

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)



**Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Liganden
des medullären Schilddrüsenkarzinoms zur Entwicklung
tumorselektiver Adenoviren**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Miriam Böckmann
aus Bochum

Oktober 2004

Der Hauptteil der in der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurde am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte ein Teil der hier aufgeführten Experimente in der Arbeitsgruppe Vektorologie und Experimentelle Gentherapie des Universitätsklinikums Rostock.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. B. Pützer

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Verwendung viraler Vektorsysteme in der Genterapie	1
1.2 Adenoviren als genterapeutische Vehikel	3
1.3 Adenovirus-Zell-Interaktion	7
1.4 Modifikation des natürlichen Tropismus von Adenoviren zur zielzellgerichteten Transduktion ('targeting')	11
1.5 Das medulläre Schilddrüsenkarzinom als Modellsystem zum zielgerichteten Gentransfer	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme	21
2.1.2 Kits	21
2.1.3 Plasmide	22
2.1.4 Bakterienstämme	23
2.1.5 Zelllinien	23
2.1.6 Adenoviren	24
2.1.7 Versuchstiere	24
2.1.8 Oligonukleotide	25
2.1.9 Antikörper	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 DNA-Arbeitstechniken	27
2.2.1.1 Mini-Plasmidpräparation	27
2.2.1.2 Maxi-Plasmidpräparation	27
2.2.1.3 DNA-Restriktion	29
2.2.1.4 Auffüllen 5'-überhängender Enden	29
2.2.1.5 DNA-Dephosphorylierung	29
2.2.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.7 Elution aus Agarosegelen	30
2.2.1.8 Ligation	30
2.2.1.9 Herstellung elektrokompetenter Bakterien	30
2.2.1.10 Bakterielle Transformation mittels Elektroporation	31
2.2.1.11 Bakterielle Transformation mittels Hitzeschock	31
2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.1.13 Zielgerichtete Mutagenese	32
2.2.1.14 DNA-Konzentrationsbestimmung	32
2.2.2 RNA-Arbeitstechniken	33
2.2.2.1 RNA-Präparation	33
2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.2.2.3 Reverse Transkription	33
2.2.3 Protein-Arbeitstechniken	33
2.2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	33
2.2.3.2 Herstellung von Gewebsextrakten	34

2.2.3.3	Protein-Konzentrationsbestimmung	34
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.3.5	Western Blot	35
2.2.3.6	Immundetektion	35
2.2.4	Zellkulturarbeiten und Transfektionsmethoden	36
2.2.4.1	Allgemeine Zellkultur	36
2.2.4.2	Zellzahlbestimmung	36
2.2.4.3	Calciumphosphat-Transfektion	36
2.2.4.4	Verschiedene Transfektionsmethoden	37
2.2.5	Adenovirale Arbeitstechniken	37
2.2.5.1	Das AdEasy-System	37
2.2.5.2	Modifizierung des adenoviralen Vektorrückgrats und Virusgenerierung	37
2.2.5.3	Transduktion	38
2.2.5.4	CsCl-Dichtegradientenaufreinigung	38
2.2.5.5	Virustitration	39
2.2.5.6	"PEGylierung" von adenoviralen Vektoren	40
2.2.6	Verwendung von Phagenbanken - <i>'phage display'</i>	40
2.2.6.1	Phagentitration	41
2.2.6.2	<i>In vitro 'biopanning'</i>	41
2.2.6.3	<i>In vivo 'biopanning'</i>	42
2.2.6.4	Herstellung kompetenter Bakterien zur effizienten Phagentransduktion	42
2.2.6.5	Phagentransduktion	43
2.2.6.6	Phagenpräparation über CsCl-Dichtegradienten- zentrifugation	43
2.2.6.7	Phagenpräparation nach NEB	44
2.2.6.8	ELISA: Untersuchung zur Bindeaffinität	45
2.2.6.9	Spezifitätsanalysen auf verschiedenen Zelllinien mittels Titration	45
2.2.6.10	Kompetitionsversuch <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	46
2.2.6.11	Immunzytochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie	46
2.2.6.12	Immunhistochemie	47
2.2.7	Tierexperimente	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Analyse primärer adenoviraler Zellrezeptoren in unterschiedlichen MTC-Modellen	49
3.1.1	Analyse des CAR- und Integrin-Expressionsstatus in verschiedenen Zelllinien	50
3.1.2	CAR- und Integrinexpression im Xenotransplantatmodell	51
3.1.3	Transkriptanalyse adenoviraler Zellrezeptoren im <i>RET</i> - transgenen Mausmodell	53
3.2	Identifizierung MTC-spezifischer Peptidliganden	54
3.2.1	<i>'Biopanning'</i> : Anreicherung spezifischer Phagen	55
3.2.2	Isolierung und Selektion potenzieller MTC-Liganden	57
3.2.3	Verifizierung der Zielzellspezifität pro-selektierter Phagen aus humanen MTC-Modellen	60
3.2.4	Verifizierung der Gewebsspezifität pro-selektierter Phagen im murinen MTC-Modell	64
3.2.5	Analyse zur peptidabhängigen Bindung der Phagen an die Zielzelle	66
3.2.6	Rezeptor-vermittelte Internalisierung potenzieller MTC-Liganden	70

3.3 Verifizierung des MTC-Liganden HTFEPGV im adenoviralen Kontext	73
3.3.1 Gentransfer des Vektors Ad.GFP.HTFEPGV in Anwesenheit neutralisierender Antikörper	73
3.3.2 Etablierung eines Systems zur Integration von Peptidsequenzen in das Adenovirusrückgrat	75
4 Diskussion	78
4.1 Adenovirale Rezeptoreigenschaften unterschiedlicher MTC-Modelle	79
4.2 Identifizierung spezifischer Peptidliganden	81
4.3 Spezies- und Zellspezifität identifizierter Peptidliganden	86
4.4 Verhalten der Liganden im adenoviralen Kontext	88
4.5 Ausblick und zukünftige Therapiemöglichkeiten	90
5 Zusammenfassung	91
6 Literaturverzeichnis	92
Danksagungen	109
Publikationsliste	110
Lebenslauf	111
Erklärungen	112

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ACE	<i>'angiotensin converting enzyme'</i>
Ad	Adenovirus
APC	Antigen präsentierende Zellen
ApoE	Apolipoprotein E
APN	Aminopeptidase N
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5' Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	Coxsackie B-Adenovirus Rezeptor
CEA	<i>'carcinoembryonic antigen'</i>
cDNA	komplementäre DNA
c-erbB2	<i>'receptor protein-tyrosin kinase erbB2'</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cox-2	Zyklooxygenase-2
CPE	zytopathischer Effekt
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
D1	aminoterminal V-ähnliche Ig Domäne 1
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E	<i>'early region'</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N-Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>'enzyme immunosorbent assay'</i>
v-erbB2	<i>'erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2'</i>
et al.	et alii
FCS	Fötale Kälberserum

FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FMTC	Familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GVHD	<i>'graft versus host disease'</i>
HBS	<i>'HEPES-buffered saline'</i>
HD	Helfer-abhängig (= <i>'helper-dependent'</i>)
HIV	Humanes immunodefizientes Virus
HRP	<i>'horse radish peroxidase'</i>
HRSC	Hirschsprung-Erkrankung
HSV-tk	Herpes simplex Virus Thymidinkinasegen
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
ITR	inverse terminale Repetitionen
L	<i>'late region'</i>
LMO2	<i>'LIM domain only 2'</i>
LOX 1	<i>'lectinlike oxidized LDL receptor'</i>
MEN2A	Multiple endocrine Neoplasien Typ 2A
MEN2B	Multiple endocrine Neoplasien Typ 2B
MHC	<i>'major histocompatibility complex'</i>
MOI	Infektionsmultiplizität (= <i>'multiplicity of infection'</i>)
mRNA	messenger RNA
HSG	Heparansulfat Glukosaminoglykan
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS⁻	<i>'phosphate buffered saline'</i> ohne Magnesium und Calcium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque bildende Einheiten (= <i>'plaque forming units'</i>)
pH	potentia hydrogenii
PI	Protease Inhibitor
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RET	<i>'rearranged during transfection'</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute (= ' <i>rounds per minute</i> ')
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
sCAR	lösliches CAR (= ' <i>soluble</i> ' CAR)
SCID-X1	' <i>severe combined immunodeficiency X1</i> '
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLPI	' <i>secretory leukoprotease inhibitor gene</i> '
TCID₅₀	infektiöse Dosis in Zellkultur
tet	Tetrazyklin
T_M	Schmelztemperatur
TMPEG	tresyl-monomethoxy Polyethylenglykol
TNF	' <i>tumor necrosis factor</i> '
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE2.CP1	synthetischer Calcitonin-Promotor
TSP	tumorspezifischer Promotor'
v/v	' <i>volume per volume</i> '
w/v	' <i>weight per volume</i> '
wt	Wildtyp
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid

Allgemeine übliche Abkürzungen und gebräuchliche Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt. Abkürzungen für Aminosäuren, Nukleotide oder chemische Verbindungen entsprechen den IUPAC-Regeln.

1 Einleitung

Die Gentherapie stellt bei der Tumorintervention ein alternatives Konzept zu herkömmlichen Therapien dar. Ihr Ziel ist im Gegensatz zu bisherigen Therapieansätzen, die sich auf die Behandlung der Krankheitssymptome beschränken, die Behandlung der Krankheitsursachen. Der Leitgedanke der Gentherapie basiert auf der Tatsache, dass genetische Veränderungen die Ursachen für verschiedene Formen von Krankheiten sind. Dies konnte überwiegend für monogenetisch vererbte Krankheiten wie "Zystische Fibrose", Störungen der Koagulation oder vererbte immunologische Defizite beobachtet werden. Weit verbreitete Krankheiten wie die Entwicklung von Tumoren oder vaskuläre Fehlfunktionen beruhen ebenfalls auf Mutationen in verantwortlichen Genen und der daraus resultierenden veränderten Genexpression. Ebenso können virale Infektionen, z.B. durch das humane immunodefiziente Virus (HIV), als genetische Veränderungen betrachtet werden. Mit Hilfe der Gentherapie können nun diese Gendefekte ausgeglichen werden, indem das defekte Gen durch eine intakte Kopie ausgetauscht wird. Die Vervollständigung des *'human genome project'* und die ständige Identifizierung krankheitsverantwortlicher Gene bieten ein enormes Potenzial zur Etablierung gentherapeutischer Ansätze. Daher wurden viele Strategien zur Heilung verschiedener Krankheiten entwickelt und bewertet (Verma und Somia, 1997; Somia und Verma, 2000). Neben monogenetischen (9,8%) und vaskulären Fehlfunktionen (8,3%) sind vorwiegend Tumorerkrankungen (66%) klinische Ziele gentherapeutischer Studien (Abb. 1.1 A).

1.1 Verwendung viraler Vektorsysteme in der Gentherapie

Um eine erfolgreiche Gentherapie durchzuführen, muss eine geeignete Menge des therapeutischen Gens in das Zielgewebe transportiert werden ohne unerwünschte Nebeneffekte auszulösen. Virale Systeme eignen sich besonders gut als gentherapeutische Vehikel. Jedes virale Vektorsystem besitzt bestimmte charakteristische Merkmale, die es für eine spezifische therapeutische Anwendung geeignet macht. Bei manchen Funktionsstörungen ist z.B. eine Langzeit-Expression innerhalb weniger Zellen ausreichend (genetische Fehlfunktionen), während für andere Erkrankungen eine höhere transiente Expression benötigt wird.

Unter den verwendeten Vektorsystemen stellen Retroviren und Adenoviren die größte Gruppe dar (Abb. 1.1 B). Die Familie der Retroviren setzt sich aus unterschiedlichen Gruppen zusammen; den C-Typ Retroviren ("Mammalia" und "Avia"), die auch als Onkoretroviren bezeichnet werden, sowie den Lenti- und Spumaviren (Kay et al.,

2001). Onkoretroviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie einfach zu konstruieren sind, stabil ins Wirtsgenom integrieren und somit zur Langzeit-Expression übermittelter Gene befähigt sind. Allerdings können sie ausschließlich replizierende Zellen infizieren und sind assoziiert mit malignen Erkrankungen oder Immundefekten (Coffin et al., 2000). Gleichwohl sind sie in der Gentherapie weit verbreitet und werden in klinische Studien wie der 'suicide' Gentherapie mittels des Herpes simplex Virus Thymidinkinase Gens (*HSV-tk*) zur Kontrolle der 'graft-versus-host' Krankheit (GVHD) (Bonini et al., 1997) eingesetzt. Hier wurden Donorlymphozyten mit *HSV-tk* transduziert, wodurch diese Zellen ganziklovirsensitiv wurden und über Zugabe dieses Reagenz beseitigt werden konnten. Eine andere klinische Studie beschäftigt sich mit der Behandlung von Gendefekten in immundefizienten Patienten mit 'severe combined immunodeficiency' (SCID-X1) Syndrom (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Zur Behandlung dieser Patienten wurde die cDNA der γ -Kette eines Cytokinrezeptors über retroviralen Transfer in hämatopoetische Stammzellen transformiert. Hierbei kam es zu einer retroviralen Insertion ins Wirtsgenom im sogenannten Onkogen '*LIM domain only 2*' (LMO2), was zu einer Aktivierung der LMO2-Expression und leukämieähnlichen Symptomen führte (Check, 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Kaiser, 2003). Alle bisher in der Gentherapie verwendeten Vektorsysteme und ihre Häufigkeit in der Verwendung bis 2004 sind unter Abb. 1.1 B dargestellt.

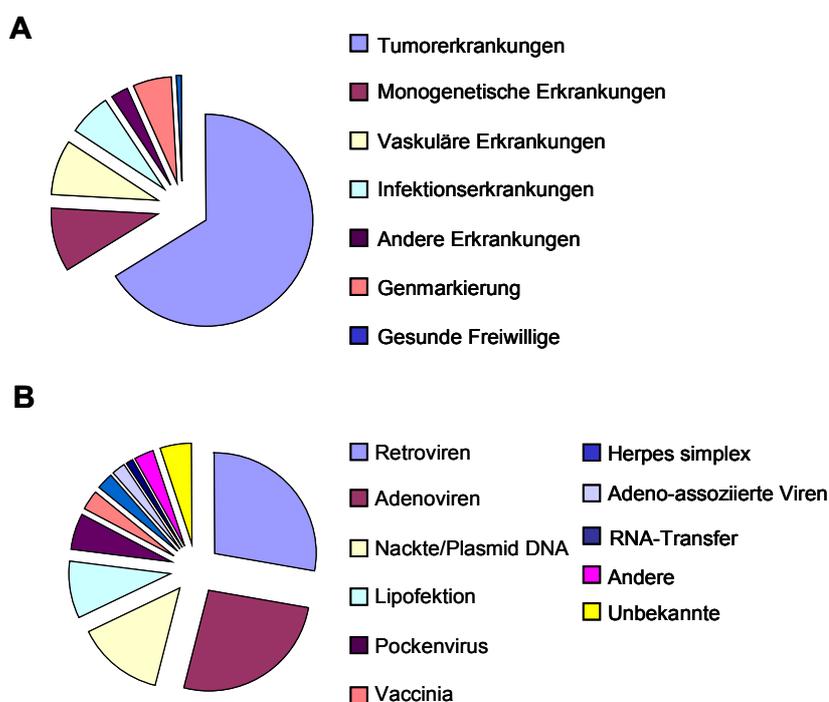


Abb. 1.1: Teilausschnitt einer schematischen Übersicht zu angewendeten klinischen Studien bis 2004. A) Klinische Zielgruppen für die angewandte Gentherapie, B) Verteilung der viralen Vektorsysteme in gentherapeutischen Studien (verändert nach Edelstein et al., 2004).

1.2 Adenoviren als gentherapeutische Vehikel

Adenoviren sind mit 26% neben Retroviren (28%) die meist verwendeten Vektoren, die in der heutigen Gentherapie eingesetzt werden. In den letzten vier Jahrzehnten wurden sie nach ihrer erstmaligen Entdeckung weitgehend charakterisiert. Ihre Fähigkeit, eine große Bandbreite an unterschiedlichen Zelltypen effizient zu transduzieren, macht sie zu einem geeigneten Vehikel für therapeutische Gene. Sie sind in der Lage, Zellen unabhängig von ihrem Replikationsstatus zu infizieren (Brody und Crystal, 1994; Bramson et al., 1995), besitzen die Fähigkeit, große Mengen heterologer DNA in ihr Genom zu inkorporieren und können zu hohen Titern generiert werden (Hitt et al., 1995). Adenoviren infizieren überwiegend den respiratorischen und gastrointestinalen Trakt und induzieren dabei grippeähnliche Symptome. Bisher konnten keine humanen neoplastischen Erkrankungen mit ihnen assoziiert werden. Lediglich eine geringe Menge von adenoviralen Vektoren (AdVektoren) ist in der Lage, Tumoren in einigen Tiermodellen zu induzieren, z.B. induziert der Adenovirus-Serotyp 12 (Ad12) Hirntumore in Ratten (Doerfler et al., 1980) oder neuroektodermale Tumore in syrischen Hamstern (Hohlweg et al., 2003; Hohlweg et al., 2004). Im Gegensatz zu Retroviren integrieren Adenoviren nicht stabil in das Wirtsgenom, so dass mutagene Effekte wie bei Retroviren weitgehend auszuschließen sind.

Humane Adenoviren sind in sechs Untergruppen klassifiziert. Diese Klassifikation basiert auf Kriterien wie z.B. der Hämagglutinationseigenschaft, der Onkogenität sowie der DNA-Homologie. Diese Untergruppen unterteilen sich in verschiedene Serotypen, die sich durch ihre antigene Kreuz-Reaktivität unterscheiden (Horwitz et al., 1990). Nahezu 50 Serotypen wurden bisher identifiziert und charakterisiert (Shenk et al., 1996). Morphologisch stellen AdViren hüllenlose DNA-Viren dar, deren doppelsträngig lineares Genom 30-40 kb umfasst. Sie werden in ikosaedrische Partikel mit einem Durchmesser von 140 nm verpackt (Stewart et al., 1991). Das Kapsid ist aus 240 Hexonkapsomeren, die 20 dreieckige Oberflächen des Ikosaeders bilden, und aus 12 Pentonkapsomeren, die aus Pentonbasis, Fiberschaft und *'fiber knob'* bestehen, zusammengesetzt (Abb. 1.2).

Das adenovirale Genom umfasst die frühen Regionen E1 bis E4, die für regulatorische Proteine kodieren, und die späten Regionen L1 bis L5, die für die Strukturproteine kodieren. Das Genom ist flankiert von inversen terminalen Repetitionen (ITR), die den Startpunkt für die virale DNA-Replikation darstellen. Die Proteine der Region E1 sind an der Virus-Replikation sowie an der Expression der frühen und späten Gene beteiligt. Sie begünstigen außerdem den viralen und vermindern den mRNA-Transport des

Wirts. Durch das Entfernen dieser Region E1 werden Adenoviren replikationsdefekt (Roy-Chowdhury und Horwitz, 2002). Die drei Genprodukte der Region E2 sind direkt an der DNA-Replikation als DNA-Bindeproteine, als DNA-Polymerase und als terminaler Proteinvorläufer beteiligt (Horwitz, 1990). Die Region E3 kodiert für Proteine, die die antivirale Immunantwort reduzieren und die durch den 'tumor necrosis factor' (TNF) induzierte Lyse und Apoptose von infizierten Zellen blockieren (Tollefson et al., 1998).

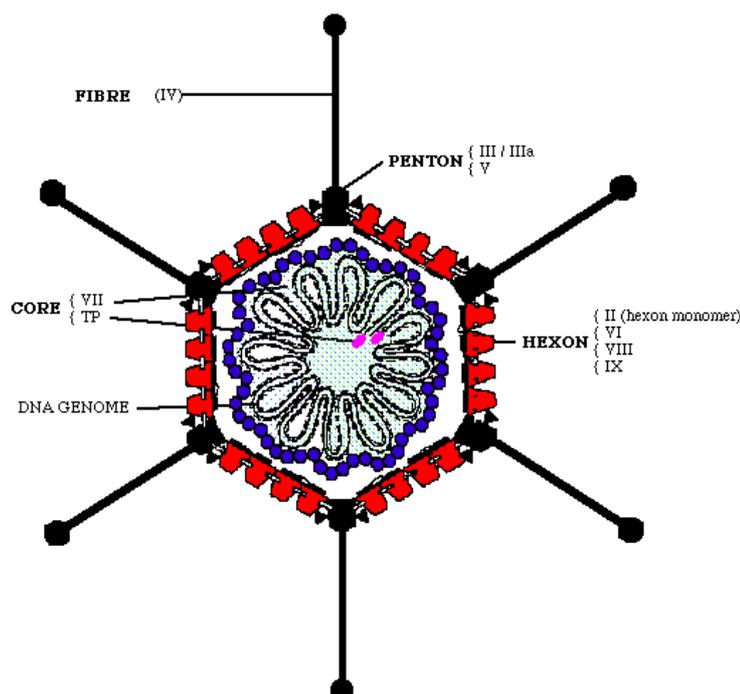


Abb. 1.2: Schematische Darstellung zur Morphologie eines Adenovirus. II Hexonmonomer, III Pentonbasis, IIIa assoziiert mit Pentonbasis, IV Fiber, V Core: assoziiert mit DNA und Pentonbasis, VI kleines Hexonpolypeptid, VII Core, VIII kleines Hexonpolypeptid, IX kleines Hexonpolypeptid, TP Genom- terminales Protein.

Sie werden nicht für die Virusproduktion *in vitro* benötigt (Wold et al., 1995). Proteine der Region E4 sind verantwortlich für den viralen RNA-Transport und ihre Stabilität sowie für die Akkumulation viraler DNA und die transkriptionelle Regulation der Regionen E2 und E4. Die Expression der späten Gene beginnt nach der Initiation der viralen DNA-Replikation. Hierbei wird das primäre Transkript gespleißt und polyadenyliert, so dass fünf Familien von mRNAs produziert werden, die für die Strukturproteine des Virions kodieren, z.B. L2 für die Pentonbasis, L3 für die Hexone und L5 für das Fiberprotein.

Die in der Gentherapie meist verwendeten adenoviralen Vektoren sind aus den Adenovirus-Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) entstanden, die der Untergruppe C

zugehörig sind (Roberts et al., 1984; Chroboczek et al., 1992). Konventionell verwendete replikationsdefekte Vektoren werden als sogenannte "Erst-Generations"-Vektoren bezeichnet. Diese basieren auf der Substitution der Region E1 durch ein Transgen bzw. durch ein therapeutisches Gen, das in die Zielzelle gebracht werden soll. Infolgedessen sind die Funktionen der Region E1 in transduzierten Zellen nicht aktiv, so dass der Vektor unter regulären Bedingungen in diesen Zellen nicht replizieren kann. Für die Vektorgenerierung müssen daher die E1-Funktionen in einer komplementären Verpackungszelllinie in *trans* exprimiert werden. Dafür werden vorwiegend embryonale Nierenzellen (293) verwendet, die zuvor mit der AdRegion E1 transformiert wurden (Graham et al., 1977; Fallaux et al., 1998; Schiedner et al., 2000). Zusätzlich können "Erst-Generations"-Vektoren eine Deletion der Region E3 tragen, die zur viralen Replikation in Zellkultur nicht benötigt wird. Daraus ergibt sich für diese Vektoren eine Klonierungskapazität von 8 kb.

Trotz der hohen Effizienz der Transgenübermittlung weisen "Erst-Generations"-Vektoren in einigen Tierexperimenten und auch klinischen Studien Nachteile auf, da die Expression viraler Gene hierbei zu direkter Toxizität und Immunogenität gegen virale Genprodukte führen kann. Eine zytotoxische T-lymphozytär (CTL) vermittelte Immunantwort führt zur Beseitigung vektortransduzierter Zellen und einer verkürzten Transgenexpression (Yang et al., 1994; Yang et al., 1995; Lusky et al., 1998). Eine humorale Immunantwort kann ebenfalls direkt gegen das exprimierte Transgen sowie das injizierte Viruspartikel erfolgen, was eine Readministration der Viren erschwert (Dai et al., 1995; Mastrangeli et al., 1996; DeMatteo et al., 1997; Mack et al., 1997; Chirmule et al., 1999). Um die anti-adenovirale Antwort zu umgehen, kann auf der einen Seite die Expression viraler Gene reduziert werden, was in folgenden Abschnitten beschrieben wird, oder auf der anderen Seite die Wirtszellimmunantwort beeinflusst werden. Einige Erfolge konnten dabei mit Immunsuppressiva wie Zyklosporin A, Zyklophosphamiden, Deoxypergulain sowie FK506, die eine zelluläre und in einigen Fällen auch die humorale Immunantwort verzögern (Dai et al., 1995; Fang et al., 1995; Smith et al., 1996; Kaplan und Smith, 1997; Kuriyama et al., 2000), erreicht werden. Einen ähnlichen Effekt erzielten anti-CD4, anti-CD8 und anti-T Zellrezeptor Antikörper. Durch den Einsatz von anti-CD8 und anti-T Zellrezeptor Antikörpern konnte eine Verminderung der CTLs und damit eine anhaltende Transgenexpression erreicht werden (Poller et al., 1996; Sawchuk et al., 1996). Neben der verzögerten CTL-Antwort konnte eine transiente Verminderung CD4-positiver T-Zellen durch anti-CD4 Antikörper das Auftreten von anti-Ad neutralisierenden Antikörpern verhindern. Eine alternative Strategie ist die Reduktion der Immunantwort durch eine Blockade mittels kostimulatorischer Interaktion zwischen Antigen

präsentierenden Zellen (APCs), T- und B-Zellen. Hierbei kann z.B. durch systemische Gabe von CTLA4Ig ebenfalls eine verlängerte Transgenexpression erzielt werden, da eine verminderte T-Zellaktivierung erreicht wird (Kay et al., 1995; Guerette et al., 1996; Jooss et al., 1998).

Auf dieser wissenschaftlichen Grundlage wurden adenovirale Vektoren weiterhin modifiziert, indem für die Transgenübermittlung nicht benötigte Gene ausgeschaltet bzw. entfernt wurden. Die sogenannten "Zweit-Generations"-Vektoren besitzen neben den Deletionen in Region E1 und E1/E3 weitere Deletionen oder Inaktivierungen der Region E2 (z.B. bei Konstruktion temperatursensitiver Mutanten). Verglichen mit "Erst-Generations"-Vektoren vermitteln diese Vektoren eine längere Transgenexpression und sind mit einer schwächeren Immunantwort assoziiert (Engelhardt et al., 1994). "Zweit-Generations"-Vektoren können zusätzlich in der E4-Funktion deletiert sein, was ebenfalls zu einer andauernden Transgenexpression mit reduzierter Immunantwort führt (Armentano et al., 1995; Gao et al., 1996; Wang et al., 1997).

