalloprotease
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
n	Nano-
NEB	New England Biolabs
NTP	Nukleosid-triphosphat
OD	optische Dichte
p	Piko-
p.a.	pro analysis
p.i.	post infection
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
<i>pol</i>	retrovirales Gen, welches für die viralen Proteine mit enzymatischer Aktivität kodiert
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
Ram-1	zellulärer Rezeptor des amphotropen MLV
RLV	Rauscher Leukämie Virus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	Kulturmedium aus dem „Roswell Park Memorial Institute“
rPSB	retrovirale Protease-Substrat-Bibliothek
RT	Reverse Transkriptase
s. Kap.	siehe Kapitel
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> , schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> )
sec	Sekunde(n)
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
β-Gal	β-Galaktosidase
SU	Oberflächenhüllprotein ( <i>surface protein</i> )

SV40	simianes Virus 40
TAE	Trisacetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TAP	Tumorassoziierte Protease
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
TFB	Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien ( <i>transformation buffer</i> )
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloprotease</i>
T <sub>m</sub>	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
UTP	Uridin-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen ( <i>volume</i> )
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w	Gewicht ( <i>weight</i> )
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
Ψ	Verpackungssignal der viralen genomischen RNA Psi
α - x	Antikörper gegen x

## 9 Danke

Bei der Anfertigung dieser Arbeit war ich auf die Unterstützung vieler angewiesen. Einigen davon möchte ich hiermit namentlich danken:

DANKE an Dr. Christian Buchholz für das interessante Thema, die gründliche Durchsicht dieses Manuskripts und seine Gelassenheit in allen Dingen.

DANKE an Prof. Klaus Cichutek für spannende und kontroverse Diskussionen zum Fortgang der Arbeit und für den Platz in seiner Abteilung.

DANKE an Prof. Bernd Ludwig für die freundliche und aufmerksame Betreuung von Seiten der Uni seit meinem Studium.

DANKE an Yuansheng Sun für die Hilfe bei den Tierexperimenten, und an Astrid und Bernhard, für die Fortführung des Projekts.

DANKE dem YFSCC für die schöne Zeit und die Projekt-übergreifende Diskussionsbereitschaft, besonders Daphne, Nina, Melli, Manon und Renate K. für ihre Freundschaft.

DANKE an Richard für die Pionierarbeit, an Christoph und Jörn für die gemeinsamen kreativen Spinnereien, Hauke und Manon für die „gestohlene“ Zeit, Julia M. für die technische Assistenz, Gundi für viele kleine rettende Gefallen, Carsten für den nötigen „Ernst“ bei der Sache, Matthias H. für viele Ideen zu Blockierungsdomänen und therapeutischen Genen, den Kochgruppen für die leckeren Rezepte, und überhaupt an alle PEI-ler, für ihre Hilfsbereitschaft und Nahrungsmittel.

Ich habe von Euch allen viel gelernt!

DANKE an meine Eltern, Geschwister und Großeltern für die nötige Ablenkung und die großartige Unterstützung in allen Lebenslagen.

DANKE an Jens für alles was Du für mich bist.

## 10 Lebenslauf

Name: Irene Hartl  
Geburtsdatum: 28. August 1975  
Geburtsort: Hanau  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Ausbildung:**

---

#### **Promotionsstudium der Biochemie**

*März 2001 bis dato*

Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt, Betreuung durch Prof. Dr. Bernd Ludwig

#### **Doktorarbeit**

*Februar 2001 bis August 2004*

Paul-Ehrlich-Institut, Langen,

Abteilung Medizinische Biotechnologie, Fachgebiet Gentransfer Arzneimittel I

Leitung: PD Dr. C. Buchholz

„Tumor-Targeting: Selektion konditional replizierender Retroviren durch gerichtete Evolution“

#### **Diplomarbeit**

*Januar bis November 2000*

Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Abteilung Medizinische Biotechnologie

Leitung: Prof. Dr. K. Cichutek

Thema: „Charakterisierung semireplikationskompetenter retroviraler Vektorsysteme“

Verleihung des akademischen Titels: **Diplom-Biochemikerin**

#### **Studium der Biochemie**

*Oktober 1995 bis November 2000*

Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt

Gesamtnote der Diplom - Vorprüfung im September 1997: „sehr gut“

Gesamtnote der Diplom - Hauptprüfung im November 2000: „sehr gut“ mit Auszeichnung

#### **Abitur (Allgemeine Hochschulreife)**

*Juni 1995*

Gymnasium der Marienschule der Ursulinen, Offenbach

Leistungsfächer: Mathematik, Biologie, Musik; Abiturnote: 1,8

---

**Publikationen :**

---

**I. Hartl**, R.M. Schneider, Y. Sun, J. Medvedovska, M.P. Chadwick, S.J. Russell, K. Cichutek and C.J. Buchholz. ***Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells.*** Gene Therapy (2005): Feb 17 online publiziert

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

---

**Vorträge:**

---

**I. Hartl**, R.M. Schneider, Y. Sun, A. Schwantes, J. Medvedovska, M.P. Chadwick, S.J. Russell, K. Cichutek and C.J. Buchholz.

***Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells.***

Vortrag an der ESGT (European Society of Gene Therapy) Tagung in Tampere, Finnland, November 2004, Vortragende A. Schwantes

**I. Hartl**, R. Schneider, Y. Medvedowska, Y. Sun, S.J. Russell, K. Cichutek, C.J. Buchholz.

***Directed in vivo evolution of Retroviruses activatable by tumour-associated matrix metalloproteases.***

Vortrag an der "International Union of Microbiological Societies"- Tagung, Paris, Juli 2002

**I. Hartl**, J. Stitz, S. Steidl, K. Cichutek.

***Herstellung und Charakterisierung von semi-replikationskompetenten retroviralen Vektoren.***

Vortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Dresden, März 2001