Da "Zweit-Generations"-Vektoren aber dennoch nicht das Problem der Immunogenität lösen und noch eine limitierte Klonierungskapazität besitzen, wurden sogenannte Helfer-abhängige (helper-dependent, HD) oder 'gutless' AdVektoren konstruiert (Fisher et al., 1996; Kochanek et al., 1996; Kumar-Singh und Farber, 1998). Sie zeichnen sich durch die Entfernung aller kodierenden viralen Gene aus und besitzen lediglich ITRs und das Verpackungssignal als virale Elemente. Damit sind sie in der Lage Fremd-DNA mit einer Größe von bis zu 36 kb aufzunehmen (z.B. cDNAs, gewebsspezifische oder regulierbare Promotoren unterschiedlicher Größe sowie verschiedene Expressionskassetten). Ein weiterer Vorteil ist ihre reduzierte Toxizität und Immunogenität (Morrall et al., 1998; Morsy et al., 1998; Schiedner et al., 1998; Thomas et al., 2000) sowie eine Langzeit-Transgenexpression (Schiedner et al., 1998). Für die Generierung der HD AdVektoren wird ein sogenanntes Helfervirus, das alle viralen Funktionen mit Ausnahme der E1 Funktion exprimiert, benötigt. Die Vektorproduktion beruht auf einer Rekombinase-vermittelten Exzision des Verpackungssignals im Helfervirus, welches von *loxP* (Parks et al., 1996; Hardy et al., 1997) oder *frt* (Umana et al., 2001) Erkennungssequenzen flankiert wird. Als Verpackungszelllinie werden ebenfalls 293 Zellen, die konstitutiv Cre Rekombinase (Chen et al., 1996) oder Flp Rekombinase (Umana et al., 2001) exprimieren, verwendet. Nach Kotransfektion in diese Zelllinie und mehreren Amplifizierungsschritten kann das Helfervirus vom HD AdVektor über einen CsCl-Dichtegradienten getrennt werden. Die Kontaminationen durch das Helfervirus betragen in diesem System unter 0,1 %.

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von konditionell replikationskompetenten Adenoviren, die in der Tumorthherapie auch als onkolytische Viren bezeichnet werden (Alemany et al., 2000a). Viele Tumoren besitzen sogenannte 'loss-of-function' Mutationen in Zellzyklus-regulatorischen Proteinen wie p53 oder pRb. Die adenoviralen Proteine E1B und E1A sind in der Lage, p53 und pRb, respektiv zu binden und somit den Zellzyklus zu aktivieren. E1B-deletierte zunächst als "Erst-Generations"-replikationsdefekte bezeichnete AdVektoren können bei Transduktion p53-negativer Zellen hier wieder replizieren (Bischoff et al., 1996). Damit können sie selektiv den Tod der Tumorzelle auslösen und diese lysieren. Dasselbe gilt für Zellen, die im Hinblick auf die pRb-Funktion negativ sind (Einsatz E1A-deletierter AdVektoren). Damit können replikationskompetente AdVektoren spezifisch zur Behandlung von Tumorzellen eingesetzt werden. Replikationskompetente Viren können zusätzlich eine Deletion der Region E3 besitzen, die keinen Effekt auf die virale Infektivität hat. In den vergangenen Jahren konnten diese Viren in verschiedenen klinischen Studien eingesetzt werden (Khuri et al., 2000; Habib et al., 2002; Kuball et al., 2002).

1.3 Adenovirus-Zell-Interaktion

Neben den Vorteilen, die Adenoviren in ihrer Verwendung für die Gentherapie bieten, weisen sie allerdings zwei erhebliche Nachteile auf. Zum einen lösen sie eine hohe Immunantwort aus, die man, wie oben beschrieben, durch Deletion der verantwortlichen viralen Gene zu umgehen versucht. Zum anderen besitzen sie eine verminderte Zielzellselektivität. Ihre Selektivität richtet sich dabei nach ihren Binde- und Internalisierungseigenschaften. Der adenovirale Infektionsprozess von Zellen ist in zwei Interaktionen unterteilt: Die erste Bindung erfolgt über den 'fiber knob' des Virus, der an den zellulären Coxsackie B-Adenovirus Rezeptor (CAR) über spezifische Aminosäurereste bindet (Bergelson et al., 1997). Die Internalisierung des Virus in die Zelle stellt die zweite Interaktion dar. Hierbei kommt es zu einer Bindung des RGD-Motivs in der viralen Pentonbasis mit zellulären $\alpha\beta$ -Integrinen (Wickham et al., 1993). Diese Bindung führt zur Clathrin-vermittelten Endozytose (Chardonnet und Dales, 1970; Patterson und Russell, 1983; Svensson, 1985). Der virale Infektionsweg ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt.

Die Fiberproteine aller AdSpezies mit Ausnahme der Gruppe B sind in der Lage über den CAR Rezeptor zu binden (Roelvink et al., 1998). Das 346 Aminosäuren (AS) lange CAR-Protein kann zu den Typ I-Transmembranproteinen gezählt werden, die eine extrazelluläre Domäne besitzen. Die extrazelluläre Domäne umfasst 216 AS und wird

in eine V-ähnliche Immunglobulin (Ig)- (AS 1-120) und in die C2-ähnliche Domäne (AS 124-210) gegliedert. Die aminoterminal V-ähnliche Ig Domäne 1 (D1) fungiert dabei als AdBindedomäne. Dies konnte in früheren Studien von Bergelson et al. (1997) und Tomko et al. (1997) gezeigt werden. Die genaue Funktion von CAR ist bisher noch nicht vollständig verstanden, aber seine Lokalisation in den *'tight junctions'* sowie in der basolateralen Membran weist auf eine Rolle in der Zelladhäsion hin (Cohen et al., 2001).

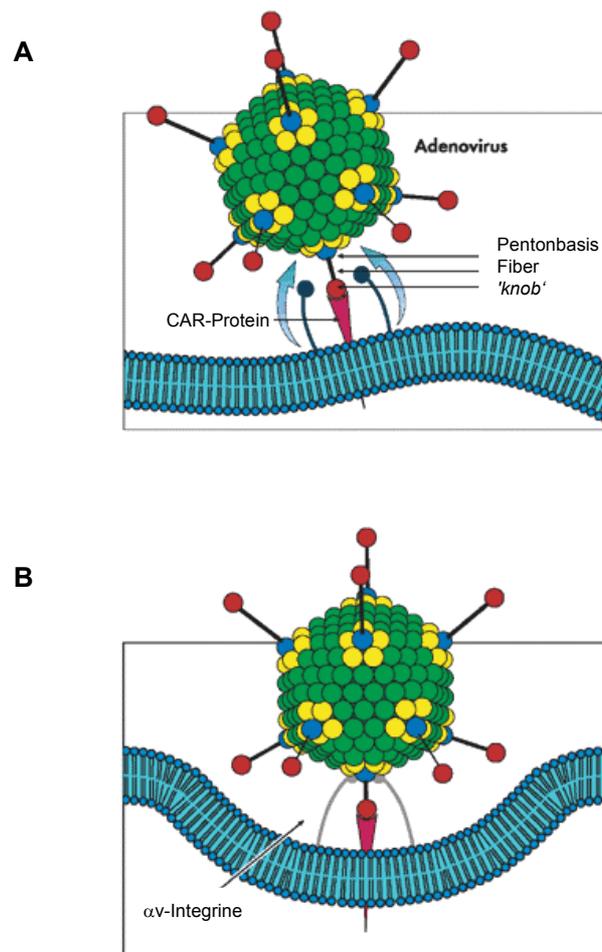


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Virus-Zell-Interaktion. Der zelluläre Bindungsprozess von Adenoviren ist ein Zwei-Stufen-Prozess. A) Zelladhäsion des *'fiber knobs'* über den Coxsackie B-Adenovirus Rezeptor (CAR). B) Bindung der Pentonbasis an zelluläre αv -Integrine zur Internalisierung des Virus in die Zelle (verändert nach *'adenovirus technology logo'*, Qbiogene 2002).

Die Selektivität von Adenoviren wird durch ihre Bindung an den primären Rezeptor CAR insofern limitiert, als dass CAR ubiquitär auf fast allen respiratorischen Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert wird. Humanes CAR konnte im Herzen, der Bauchspeicheldrüse, dem zentralen und peripheren Nervensystem, der Prostata, den Hoden sowie in der Lunge, dem Verdauungstrakt und vor allem aber in der Leber detektiert werden. Adenoviren besitzen zusätzlich einen erhöhten Lebertropismus (Huard et al., 1995; Alemany und Curiel, 2001), so dass nach intravenöser Gabe 80% der Viren in der Leber lokalisiert sind und es zur Lebertoxizität kommen kann. Nach systemischer Applikation können daher Adenoviren nicht mehr zelltyp- bzw. gewebsspezifisch binden, was zu einer unspezifischen Transgenaufnahme führt. Damit kommt es zu einer Dosisungenauigkeit und die therapeutische Wirkung wird reduziert. Auf der anderen Seite weisen verschiedene Zellen und Gewebe eine geringe oder keine Expression von CAR auf, wie es auf vielen Tumorzellen der Fall ist (Miller et al., 1998; Bauerschmitz et al., 2002a; Shayakhmetov et al., 2002). Hier kommt es zu einer Resistenz gegenüber adenoviraler Transduktion. Damit verbunden sind wiederum verminderte Expressionslevel der übermittelten Transgene sowie eine aberrante Lokalisation auf Zell- und Gewebesebene (Anders et al., 2003).

Die Bindung an den CAR-Rezeptor erfolgt über spezifische Aminosäurereste im '*fiber knob*' Protein des Virus. Diese konnten in vorangegangenen Studien identifiziert und charakterisiert werden (Kirby et al., 1999; Roelvink et al., 1999). In Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass die virale Bindung an den CAR-Rezeptor durch mutierte Fiberproteine inhibiert wird. Neben Punktmutationen (P409A, Y491A, P190A, T470A, P396A, K420A, K417G, S408E, Y477A, Y262A, S189E, K201A, K198G, S395E und L407G) wurden ebenso Substitutionen/ Deletionen (rDPE-GGG, d489-492, r487-491) in das kodierende Fibrogen eingefügt; demzufolge war das mutierte Fiberprotein nicht in der Lage, eine Wildtyp-Transduktion zu unterdrücken (Roelvink et al., 1999).

Die Bioverteilung von Adenoviren wird jedoch nicht nur über die CAR-Expression allein bestimmt. Der Grad der Durchblutung und der Vaskularität eines Organs beeinflusst die Verteilung im Körperkreislauf. Nach intravenöser Injektion werden adenovirale Partikel von Makrophagen, wie z.B. den "Kupfer'schen Sternzellen" der Leber, aufgenommen, wodurch Adenoviren aus dem Blutkreislauf entfernt werden und somit zur selektiven Infektion nicht mehr zu Verfügung stehen (Alemany et al., 2000b). Dem kann entgegen gewirkt werden, indem "Kupfer'sche Sternzellen" vor adenoviraler Injektion entfernt werden (z.B. durch Gabe von Klodronat). Diese Behandlung führt zu einer verringerten vektorinduzierten Toxizität, einer höheren Transduktion der

Hepatozyten sowie einer geringeren humoralen Immunantwort gegen transgene Proteine (Wolff et al., 1997; Alemany et al., 2000b).

Als sekundäre Zellrezeptoren, die für die Internalisierung des Virus in die Zelle verantwortlich sind, können $\alpha\beta$ -Integrine betrachtet werden. Integrine sind relativ große heterodimere Transmembranproteine, die sich aus den Untereinheiten α und β zusammensetzen. Insgesamt gibt es über 20 verschiedene Mitglieder der Integrinfamilie, die in den meisten Fällen über das sogenannte Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Motiv mit extrazellulären Matrixproteinen interagieren. Zu diesen zählen z.B. Vitronektin, Fibronektin und Tenascin. Interaktionen von Integrinen mit diesen Zellliganden lösen wichtige zelluläre Funktionen wie Zellanheftung, Zellmigration, Wachstum und Differenzierung aus. Integrine spielen daher ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zellhomöostase und sind an Prozessen wie Wundheilung, Osteogenese, Tumormetastasierung und eventuell an einigen neuronalen Funktionen beteiligt (Hynes, 1992).

Adenoviren binden ebenfalls über das RGD-Motiv in der Pentonbasis an die Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$, die die Virusaufnahme in die Zelle begünstigen (Wickham et al., 1993). Wickham et al. (1993) konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Internalisierung des Virus in die Zelle durch Zugabe eines Antikörpers gegen die Untereinheit αv blockiert bzw. reduziert wird, aber keinen Einfluss auf die Zellanheftung hat. Rekombinantes AdFiberprotein, aber nicht das Pentonbasisprotein, kann die Zellanheftung kompetitieren. Zwei weitere Studien zeigen allerdings, dass Integrine auch einen Einfluss auf die Zellanheftung besitzen (Huang et al., 1996; Roelvink et al., 1996). Maßgeblich sind αv -Integrine aber an der Virusaufnahme beteiligt. Viele AdSerotypen unterschiedlicher Untergruppen besitzen ein konserviertes RGD-Motiv (Mathias et al., 1994) und können darüber in die Zielzelle internalisieren (Mathias et al., 1998). Zwischen den verschiedenen Serotypen kommt es zu Unterschieden in denen das RGD-Motiv flankierenden Sequenzen, die in ihrer Länge variieren. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit diese Sequenzen die Integrinbindung der Pentonbasis beeinflussen können (Nemerow und Stewart, 1999).

Neben dem CAR-Rezeptor und den Integrinen wurde noch weitere adenovirale Rezeptoren identifiziert. Über '*phage display*'-Techniken konnte die $\alpha 2$ -Domäne von MHC Klasse I-Molekülen als direkter Ad5 '*fiber knob*'-Interaktionspartner isoliert werden (Hong et al., 1997). Heparansulfat-Glukosaminoglykane (HSG) sind ebenfalls in die Virusbindung involviert (Dehecchi et al., 2001; Smith et al., 2003a). Die Bindung an HSGs erfolgt über das Sequenzmotiv Lysin-Lysin-Threonin-Lysin (KKTK) im Fiberschaft, welches die Transduktion von Hepatozyten maßgeblich beeinflusst hat (Smith et al., 2003b).

Ein weiterer Rezeptor konnte für den Serotyp Adenovirus 37 identifiziert werden. Dieser Adenovirus bindet an die Zelloberfläche mittels N-Acetylneuraminsäure, wobei die Bindung und Internalisierung über den *'fiber knob'* vermittelt wird (Arnberg et al., 2000a; Arnberg et al., 2000b; Arnberg et al., 2002).

1.4 Modifikation des natürlichen Tropismus von Adenoviren zur zielzellgerichteten Transduktion (*'targeting'*)

Mit dem sogenannten *'targeting'* von Adenoviren sollen die oben beschriebenen Limitierungen umgangen werden, wie z.B. die Fähigkeit eine Vielzahl von Zellen zu infizieren, wodurch ein spezifischer Gentransfer zum Zielgewebe nicht mehr gewährleistet wird. Ziel vieler Ansätze ist es, den natürlichen Tropismus des Virus zu deletieren und einen neuen Tropismus zu integrieren, um eine verbesserte Transduzierbarkeit der Zielzellen zu erreichen. Dies ist besonders in der Tumorthherapie von Bedeutung, da viele Tumorzellen den primären Adenovirusrezeptor CAR nicht exprimieren und dadurch für eine adenovirale Infektion resistent sind. Die Modifizierung von Adenoviren kann mittels unterschiedlicher "Targetingstrategien" in zwei große Gruppen unterteilt werden (Abb. 1.4).

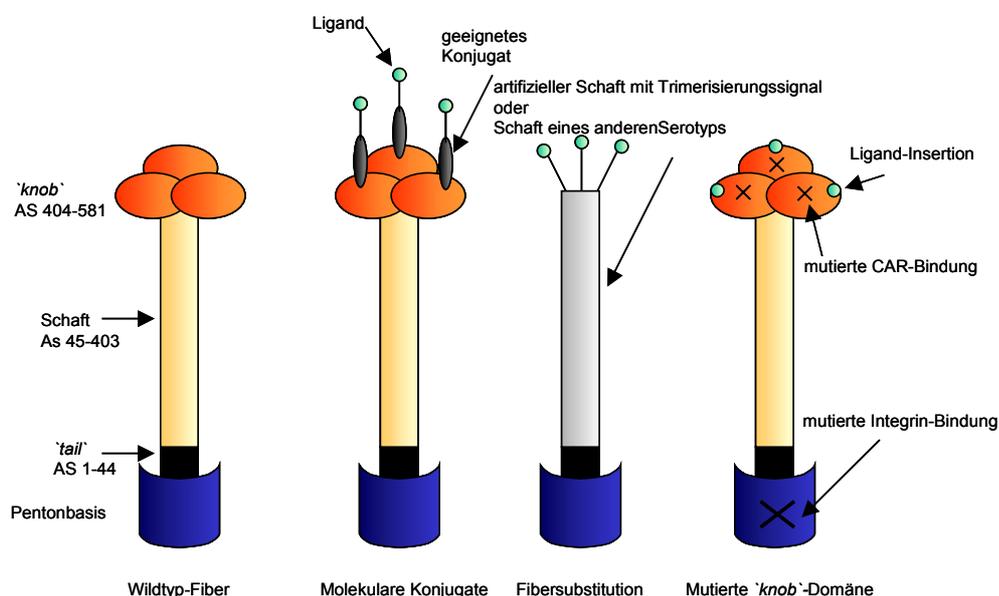


Abb. 1.4: Schematische Übersicht zur Modifizierung des Adenovirus-Kapsids. Das Wildtyp-Fiberprotein kann in drei Domänen unterteilt werden: Pentonbasis, Schaft und *'knob'*. Der Schaft enthält repetitive Sequenzen, die ihm eine zylindrische Form verleihen. Der *'knob'* wird durch die trimere Struktur stabilisiert und ist zur Bindung an CAR befähigt. Die relative Größe der einzelnen Domänen ist in Aminosäuren (AS) angegeben. Liganden wurden über molekulare Konjugate, durch Fibersubstitution und durch Insertion in den *'knob'* hinzugefügt (verändert nach Einfeld und Roelvink, 2002).

Die erste Gruppe wird als Konjugat-*'targeting'* bezeichnet und basiert auf einem Zwei-Komponenten-System. Um den natürlichen Tropismus des Virus zu erweitern, werden überwiegend bispezifische Antikörper verwendet, die auf der einen Seite ein Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers besitzen, das den *'fiber knob'* binden kann und somit die Interaktion mit zellulärem CAR verhindert. Auf der anderen Seite sind diese Antikörper mit einem spezifischen Zellrezeptor oder mit einem Antikörper gegen spezifische Oberflächenantigene konjugiert.

Ein typischer Zellrezeptor ist Folsäure. Mit diesem Konjugat konnte eine CAR-unabhängige Folsäurerezeptor-vermittelte Transduktion von Folsäure exprimierenden Tumorzellen gezeigt werden (Douglas et al., 1996). In einer anderen Studie konnte ein konjugierter Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF2) zum *'targeting'* von FGF2-positiven Ovarkarzinomzellen *in vitro* mit Erfolg eingesetzt werden (Rancourt et al., 1998). Aus diesen Voruntersuchungen resultierte das Protokoll für eine klinische Studie, bei der Patienten mit Ovarialtumoren mit einem FGF2-konjugierten Adenovirus, der die Herpes simplex Virus Thymidin Kinase (HSVtk) als Transgen trug, behandelt wurden (Bauerschmitz et al., 2002b). Die Etablierung dieses Systems führte zu einer *in vivo* Studie, bei der anti-Fiberkonjugate mit dem *'angiotensin-converting enzyme'* (ACE) verknüpft und systemisch appliziert wurden. ACE wird in großen Mengen im Endothel von Pulmonarkapillaren exprimiert. Mit diesem Vektor konnte im Vergleich zum unmodifizierten Wildtyp-Adenovirus eine 20fach erhöhte Transgenexpression in der Lunge erreicht werden. Gleichzeitig wurde die Transgenexpression in der Leber und der Milz um 80% bzw. 50% reduziert (Reynolds et al., 2000). In einem aktuellen Ansatz konnten Korn et al. (2004) bei der Verwendung eines *'carcinoembryonic antigen'* (CEA)-konjugierten Virus ebenfalls eine erhöhte Transduktionsrate in CEA-exprimierenden Tumorzellen erkennen. Neben den gegen den Fiber gerichteten Antikörpern wurden zusätzlich Antikörper hergestellt, die gegen eine FLAG-modifizierte Pentonbasis oder ein anderes Kapsidprotein (Hexon) gerichtet sind (Barnett et al., 2002).

Ein weiterer Ansatz bei der Entwicklung von Adenovirus-Konjugaten ist die Verwendung der CAR-Ektodomäne, die die fiberbindende Komponente darstellt und hier in einer trunkierten löslichen Form eingesetzt wird (sCAR). In Fusion mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) zeigte sich im Vergleich mit einem nicht-modifizierten Vektor ein 9facher Anstieg in der Reporterexpression in verschiedenen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) exprimierenden Tumorzelllinien (Dmitriev et al., 2000; Hemminki et al., 2001). Eine verstärkte Bindung zwischen sCAR und Fiber kann durch die Verwendung eines trimeren sCAR erreicht werden. Der Fiber bindet bei der zellulären Adhäsion ebenfalls als Trimer, so dass bei

der Verwendung eines trimeren sCAR die Fiber-CAR-Bindung stabiler ist. Kashentseva et al. (2002) zeigten, dass trimeres sCAR eine 20fach höhere Affinität zum Fiber besitzt als monomeres sCAR. Außerdem konnten sie nachweisen, dass durch eine Inkorporation eines anti-c-*erbB2* Antikörpers in das trimere sCAR die Zelltransduktion gesteigert wurde. Ein weiterer Vergleich wurde zwischen Trimer und Monomer beim Einsatz der rezeptorbindenden Domäne von ApoE vorgenommen. Auch hier konnte eine Steigerung der Transduktion CAR-negativer Zellen erreicht werden, wobei die Transduktionseffizienz bei Verwendung eines trimeren sCAR 30fach höher war als bei der Verwendung eines Monomers (Kim et al., 2002).

Eine andere post-produktive Modifikation von Adenoviren kann über kovalente Bindung von Polymeren erfolgen. Bifunktionales Polyethylenglykol (PEG) wird z.B. verwendet, um kurze Peptidsequenzen an einen Virus zu koppeln, die die Transduzierbarkeit von Epithelzellen der Atemwege verbessern (Romanczuk et al., 1999; Drapkin et al., 2000). PEG bindet über Aminogruppen an das Viruskapsid und verhindert dadurch, dass das Virus von neutralisierenden Antikörpern inaktiviert wird. Aus diesem Grund sind polymerveränderte Viren für *in vivo* Applikationen von großer Bedeutung. Z.B. wird nach systemischer Administration die Transduzierbarkeit der Leber erhöht (Croyle et al., 2000). Durch die Kopplung von FGF2 konnte ebenfalls eine CAR-unabhängige Transduktion in einem Ovarkarzinommodell gezeigt werden, wobei eine erhöhte Transgenexpression des Vektors und eine verminderte Immunantwort erreicht wurde (Lanciotti et al., 2003).

All diese Zwei-Komponenten-Systeme weisen jedoch einige Nachteile gegenüber dem Ein-Komponenten-System auf. Der natürliche Tropismus von Adenoviren bleibt zum Teil erhalten, so dass es *in vivo* immer noch zu unspezifischen Bindungen an unterschiedliche Gewebe kommen kann. Ein-Komponenten-Systeme basieren dagegen hauptsächlich auf der genetischen Modifizierung des Adenovirus Kapsids, überwiegend des '*fiber knob*'. Bei der genetischen Veränderung des Virus steht zunächst die Deletion der natürlichen Rezeptorbindestellen im Vordergrund (CAR und $\alpha\beta$ -Integrine). In einem weiteren Modifizierungsschritt folgt dann die Integration eines neuen Tropismus (z.B. in Form von Peptidliganden) an einer geeigneten Insertionsstelle, die die natürliche Konformation des Virus nicht beeinflusst. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, zwei Modifikationsschritte miteinander zu kombinieren und somit ein geeignetes Potenzial für klinische Studien zu liefern. Ein weiterer Vorzug ist, dass dieses System gegenüber den Konjugat-Komplexen des Zwei-Komponenten-Systems für *in vivo* Applikationen viel stabiler ist und eine einfachere Stöchiometrie besitzt.

Im Überblick kann das genetische '*targeting*' in mehrere Untergruppen unterteilt werden: 1) die Modifikation des Viruskapsids, 2) die Konstruktion von Fiberchimeren und 3) das transkriptionelle '*targeting*' mit der Verwendung von gewebsspezifischen Promotoren. Eine Kombination dieser drei Strategien erweitert die Möglichkeit zum zielzellspezifischen '*targeting*'.

Zur Verbesserung des "Targetingpotenzials" gentherapeutischer Adenoviren werden zunächst solche natürlichen Bindestellen deletiert bzw. mutiert, die einen Einfluß auf die Bioverteilung und Transduktion haben. Anschließend wird ein neuer Tropismus in das Kapsid eingefügt. Bei der Entfernung oder Veränderung der CAR- und Integrin-Bindestellen konnten Einfeld et al. (2001) nach systemischer Applikation in einem Mausmodell eine 10fache Reduktion der Transduktionseffizienz der Leber beobachten, wobei eine höhere Reduktion des nativen Tropismus erzielt wurde, wenn ein Vektor mit Deletionen im '*fiber knob*' und der Pentonbasis verwendet wurde. Bei Gebrauch von Vektoren, bei denen eine natürliche Bindestelle erhalten blieb, kam es nur zu einer verminderten Infektivität. Von anderen Forschergruppen konnte diese Aussage z.T. nicht belegt werden, obwohl gleiche Vektormutanten eingesetzt wurden (Alemany und Curiel, 2001; Leissner et al., 2001; Mizuguchi et al., 2002; Smith et al., 2002). Diese unterscheiden sich allerdings in einer Insertion im '*HI-loop*'.

Die Insertion von Fremdsequenzen wurde zunächst am C-Terminus des Fiberproteins durchgeführt (Michael et al., 1995; Wickham et al., 1996; Wickham et al., 1997; Hidaka et al., 1999). Der Einbau von Fremdsequenzen wie das integrinbindende RGD-Motiv oder das heparansulfatbindende Polylysin führten hierbei zu vielversprechenden Erfolgen *in vitro* und *in vivo*. Bei der Integration größerer Peptide zeigte sich jedoch, dass es zu einer ineffizienten Verpackung des Virions kam. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass das Fiberprotein durch Fremdinkorporationen nicht mehr in der Lage war zu trimerisieren (Wickham et al., 1997). Etwas später konnte der sogenannte '*HI-loop*' im '*fiber knob*' als geeignete Integrationsstelle von neuen Zellrezeptorliganden identifiziert werden (Krasnykh et al., 1998; Belousova et al., 2002). An dieser Stelle konnten bis zu 100 Aminosäurereste integriert werden ohne einen negativen Effekt auf die virale Integrität auszuüben. Zur Bestätigung dieser Strategie inkorporierten Krasnykh et al. (1998) ein FLAG-Oktapeptid. Daraufhin folgten weitere Integrationen von Peptiden, wie z.B. die Integration des Liganden RGD-4C (Dmitriev et al., 1998), der die virale Transduzierbarkeit für viele Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erweiterte, da Tumorzellen als auch Blutgefäßzellen in erhöhten Mengen den RGD-Rezeptor $\alpha_v\beta$ -Integrin exprimieren. Ein durch Integration des RGD-Motivs verbesserter Gentransfer konnte ebenfalls in nichthumanen Pankreaszellen erreicht werden (Bilbao et al., 2002).

Des Weiteren eignen sich Adenoviren auch zu "Vakzinierungsexperimenten". Worgall et al. (2004) konnten durch Inkorporation eines RGD-Motivs in das AdKapsid die Transduzierbarkeit von dendritischen Zellen (DC) erhöhen und eine gesteigerte Immunantwort gegen β -Galaktosidase als Modellantigen erreichen. Das RGD-Motiv wurde auch in Kombination mit onkolytischen Adenoviren verwendet, um auch hier eine Steigerung der Infektivität zu erreichen (Bauerschmitz et al., 2002b; Lamfers et al., 2002; Liu et al., 2004).

Weitere Peptide wie z.B. der Ligand Asparagin-Glycin-Arginin (NGR), der spezifisch an Aminopeptidase N (APN oder CD13) bindet (Mizuguchi et al., 2001) oder das Peptid SIGYPLP, das selektiv an Endothelzellen bindet (Nicklin et al., 2001), konnten erfolgreich in den '*HI-loop*' integriert werden und eine erhöhte Infektivität der Zielzellen herbeiführen. Verschiedene Liganden können aber auch zur erweiterten Verbesserung des Gentransfers kombiniert werden (Koizumi et al., 2003), wie im Falle von Cervixkarzinomen. Durch die Inkorporation des RGD-Motivs in den '*HI-loop*' und einen zusätzlichen Polylysinrest am C-Terminus des Fibers konnte eine signifikante Verbesserung der Transduktion des Tumors im Verhältnis zur Leber beobachtet werden (Rein et al., 2004). In einer früheren Studie konnten Contreras et al. (2003) den gleichen positiven Effekt an humanen Pankreaszellen beobachten. Ergänzend konnten genetische Modifikationen in Kombination mit bispezifischen Antikörpern eingesetzt werden (van Beusechem et al., 2002; Nettelbeck et al., 2004).

Ein weiterer Ansatz zur Modifizierung von Adenoviren ist das Entfernen des gesamten '*fiber knob*' und sein Ersetzen durch geeignete "Targetingsequenzen". Das chimere Protein muss dennoch in der Lage sein zu trimerisieren, da die natürliche '*knob*' Domäne für diese Funktion verantwortlich ist. Weiterhin muss das Virus die Eigenschaft zur Kernlokalisierung beibehalten, da hier der Ort des Kapsidzusammenbaus ist. Magnusson et al. (2001) haben dieses Problem gelöst, indem sie den Liganden RGD mit einem Linker, der ein externes Trimerisierungssignal trägt, fusioniert haben. Als Alternative kann Fibrin des Phagen T4 als C-terminale Fusion genutzt werden, das ebenfalls eine Trimerisierung vermittelt (Krasnykh et al., 2001). Eine andere Variante beinhaltet die Substitution des '*fiber knob*' oder des Schafts durch die anderer Serotypen. Von besonderem Interesse hierbei sind die auf dem Ad5-Vektorrückgrat basierenden Vektoren mit einem '*knob*' oder Fiber der Untergruppe B, die einen anderen zellulären Rezeptor als CAR aufweisen (Krasnykh et al., 1996; Havenga et al., 2002; Kanerva et al., 2002; Shayakhmetov et al., 2002). Ad5/Ad3-'*knob*' Vektoren konnten von Kanerva et al. (2002) konstruiert werden und zeigten eine effiziente Transduktion von Tumorzellen mit geringen CAR-Leveln *in vitro*. Zusätzlich treten keine neutralisierende Ad5-Antikörper auf und der starke

Lebertropismus wird reduziert (Vigne et al., 2003). Durch eine Substitution durch den Ad40-Fiber kommt es ebenfalls zu einer Reduktion des Lebertropismus, die auf einen verkürzten Fiberschaft zurückzuführen ist (Nakamura et al., 2003).

Neben dem transduktionellen '*targeting*' gibt es die Möglichkeit des transkriptionellen '*targeting*'. Beim transduktionellen '*targeting*' steht eine Verbesserung der Virusaufnahme in die Zielzelle und eine Reduktion des Gentransfers in Nichtzielzellen im Vordergrund. Beim transkriptionellen '*targeting*' wird der äußere Tropismus des Virus nicht verändert, sondern die Transgenexpression wird auf die Zielzellen beschränkt. Hier werden Transgene unter die Kontrolle eines gewebs- oder tumorspezifischen Promotors gestellt (TSP). Viele verschiedene Promotoren zeigten vielversprechende vorklinische Ergebnisse (Bauerschmitz et al., 2002a). Das sekretorische Leukoproteaseinhibitorgen (SLPI) ist in unterschiedlichen Karzinomzellen exprimiert. Seine Expression in normalen Organen, wie der Leber, ist sehr gering. Deshalb wurde der SLPI-Promotor zur Transgenexpression in Ovarkarzinomzelllinien und in primären Tumoren erfolgreich verwendet (Barker et al., 2003). Ein anderer Promotor, der Zyklooxygenase 2 (Cox-2)- Promotor, wurde im Kontext mit gastrischen (Yamamoto et al., 2001) und Ovarkarzinomen (Kanerva et al., 2004) verwendet. Dabei konnte eine geringere Transgenexpression in normalen Mesothelzellen und in der Leber nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 2001; Kanerva et al., 2004)

Zur Identifizierung gewebs- oder tumorspezifischer Liganden zeigen '*phage display*'-Technologien viel versprechende Erfolge *in vitro* und *in vivo*. 1990 konstruierten (Scott und Smith, 1990) eine sogenannte "Epitopenbank", die auf der Grundlage von filamentösen Phagen basierte. Hierbei wurden Zufallspeptide in Fusion mit einem Phagenhüllprotein exprimiert und somit an der Phagenoberfläche präsentiert. Aufgrund der Zufallspeptidsequenzen besitzen diese auch als Phagenbibliotheken bezeichneten "Epitopenbanken" eine Kapazität von bis zu 10^9 elektroporierten Sequenzen. Damit bieten Phagenbänke ein enormes Potenzial zur Identifizierung zellspezifischer Liganden (Smith und Scott, 1993). Der Prozess der Isolierung spezifischer Peptidliganden wird als '*biopanning*' bezeichnet, wobei über mehrere sukzessive Runden ein potentieller Peptidkandidat ermittelt wird. Dabei kann das sogenannte '*target*' ein bestimmtes Peptid bzw. Protein oder eine kultivierte Zelllinie sein. Das '*biopanning*' kann aber auch unter *in vivo* Bedingungen erfolgen, wobei das '*target*' ein Organ bzw. Gewebe darstellt. Zur Identifizierung spezifischer Liganden können verschiedene Phagenbanken eingesetzt werden; z.B. gibt es Phagenbänke, die

Antikörperdomänen, cDNAs oder Peptide unterschiedlicher Länge in Fusion mit dem Phagenhüllprotein exprimieren.

In frühen Studien von Koivunen et al. (1993) konnten mehrere Peptidliganden für das Integrin $\alpha 5\beta 1$ identifiziert werden, die alle ein typisches Konsensusmotiv, nämlich RGD, aufwiesen. Auch ein umgekehrtes '*biopanning*' gegen das RGD-Motiv führte zur Verifizierung der Integrininteraktion (Pasqualini et al., 1995). Verschiedene '*phage display*'-Strategien haben gezeigt, dass das RGD-Motiv sowie weitere isolierte NGR- und GSL-Motive an Rezeptoren im vaskulären System von unterschiedlichen Tumoren binden und nicht im umliegenden Gewebe gefunden wurden (Pasqualini und Ruoslahti, 1996; Arap et al., 1998; Rajotte et al., 1998; Rajotte und Ruoslahti, 1999; Pasqualini et al., 2000; Ruoslahti, 2000). Durch *in vitro* '*biopanning*'-Versuche konnten selektive Liganden zum adenoviralen Transfer in vaskuläre Endothelzellen (Nicklin et al., 2000; Trepel et al., 2000; Nicklin et al., 2004), Interaktionspartner des endothelzellspezifischen LOX-1 Rezeptors (White et al., 2001) und spezifische Peptidliganden für eine Kolonkarzinomzelllinie über subtraktives '*biopanning*' (Rasmussen et al., 2002) ermittelt werden. Die Etablierung des *in vivo* '*phage display*' erfolgte 1996 von Pasqualini und Ruoslahti. In jüngeren Studien konnten mittels dieser Technik viele Peptidkandidaten z.B. für Aminopeptidase P (Essler und Ruoslahti, 2002) und für Lymphgefäße (Laakkonen et al., 2002) isoliert werden. In einem *ex vivo* Ansatz konnten selektive Peptide für das Urothelium identifiziert werden, die in der Lage waren in die Zielzellen zu internalisieren (Ardelt et al., 2003). Dieser Ansatz zeigt durch das Internalisierungsexperiment eine wichtige Grundeigenschaft von Peptiden, die zum adenoviralen Gentransfer eingesetzt werden sollen. Arap et al. (2002b) etablierten den ersten Schritt zur Entwicklung einer molekularen Übersicht des humanen Blutgefäßsystems, indem sie zum ersten Mal eine Phagenbibliothek in einen Patienten applizierten und verschiedene Organe analysierten. Eine Weiterentwicklung dieses Systems erfolgte durch Pereboev et al. (2001) und Müller et al. (2003), indem sie Phagenbanken konstruierten, die Kapside von Adenoviren und adeno-assoziierten Viren mit integrierten Zufallspeptiden enthielten. Der Vorteil dieser Banken ist, dass die identifizierten Peptide sofort im Viruskontext getestet werden und eine Aussage darüber getroffen werden kann, ob das jeweilige Virus in der Lage ist, seine natürliche Konformation beizubehalten.

1.5 Das medulläre Schilddrüsenkarzinom als Modellsystem zum zielgerichteten Gentransfer

Die Entstehung von Tumoren beruht auf mutagenen Fehlfunktionen, die sich auf die Gewebshomöostase auswirken und somit den Zyklus einer Zelle beeinflussen (Hanahan und Weinberg, 2000). Sogenannte Proto-Onkogene, die durch Mutationen zu Onkogenen werden, sind an der Entwicklung von Tumoren beteiligt. Die Gentherapie bietet hier eine Alternative zu klassischen anti-tumoralen Interventionen wie Chemo- und Strahlentherapie, diesen genetischen Defekt wieder auszugleichen.

Neben drei weiteren Schilddrüsenkrebsarten repräsentiert das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) mit 5-10% aller Schilddrüsenkarzinome zwar eine Minderheit, hebt sich aber durch seine besonders aggressive Ausprägung von den anderen ab (Vitale et al., 2001). Es entstammt parafollikulären Calcitonin-produzierenden Thyroid-C-Zellen (Gimm, 2001), wohingegen die anderen Schilddrüsenkrebsarten follikulären Epithelzellen entspringen. MTCs treten in 75% aller Fälle als sporadische Läsionen auf, während 25 % hereditär in drei verschiedenen klinischen Syndromen auftreten: als Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A (MEN 2A), Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2B (MEN 2B) und als familiäres Schilddrüsenkarzinom (FMTC). Annähernd 40-70% der sporadischen und bis zu 95% der hereditären Fälle weisen Mutationen im *RET* (REarranged during Transfektion) Proto-Onkogen auf (Mulligan et al., 1993; Eng und Mulligan, 1997; Eng, 1999). Das *RET*-Proto-Onkogen kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die sich in eine extrazelluläre cadherinähnliche Domäne, eine cysteinreiche Domäne nahe der Zellmembran und zwei intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen unterteilen lässt. Die häufigste Mutation, die in Patienten mit MEN 2A-Syndromen (90%) wie auch in wenigen sporadischen Fällen gefunden wurde, beeinflusst das Codon 634 (Eng et al., 1997; Eng et al., 1999; Hansford und Mulligan, 2000). Die in MEN 2A und FMTC identifizierten Mutationen sind in der extrazellulären cysteinreichen Region lokalisiert. Über die Formierung intramolekularer Disulfidbrücken kommt es hier zur Liganden-unabhängigen konstitutiven Dimerisierung des Proteins (Asai et al., 1995; Santoro et al., 1995), die als '*gain of function*' bezeichnet werden kann. Dies führt zu einer andauernden *trans*-Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste, welche die onkogene Signaltransduktion beeinflussen. Im Falle des MEN 2B Syndroms beziehen sich die meisten Mutationen auf die Tyrosinkinase-Domäne, wobei zu 95% das Codon 918 einen Aminosäureaustausch aufweist. Auch in sporadisch auftretenden MTCs kann dieser Austausch beobachtet werden (Eng et al., 1997). Im Gegensatz zu MEN 2A und FMTC wird bei MEN 2B das katalytische Zentrum des RET-Rezeptors

beeinflusst, was zu Konformationsänderungen und veränderten Substratspezifitäten führt (Santoro et al., 1995; Bocciardi et al., 1997). Des Weiteren kann eine Mutation in der extrazellulären Domäne des *RET*-Proto-Onkogens zu einer anderen Krankheitsform, der Hirschsprung-Erkrankung (HRSC) führen (Edery et al., 1994). Hierbei kommt es zum sogenannten '*loss of function*', der zu einem beeinträchtigten Transport des *RET*-Proteins zur Zellmembran führt.

Zur Behandlung von MTCs kann zunächst die chirurgische Entfernung allen neoplastischen Gewebes dienen (Orlandi et al., 2001). Nichtchirurgische Versuche wie Radiotherapie oder Chemotherapie zeigen keine nennenswerten Erfolge (Vitale et al., 2001). Da MTCs zum Zeitpunkt ihrer Diagnose schon ein starkes Metastasierungsverhalten aufweisen, können oben genannte Therapien nicht erfolgreich angewendet werden. Deshalb stellt die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze eine neue Form der Behandlung dar. In vorangegangenen Studien wurden dominant-negative *RET*-Mutanten konstruiert und mit Hilfe des adenoviralen Gentransfers in *in vitro*- und *in vivo*-MTC-Modellen erfolgreich eingesetzt (Drosten et al., 2002; Drosten und Pützer, 2003; Drosten et al., 2003; Drosten et al., 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und die Identifizierung krankheitsbeeinflussender Gene liefern ein großes Potenzial für die Etablierung gentherapeutischer Methoden. Dabei bietet die Verwendung von Adenoviren als hochkompetente Gentransfervehikel für die Therapie verschiedener Tumorerkrankungen völlig neue Möglichkeiten der Intervention. Adenoviren sind in der Lage eine Vielzahl von Zellen über ihren primären CoxsackievirusB-Adenovirus Rezeptor (CAR) zu infizieren (Bergelson et al., 1997), was sie aber für einen selektiven Gentransfer refraktär macht. Tumorzellen weisen dagegen nur eine geringe CAR-Expression auf (Miller et al., 1998; Bauerschmitz et al., 2002a; Shayakhmetov et al., 2002), so dass ihre adenovirale Transduzierbarkeit restringiert ist oder sie sogar resistent gegenüber einer adenoviralen Infektion sind. Dies hat erhebliche Ausmaße auf die Transgenexpression sowie ihre Lokalisation (Anders et al., 2003). Die Modifizierung des adenoviralen Kapsids stellt daher eine Möglichkeit dar, den natürlichen Tropismus zu umgehen und eine neue tumorselektive Spezifität zu integrieren.

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) bietet sich aufgrund seiner Metastasierungseigenschaften und aufgrund des Hinweises auf eine reduzierte Transduzierbarkeit *in vivo* (Drosten et al., 2003) als geeignetes '*targeting*'-Modell an. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand deshalb folgende Fragestellung im Vordergrund:

- 1) Verifizierung der adenoviralen Rezeptoreigenschaften in unterschiedlichen MTC-Modellen (MTC-Zelllinie TT, Xenotransplantatmodell, klinisch relevantes *RET*-transgenes Mausmodell)
- 2) Identifizierung und Charakterisierung MTC-spezifischer Peptidliganden durch die Etablierung von '*phage display*'-Techniken *in vitro* und *in vivo*
- 3) Analyse der isolierten Peptidliganden im adenoviralen Kontext und Etablierung von Kapsidmodifizierungsstrategien

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in höchster Reinheits- und Qualitätsstufe von den Firmen Amersham-Bioscience (Freiburg), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Fresenius (Bad Homburg), GibcoLifetechnologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roth (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989).

Restriktions- sowie DNA-modifizierende Enzyme der Firmen Eppendorf (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) wurden nach Angaben der Hersteller benutzt.

2.1.2 Kits

Zur Aufarbeitung, Aufreinigung und Modifikation von Nukleinsäuren, Proteinen sowie Adenoviren und Bakteriophagen wurden folgende Kits nach Angaben der jeweiligen Hersteller eingesetzt:

Detection Module Recombinant Phage Antibody System (Amersham-Bioscience, Freiburg)

Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Omniscript RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden)

PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden)

QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QIAprep Spin M13 Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg)

RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Super-Signal Dura West Extended Kit (Pierce, Bonn)

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, NL)

2.1.3 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pAdEasy1	Plasmidvektor, der das Ad5 Genom trägt; zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, MD, USA; (He et al., 1998).
pAdEasy1.LDD	Plasmidvektor, der das Ad5 Genom mit im RGD-Motiv mutierter Penton Base trägt.
pCR2.1-Topo	Klonierungsvektor zur Subklonierung von PCR-Fragmenten. Invitrogen, Groningen, NL.
pCR2.1-Topo.1xEcoRI	Klonierungsvektor zur Subklonierung von PCR-Fragmenten mit nur einer <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle.
pCR2.1-Topo.Pentonbasis	Klonierungsvektor nach Einführung der Pentonbasis in die <i>BcII</i> -Restriktionsschnittstelle des Vektors.
pCR2.1-Topo.Pentonbasis.LDD	Klonierungsvektor nach Einführung der Pentonbasis in die <i>BcII</i> -Restriktionsschnittstelle des Vektors und nach Einführung einer Punktmutation der Pentonbasis im RGD-Motiv über PCR-Mutagenese.
pCR2.1-Topo.Fiber-His	Klonierungsvektor nach Einführung des Fibergens mit C-terminalem His-Tag.
pCR2.1-Topo.Fiber-His.TAYT-Del.	Klonierungsvektor nach Einführung des Fibergens mit C-terminalem His-Tag und TAYT-Deletion durch PCR-Mutagenese.
pCR2.1-Topo/Fiber-His.TAYT-Del.SwaI =pCR2.1-Topo.modif.Fiber	Klonierungsvektor nach Einführung des Fibergens mit C-terminalem His-Tag und TAYT-Deletion und Einführung einer <i>SwaI</i> -Restriktionsschnittstelle im HI-Loop durch PCR-Mutagenese.
pCR2.1-Topo/modif.Fiber/CHTFEPGVC	Klonierungsvektor nach Konstruktion des modifizierten Fibergens und Einführung eines CHTFEPGVC-Sequenzmotivs.
pGeneV5-HisA	Klonierungsvektor zur Subklonierung eines 6 kb großen Fragmentes, das das Fibergen enthält. Invitrogen, Groningen, NL.
pGene/Fiber	Klonierungsvektor nach Einführung des Fibergen-Fragmentes.
pGene/modif.Fiber	Klonierungsvektor nach Austausch des Wildtyp-Fibergens gegen das modifizierte Fibergen.
pGene/modif.Fiber/CHTFEPGVC	Klonierungsvektor nach Austausch des Wildtyp-Fibergens gegen das modifizierte Fibergen nach Einführung eines zusätzlichen CHTFEPGVC-Sequenzmotifs.
pAdEasy-LDD/modif.Fiber	Plasmidvektor, der das Ad5 Genom mit im RGD-Motiv mutierter Penton Base trägt nach Einführung des modifizierten Fibergens.
pAdEasy-LDD/modif.Fiber/CHTFEPGVC	Plasmidvektor, der das Ad5 Genom mit im RGD-Motiv mutierter Pentonbasis trägt nach Einführung des modifizierten Fibergens mit zusätzlichem CHTFEPGVC Sequenzmotiv.

pAdTrack.CMV	Adenoviraler 'shuttle'-Vektor zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, MD, USA; (He et al., 1998).
--------------	---

2.1.4 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi^{-1} relA1 lac[F' proAB^{+} lacI^{\Delta}Z\Delta M15 Tn10 (Tet^{r})]$
<i>E. coli</i> XL2-Blue	$recA1 endA1 gyrA96 thi^{-1} hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB^{+} lacI^{\Delta}Z\Delta M15 Tn10 (Tet^{r}) Amy Cam^{r}]$
<i>E. coli</i> XL10-Gold	$Tet^{r}\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi^{-1} recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^{\Delta}Z\Delta M15 Tn10 (Tet^{r}) Amy Cam^{r}]$
<i>E. coli</i> Top 10F'	$F' [lacI^{\Delta} Tn10 (Tet^{r})] mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80lacI^{\Delta} Z\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rspL (Str^{r}) endA1 nupG$
<i>E. coli</i> BJ5183	$endA1 sbcBC recBC galK met thi^{-1} bioT hsdR (Str^{r})$
<i>E. coli</i> DH5 α	$F^{-}\phi 80lacI^{\Delta} Z\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_{k}^{-}, m_{k}^{+}) gal\ phoA supE44 \lambda^{-} thi^{-1} gyrA96 relA1$
<i>E. coli</i> ER2738	$F' lacI^{\Delta} \Delta(lacZ)M15 proA^{+}B^{+} zzz::Tn10(Tet^{r})/fhuA2 supE thi \Delta(lac-proAB) \Delta(hsdMS-mcrB)5 (r_{k}^{-} m_{k}^{-} McrBC^{-})$
<i>E. coli</i> SCS110	$rpsL (Str^{r}) thr leu endA thi^{-1} lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^{\Delta} Z\Delta M15]$

Die Bakterienstämme XL1-Blue, XL2-Blue, XL10-Gold und SCS110 wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg), ER2738 von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Top 10F' sowie DH5 α von der Firma Invitrogen (Groningen, NL) bezogen. Der Bakterienstamm BJ5183 wurde von B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
293	Ad5-E1A stabil transformierte humane embryonale Nierenzellen (Graham et al., 1977); Microbix Biosystems Inc. (Toronto, Canada)
H1299	Aus einem humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom etablierte Zelllinie; zur Verfügung gestellt von B. Opalka (Innere Tumorklinik, Universitätsklinikum Essen)
VH6	Aus humanen Vorhautfibroblasten etablierte Zelllinie; zur Verfügung gestellt von M. Roggendorf (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen)

TT	Aus einem humanen medullären Schilddrüsenkarzinom etablierte Zelllinie (ATCC, Manassas, USA; CRL-1803)
Capan-2	Aus einem humanen Pankreasadenokarzinom etablierte Zelllinie (ATCC, Manassas, USA; HTB 80)

2.1.6 Adenoviren

Viren	Beschreibung
Ad.CMV.GFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, der das grün fluoreszierende Protein als Fusionsprotein GFP-Spektrin unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Das Konstrukt war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Pützer et al., 2000).
Ad.CMV.GFP.PEG	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, der das grün fluoreszierende Protein als Fusionsprotein GFP-Spektrin unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Zur chemischen Kopplung von Peptiden wurde der vorhandene Vektor mittels bifunktionalem TMPEG an der Virusoberfläche modifiziert.
Ad.CMV.GFP.PEG. HTFEPGVC	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, der das grün fluoreszierende Protein als Fusionsprotein GFP-Spektrin unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. Das Peptid HTFEPGVC wurde an den mittels bifunktionalem TMPEG modifizierten Vektor chemisch gekoppelt.

2.1.7 Versuchstiere

Bezeichnung	Beschreibung
<i>nu/nu</i> (Nackt)-Mäuse:	Diese Tiere wurden aus der Zucht des 'Zentralen Tierlabors' des Universitätsklinikums Essen bezogen.
CT-2A-Mäuse:	Transgene Mäuse, die mit einer RET51-cDNA mit Mutation im Codon 634 (Cys-634-Arg; häufigste Mutation bei MEN2A) transformiert wurden, wurden von A. Cranston (Institut für Onkologie, Universität Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die RT-PCR:

GAPDH-hum fwd	5'-CACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH-hum rev	5'-CACACCCTGTTGCTGTA-3'
GAPDH-mur fwd	5'-ACATCAAATGGGGTGAGGCCGGTG-3'
GAPDH-mur rev	5'-TTCTGGGTGGCAGTGATGGCATGG-3'
CAR-hum fwd	5'-GGAGCCTGGGACCAGGAGCGAGA-3'
CAR-hum rev	5'-GCCACTCGATGTCCAGCGGTCCC-3'
CAR-mur fwd	5'-CTCTTGTGCGGGATCGCGGATTTC-3'
CAR-mur rev	5'-TGCCAATGTCCGACAGCTGCAGGT-3'
α V-hum fwd	5'-AGAATGACACGGTTGCCGGGCAAG-3'
α V-hum rev	5'-GGCCGGACCCGTTTAAAAAAGCCC-3'
α V-mur fwd	5'-TTGACCTCGCCGAAAAGGCTGCTG-3'
α V-mur rev	5'-GCCGCCCTGTGTCAATTCTTTTCG-3'
β 3-hum fwd	5'-TGCATGTCCAGCAATGGGCTGCTG-3'
β 3-hum rev	5'-CGGCAAGCCAATGAGCAGAATGG-3'
β 3-mur fwd	5'-GCAACCTTCGGATTGGCTTTGGGG-3'
β 3-mur rev	5'-TCATTGGGCAGGACAATGCCTGCC-3'
β 5-hum fwd	5'-ACTGCGGGGAATGCAAGTCCATG-3'
β 5-hum rev	5'-TCATGGCGTTGGGGGTGTTTCCAC-3'
β 5-mur fwd	5'-ACCCTCTACGCCTGTCTGCT-3'
β 5-mur rev	5'-ATCTCCTGCGGCGTCATCTG-3'
AdFiber fwd	5'-ATGAAGCGCGCAAGACCGTC-3'
AdFiber rev	5'-GCCCATTTTGAGCGCAAGCA-3'

Oligonukleotide zur Mutagenese

LDD-1 fwd	5'-Pho-GATCATGCCATTCTAGACGACACCTTTGCCACACGG-3'
LDD-2 rev	5'-Pho-CCGTGTGGCAAAGGTGTCGTCTAGAATGGCATGATC-3'
TAYT-del fwd	5'-GGAGATCTTACTGAAGGCAACGCTGTTGGATTTATG-3'
TAYT-del rev	5'-CATAAATCCAACAGCGTTGCCTTCAGTAAGATCTCC-3'
HI-Swal fwd	5'-GAAACAGGAGACACAACCTATTTAAATCCAAGTGCATA CTCTATG-3'
HI-Swal rev	5'-CATAGAGTATGCACTTGGATTTAAATAGTTGTGTCTCC TGTTC-3'

Oligonukleotide zur Fiber-Amplifizierung

Fiber fwd	5'GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATA GAACCATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGAT-3'
Fiber rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAATGGTGATGG- TGATGGTGTCTTGGGCAATGTATGAAAAAGT-3'

Oligonukleotide zur Hybridisierung und Subklonierung

PepHTF fwd	5'-Pho-GTCATACGTTTGAGCCGGGGTTTGTGG-3'
PepHTF rev	5'-Pho-CCACAAACCCCGGCTCAAACGTATGAC-3'
PepAQL fwd	5'-Pho-GTCTTTTGTCTCAGCTTGGTCCTCGTGG-3'

PepAQL rev	5'-Pho-CCACGAGGACCAAGCTGAGCAAAAAGAC-3'
PepTPRT fwd	5'- Pho-GTACGCCGCGGACTTAGAAGGCTTGTGG-3'
PepTPRT rev	5'-Pho-CCACAAGCCTTCTAAGTCCGCGGCGTAC-3'
PepSRES fwd	5'Pho-GTAGTCGTGAGTCGCCGCATCCTTGTGT-3'
PepSRES rev	5'-Pho-CCACAAGGATGCGGCGACTCACGACTAC-3'

2.1.9 Antikörper

Name	Bezeichnung	Epitop	Firma
CAR	Klone RmcB	erkennt spezifisch gesamtes CAR-Protein	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
α V Integrin	Q-20	erkennt Carboxy- terminus	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg
Actin	I-19	reagiert mit Carboxyterminus	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg
Anti-M13		detektiert das Hüllprotein, Produkt des Gens VIII	Amersham-Bioscience Freiburg
Adenovirus Fiber		erkennt das Kapsid- Protein, kann Virus als Monomer und als Trimer erkennen	Biomeda, USA

Die beschriebenen Antikörper wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Die jeweiligen Sekundärantikörper sind *'horse radish peroxidase'* (HRP) gekoppelt (Amersham, Freiburg) und zum Chemilumineszenznachweis geeignet. Zur Immunfluoreszenz-mikroskopie wurde der entsprechende Sekundärantikörper gekoppelt an Alexa Fluor⁵⁴⁶ eingesetzt (Molecular Probes, Leiden, NL). Für immunhistologische Nachweise wurden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet (Linaris, Wertheim).

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1 Mini-Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden die jeweiligen *E. coli*-Stämme in 5 ml LB-Medium unter entsprechenden Selektionsbedingungen (50 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin) über Nacht bei 37°C und 225 rpm vermehrt. 2 ml dieser Kultur wurden sedimentiert (1 min, 12000 x g, 4°C) und das Bakteriensediment mit 300 µl S1 Puffer resuspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 300 µl S2 Puffer bei einer Inkubation für 5 min bei RT. Nach weiterem Zusatz des Puffers S3 wurden die Proteine auf Eis gefällt und anschließend 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 630 µl Isopropanol die Plasmid-DNA präzipitiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min, 12000 x g und 4°C wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol für 10 min bei 12000 x g und 4°C gewaschen und dann luftgetrocknet. Im Folgenden wurde das Pellet in 30 µl ddH₂O resuspendiert. Mit der aufgereinigten DNA konnten Restriktionsanalysen durchgeführt werden.

LB-Medium:	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 170 mM NaCl ad 1 l ddH ₂ O pH 7,5 (autoklaviert)
S1 Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
S2 Puffer:	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
S3 Puffer:	2,6 M Kaliumacetat pH 7,2

2.2.1.2 Maxi-Plasmidpräparation

Die Aufarbeitung von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden Bakterienkulturen in 500 ml SB-Medium

über Nacht bei 37°C und 225 rpm unter entsprechenden Selektionsbedingungen angezogen. Zur Sedimentation der Bakterien wurden die Ansätze für 10 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml GTE-Puffer resuspendiert und nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurde den Ansätzen 80 ml Lysepuffer zugesetzt. Nach vorsichtigem Invertieren verblieben die Ansätze für 10 min auf Eis und es erfolgte eine Zugabe von 40 ml Kaliumacetatlösung. Wiederholt wurden die Ansätze invertiert und nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden ausgefallene Proteine für 10 min bei 4000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Faltenfilter in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol für 30 min bei RT präzipitiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4000 x g und 4°C. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 7 ml 0,1 x SSC-Puffer resuspendiert. Pro ml resuspendierter DNA wurde 1 g CsCl hinzugegeben, durch kräftiges Schütteln mit der DNA vermischt und für 30 min auf Eis belassen. Im Folgenden wurde zentrifugiert (20 min, 4000 x g, 4°C) und der Überstand in ein Beckmann-Ultrazentrifugenröhrchen überführt, mit 200 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid versetzt und mit Mineralöl überlagert. Die Gefäße wurden mit dem Beckmann Quick Sealer versiegelt und für 16 h bei 55000 rpm und 20°C (TI75 Kontron Rotor) ultrazentrifugiert. Die entstandene Plasmidbande wurde mit einer 18-Gauge-Kanüle abgezogen und das Ethidiumbromid mit TE-gesättigtem Butanol durch mehrfaches Ausschütteln extrahiert. Durch Zugabe von 3 Volumen TE-Puffer und 8 Volumen 100% Ethanol wurde die DNA schließlich präzipitiert und für 30 min bei 4000 x g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 65°C getrocknet und in 0,1 x SSC resuspendiert.

SB-Medium:	80 g LB-Premix 88 g Trypton 60 g Hefeextrakt 5 mM Glukose 5 mM NaOH ad 4 l ddH ₂ O
GTE-Puffer:	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 5 mg/ml Lysozym
Lysepuffer:	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS

Kaliumacetatlösung:	3 M Kaliumacetat mit Eisessig pH 5,5
20 x SSC:	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat pH 7
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

2.2.1.3 DNA-Restriktion

Zur Restriktion wurden pro 1 µg DNA 1-2 Enzymeinheiten der entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet. Die Inkubationsdauer bzw. -temperatur richtete sich nach den Angaben der Hersteller. Die Verifizierung der DNA-Restriktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.6).

2.2.1.4 Auffüllen 5'-überhängender Enden

Das Auffüllen 5'-überhängender Enden erfolgte im 40 µl Ansatz, der sich aus 5 µg DNA, 4 µl Klenow-Puffer, 2 µl Klenow-Enzym (Roche, Mannheim) und 2 µl dNTP-Mix (je 10 µM) zusammensetzte. Das Volumen wurde auf 40 µl aufgefüllt und für 2-3 h bei 37°C inkubiert.

10 x Klenow-Puffer:	0,5 M Tris/HCl pH 7,5 0,1 M MgCl ₂
---------------------	--

2.2.1.5 DNA-Dephosphorylierung

Zur Unterbindung der Religation wurden die 5'-Phosphatgruppen linearisierter Plasmidvektoren abgespalten. Dies erfolgte mittels alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim). In einem Reaktionsansatz wurden 4 Enzymeinheiten, 4 µl 10 x Puffer zu 10 µg linearisierter DNA hinzugefügt und zu einem Reaktionsvolumen von 40 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 2-3 h bei 37°C inkubiert und anschließend über das PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.2.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe erfolgte über Agarosegele. Die Gele wurden 0,8-2% (w/v) mit 1x TAE-Puffer präpariert und mit 0,2 µg/ml

Ethidiumbromid versetzt. PCR-Fragmente wurden mittels vertikaler 0,05%iger Polyacrylamidgele in 0,5 x TBE-Puffer aufgetrennt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 10 x DNA-Probenpuffer versetzt und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 5-20 V/cm durchgeführt.

50 x TAE-Puffer:	2 M Tris/Acetat 150 mM EDTA pH 8,0
5 x TBE-Puffer:	450 mM Borsäure 450 mM Tris/HCl 10 mM EDTA pH 8,0 ad 1 l ddH ₂ O
10 x DNA-Probenpuffer:	0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,5% (w/v) Xylencyanol 50% (v/v) Glycerin

2.2.1.7 Elution aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.8 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden erfolgte in einem molaren Verhältnis 1:3 von Vektor zu Fragment, bei Ligationen von glatten Enden in einem Verhältnis von 1:5. Hierbei wurde die einzusetzende Menge des DNA-Fragmentes bei 100 ng Vektor über folgende Formel berechnet:

$$(100 \text{ ng Vektor} \times \text{Länge Fragmentes in bp}) / \text{Länge des Vektors in bp} \times 3 \text{ bzw. } 5.$$

Die berechnete Menge an DNA wurde anschließend mit einer Enzymeinheit T4 DNA Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) in einem 10 µl Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.1.9 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Stämme wurden die Bakterien in 250 ml LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezogen. Anschließend verblieben die Bakterien für 15 min auf Eis, wurden dann bei 2500 x g, 4°C und 15 min sedimentiert und in 100 ml vorgekühltem ddH₂O resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation

(15 min, 2500 x g, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 50 ml vorgekühltem ddH₂O resuspendiert und nochmals sedimentiert (15 min, 2500 x g, 4°C). Das Pellet wurde weiterhin in 10% Glycerin aufgenommen, resuspendiert und in einem letzten Zentrifugationsschritt (15 min, 2500 x g, 4°C) sedimentiert. Die Bakterien wurden dann in 400 µl 10% Glycerin aufgenommen, in 40 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.10 Bakterielle Transformation mittels Elektroporation

Die Transformation von Ligationsansätzen sowie Plasmid-DNA erfolgte mit 40 µl elektrokompetenter *E. coli*-Bakterien, denen 1,5-2 µl Ligationsansatz oder eine entsprechende Menge Plasmid-DNA beigefügt wurden. Bakterien und DNA wurden in eine gekühlte 0,1 mm-Elektroporationsküvette (PepLab) gegeben und bei 1,8 kV im *E. coli*-Gene Pulser (Bio-Rad, München) elektroporiert. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium erfolgte die phänische Expression bei 37°C für 30-60 min im Bakterienschüttler. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgebracht und bei 37°C über Nacht bebrütet.

SOC-Medium:	2% (w/v) Trypton
	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glukose

2.2.1.11 Bakterielle Transformation mittels Hitzeschock

Zur Transformation wurden 2 µl eines Ligationsansatzes oder 10-100 ng Plasmid-DNA zu 30 µl chemisch kompetenten Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42°C. Anschließend wurden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt und die phänische Expression erfolgte wie unter 2.2.1.10.

2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Mullis et al., 1992). Hierbei wurde die HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Ein typischer

Ansatz, wie er zur Amplifizierung von revers transkribierter cDNA (2.2.2.3) verwendet wurde, setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl 10 x Puffer
 2 µl dNTPs (10 µM)
 2 µl 5'-Primer (10 pmol/µl)
 2 µl 3'-Primer (10 pmol/µl)
 0,5 µl HotMaster Taq DNA Polymerase (10 Einheiten/µl)
 2 µl cDNA (nach Kapitel 2.2.2.3)
 ad 50 µl dd H₂O

Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet: Für die Amplifizierung von cDNA wurde ein 'touchdown'-Programm (Don et al., 1991) ausgewählt.

94°C	5 min		
94°C	15 s	↶	10 Zyklen
T _m +2°C (-0,5°C/Zyklus)	30 s		
72°C	1 min		
94°C	15 s	↶	8-25 Zyklen
T _m -3°C	30 s		
72°C	1 min		
72°C	7 min		

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose- bzw. Polyacrylamid-gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) überprüft.

2.2.1.13 Zielgerichtete Mutagenese

Zur zielgerichteten Punktmutation oder Deletion eines spezifischen Nukleinsäureabschnittes wurde das QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Abschnitt (2.1.8) beschrieben. Die Reaktion wurde nach Angaben und Protokollen des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.14 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm vermessen.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration} = 62,9 \times \text{OD}_{260} - 36,0 \times \text{OD}_{280} \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

2.2.2 RNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen bzw. Geweben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurde das RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) verwendet. Die RNA wurde anschließend in 30 μl RNase-freiem H_2O eluiert und bei -80°C gelagert. Die Qualität der RNA wurde photometrisch überprüft.

2.2.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch über die Extinktion einer wässrigen RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktion wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

2.2.2.3 Reverse Transkription

Die Umsetzung von Gesamt-RNA in cDNA zur semiquantitativen Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe des Omniscript RT-Kit (Qiagen, Hilden) ausgeführt. Dazu wurde 1 μg Gesamt-RNA mit 1 μM Random Hexamer Primer (Perkin Elmer, Weiterstadt), 1 mM dNTP, 40 Einheiten RNase Inhibitor (Promega, Mannheim) und 4 Einheiten Reverser Transkriptase (Qiagen, Hilden) in 10 x Reaktionspuffer und einem Gesamtvolumen von 20 μl für 60 min bei 37°C nach Herstellerangaben inkubiert. Nach Inaktivierung für 5 min bei 95°C wurden dem Ansatz 30 μl RNase-freies H_2O zugefügt und 2 μl dieses Ansatzes in die PCR-Reaktion (2.2.1.12) eingesetzt.

2.2.3 Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtprotein aus Zellextrakten wurden die Zellen von der entsprechenden Zellkulturschale abgeschabt, im eigenen Medium resuspendiert und

für 10 min bei 300 x g und 4°C sedimentiert. Je nach Zellzahl wurde das Zellpellet in 50–200 µl RIPA-Puffer mit 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail (PI) Complete Mini (Roche, Mannheim) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung unlöslicher Zelltrümmer wurde für 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei –80°C gelagert.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,2
	150 mM NaCl
	0,1% (w/v) SDS
	1% Na-Desoxycholat
	1% Triton X-100

2.2.3.2 Herstellung von Gewebsextrakten

Zunächst wurden die entsprechenden Gewebe aus verschiedenen Mausmodellen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Lysierung in RIPA-Puffer (2.2.3.1) wurden die Gewebe unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und wie unter 2.2.3.1 weiterbehandelt.

2.2.3.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzell-/Gewebsextrakten erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München). Hierzu wurde 1 µl Proteinextrakt mit 99 µl PBS⁻, 700 µl H₂O und 200 µl Bio-Rad Protein-Assay bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer vermessen. Durch die Verwendung einer BSA-Eichkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gesamtproteine wurden über sog. SDS-Polyacrylamidgele unter reduzierenden Bedingungen im diskontinuierlichen System (Laemmli, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag je nach Proteingröße zwischen 6-10 %. Die Zusammensetzung der Puffer erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Für die Elektrophorese wurden pro Gelspur 80-200 µg Gesamtproteinextrakt zusammen mit SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95°C denaturiert und zur Auftrennung im PROTEAN III-System (Bio-Rad, München) in 1 x SDS-Laufpuffer aufgetragen.

5 x SDS-Laufpuffer:	125 mM Tris 125 mM Glycin 0,5% (w/v) SDS
SDS-Gelladepuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,8 100 mM Dithiothreitol 2% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Bromphenolblau 10% (v/v) Glycerin

2.2.3.5 Western Blot

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) zu transferieren, wurde das *'semi-dry blotting'*-Verfahren mit Hilfe der Trans Blot SD-Zelle (Bio-Rad, München) verwendet. Nachdem die Membran sowie weitere Bestandteile in 1 x Blotpuffer äquilibriert wurden, wurden die Proteine je nach Größe für 60-90 min bei 1,5 mA/cm² Membranfläche transferiert.

5 x Blotpuffer:	970 mM Glycin 125 mM Tris/HCl pH 8,3
-----------------	---

2.2.3.6 Immundetektion

Abhängig vom Primärantikörper wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT in TBS mit 0,1% Tween-20 (TBST 0,1%) und 5–10% (w/v) Milchpulver blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers bei einer Verdünnung von 1:100–1:10000 in TBST 0,1% mit 5% (w/v) Milchpulver erfolgte unter Schwenken über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen in TBST 0,1% wurde die Membran mit dem entsprechenden *'horse radish peroxidase'* (HRP) gekoppelten Zweitantikörper nach Herstellerangaben inkubiert. Die Membran wurde dann erneut dreimal in TBST 0,1%, zweimal in TBST 0,2% und einmal in TBS gewaschen. Die Chemilumineszenz-Detektion erfolgte mit Hilfe des Super Signal Dura Extended Kit (Pierce, Bonn) nach den Herstellerangaben. Zur Exposition der Membran wurden X-Omat Kodak Röntgenfilme verwendet.

10 x TBS-Puffer:	200 mM Tris 1,35 M NaCl
------------------	----------------------------

2.2.4 Zellkulturarbeiten und Transfektionsmethoden

2.2.4.1 Allgemeine Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden auf beschichteten Zellkulturschalen bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle Zelllinien wurden in DMEM-Medium kultiviert mit Ausnahme der TT-Zellen, die in RPMI 1640 herangezogen wurden. Weitere Medienzusätze waren 10% fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Penicillin und 100 Einheiten/ml Streptomycin. Zum Passagieren wurden die Zellen nach Aspiration des Mediums mit PBS⁻ gewaschen, mit Trypsin (2,5 mg/ml Trypsin-Lsg.) bedeckt und von der Zellkulturschale gelöst. Von diesen Zellen wurde ein Aliquot in eine neue Zellkulturschale mit frischem Medium überführt.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl einer entsprechend verdünnten Zellsuspension wurde ein Hämatozytometer (nach Neubauer) verwendet. Hierbei wurden vitale von beschädigten Zellen durch Zugabe von 0,5% Trypanblau unterschieden.

2.2.4.3 Calciumphosphat-Transfektion

Zunächst wurden die zu transfizierenden Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. 2 µg der zu transfizierenden DNA wurden in 438 µl H₂O gelöst und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit 62 µl 2 M CaCl₂-Lösung überführt. Diese Lösung wurde nun tropfenweise unter Vortexen zu 500 µl 2 x HBS gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der Zellkulturschale bis auf 1 ml abgezogen und der DNA/CaCl₂/HBS-Mix tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation für 6-18 h bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre erfolgte ein Austausch des Transfektionsansatzes durch frisches Zellkulturmedium.

2 x HBS.	50 mM HEPES pH 7,05
	10 mM KCl
	120 mM Dextrose
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄
	pH ad 7,05 +/- 0,05

2.2.4.4 Verschiedene Transfektionsmethoden

Neben der Calciumphosphat-Transfektion wurden Zellen ebenfalls mit Effectene-, Polyfect- und Superfect-Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben transfiziert.

2.2.5 Adenovirale Arbeitstechniken

2.2.5.1 Das AdEasy-System

Zur Herstellung replikationsdefekter adenoviraler Vektoren (AdVektoren) wurde das sogenannte AdEasy-System (He et al., 1998) verwendet. Bei diesem System sollen Fremdgene mittels homologer Rekombination in das Ad5-Genom eingeschleust werden. Dazu befindet sich das in den Regionen E1 und E3 deletierte Ad5-Genom auf dem einen Plasmid (pAdEasy 1), das Einbringen von Fremdgenen erfolgt über das sogenannte Shuttle-Plasmid (pShuttle, pAdTrack), das kurze homologe Sequenzen des Ad5-Genoms enthält. Durch die homologe Rekombination in *E.coli* BJ5183 Bakterien wird ein Plasmid erzeugt, das neben dem Ad5-Genom eine Expressionkassette in der deletierten E1 Region besitzt. Die Generierung des Virus erfolgt nach Linearisierung des Vektors und Transfektion in E1A transformierte 293 Zellen. Alle Komponenten dieses Systems wurden von B. Vogelstein (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2.5.2 Modifizierung des adenoviralen Vektorrückgrats und Virusgenerierung

Zur Herstellung eines modifizierten Adenovirus, dessen natürlicher Tropismus deletiert werden sollte, wurde zunächst innerhalb des pAdEasy 1-Plasmids das Pentonbasis-Gen in einen Klonierungsvektor (pCR2.1-Topo) subkloniert und in den Aminosäuren R340L und G341D mutiert. Diese mutierte Pentonbasis wurde dann über geeignete Restriktionsschnittstellen gegen die Wildtyp-Pentonbasis ausgetauscht. In einem weiteren Schritt wurde das Fibrogen in einer PCR-Reaktion amplifiziert und ebenfalls in den Vektor pCR2.1-Topo subkloniert. Für die PCR wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, so dass an das C-terminale Ende des Fibergens ein 6 x His-Tag angehängen wurde. Im sogenannten '*FG-loop*' des Fibers wurde eine Deletion (d489-492) durchgeführt und überdies eine *Swal*-Schnittstelle zur Subklonierung kurzer Peptidsequenzen (CHTFEPGVC und CSRESPHPC) in den '*HI-loop*' des Fibergens eingefügt. Das modifizierte Fibrogen wurde ebenfalls gegen das Wildtyp-Gen im

AdEasy 1-Plasmid über geeignete Restriktionsschnittstellen ausgetauscht, wobei ein Zwischenschritt über ein weiteres Plasmid (pGene V5-HisA) erfolgte (siehe Abb.: 3.20).

Zur Generierung eines Virus wurde zunächst eine Rekombination des "natürlichen" oder modifizierten pAdEasy 1-Plasmids mit dem *PmeI* linearisierten "shuttle"-Plasmid pAdTrack.CMV in dem dafür geeigneten Bakterienstamm *E. coli* BJ5183 durchgeführt. Nach Überprüfung von Rekombinationsklonen wurde positive Plasmid-DNA in XL2-Blue Bakterien retransformiert, über eine CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und mit der Restriktionsendonuklease *PacI* linearisiert. Die linearisierte DNA wurde zweimal über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und in E1A-transformierte 293 Zellen transfiziert. Diese Zelllinie stellt die deletierten Genprodukte der Ad5 E1 Region in *trans* zur Verfügung und ist daher zur Generierung und Propagierung von Adenoviren wichtig. 3–7 Tage nach Transfektion wurden infektiöse 293 Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und zusammen mit dem Überstand durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C lysiert. Zur Herstellung sog. 'high titer' wurden acht 15 mm Zellkulturschalen mit dem lysierten Zellüberstand, in dem sich die freigesetzten Viren befinden, infiziert und nach Entstehung eines zytopathischen Effektes (CPE) vereinigt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g und 4°C wurde das Zellpellet in 4 ml PBS^{+/+} mit 10% Glycerin (v/v) resuspendiert und dreimal zur Freisetzung der viralen Partikel wie oben lysiert. Die Lagerung des Virus erfolgte bei –80°C.

2.2.5.3 Transduktion

Die Transduktion von verschiedenen Zelllinien mit AdVektoren wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Hierzu wurde das Medium aspiriert und die Vektoren in kleinstem Volumen (ca. 5% des Ausgangsvolumens) auf die Zellen gegeben und anschließend mit entsprechendem Medium wieder aufgefüllt. Die Transduktion erfolgte für jede Zelllinie mit der entsprechenden Infektionsmultiplizität (MOI), mit der eine 100%ige Transduktion der Zellen erreicht wurde.

2.2.5.4 CsCl-Dichtegradientenaufreinigung

Zur Aufreinigung adenoviraler Partikel mittel CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurden zunächst 32 15 cm Zellkulturschalen mit 293 Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 200-400 µl des 'high titer' Stocks infiziert (2.2.5.2) und bis zum Entstehen eines CPE im CO₂-Inkubator bei

37°C belassen. Die Zellen wurden nun abgeschabt und zusammen mit dem Medium in Zentrifugenbecher überführt. Nach Sedimentierung der Zellen für 15 min, 1000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 15 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert. Dem Ansatz wurden 1,5 ml 5% Na-Desoxycholat hinzugefügt und dieser für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Zelllyse erfolgte eine Zugabe von 150 µl 2 M MgCl₂ und 75 µl DNase I-Lösung (10 mg/ml) sowie eine Inkubation für 30-60 min bei 37°C. Zur Beseitigung von Zellfragmenten wurde erneut für 15 min, 2500 x g und 4°C zentrifugiert und jeweils 5 ml des Lysatüberstandes auf einen vorbereiteten Gradienten gegeben:

3 ml	1,5 g/cm ³ CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0
3 ml	1,35 g/cm ³ CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0
0,5 ml	1,25 g/cm ³ CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0

Der Gradient wurde aufeinander geschichtet und in dafür vorgesehene SW 40 Ultra Clear-Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Unterschleißheim) überführt. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation im SW 40 Ausschwingrotor für 1 h, 35000 rpm und 10°C. Die Virusbande wurde mittels einer 18-Gauge-Kanüle aus den Zentrifugenröhrchen abgesaugt und in ein neues SW 40-Zentrifugenröhrchen überführt. Der Ansatz wurde mit 1,35 g/cm³ CsCl in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgefüllt und für 16-24 h bei 35000 rpm und 10°C ultrazentrifugiert. Die Virusbande wurde wiederholt abgesaugt und mittels einer 18-Gauge-Kanüle in eine Slide-A-Lyzer-Dialysekassette (Pierce, Bonn) gegeben. Die Dialyse erfolgte für 24 h bei 4°C gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0. Zur Lagerung bei -80°C wurde das aufgereinigte Virus mit Glycerin versehen mit einer Endkonzentration von 10%.

2.2.5.5 Virustitration

Neben der Titerbestimmung des Virus anhand des "Standard-Plaquesassays" in 293 Zellen (Graham und Prevec, 1991; Hitt et al., 1994) wurde die infektiöse Dosis in Zellkultur (TCID₅₀) bestimmt. Dazu wurden auf eine 96 Loch-Zellkulturplatte jeweils 10⁴ 293 Zellen ausgesät. 24 h später wurden verschiedene Verdünnungen der Viruspräparation in zehnfachem Ansatz auf die Zellen gegeben und nach 7-10 Tagen die Plauebildung beobachtet. Der Titer wurde statistisch nach der KÄRBER-Methode nach folgender Formel ausgewertet:

$$T=10^{1+d(S-0,5)}$$

Hierbei beschreibt 'd' den log 10 der Verdünnung (=1 für eine 10fache Verdünnung) und 'S' entspricht der Summe aller Verhältnisse. Die Umrechnung in Plaque bildende Einheiten pro ml (pfu/ml) ergibt sich aus folgender Formel:

$$10^y \text{TCID}_{50}/\text{ml} = 10^{y-0,7} \text{ pfu/ml}$$

2.2.5.6 "PEGylierung" von adenoviralen Vektoren

Der Virus Ad5.CMV.GFP wurde wie unter 2.2.5.4 aufgereinigt und gegen 130 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 zuzüglich 5% (w/v) Sukrose über Nacht in einer Slide-A-Lyzer Dialysekassette (Pierce, Bonn) dialysiert. Zum Virus wurden anschließend 5% (w/v) bifunktionales TMPEG hinzugefügt. Um eine Kopplung an die Virusoberfläche zu ermöglichen, erfolgte eine Inkubation der Ansätze für 1 h bei RT unter ständigem Rühren (O'Riordan et al., 1999). Zur Beseitigung nichtreaktiven TMPEG wurde die Aufreinigung über einen CsCl-Dichtegradienten (1,35 g/cm³) wiederholt und anschließend gegen PBS⁻ + 5% Sukrose (w/v) dialysiert (Romanczuk et al., 1999). Die Peptide HTFEPGVC und TPRTQKAC, das als Negativkontrolle diente, wurden kommerziell synthetisiert und enthielten jeweils ein C-terminales Cystein mit einer freien Sulfhydryl-Gruppe. Beide Peptide wurden in PBS⁻ + 5% Sukrose (w/v) verdünnt und auf eine Endkonzentration von 10 mM eingestellt. Diese wurden dem "PEGylierten" Virus zugefügt wobei die Peptidkonzentration 1 mM betrug. Die Ansätze wurden dann für 4 h bei RT unter ständigem Rühren inkubiert. Zur Beseitigung nicht gebundenen Peptids erfolgte ein weiterer Dialyseschritt gegen PBS⁻ + 5% Sukrose (w/v) über Nacht. Zur Lagerung bei -80°C wurde das "PEGylierte" Virus mit Glycerin versehen mit einer Endkonzentration von 10%. Ohne Zusatz an Glycerin wurde das Virus bei 4°C gelagert und sofort zur Transduktion eingesetzt.

2.2.6 Verwendung von Phagenbanken - '*phage display*'

'*Phage display*' beschreibt eine Technik, bei der Peptide oder Proteine als Fusion mit dem Hüllprotein eines Bakteriophagen exprimiert und auf der Oberfläche des Virions präsentiert werden. Die Konstruktion einer filamentösen Phagenbank (Bakteriophage M13) erfolgte über das Plasmid fUSE5, auf dem eine Zufallsnukleotidsequenz (NNK_x; N= G, A, T, C; K= G, T; x= Anzahl der Triplets) mit dem kleinen Hüllprotein pIII fusioniert ist (Scott und Smith, 1990). Auf diese Weise entsteht eine "Epitopen-Bank" mit einer Kapazität von ca. 10⁹ elektroporierten Sequenzen, die eine schnelle Identifizierung von Peptidliganden über Sequenzierung der kodierenden DNA-Abschnitte für eine Vielzahl von Zielmolekülen erlaubt. Die Vermehrung der

Phagenbank erfolgt hierbei in *E. coli* Bakterien, die durch den Bakteriophagen nicht lysiert werden. Der Selektionsprozess wird als '*biopanning*' bezeichnet, bei dem die Phagenbank mit den jeweiligen Zielmolekülen inkubiert wird, ungebundene Phagen durch mehrere Waschschrte entfernt und spezifisch gebundene Phagen vom Zielmolekül eluiert werden. Eluierte Phagen werden anschließend in Bakterien amplifiziert und für weitere '*biopanning*'-Zyklen eingesetzt, so dass spezifische Phagen angereichert werden.

In dieser Arbeit wurde eine 7 Aminosäuren lange zyklische Phagenbank verwendet (New England Biolabs, Frankfurt am Main).

2.2.6.1 Phagentitration

Um die genaue Konzentration infektiöser Phagen zu bestimmen, wurde eine serielle Verdünnungsreihe angefertigt. Nach einem '*biopanning*'-Zyklus (2.2.6.2 und 2.2.6.3) wurden Verdünnungen von 10^1 - 10^6 , nach einer Phagenamplifizierung (2.2.6.5 und 2.2.6.6) Verdünnungen von 10^8 - 10^{11} verwendet. Zunächst wurde eine *E.coli* ER2738 Übernachtskultur angelegt, womit 5–10 ml LB-Medium zuzüglich Tetrazyklin (tet) mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml (LB_{tet}-Medium) inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,5 im Bakterienrüttler inkubiert wurden. Parallel wurde Agarose Top-Medium in der Mikrowelle aufgeköcht und in 3 ml Aliquots bei 45°C belassen. Zur Phageninfektion wurden je 10 µl einer Verdünnung mit 200 µl kompetenten Bakterien für 1-5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Bakterienzellen in ein Reaktionsgefäß mit Agarose Top-Medium transferiert, gevortext und auf LB-Agarplatten zuzüglich Tetrazyklin, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid (X-Gal) und Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid (IPTG) zur Blau-Weiß-Selektion ausgebracht. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Phagenplaques (plaque forming units = pfu) gezählt, wobei nur blaue Plaques rekombinante Phagen darstellen. Die Konzentration infektiöser Partikel für 1 ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{pfu/ml} = \text{gezählte Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100$$

2.2.6.2 *In vitro* 'biopanning'

Die Inkubation der Phagenbank erfolgte direkt auf kultivierten TT Zellen (Nicklin et al., 2000). Für die '*panning*'-Prozedur wurden zunächst TT Zellen auf einer 6 Loch-Zellkulturschale ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz sollten die Zellen für weitere 2 Tage in frischem Medium

(RPMI 1640 mit den benötigten Zusätzen) verbleiben. Anschließend wurde das Medium aspiriert und durch RPMI 1640 ohne Zusätze mit 1% BSA ersetzt. Die Zellen wurden für 15 min bei 4°C belassen und anschließend mit 1×10^9 pfu/ml der Ausgangsphagenbank für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach 5 Waschschrritten mit jeweils 1 ml eiskaltem PBS mit 1% BSA konnten schwach assoziierte Phagen mit 1 ml 0,2 M Glycin-Puffer eluiert werden. Die Lösungen wurden dann mit 200 μ l 1 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert. Zur Elution der stark assoziierten Phagen wurden die Zellen mittels 1 ml 30 mM Tris/HCl + 1 mM EDTA pH 8,0 für 1 h bei 4°C lysiert. Im Folgenden wurden die Zellen geerntet, für 10 min bei 300 x g und 4°C sedimentiert und der Phagentiter ermittelt (2.2.6.1). Zur Anreicherung spezifischer Phagen wurden 600–1000 einzelne Phagenklone amplifiziert und vereinigt, um mit diesen nach Phagenpräparation (2.2.6.7) einen neuen '*biopanning*'-Zyklus durchzuführen. Das gesamte Verfahren wurde 2 x wiederholt.

2.2.6.3 *In vivo* 'biopanning'

Zunächst wurden 10^7 TT Zellen subkutan in die rechte hintere Flanke immunsuprimierter Nacktmäuse injiziert. Mäusen, die einen Tumor mit ca. 1 cm Durchmesser entwickelten, wurden 10^{12} pfu der Ausgangsphagenbank intravenös in die Schwanzvene appliziert. Nach 5 min Zirkulation der Phagen im Blutkreislauf und Perfusion durch das Herz wurde die jeweilige Maus getötet und der Tumor sowie mehrere Kontrollgewebe isoliert. Die entnommenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe eines Mörsers zu feinem Pulver aufgearbeitet. Dieses wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in DMEM mit 1 x Protease-Inhibitor (PI) aufgenommen und für 5 min bei 300 x g und 4°C sedimentiert. Nach 3 x Waschen in DMEM mit 1 x PI und 1% BSA erfolgte eine Inkubation mit 1 ml kompetenter *E. coli* ER2738 (2.2.6.4) für 1 h bei RT. Von den Ansätzen wurden verschiedene Verdünnungen angefertigt und zur Titerbestimmung eingesetzt. Zur Anreicherung tumorspezifischer Phagen wurden 200–500 Phagenklone aus dem aufgearbeitetem Tumor amplifiziert und vereinigt. Nach geeigneter Phagenpräparation (2.2.6.6) wurde das '*biopanning*' 2 x wiederholt (Pasqualini et al., 1996).

2.2.6.4 Herstellung kompetenter Bakterien zur effizienten Phagentransduktion

20 ml NZY-Medium zuzüglich Tetrazyklin mit einer Endkonzentration von 20 μ g/ml wurden 5%ig aus einer Übernachtskultur *E. coli* ER2738 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4–0,6 im Bakterienschüttler bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Die

Bakterienzellen wurden für 10 min bei 1000 x g und 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml 80 mM NaCl gewaschen. Nach 45 min Inkubation im Bakterieneschüttler bei 37°C wurden die Zellen wie oben sedimentiert und in 1 ml NAP-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Bakterien konnten 5 Tage bei 4°C gelagert werden (Smith und Scott, 1993).

NZY-Medium:	10 g NZ-Amine (enzymatisches Caseinhydrolysat)
	5 g NaCl
	5 g Hefeextrakt
NAP-Puffer:	90 ml 88 mM NaCl
	10 ml 0,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 7,0

2.2.6.5 Phagentransduktion

20 µl kompetente Bakterien (2.2.6.4) wurden mit 20 µl der Ausgangsphagenbank für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von NZY-Medium zuzüglich Tetrazyklin wurden die Ansätze für 20-40 min bei 37°C im Bakterieneschüttler inkubiert (Smith und Scott, 1993).

2.2.6.6 Phagenpräparation über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Aufarbeitung der Phagen im großen Maßstab (Smith und Scott, 1993) wurde 1 l LB-Medium mit infizierten Bakterien (2.2.6.5) inokuliert und für 5 h oder über Nacht bei 37°C im Bakterieneschüttler belassen. Die Bakterienzellen wurden durch zweifache Zentrifugation im GSA-Rotor für 10 min bei 4000 bzw. 10400 x g und 4°C sedimentiert, wobei sich die Phagen im Überstand befanden. Dem Überstand wurden 0,15 Volumen PEG/NaCl-Lösung zugefügt und der Ansatz nach Durchmischen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min, 10400 x g und 4°C im GSA-Rotor wurde das Phagenpräzipitat in 30 ml 1 x TBS-Puffer pH 7,5 resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde zur Beseitigung von Bakterienresten nochmals zentrifugiert (10 min, 27000 x g, 4°C) und der Überstand mit 4,5 ml PEG/NaCl-Lösung gemischt und für 1 h auf Eis belassen. Zur Sedimentation der Phagen schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (30 min, 7700 x g, 4°C) an und die Phagen wurden in 10 ml 1 x TBS-Puffer resuspendiert. Zur Reinigung wurde nochmals abzentrifugiert (10 min, 27000 x g, 4°C) und der Überstand in ein dafür vorgesehenes SW 40 Ultra Clear-Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Unterschleißheim) überführt. Der Ansatz wurde mittels 1 x TBS-Puffer auf 10,75 g eingewogen und durch Zugabe von 4,83 g CsCl auf eine Dichte von 1,3 g/ml eingestellt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation im SW 40 Beckmann-Ausschwingrotor für 40 h bei 37000 rpm und

4°C. Die Isolierung der Phagenbande wurde durch Punktierung mit einer 18-Gauge-Kanüle durchgeführt, wobei die Phagen anschließend in ein 26 ml-Polykarbongefäß überführt und mit TBS-Puffer aufgefüllt wurden. Es erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation in einem 60Ti-Rotor der Firma Beckmann für 4 h bei 50000 rpm und 4°C, nach der das Phagensediment in 3,2 ml 1 x TBS-Puffer resuspendiert und in 8 x 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurde. In einem letzten Schritt wurden die Phagen im TLA-100.1 Beckmannrotor für 90 min, 57000 rpm und 4°C sedimentiert und in einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgenommen. Diese Aufarbeitung führte zu einem Titer von ca. 1×10^{13} pfu/ml. Die aufgearbeiteten Phagen wurden zum Teil mit Glycerin (Endkonzentration 50%) versetzt und bei -20°C gelagert. Phagen, die direkt in Funktionalitätsanalysen getestet wurden, verblieben bei 4°C.

PEG/NaCl-Lösung:	20% (w/v) Polyethylenglykol 8000 2.5 M NaCl
10 x TBS-Puffer:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl pH 7,5

2.2.6.7 Phagenpräparation nach NEB

Die aufzuarbeitenden Phagen wurden mit 30 ml 1:50 in LB_{tet}-Medium verdünnten *E. coli* - Bakterien (ER2738) für 4-5 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min, 12000 x g und 4°C wurde der Phagenüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals wie oben zentrifugiert. 80% des Überstandes wurden anschließend mit 1/6 Volumen PEG/NaCl-Lösung vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Sedimentation der Phagen erfolgte für 15 min bei 12000 x g und 4°C. Das Phagenpräzipitat wurde in 1 ml TBS-Puffer resuspendiert und zur Beseitigung restlicher Bakterienzellen erneut wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, nochmals mit 1/6 Volumen PEG/NaCl-Lösung versetzt und verblieb für 1 h auf Eis. Das Phagenpräzipitat wurde sedimentiert (10 min, 12000 x g, 4°C) und in 100 µl TBS-Puffer zuzüglich 0,2 %NaN₃ resuspendiert. Die aufgearbeiteten Phagen wurden zum Teil mit Glycerin (Endkonzentration 50%) versetzt und bei -20°C gelagert. Phagen, die direkt in Funktionalitätsanalysen getestet wurden, verblieben bei 4°C.

2.2.6.8 ELISA: Untersuchung zur Bindeaffinität

Zur Analyse der Bindeaffinität einer großen Menge an Phagenklonen wurde ein 'enzyme linked immunosorbent assay' (ELISA) etabliert. Dazu wurden zunächst TT Zellen auf einer 96 Loch-Platte ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 10% Formaldehyd/PBS für 20 min bei RT. Die zu untersuchenden Phagenklone wurden als sogenannte Phagenstocks eingesetzt. Dazu wurden kompetente Bakterien mit einzelnen Phagenplaques transduziert und für 5 h bei 37°C im Bakterienschüttler vermehrt. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (15 min, 4000 x g, 4°C) und der phagenhaltige Überstand wurde zur Analyse eingesetzt. Der Wildtypphage M13 diente als Negativkontrolle, als Basiswert wurde reines LB_{tet}-Medium verwendet. Zunächst erfolgte eine Abblockreaktion mit PBS⁻ + 1% BSA + 10% FCS für 15 min bei RT. Die Phageninkubation selbst wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Nach fünf Waschschrritten mit PBS⁻ + 1% BSA wurden die Ansätze mit einem 'horse radish peroxidase' gekoppelten anti-M13 Antikörper über Nacht inkubiert. Um die Phagen-Zell-Interaktion nachzuweisen wurde das Detection Module Recombinant Phage Antibody System (Amersham, Freiburg) verwendet und nach Herstellerangaben fortgefahren. Die Visualisierung erfolgte im Benchmark microplate reader (Bio-Rad, München) bei 415 nm.

2.2.6.9 Spezifitätsanalysen auf verschiedenen Zelllinien mittels Titration

Zum Nachweis der spezifischen Bindung verschiedener Phagenklone an TT Zellen wurde das Bindeverhalten im Vergleich auf verschiedenen Zelllinien getestet. Hierzu wurden 10⁷ Zellen (TT, 293, H1299 und VH6) ausgezählt und für 4 h bei 4°C mit 1,5 x 10¹¹ Phagen in Lösung inkubiert. Nach 5 Waschschrritten mit kaltem PBS⁻ + 1% BSA + 0,1% Tween-20 wurden gebundene Phagen mit Hilfe von 0,1 M Glycin-Puffer pH 2,2 eluiert. Die lysierten Zellen wurden dann sedimentiert (10 min, 300 x g, 4°C) und der Überstand mit 2 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert. Zur Bestimmung der Phagenspezifität *in vivo* wurden 10⁹ pfu verschiedener Phagenklone in die Schwanzvene der jeweiligen Maus injiziert und es erfolgte eine Zirkulation im Blutkreislauf für 5 min mit anschließender Perfusion durch das Herz. Die Tumoren sowie Kontrollorgane (Niere, Leber, Lunge, Herz) wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wie unter 2.2.6.3 aufgearbeitet. *In vitro* und *in vivo* isolierte Phagen wurden anschließend mit kompetenten Bakterien inkubiert, um den Phagentiter (2.2.6.1) zu bestimmen.

2.2.6.10 Wettbewerbsversuch *in vitro* und *in vivo*

Zur Verifizierung der spezifischen Peptidbindung wurden 10^9 pfu des Phagen HTFEPGV in Kombination mit 300 ng–30 µg der Peptide HTFEPGV und TRPTQKA mit jeweils 10^6 TT Zellen für 1 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 1% BSA und 0,1% Tween-20 wurden die Phagen mit 0,1 M Glycin-Puffer eluiert. Die Zellen wurden pelletiert und mit 2 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert. Für den *in vivo* Ansatz wurden 10^9 pfu der Phagen HTFEPGV (Nacktmausmodell) und SRESPHP (transgenes *RET*-Mausmodell) intravenös in Kombination mit den jeweils analogen Peptiden injiziert. Dann wurde wie unter 2.2.6.9 fortgefahren. Der Phagentiter wurde wie unter 2.2.6.1 bestimmt.

2.2.6.11 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der Lokalisation gebundener Phagen erfolgte durch Immunfluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden 10^6 TT Zellen auf Deckgläschen ausgesät und bis zur vollständigen Adhärenz (48 h) im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläschen in den entsprechenden Zellkulturschalen mit 10% Formaldehyd in PBS⁻ für 20 min inkubiert. Nach dreifachem Waschen in PBS⁻-Puffer wurden die Ansätze mit $1,5 \times 10^{11}$ Phagen inkubiert und anschließend mit PBS⁻ + 1 % BSA + 10% FCS abgeblockt. Für ein Internalisierungsexperiment wurden pro Deckgläschen 5×10^4 Zellen ausgesät und für 24 h mit der gleichen Phagenmenge wie oben für 24 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Als positiver Kontrollphage diente der Phage RGD-4C, als Negativkontrollen wurden der Wildtypphage M13 und eine unbehandelte Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden anschließend mit 500 mM NaCl/ 50 mM Glycin behandelt, um schwach gebundene Phagen zu eluieren. Danach wurden die Zellen mit 10% Formaldehyd in PBS⁻ fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 0,2% Triton X-100 in PBS⁻ verwendet. Nach einer Abblockreaktion mit PBS⁻ + 1 % BSA + 10% FCS von 4 h bei RT erfolgte die Detektion der Phagen mittels spezifischer Antikörper. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-M13 (Verdünnung 1:100) erfolgte für 1 h bei RT. Der Alexa Fluor⁵⁴⁶ gekoppelte anti-Maus Sekundärantikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS⁻ + 1 % BSA in einer Verdünnung 1:300 eingesetzt und für 30 min auf den Ansätzen belassen. Zur Gegenfärbung der Nuklei wurden die Ansätze für 10 min mit einer DAPI-Färbelösung (1 mg/ml in PBS⁻) behandelt. Zur Langzeiterhaltung der Fluoreszenz wurden die Deckgläschen mit einem Eindeckmedium Vectashield (Linaris, Wertheim) überschichtet und auf Objektträgern

luftdicht versiegelt. Die Dokumentation der markierten Phagen auf Ein-Zell-Ebene erfolgte durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie oder konfokale '*laser scanning*' Mikroskopie (LSM 510, Zeiss, Oberkochen).

2.2.6.12 Immunhistochemie

Zum Nachweis spezifisch gebundener Phagen wurden die entsprechenden Gewebe (Tumor, Niere, Leber, Lunge und Herz) der zuvor mit 10^9 Phagen injizierten und perfundierten Tiere entnommen und in Paraffin eingebettet. Von den resultierenden Paraffinblöcken wurden Gewebsschnitte mit einer Dicke von 5 μm angefertigt und zum immunhistochemischen Nachweis auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht. Zunächst wurden die Schnitte durch eine Inkubation in Xylol (dreimal 5 min), in 100% Ethanol (zweimal 10 min) und in 95% Ethanol (zweimal 10 min) deparaffinisiert. Nach mehreren Waschschritten in ddH₂O und PBS⁻-Puffer erfolgte die Antigendemaskierung in der Mikrowelle bei voller Leistung (900 W) für 1 min in 10 mM Natriumcitrat-Puffer pH 6,0. Die Proben verblieben für weitere 9 min bei mittlerer Leistung im oben genannten Puffer. Anschließend wurden die Proben bei RT gekühlt und nochmals mit ddH₂O gewaschen. Nach Inkubation in 1% Hydrogenperoxid/PBS⁻-Lösung wurden die Gewebsschnitte für 1 h bei RT in 5% (v/v) Ziegen Serum/PBS⁻ abblockt. Nach Entfernen der Blockierungslösung wurde der Primärantikörper anti-M13 1:100 in derselben Lösung verdünnt und es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS⁻ gewaschen und der biotinylierte Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG) in einer Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde wiederholt mit PBS⁻ gewaschen und nach der Avidin/Biotin-Methode fortgeföhren, die auf einer Kopplung von Avidin und biotinylierten '*horse radish peroxidase*' Makromolekülkomplexen beruht und das immunhistochemische Signal verstärkt. Hierzu wurde das sogenannte ABC-Reagenz (Linaris, Wertheim) verwendet und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde das ABC-Reagenz mittels PBS entfernt und zur Färbung der Schnitte das sogenannte DAB-Reagenz (Linaris, Wertheim) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hilfe von Hämatoxylin (Linaris, Wertheim). Die Gewebsschnitte wurden anschließend mit ddH₂O gewaschen und zur Dehydrierung zunächst zweimal für 10 s in 95% Ethanol, zweimal für 10 s in 100% Ethanol und schließlich zweimal für 10 s in Xylol inkubiert. Zur Langzeiterhaltung wurden die Objektträger mit Eindeckmedium Vectashield (Linaris, Wertheim) überschichtet und mit Deckgläsern luftdicht versiegelt.

2.2.7 Tierexperimente

Zur Durchführung des *in vivo* 'phage display' wurde zum einen mit der TT Zelllinie ein Xenotransplantat-Modell eines humanen medullären Schilddrüsenkarzinoms sowie *RET*-transgene Tiere verwendet. Nach Etablierung der Tumoren (\varnothing 0,5-1 cm) wurde den Tieren 10^{12} pfu der Ausgangsphagenbank sowie 10^9 pfu der zu untersuchenden Phagenklone intravenös über die Schwanzvene injiziert. Um unspezifische Bindungen der Phagen zu unterbinden, wurden die Tiere 1-5 min nach Phageninjektion durch das Herz mit 5 ml DMEM ohne Zusätze perfundiert. Die Durchführung der Perfusion erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Gero Hilken.

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien der Tier-Versuchskommission der Universität-Gesamthochschule Duisburg-Essen durchgeführt.

3 Ergebnisse

Die Verwendung von Adenoviren als sogenannte Gen-Vehikel ist in der heutigen Gentherapie weit verbreitet. Die Vorteile gegenüber anderen Viren sind z.B. die Fähigkeit zur Inkorporation großer Transgene, die Produktion hoher Virustiter und höchster Reinheit sowie die Möglichkeit, eine Vielzahl von Zellen unabhängig von ihrem Replikationsstatus zu transduzieren. Limitiert wird die therapeutische Anwendung von Adenoviren durch ihren natürlichen Tropismus, der ihre Fähigkeit, an gewünschte Zielgewebe zu binden und diese zu infizieren, stark einschränkt. Zusätzlich führt eine nicht-selektive Transduktion verschiedener Gewebe, insbesondere der Leber, zu unerwünschten Nebeneffekten, so dass eine effiziente Transgenübermittlung nicht mehr gewährleistet wird. In diesem Zusammenhang ist es von großer Bedeutung, Vektoren mit selektivem Tropismus für das gewünschte Zielgewebe zu entwickeln. Das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC), das zum Zeitpunkt seiner Diagnose schon ein starkes Metastasierungsverhalten aufweist, stellt daher ein gutes Modell für den selektiven Gentransfer dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Identifizierung MTC spezifischer Liganden sowie die Konstruktion eines selektiven adenoviralen Vektors zur effizienteren Therapie dieses Tumorsystems beitragen.

3.1 Analyse primärer adenoviraler Zellrezeptoren in unterschiedlichen MTC-Modellen

Um den natürlichen Tropismus auszuschalten, muss der virusspezifische Bindungsprozess an die Zelle verstanden bzw. berücksichtigt werden:

Die zelluläre Aufnahme des meist verwendeten Vektors Adenovirus 5 (Ad5) besteht aus zwei Teilschritten: 1) Bindung des *'fiber knob'*-Proteins an den primären Coxsackie B-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997) und 2) Bindung des RGD-Motivs innerhalb des Pentonbasisproteins an $\alpha\beta$ -Integrine (Wickham et al., 1993), welche zur Clathrin-vermittelten Endozytose des Vektors führt. Das Fehlen des primären Rezeptors CAR kann zu einer verminderten Transduzierbarkeit der Zellen führen (Miller et al., 1998; Cohen et al., 2001; Hemminki et al., 2002). Tatsächlich ist CAR ubiquitär auf normalen Epithelzellen exprimiert, wohingegen seine Expression auf Tumorzellen variiert (Dmitriev et al., 1998; Miller et al., 1998; Bauerschmitz et al., 2002; Kanerva et al., 2002). Dies kann zu einer Resistenz gegenüber der adenoviralen Infektion führen. Aus diesem Grund wurden zunächst die Rezeptoreigenschaften verschiedener MTC-Modelle im Vergleich mit anderen Zellsystemen untersucht.

3.1.1 Analyse des CAR- und Integrin-Expressionsstatus in verschiedenen Zelllinien

Die Anwesenheit von CAR-Molekülen auf der Zelloberfläche ist ein Schlüsselfaktor zur Bestimmung der Transduktionseffizienz von Adenoviren. Aus diesem Grund wurden der CAR- und Integrinstatus in einer humanen TT Zelllinie, die aus einer Metastase eines humanen medullären Schilddrüsenkarzinoms isoliert und *in vitro* kultiviert worden ist (Leone et al., 1981), mit denen aus verschiedenen humanen nicht-MTC-Zelllinien auf RNA- und Proteinebene verglichen. Dabei wurden zum Vergleich zwei Nicht-Tumorzelllinien, Ad5-E1A stabil transformierte humane embryonale Nierenzellen (293) und eine aus humanen Vorhautfibroblasten etablierte Zelllinie (VH6), verwendet. Als weitere Tumorzelllinien wurden eine aus einem humanen kleinzelligen Bronchialkarzinom (H1299) und eine aus einem humanen Pankreas-Adenokarzinom etablierte Zelllinie (Capan-2) eingesetzt.

Auf RNA-Ebene zeigen humane TT Zellen eine im Vergleich zu anderen untersuchten Zelllinien vergleichbare CAR-Expression (Abb. 3.1).

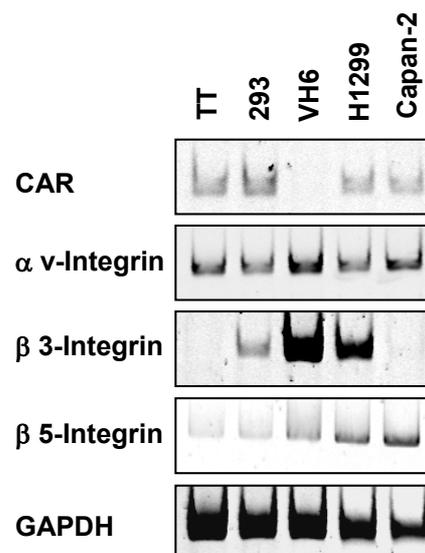


Abb. 3.1: Expression viraler Zellrezeptormoleküle in verschiedenen Zelllinien. Semiquantitative RT-PCR zur Überprüfung der mRNA-Spiegel von CAR, αv -Integrin, $\beta 3$ -Integrin, $\beta 5$ -Integrin und GAPDH als Kontrolle.

Western Blot-Analysen zeigen dagegen ein differenzierteres Bild, wobei TT sowie auch Capan-2 Zellen geringe Mengen des CAR-Proteins gegenüber 293 und H1299 Zellen (Abb. 3.2) aufweisen. In humanen Fibroblasten kann dagegen CAR weder auf Transkript- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 3.1; Abb. 3.2).

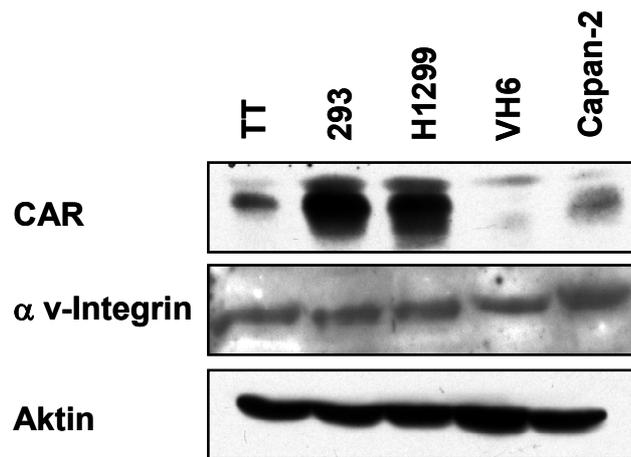


Abb. 3.2: Expressionsvergleich primärer adenoviraler Rezeptoren in verschiedenen Zellsystemen. Western Blot mit Gesamtzellextrakt. 100 µg der Gesamtzellextrakte wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE mit anti-CAR und anti- α v-Integrin Antikörpern detektiert. Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurden die Blots mit anti-Aktin Antikörpern behandelt.

Neben dem CAR-Rezeptor spielen Integrine eine wichtige Rolle bei der zellulären Aufnahme (Internalisierung) des Virus in die Zelle. Dabei sind vor allem α v β 3- und α v β 5-Integrine beteiligt, wobei α v-Integrine eine maßgebliche Rolle spielen (Wickham et al., 1993). Die Analyse der Transkripte und der exprimierten Proteine dieser Integrinuntereinheit zeigt für alle untersuchten Zelllinien vergleichbare Mengen. Des Weiteren wurden für die Integrinuntereinheiten β 3 und β 5 RT-PCR-Analysen angefertigt, wobei in TT Zellen nur eine geringe Menge der Transkripte nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.1).

3.1.2 CAR- und Integrinexpression im Xenotransplantatmodell

Im Folgenden wurde die Expression adenoviraler Rezeptoren in TT Zellen mit der Expression im Xenotransplantatmodell verglichen. Bei diesem Modell wurden TT Zellen subkutan in immunsupprimierte Nacktmäuse transplantiert, woraus sich nach 6-8 Wochen ausgeprägte Tumoren entwickelten. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass der Einsatz therapeutischer Adenoviren in TT Zellkulturen eine hohe Effizienz besitzt (Drosten et al., 2002). In transplantierten Tumoren konnte dagegen nur ein transienter Einfluss auf den Tumor nachgewiesen werden (Drosten et al., 2003).

Daher sollte ermittelt werden, ob sich die Rezeptoreigenschaften innerhalb des *in vivo* Modells bei der Entwicklung von Tumoren verändern.

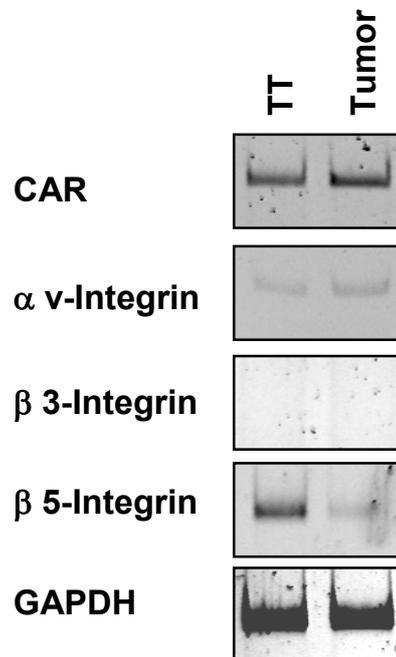


Abb. 3.3: Vergleich der mRNA-Spiegel verschiedener Zellrezeptormoleküle auf kultivierten Tumorzellen und in transplantierten Tumoren. Die semi-quantitative RT-PCR wurde mit spezifischen Oligonukleotiden für CAR, αv -, $\beta 3$ - und $\beta 5$ -Integrin durchgeführt. Als Kontrolle diente GAPDH.

Die mRNA-Spiegel von CAR und αv -Integrin zeigten keinen Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Modell in der Rezeptorexpression (Abb. 3.3). Die Proteinmengen beider Rezeptoren wiesen allerdings quantitative Abweichungen auf. Das CAR-Protein wurde wesentlich stärker in etablierten Tumoren exprimiert als in TT Zellen, während bei αv -Integrin eine genau entgegengesetzte Expression beobachtet wurde (Abb. 3.4). $\beta 3$ -Integrin konnte, wie schon in Abb. 3.1 gezeigt, weder in TT Zellen noch im etablierten Tumor detektiert werden. $\beta 5$ -Integrin konnte in TT Zellen nachgewiesen werden, dagegen war die Transkriptmenge im etablierten Tumor minimiert.

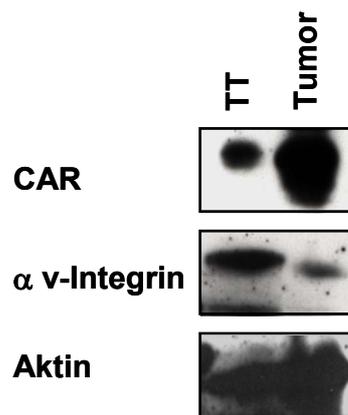


Abb. 3.4: Im TT-Zell-Xenotransplantat ist die CAR-Expression erhöht, dagegen die αv -Integrin-Expression reduziert. Western Blot mit Gesamtzell- bzw. Gewebsextrakten. 100 μ g der jeweiligen Extrakte wurden elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-CAR und anti- αv -Integrin Antikörpern detektiert. Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurden die Blots mit anti-Aktin Antikörpern behandelt.

3.1.3 Transkriptanalyse adenoviraler Zellrezeptoren im *RET*-transgenen Mausmodell

Neben den humanen MTC-Modellen wurde zusätzlich die Rezeptorexpression in Primärtumoren anhand *RET*-transgener Mäuse (CT-2A), die die MEN 2A-Mutation im Codon 634 (Cys-634-Arg) exprimieren, untersucht (Reynolds et al., 2001; Cranston et al., 2003). Aufgrund der gleichen Mutation wie beim humanen MEN 2A-Syndrom sind im murinen MTC-Modell gleiche Voraussetzungen für die Entwicklung der Tumoren in ihrer "natürlichen" orthotopen Umgebung gegeben, so dass dieses Modell hier klinische Relevanz besitzt.

Im murinen MTC-Modell wurde die CAR- und Integrinexpression im Tumor mit verschiedenen Geweben (Niere, Leber, Lunge und Herz) verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die mRNA-Menge von CAR im Tumor und in der Lunge bedeutend reduziert ist. Im Gegenteil dazu weisen Niere, Leber und Herz eine hohe Transkriptmenge auf. Die Integrinexpression ist in allen Geweben vergleichbar, mit Ausnahme von $\beta 3$ -Integrin, das nur in Lunge und Herz deutlich detektiert werden konnte (Abb. 3.5).

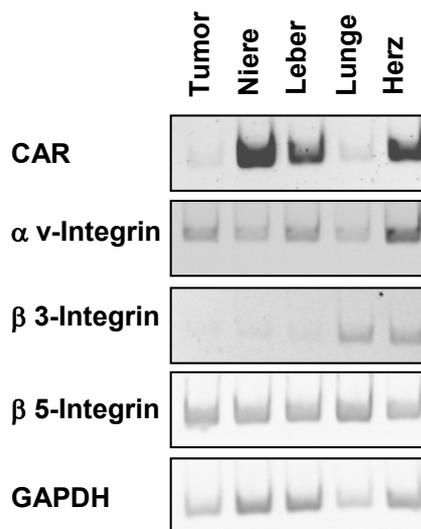


Abb. 3.5: Semi-quantitative RT-PCR Analyse verschiedener adenoviraler Rezeptormoleküle im *RET*-transgenen Mausmodell. Gesamt-RNA wurde aus den Geweben Tumor, Niere, Leber, Lunge und Herz isoliert und revers transkribiert. Die PCR-Analyse erfolgte unter linearen Bedingungen für die Gene CAR, αv -, $\beta 3$ - und $\beta 5$ -Integrin. Als Kontrolle diente GAPDH.

3.2 Identifizierung MTC-spezifischer Peptidliganden

Bezugnehmend auf die nachgewiesenen Unterschiede in der Expression adenoviraler Rezeptoren zwischen der kultivierten TT Zelllinie *in vitro* und etablierten Tumoren in Mäusen, die auf eine reduzierte Menge des internalisierungsrelevanten αv -Integrin hinweist, und im Hinblick auf vorherige Studien (Drosten et al., 2003), ist eine Modifizierung von Adenoviren zur Verbesserung des Gentransfers notwendig.

Zur Identifizierung alternativer Bindungsliganden wurde in dieser Arbeit die sogenannte '*phage display*'-Technologie etabliert. Diese Methode bietet die Möglichkeit kurze Peptidsequenzen zu identifizieren, die zur Inkorporation in den mit der Zelle interagierenden '*fiber knob*' des Virus geeignet sind. '*Phage display*' beinhaltet den Einsatz potenzieller Phagenbibliotheken, bei denen kurze Peptidsequenzen in Fusion mit dem Hüllprotein eines Bakteriophagen exprimiert werden (Scott et al., 1990). Dabei werden Zufallssequenzen exprimiert, so dass diese Phagenbanken eine Kapazität von ca. $1,2 \times 10^9$ elektroporierten Sequenzen aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zyklische 7mer- (sieben Aminosäuren lange) Phagenbank verwendet, bei der das Peptid von zwei Cysteinen, die miteinander unter nichtreduzierenden Bedingungen Disulfid-Brücken eingehen, flankiert wird. Dadurch kommt es zur Zyklisierung der

Heptapeptide, was ihnen eine "starre" Struktur verleiht. Aus diesem Grund eignen sich zyklische Phagenbanken zur *in vivo* Analyse.

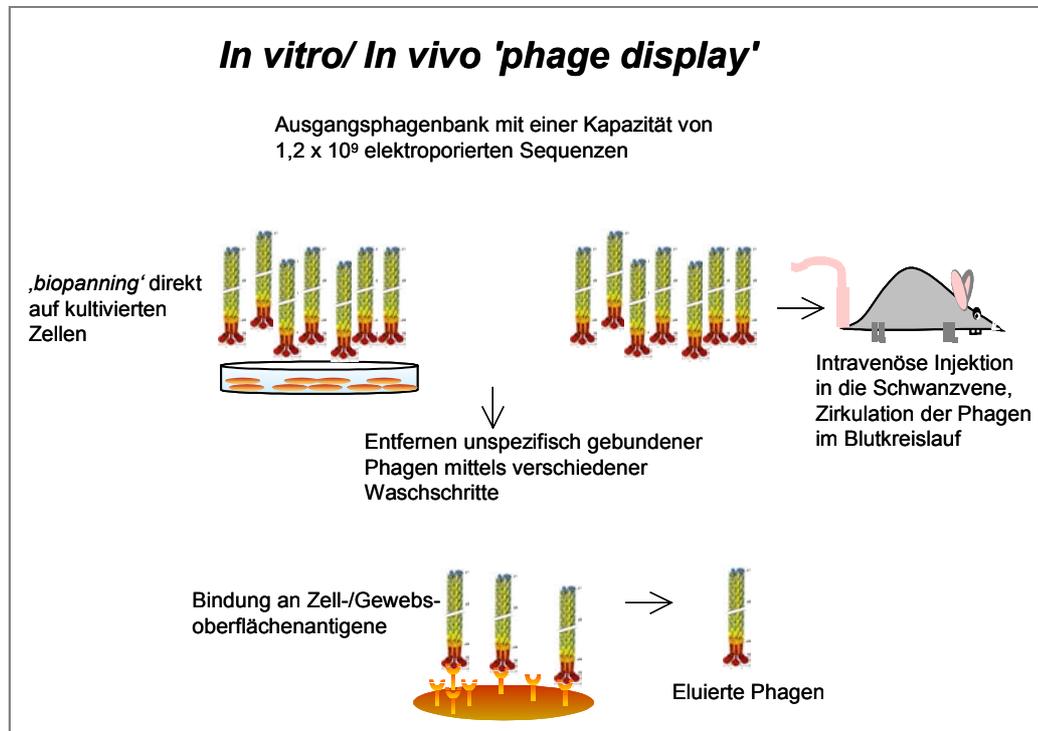


Abb. 3.6: *In vitro* und *in vivo* 'phage display'. Schematische Übersicht zur Versuchsdurchführung: Unter *in vitro* Bedingungen erfolgte das sog. 'biopanning' auf kultivierten Tumorzellen (TT), unter *in vivo* Bedingungen im Xenotransplantat- sowie im *RET*-transgenen Mausmodell.

Das 'phage display' wurde in dieser Untersuchung sowohl auf kultivierten TT Zellen als auch unter *in vivo* Bedingungen in transplantierten Tumoren sowie primären MTCs *RET*-transgener Mäuse durchgeführt (Abb. 3.6). Bisher wurden *in vivo* Studien von Pasqualini et al. (1996) und Rajotte et al. (1998) vorgenommen, nach deren Protokoll sich der Versuchsablauf in dieser Arbeit richtete. Die *in vitro*-Analysen bezogen sich auf veränderte Protokolle nach Nicklin et al. (2000) und Rasmussen et al. (2002).

3.2.1 'Biopanning': Anreicherung spezifischer Phagen

Um spezifisch-bindende Phagen auf TT-Zellen sowie in transplantierten Tumoren und im *RET*-transgenen Tumorsystem anzureichern, wurde das sogenannte 'biopanning' zweimal wiederholt. In Zellkultur wurden daher auf den TT Zellen gebundene Phagen einzeln amplifiziert und anschließend vereinigt, um dann in einer nachfolgenden

Selektionsrunde eingesetzt zu werden. Unter *in vivo* Bedingungen wurde die Ausgangsphagenbank systemisch über die Mausschwanzvene appliziert. Im Tumor gebundene Phagen wurden anschließend eluiert, wie oben einzeln amplifiziert und wieder zu einer neuen Phagenbank vereinigt. Die neu erhaltene Phagenbank wurde in einem weiteren Schritt erneut systemisch in die jeweilige Maus injiziert. Durch diesen Prozess wurden MTC-unspezifisch bindende Phagen eluiert und ein 'pool' selektiver Phagen verifiziert.

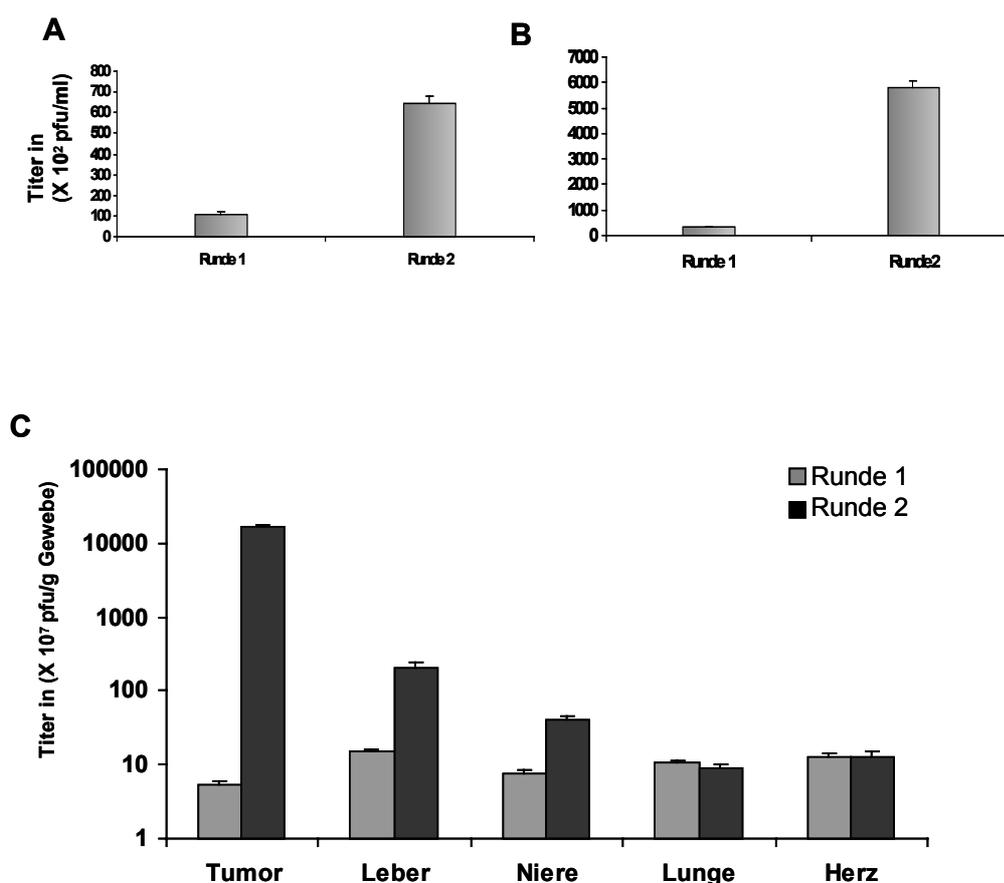


Abb. 3.7: 'biopanning': Selektion spezifischer Phagen. (A) *In vitro* 'biopanning' auf kultivierten TT Zellen. Nach einer Selektionsrunde wurden jeweils 600 einzelne Phagenklone amplifiziert und wiedervereinigt, um in einem weiteren Selektionsprozess eingesetzt zu werden. (B) *In vivo* 'biopanning' in mit TT Zellen transplantierten Nacktmäusen. Für die weitere Selektion wurden nach jeder 'biopanning'-Runde 200 Phagenklone aus dem etablierten Tumor isoliert, amplifiziert und vereinigt. (C) *In vivo* 'biopanning' im *RET*-transgenen Mausmodell. Zur Anreicherung tumorspezifischer Phagen wurden 200 Phagenklone der vorangegangenen Selektionsrunde aus dem Tumor isoliert, amplifiziert, vereinigt und für weitere Selektionen eingesetzt. Eine systemische Verteilung der Phagenklone wurde im Vergleich zu anderen Geweben (Niere, Leber, Lunge, Herz) überprüft. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine Titration der Phagen, wobei die Menge der infektiösen Partikel pro ml oder pro g Gewebe berechnet wurde. Die Standardabweichungen beruhen auf zwei voneinander unabhängigen Titrationen.

Schon innerhalb der ersten beiden Selektionsrunden konnte in allen drei MTC-Modellen ein signifikanter Anstieg im Titer der isolierten Phagen, der auf die Phagenmenge verweist, beobachtet werden (Abb.3.7). In den humanen MTC-Modellen kam es zu einem 7fachen Titeranstieg *in vitro* von 100 auf 700×10^2 pfu/ml (Abb. 3.7 A) und einem 20fachen Anstieg im etablierten Tumor von 300 auf 6000×10^2 pfu/ml (Abb. 3.7 B).

Im Maus MTC-Modell wurden neben dem Tumor noch weitere Kontrollorgane (Niere, Leber, Lunge und Herz) analysiert. Nach der ersten systemischen Applikation war eine gleichmäßige Verteilung der Phagen auf alle untersuchten Gewebe deutlich nachweisbar. Nach der zweiten Applikation konnte dann ein eindeutiger Anstieg im Tumor (3000fach) von 5 auf 15000×10^7 pfu/g Gewebe beobachtet werden, der in keinem der anderen Gewebe erreicht wurde. In den Geweben Leber und Niere stieg der Titer zwar ebenfalls an, aber nur moderat auf das 13fache bzw. 5,3fache; für Lunge und Herz konnte kein Titeranstieg verzeichnet werden, sondern zum Teil sogar ein Abfall der Phagenmenge (Lunge).

3.2.2 Isolierung und Selektion potenzieller MTC-Liganden

Um eine Vorauswahl an putativen Liganden aus einer hohen Anzahl von Phagen zu treffen, wurde zunächst ein 'enzyme linked immunosorbent assay' (ELISA) etabliert. Dieser Versuch, bei dem 300 isolierte Phagenklone aus dem *in vitro* und *in vivo* 'biopanning' (humane MTC-Modelle) gleichzeitig analysiert werden können, wurde direkt auf TT Zellen durchgeführt. Hierzu wurden TT Zellen auf eine 96 Loch-Zellkulturschale ausgebracht und bis zu ihrer Konfluenz wachsen gelassen. Nach Inkubation mit den entsprechenden Phagenstocklösungen wurde die Bindungsaffinität einzelner Phagen an die Zielzelle im Vergleich mit dem Wildtypphagen M13 untersucht (Kapitel 2.2.6.8).

Abb. 3.8 illustriert eine repräsentative Auswahl an 25 von insgesamt 300 untersuchten Phagenklonen, die ein unterschiedliches Bindungsverhalten aufweisen. Die Klone 3 (15fach), 4 (16fach), 11 (22fach), 15 (17fach) und 17 (18fach) zeigen die stärkste Bindung an TT Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Nr.25). Eine signifikant schwächere Bindungsaffinität konnte für die Klone 2 (3fach), 10 (4fach), 12 (4,5fach) und 16 (6fach) gefunden werden. Die bestbindenden Kandidaten zeichneten sich durch eine 15-22fach stärkere Bindeaktivität an TT Zellen im Verhältnis zum Wildtyp M13 aus.

Die selektierten Phagenklone wurden im Weiteren auf ihre peptidkodierende Sequenz hin untersucht. Aus den Untersuchungen in den humanen MTC-Modellen ergaben sich

nach diesem 'pre-screening' 35 unterschiedliche Sequenzen, die in ihrer Frequenz von 1-35 variierten und zum Teil interne Sequenzmotive aufwiesen (Tab.3.1)

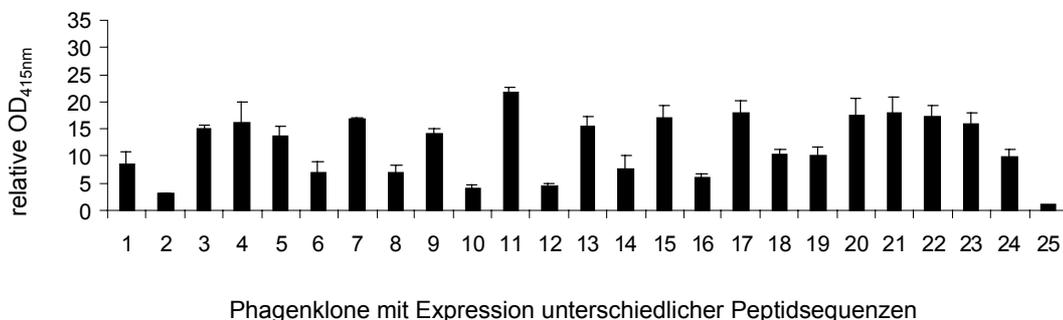


Abb. 3.8: ELISA: Vergleich der Bindeaffinität verschiedener Phagenklone zu TT Zellen: TT Zellen wurden zuvor auf einer 96 Lochplatte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % wachsen gelassen. Nach Inkubation mit einzelnen Phagenklonen (Nr. 1-24) wurden bindende Phagen mit einem 'horse radish peroxidase'-gekoppelten anti-M13 Antikörper detektiert und über ABTS-Substratumsetzung bei 415nm detektiert. Als Kontrolle diente der Wildtypphage M13 (Nr.25). Die Standardabweichungen ergaben sich aus dreifachen Bestimmungen.

Die Peptidsequenz HTFEPGV wurde 35fach gefunden und aus dem *in vitro* sowie aus dem *in vivo* 'screening' humaner MTC-Modelle isoliert. Andere Peptide formten abhängig von ihren Sequenzmotiven Kluster, z.B. PST, AM, MS oder AQL. Einige Peptide, wie PPEAMHL, KAMSWYA, TSPTNRS, HGKYFVS und NTHMTAF wurden zweifach identifiziert (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Peptidsequenzen der identifizierten Phagen. Auflistung der Peptidsequenz und –häufigkeit aus *in vitro* und *in vivo* 'phage display' auf TT Zellen bzw. im TT zelltransplantierten Mausmodell.

Sequenz	Frequenz	Sequenz	Frequenz	Sequenz	Frequenz
HTFEPGV	35	HGKYFVS	2	HPLRLPA	1
PSTNHAL	1	PQRHVNY	1	HQSVNKE	1
PSTLTSS	1	MMSQLAH	1	LQNPTPE	1
APSQTYH	2	APSQTYH	s.o..	PTEAQLQ	1
KIPSAFA	1	PMAHLEF	1	LFAQLGP	1
PPEAMHL	2	ELIKESR	1	NQPTRAL	1
KAMSWYA	2	QPENLPT	1	TPRTQKA	1
SRESPHP	1	NTHMTAF	2	IHFPSAS	1
QSRLSLG	1	NMSPQLD	s.o.	PLRIAQH	1
LDHFAPM	1	KAMSWYA	s.o.		
LDKKTTS	1	MMSQLAH	s.o.		
NMSPQLD	1	PFKLSKH	1		
SQRQTLD	1	ASSLHTI	1		
STKLLHE	1	PSTLTSS	s.o.		
TSPTNRS	2				
PHSPTSLS	1				

Für identifizierte Phagen aus dem *RET*-transgenen System konnte kein ELISA durchgeführt werden, da zu diesem murinen System keine geeignete Zelllinie existiert. Aus dem Tumor isolierte Phagenklone wurden deshalb direkt nach jeder Selektionsrunde sequenziert.

A

Runde 1			Runde 2		
Sequenz	Frequenz	<i>in vitro/in vivo</i>	Sequenz	Frequenz	<i>in vitro/in vivo</i>
TTLSTQI	1	-/+	LGEPRAH	1	-/+
EQTQTLQ	1	-/+	SRESPHP	13	+/+
TLTPKNI	1	-/+			
TAPTVNL	1	-/+			
SDLYLNF	1	-/+			
MDTAYPH	1	-/+			
QLVSYKE	1	-/+			
FAVDEQE	1	-/+			
FKQVRHA	1	-/+			
LATRPPD	1	-/+			
SDSLTPQ	1	-/+			
PSLRLFN	1	-/+			
SRESPHP	2	+/+			

B

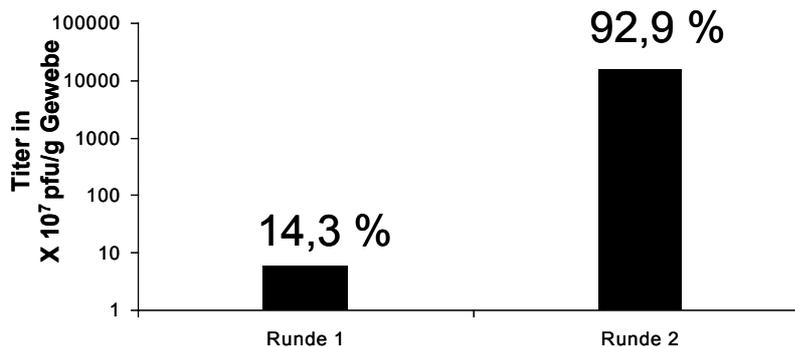


Abb. 3.9: Peptidsequenzen identifizierter Phagen aus *in vivo* 'phage display' im *RET* transgenen System. (A) Aus dem Tumor isolierte Phagen wurden nach der ersten und zweiten '*biopanning*'-Runde sequenziert und ihre Häufigkeit wurde überprüft. Eine repräsentative Auswahl der identifizierten Phagen ist hier dargestellt. (B) Im Vergleich ist der Titeranstieg der aus dem Tumor eluierten Phagen innerhalb der ersten zwei '*biopanning*'-Runden als Balkendiagramm gezeigt.

Anhand einer Auswahl identifizierter Phagenklone zeigte sich, dass die Peptidsequenz SRESPHP mit einer signifikant hohen Frequenz vorkam und schon nach der ersten Selektionsrunde im Tumor gefunden wurde (Abb. 3.9 A). Bei einer Untersuchung von 14 willkürlich ausgesuchten Phagenklonen betrug der prozentuale Anteil des Phagen SRESPHP nach der ersten Runde 14,3 % und stieg in der zweiten Runde auf 92,9 % an. Parallel konnte mit dem Anstieg dieses Phagen auch ein starker Anstieg im Titer von der ersten zur zweiten Selektionsrunde beobachtet werden (Abb. 3.9 B).

Die identifizierte Peptidsequenz SRESPHP konnte ebenfalls im *in vitro* Ansatz auf TT Zellen identifiziert werden (vgl. Tab.3.1), zeigte in dieser Untersuchung aber keine erhöhte Bindungsaffinität zu TT-Zellen. Die Bindung zu TT Zellen dieses Phagen war insgesamt nur um ein 3faches höher als die des Wildtyps M13 und somit wurde dieser Phage nicht für weitere Experimente ausgewählt.

3.2.3 Verifizierung der Zielzellspezifität pro-selektierter Phagen aus humanen MTC-Modellen

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die zuvor identifizierten Phagenklone auf ihre Bindungsspezifität und MTC-Selektivität hin untersucht.

Das Bindungsverhalten MTC-spezifischer Phagen, die ein positives ELISA-Signal (bzw. negatives Signal s.u.) im Vergleich mit dem Wildtyp M13 gezeigt hatten, wurde nun auf verschiedenen humanen Zelllinien (TT, 293, H1299 und VH6) in einem Titrationsversuch analysiert. Die Auswahl der Phagen richtete sich hierbei neben einer hohen Bindungsaffinität im ELISA nach folgenden Kriterien: hohe Frequenz (HTFEPGV 35x, KAMSWYA 2x), Sequenzmotive (LFAQLGP) oder negatives Signal im ELISA (TPRTQKA-Phage) als Negativ-Kontrolle. Dazu wurden die entsprechenden Zellen 4 h mit den ausgewählten Phagen inkubiert. Über glycininduzierte Zellyse wurden die gebundenen Phagen von den Zellen eluiert und mittels kompetenter Bakterien titriert. Die entstandenen Phagenplaques (Abb. 3.10 A) wurden anschließend ausgewertet (Abb. 3.10 B). Der Phage HTFEPGV, der am häufigsten gefunden wurde, wies die höchste Spezifität für TT Zellen auf ($1,8 \times 10^6$ pfu/ml). Dieser Phage band 9fach stärker an TT Zellen als an die Lungenkarzinomzelllinie H1299 (2×10^5 pfu/ml), 4fach stärker als an transformierte Nierenzellen 293 ($4,7 \times 10^5$ pfu/ml) und 13fach stärker gegenüber VH6 Fibroblasten ($1,4 \times 10^5$ pfu/ml). Im Vergleich dazu zeigten die Phagen TPRTQKA und KAMSWYA keine Selektivität für TT Zellen, sondern hatten eine erhöhte Affinität zu 293 Zellen. Z.B. zeigt der Phage TPRTQKA eine sehr schwache Bindeaffinität zu TT Zellen ($7,3 \times 10^5$ pfu/ml) und H1299 Zellen ($4,5 \times 10^5$ pfu/ml), während die Bindung zu 293 und VH6 Zellen ($6,6 \times 10^6$ pfu/ml und 9×10^5 pfu/ml) weitaus höher ist. Die Bindungsaffinität des Phagen KAMSWYA an TT Zellen war ebenfalls sehr gering (1×10^6 pfu/ml), aber sehr hoch für H1299 Zellen ($1,4 \times 10^7$ pfu/ml) und 293 Zellen ($9,5 \times 10^7$ pfu/ml). Im Vergleich zu Lungen- und Nierenzellen ist die Bindung dieses Phagen an VH6 Zellen zwar schwächer, aber dennoch höher als an TT Zellen ($1,3 \times 10^6$ pfu/ml). Neben dem Phagen HTFEPGV ist der Phage LFAQLGP ein weiterer putativer

Kandidat. Dieser zeigte ebenfalls eine signifikant stärkere Bindung an TT Zellen im Vergleich zu H1299 und VH6 Fibroblasten.

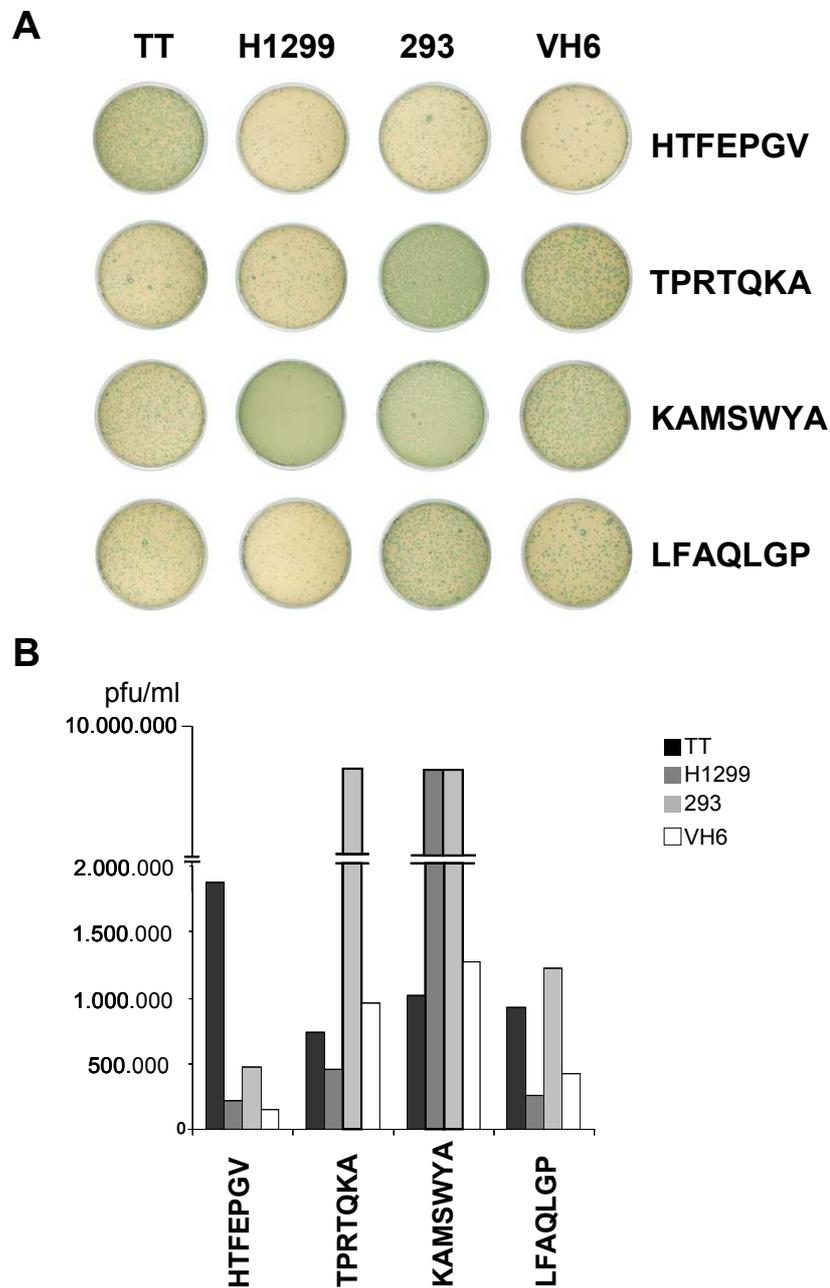


Abb. 3.10: Der Phage HTFEPGV zeigt eine erhöhte Bindungsselektivität für TT Zellen. $1,5 \times 10^{11}$ Phagen (mit den Peptidsequenzen HTFEPGV, TPRTQKA, KAMSWYA und LFAQLGP) wurden mit 1×10^7 Zellen (TT, 293, H1299 und VH6) für 4 h inkubiert und die Bindungsselektivität über eine Titration in kompetenten Bakterien quantitativ ausgewertet. (A) Plaque bildende Einheiten (pfu) konnten mittels β -Galaktosidase Färbung sichtbar gemacht und quantifiziert werden. (B) Die Auswertung ist hier als Balkendiagramm dargestellt.

Dennoch kann bei diesem Phagen eine moderate Affinität für 293 Zellen nachgewiesen werden ($1,5 \times 10^6$ pfu/ml). Auf der Grundlage dieser Daten weist der Phage HTFEPGV die höchste Bindungsaktivität für die Zielzelllinie auf.

Um die vorangegangenen Daten, die den Phagen HTFEPGV als potenziellen MTC-Liganden beschreiben, zu verifizieren, wurde ein ELISA auf den schon untersuchten Zelllinien durchgeführt. Die Zelllinien TT, 293, H1299 und VH6 wurden auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und wuchsen bis zur vollständigen Konfluenz von ca. 90 %. Nach einer 1 h Inkubationsdauer mit dem Phagen HTFEPGV erfolgte die Visualisierung der Phagen-Zell-Bindung über eine Substratumsetzung von ABTS durch Peroxidase, die bei 415 nm gemessen wurde. Auch hier wurde ein ähnliches Ergebnis wie bei der Titrationsanalyse gefunden (Abb. 3.11).

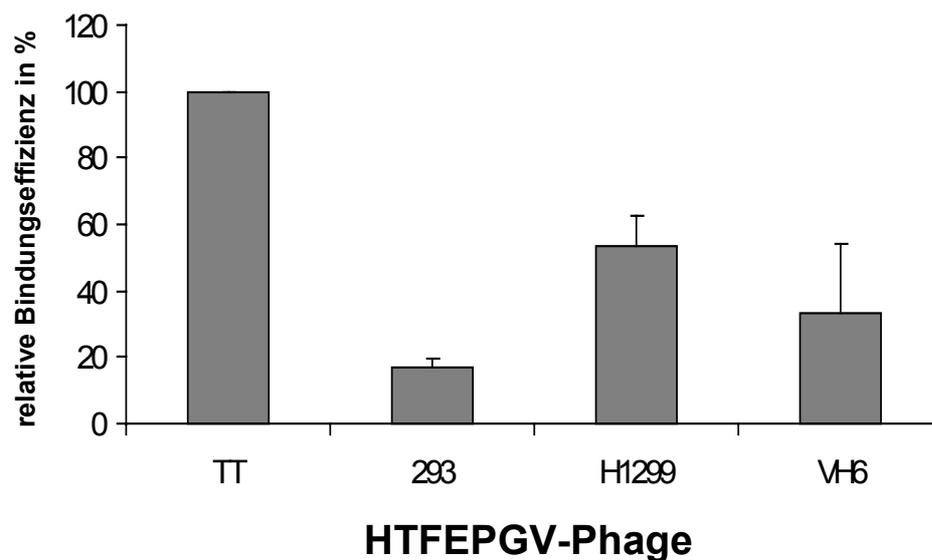


Abb. 3.11: Selektionsanalyse des Phagen HTFEPGV auf verschiedenen Zelllinien mittels ELISA. Zelllinien (TT, 293, H1299 und VH6) wurden auf einer 96-Lochplatte ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen. Nach Inkubation mit dem Phagen HTFEPGV wurden bindende Phagen mit einem 'horse radish peroxidase'-gekoppelten anti-M13 Antikörper detektiert und über ABTS-Substratumsetzung bei 415 nm visualisiert. Die Standardabweichungen ergaben sich aus dreifachen Bestimmungen.

Die Bindungseffizienz des Phagen HTFEPGV wurde für TT Zellen gleich 100% gesetzt und lag um 83% höher als für 293 Zellen (17%). Auch für die Zelllinien H1299 mit 54% und VH6 mit 32% wurde eine geringere Bindungseffizienz (ca. 2fach bzw. 3fach geringere Effizienz als zu TT Zellen) nachgewiesen. Anhand dieser Untersuchung konnte das Ergebnis der Titration bestätigt werden (vgl. Abb.3.10).

Im Hinblick auf weiterführende Experimente, bei denen Adenoviren mittels selektiver Peptide an ihren Zielort (wachsender Tumor) dirigiert werden sollen, war es von entscheidender Wichtigkeit, den identifizierten Phagen HTFEPGV in etablierten Tumortransplantaten *in vivo* zu testen. Aus diesem Grund wurde der Phage im Vergleich mit einem weiteren putativen Kandidaten LFAQLGP sowie der Negativkontrolle TPRTQKA in Nacktmäuse mit etablierten MTCs systemisch appliziert. Eine Titrationsanalyse zeigte hierbei, dass der Phage HTFEPGV mit 178×10^2 pfu/g mehr als sechsmal stärker an das Tumorgewebe band als die beiden Kontrollphagen LFAQLGP mit $29,5 \times 10^2$ pfu/g und TPRTQKA mit 24×10^2 pfu/g (Abb. 3.12).

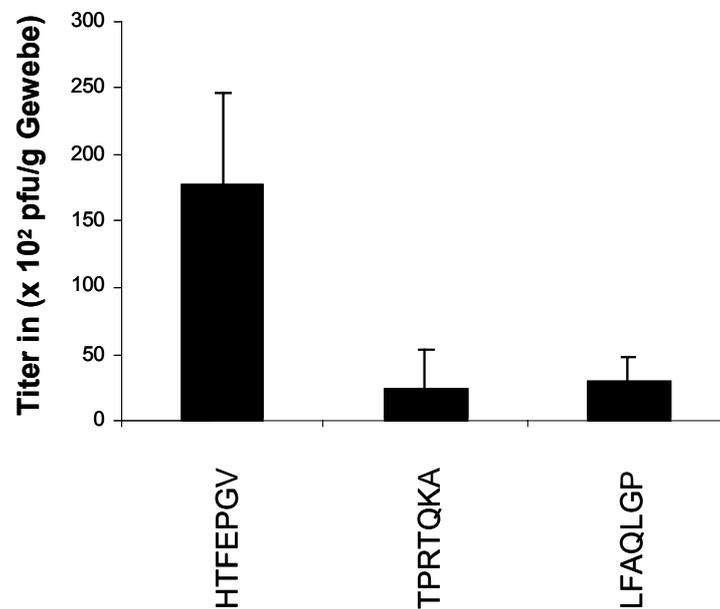


Abb. 3.12: Der Phage HTFEPGV zeigt eine erhöhte Bindungsaffinität zu etablierten Tumoren. 10^9 Phagen (mit den Peptidsequenzen HTFEPGV, TPRTQKA und LFAQLGP) wurden systemisch über die Mausschwanzvene appliziert. Im etablierten Tumor angereicherte Phagen wurden isoliert und quantitativ über eine Titration bestimmt. Die Standardabweichungen ergaben sich aus zwei von einander unabhängigen Titrationen.

3.2.4 Verifizierung der Gewebsspezifität pro-selektierter Phagen im murinen MTC-Modell

Der aus dem *RET*-transgenen Mausmodell identifizierte Phage SRESPHP wurde ebenfalls auf seine Selektivität hin überprüft. Da nichtmodifizierte Adenoviren eine besonders hohe Affinität zur Leber besitzen (Huard et al., 1995; Alemany und Curiel, 2001), ist es von großer Bedeutung, einen Peptidliganden zu identifizieren, der spezifischer an das Zielgewebe, in diesem Fall an die Schilddrüsentumorzellen bindet als an Leberhepatozyten.

Die Versuche erfolgten hier *in vivo*, wobei der Phage systemisch in das Maussystem appliziert wurde. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen und Kontaminationen des Organismus durch nichtgebundene Phagen wurde nach der Injektion eine Perfusion durch das Herz mit Zellkulturmedium (DMEM ohne Zusätze) durchgeführt. Anschließend wurden neben dem Schilddrüsentumor weitere Kontrollorgane (Niere, Leber, Lunge und Herz) entnommen und die Phagen aus den Geweben isoliert. Die Bindeaffinität bzw. Menge der gebundenen Phagen wurde mittels Titrationsanalyse bestimmt.

Wie in Abb 3.13 A verdeutlicht, wies der Phage SRESPHP eine signifikant selektive Bindung an den Tumor (als 100% gesetzt) auf. Die Bindungsaffinität zur Niere und Lunge war um mehr als 80%, zur Leber mehr als 50% und zum Herzen sogar um fast 90% minimiert. Anhand dieser Daten zeichnete sich der Phage SRESPHP als putativer MTC-Ligand aus.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit die Abhängigkeit potenzieller Peptidliganden vom verwendeten Zell- bzw. Tumorsystem untersucht werden. Da der Phage SRESPHP sehr selektiv an primäre MTCs *RET*-transgener Mäuse bindet und aus diesen sowie aus dem *in vitro* TT Zellsystem über mehrere Selektionsrunden identifiziert wurde, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, in wieweit der Phage HTFEPGV an den Tumor im transgenen Mausmodell bindet. Wie Abb. 3.13 B demonstriert, kann bei systemischer Applikation dieses Phagen keine Tumorselektivität beobachtet werden. Dieser Phage zeigte eine 6fach und 7fach höhere Affinität für Niere und Leber, sowie eine doppelt so hohe Affinität zum Herzen. Lediglich in der Lunge ist die Phagenbindung auf ein fünftel reduziert. Diese Daten belegen, dass eine gewisse Abhängigkeit zum untersuchten System besteht. Der Phage SRESPHP wurde nicht in einem umgekehrten Experiment eingesetzt, da dieser im '*pre-screening*' mittels ELISA nicht zu den bestbindenden Kandidaten zählte und somit für weitere Experimente nicht ausgewählt wurde.

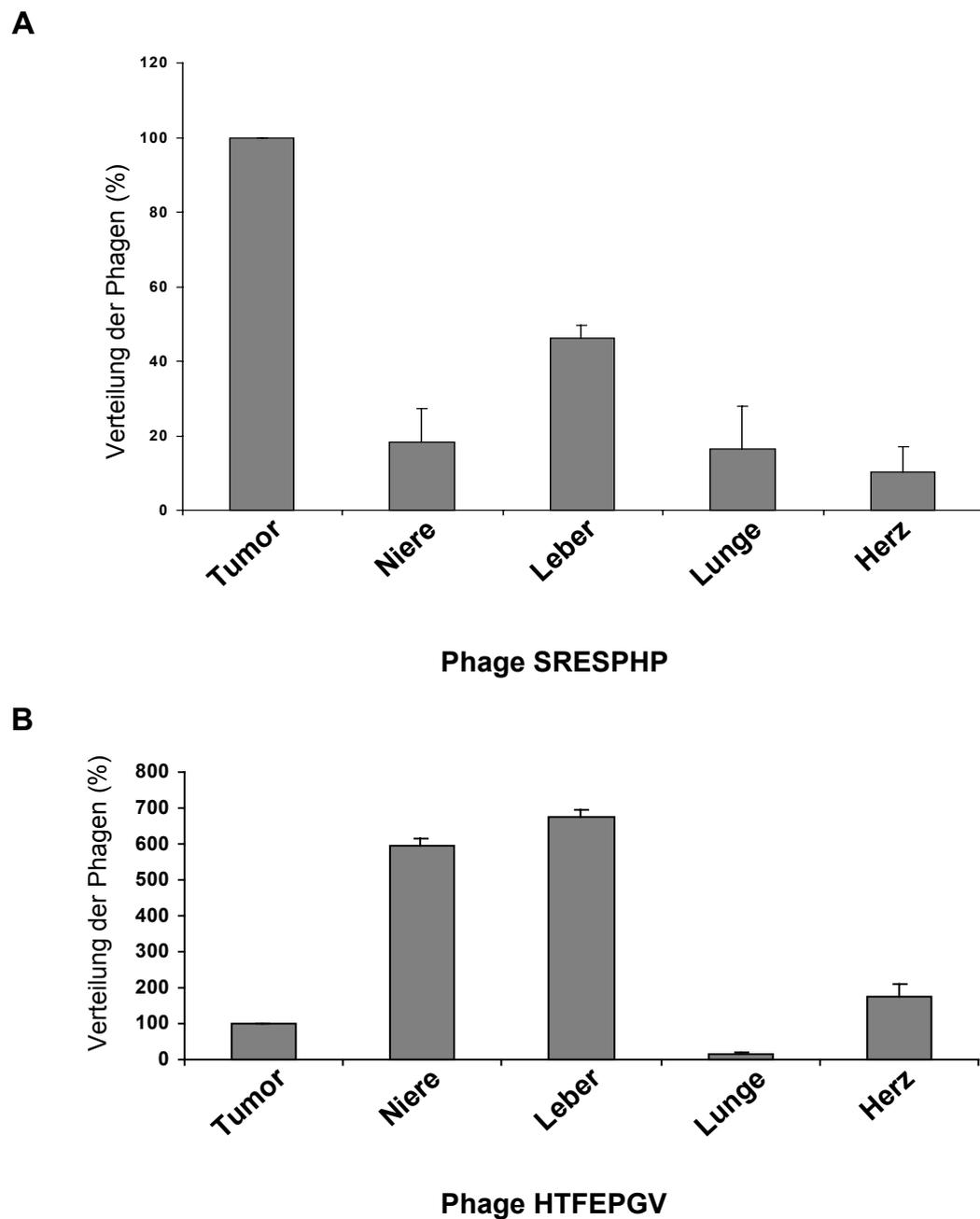


Abb. 3.13: Bioverteilung potenzieller Phagenkandidaten im *RET*-transgenen Mausmodell. 1×10^9 Phagen (A, SRESPHP und B, HTFEPGV) wurden systemisch über die Mausschwanzvene appliziert. Nach Präparation des Tumors sowie weiterer Kontrollorgane (Niere, Leber, Lunge und Herz) wurden die Phagen isoliert und über Titration in kompetenten Bakterien quantifiziert. Die Verteilung der Phagen ist hier prozentual dargestellt, wobei die Standardabweichung auf zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten beruht.

3.2.5 Analyse zur peptidabhängigen Bindung der Phagen an die Zielzelle

Um nun genauer zu analysieren, ob die Bindung des Phagen an die Zelle auf den an der Phagenoberfläche exprimierten Peptiden beruht, wurde die Bindung der identifizierten Phagen auf Ein-Zell-Ebene mittels Immunzytochemie untersucht. Mit dieser Analyse können ausschließlich qualitative Aussagen über die Bindung getroffen werden. Dazu wurden TT Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für 1 h mit dem entsprechenden Phagen (HTFEPGV, SRESPHP) inkubiert. Als Kontrollen dienten der Wildtyp-Phage M13 ohne Peptidinsertion und eine unbehandelte Probe. Die zelluläre Lokalisation der Phagen wurde mit einem anti-M13 Antikörper detektiert und über das konfokale *'laser scanning'*-Mikroskop visuell dokumentiert. Wie Abb. 3.14 demonstriert, zeigten beide untersuchten Phagen eine eindeutige Bindung an TT Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Intensitätsunterschiede in der Bindungsaffinität konnten zwischen den untersuchten Phagen nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse verweisen darauf, dass die Phagen-Zell-Interaktion tatsächlich auf dem Peptid beruht und nicht auf eine Interaktion mit dem Hüllprotein des Phagen zurückzuführen ist, da der Phage M13 allein nicht bindet.

Die Bindung des Phagen SRESPHP an das Tumorzielgewebe wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen (siehe Abb. 3. 18) und wird in Kapitel 3.2.6 erläutert.

Zur weiteren Verifizierung der Peptid-Zell-Interaktion wurde ein Wettbewerbsversuch etabliert. Hierzu wurden synthetisch hergestellte Peptide, die analog zu den identifizierten Phagen (HTFEPGV, TPRTQKA und SRESPHP) waren, eingesetzt.

Zunächst wurde der Phage HTFEPGV *in vitro* auf TT Zellen untersucht. Dazu wurden TT Zellen mit dem Phagen alleine oder in Anwesenheit eines synthetischen Peptids inkubiert. Als unspezifisches Peptid diente TPRTQKA, da der dieses Peptid exprimierende Phage innerhalb der Titrationsanalyse als unspezifisch bzw. nicht selektiv identifiziert wurde (Abb. 3.15A). Die Auswertung erfolgte auch hier über die Menge gebundener Phagen mittels Titration. Bei dieser Untersuchung konnte eine dosisabhängige Inhibition des Phagen HTFEPGV bei Verwendung des analogen Peptids beobachtet werden. Schon bei Zugabe kleiner Mengen des spezifischen Peptids von nur 0,3 µg wurde die Phagen-Zell-Interaktion um 80% reduziert (Abb. 3.15A). Bei Erhöhung der Peptidkonzentration auf 30 µg blieb die Inhibition konstant und betrug ebenfalls 80%. Durch die dosisabhängige Zugabe des unspezifischen Peptids wurde die Phagenmenge nicht reduziert und es kam somit zu keiner Inhibition der Phagen-Zell-Bindung (Abb.3.15 A). Der Phage HTFEPGV zeigte also eine

charakteristische Bindung an TT Zellen über das exprimierte Peptid, wodurch die Daten der Immunzytochemie-Mikroskopie bestätigt wurden.

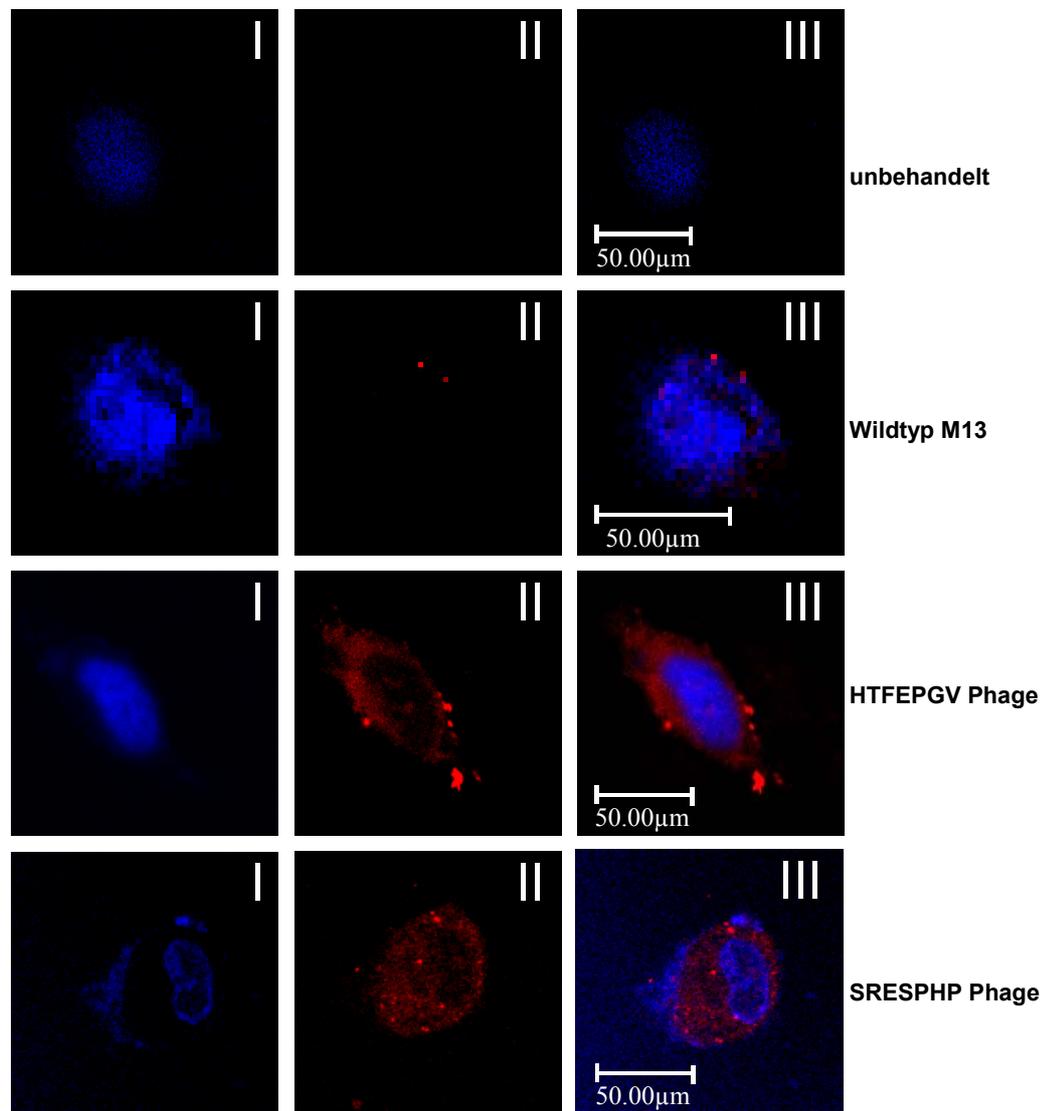


Abb. 3.14: Immunfluoreszenzanalyse potentieller Phagenkandidaten. 1×10^6 TT-Zellen wurden mit $1,5 \times 10^{11}$ Phagen für 1 h bei RT inkubiert. Als Kontrollen dienen eine unbehandelte Probe sowie der Wildtyp-Phage M13. I, DAPI Färbung; II, Anti-M13/Alexa 546 Färbung; III, Überlagerungsbild. Die Zellen wurden bei 63facher Vergrößerung im konfokalen Mikroskop LSM 510 analysiert. Ein repräsentativer Bereich ist gezeigt.

Um nun diese peptidabhängige Bindung auch *in vivo* zu kompetitieren, wurde der Phage HTFEPGV alleine oder in Anwesenheit seines analogen Peptids systemisch in transplantierte Nacktmäuse mit etablierten Tumoren appliziert. Nach anschließender Perfusion durch das Herz wurde der Tumor isoliert und die gebundene Phagenmenge ermittelt. Auch hier konnte durch dosisabhängige Zugabe des analogen Peptids eine Reduktion der Phagenmenge beobachtet werden. Bei Zugabe von 100 µg des synthetischen Peptids wurde die Bindung des Phagen um 85% inhibiert, bei Zugabe

von 500 µg des Peptids kam es zur vollständigen Inhibierung der Phagenanheftung an die Zelle (Abb. 3.15 B).

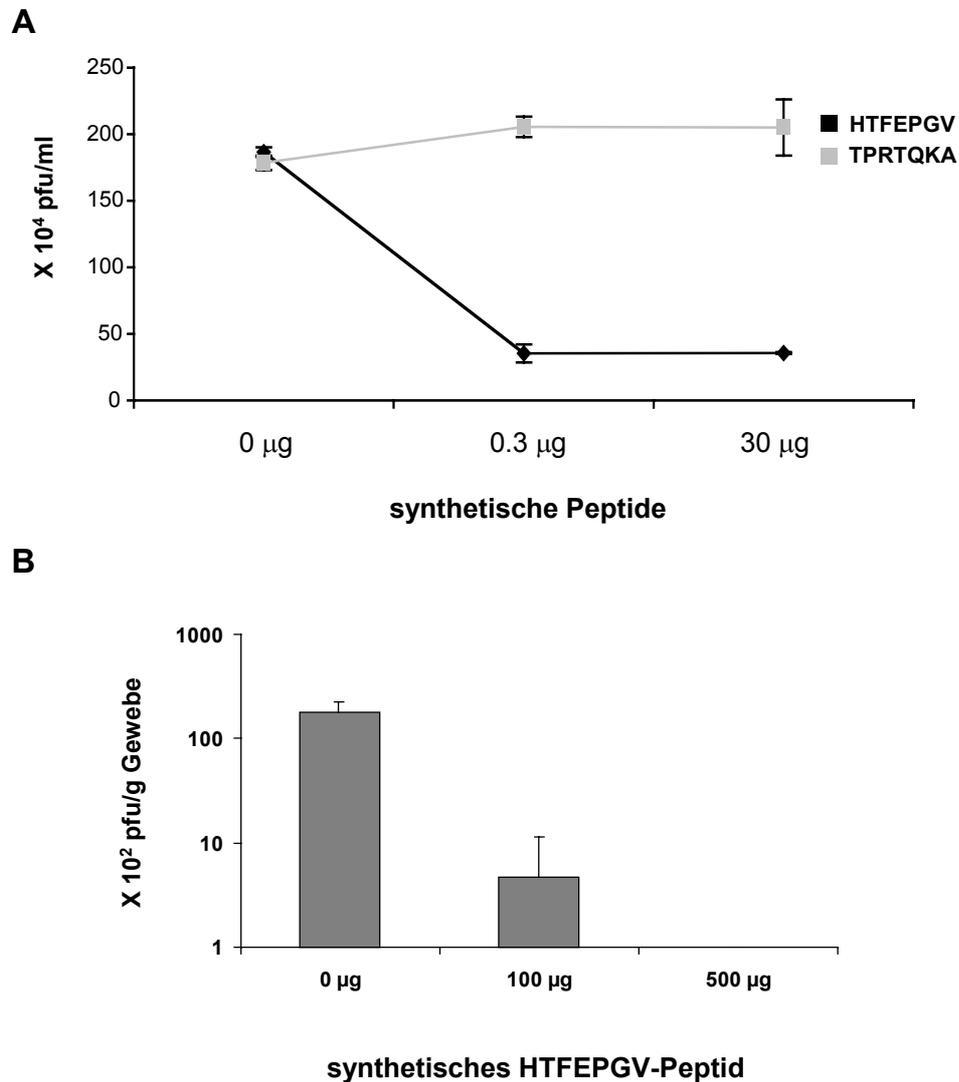


Abb. 3.15: Konkurrenz des Phagen HTFEPGV durch das analoge Peptid. (A) 5×10^5 TT Zellen wurden in Gegenwart oder Abwesenheit der synthetischen Peptide HTFEPGV und TPRTQKA in den Mengen 0 µg, 0,3 µg und 30 µg mit 10^9 pfu des Phagen HTFEPGV inkubiert. Gebundene Phagen wurden von den Zellen eluiert und über Titration quantitativ bestimmt. (B) Immunsupprimierten Nacktmäusen mit etablierten Tumoren wurden 10^9 pfu des Phagen HTFEPGV in Kombination mit oder ohne analogem Peptid intravenös injiziert. Spezifisch gebundene Phagen wurden aus dem Tumor eluiert und über Titration quantifiziert. Die Standardabweichungen ergaben sich aus zwei voneinander unabhängigen Titrationen.

Neben den aus den humanen MTC-Modellen identifizierten Phagen wurde auch der Phage SRESPHP im Hinblick auf seine peptidabhängige Zell-Bindung untersucht. Die Durchführung erfolgte wie im transplantierten Nacktmaus-Modell, wobei die aus dem Tumor isolierten Phagen mit denen aus der Leber verglichen wurden.

Im Tumor konnte eine signifikante Inhibierung durch das analoge synthetische Peptid demonstriert werden (Abb. 3.16). Schon durch Zugabe von 100 µg des Peptids wurde die Phagen-Zell-Bindung um 60% im Tumor inhibiert, bei Zugabe von 500 µg konnte eine Reduktion der Phagenbindung um weitere 5% erreicht werden. Im Vergleich dazu wurde in der Leber ohne Zugabe synthetischen Peptids eine schwächere Bindung des Phagen detektiert (50% im Vergleich zum Tumor). Durch Addition des analogen Peptids wurde zunächst eine starke Reduktion der Phagenmenge um 95% nachgewiesen, bei Erhöhung der Peptidkonzentration wurde jedoch ein Anstieg der Phagenmenge über den Ausgangswert (Phage in Abwesenheit des Peptids) hinaus detektiert. Dies ist in Anlehnung an Daten aus der Literatur auf eine unspezifische Inhibierung der Phagenbindung an die Leber zurückzuführen. Romanczuk et al. (1999) führten eine Kompetition eines modifizierten Adenovirus auf Zielzellen und Nicht-Zielzellen durch und detektierten in Nicht-Zielzellen eine unspezifische Inhibierung der Virus-Zell-Adhäsion bei erhöhter Peptidmenge. Aufgrund dieser Daten wies auch der Phage SRESPHP eine charakteristische Bindung an das Zielgewebe über das exprimierte Peptid auf.

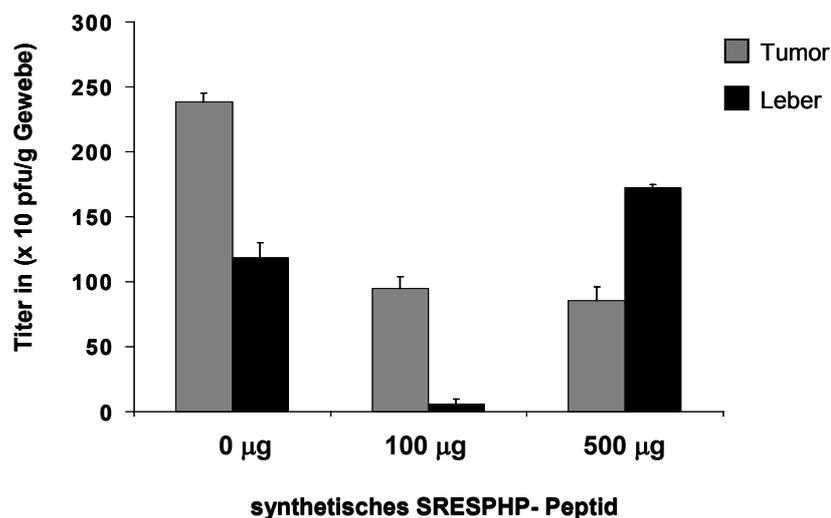


Abb. 3.16: Kompetition des Phagen SRESPHP durch das analoge Peptid im *RET*-transgenen System. *RET*-transgenen Mäusen wurden 1×10^9 pfu des Phagen SRESPHP in Gegenwart oder Abwesenheit des synthetischen Peptids SRESPHP intravenös injiziert. Spezifisch gebundene Phagen wurden aus Tumor und Leber eluiert und über Titration (pfu) quantitativ bestimmt. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, aus denen sich die Standardabweichung ergab.

3.2.6 Rezeptor-vermittelte Internalisierung potenzieller MTC-Liganden

Nach der initialen Zell-Adhäsion beruht die adenovirale Infektion auf der Interaktion des RGD-Motivs innerhalb der viralen Pentonbasis mit zellulären Integrinen. Diese Interaktion löst die Internalisierung des Virus aus (Wickham et al., 1993). Um eine optimale Transduktion von Zellen zu gewährleisten, sollte ein selektiver Adenovirus, dessen natürlicher Tropismus modifiziert wurde, in der Lage sein, mittels des integrierten Liganden zu internalisieren.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die isolierten Peptidmotive (HTFEPGV und SRESPHP) im Hinblick auf diese Eigenschaft untersucht. Für beide Phagen wurde zunächst ein Internalisierungsexperiment etabliert. TT Zellen wurden mit aufgereinigten Phagenamplifikaten ($1,5 \times 10^{11}$ pfu/ml) für 24 h inkubiert. Als Kontrolle diente der Phage RGD-4C, der in früheren Studien als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Ardelt et al., 2003) und das spezifische Konsensusmotiv für die αv -Integrin-vermittelte Zellinternalisierung trägt. Weitere Kontrollen waren der Wildtypphage M13 sowie eine unbehandelte Probe.

Wie in Abb. 3.17 gezeigt, demonstrierten beide Phagen eine Peptid-vermittelte Zellaufnahme, die vergleichbar mit der RGD-vermittelten Internalisierung war, und erfüllten somit die Voraussetzung für einen effizienten adenoviralen Gentransfer. Die zelluläre Lokalisation der Phagen wurde mit einem anti-M13 Antikörper detektiert, wobei interne Phagen in der Abbildung durch weiße Pfeile gekennzeichnet wurden.

Der Phage SRESPHP wurde ebenfalls *in vivo* im *RET*-transgenen Maussystem getestet. Über immunhistologische Färbungen wurde die Lokalisation des Phagen im Gewebe nachgewiesen und ebenso die zelluläre Internalisierung überprüft. Dazu erfolgte die gleiche Versuchsdurchführung wie für die Titrationsanalyse: Transgenen Mäusen wurden 10^9 pfu des Phagen SRESPHP systemisch appliziert und die zu untersuchenden Gewebe (Tumor, Niere, Leber, Herz, Lunge) in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 μ m angefertigt und zum immunhistologischen Nachweis eingesetzt (Abb. 3.18).

Beim Vergleich des Tumors mit den übrigen Geweben konnte eine charakteristische Anfärbung der Phagen im Tumor beobachtet werden. Ein positives Signal konnte an den Endothelzellen, der Invasionsfront und in einzelnen Tumorzellen detektiert werden. Mit diesem Nachweis wurde sowohl die Bindung des Phagen an den Tumor als auch eine Internalisierung *in vivo*, die für die effiziente Transduktion mittels Adenoviren vorausgesetzt wird, gezeigt.

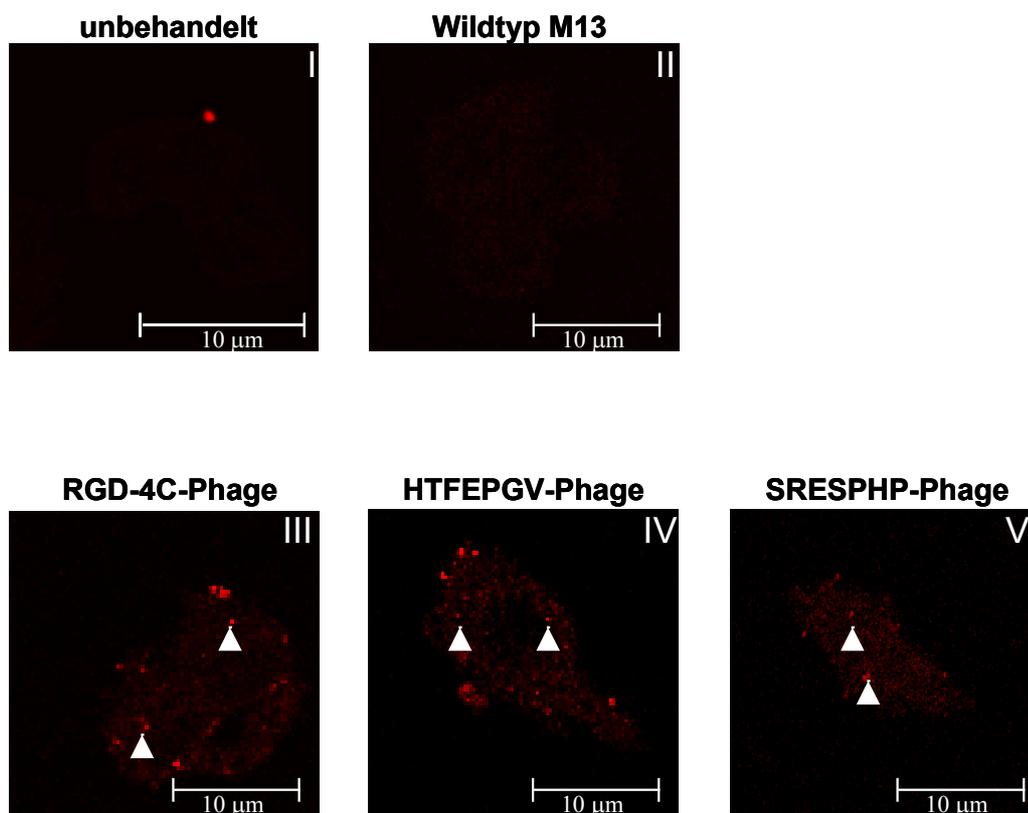


Abb. 3.17: Peptid-vermittelte Internalisierung in TT-Zellen. 5×10^4 TT Zellen wurden mit den entsprechenden Phagenamplifikaten für 24 h inkubiert und anschließend mit Anti-M13/Alexa 546 Antikörpern detektiert. Die Visualisierung erfolgte bei 63facher Vergrößerung im konfokalen Mikroskop LSM 510. Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt. Als Negativkontrollen dienen unbehandelte Zellen (I) und der Wildtyp-Phage M13 (II). Zum Vergleich mit den Phagen HTFEPGV (IV) und SRESPHP (V) wurde der Phage RGD-4C (III) als Positivkontrolle hinzugezogen, der als αv -Integrin Ligand bekannt ist. Internalisierte Phagen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

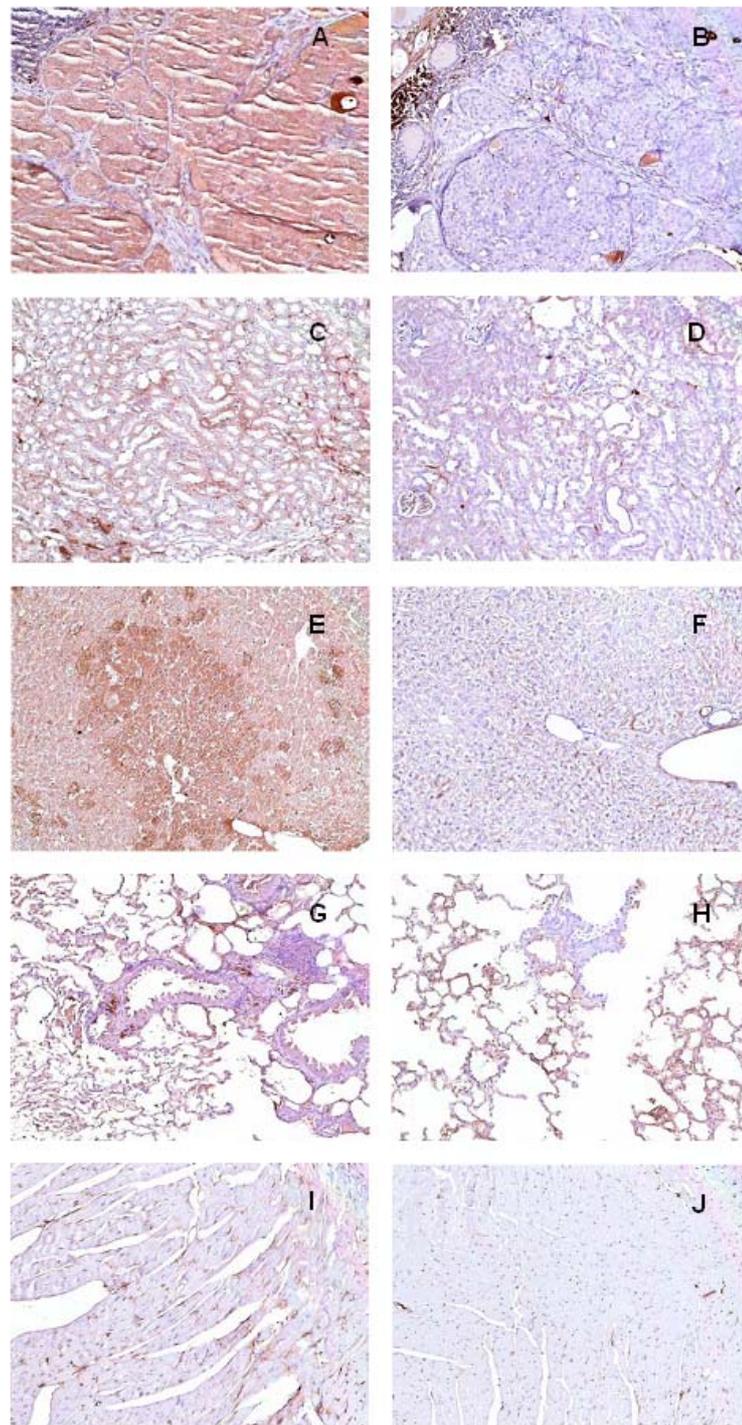


Abb. 3.18: Immunhistologischer Nachweis von M13-Phagen in unterschiedlichen Geweben. 10^9 pfu des Phagen SRESPHP wurden systemisch in *RET*-transgene Mäuse appliziert. Die verschiedenen Gewebe A, B) Tumor; C, D) Niere; E, F) Leber; G, H) Lunge und I, J) Herz wurden anschließend aus den Tieren isoliert und zum Nachweis in Paraffin eingebettet. Der immunhistologische Nachweis erfolgte mit einem anti-M13 Antikörper. A, C, E, G und I zeigen eine Inkubtion mit anti-M13 Antikörper; B, D, F, H und J stellen Negativkontrollen ohne Verwendung des anti-M13 Antikörpers dar. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Gewebe sind in einer 40fachen Vergrößerung dargestellt.

3.3 Verifizierung des MTC-Liganden HTFEPGV im adenoviralen Kontext

Um zielzellspezifische adenovirale Vektoren herzustellen, kann die Modifizierung des natürlichen Tropismus von Adenoviren auf unterschiedliche Weise erfolgen. Dabei kann das Zwei-Komponenten- oder das Ein-Komponenten-System angewendet werden. Die erste Variante beinhaltet 1) die Verwendung bispezifischer Antikörper, die auf der einen Seite gegen einen spezifischen Zellrezeptor gerichtet sind und auf der anderen Seite gegen das Fiberprotein des Virus; 2) die Fusion der CAR-Ektodomäne mit spezifischen Zellrezeptoren und 3) den Gebrauch von bifunktionalem Polyethylenglykol zur chemischen Kopplung eines Liganden an das Virus. Die Ein-Komponenten-Variante beruht auf der genetischen Modifizierung des adenoviralen Vektorrückgrats. Hierbei werden die natürlichen Bindestellen des Virus (RGD-Motiv in der Pentonbasis, Bindestelle für den CAR-Rezeptor) deletiert und ein neues Bindemotiv an dafür geeigneter Stelle integriert.

3.3.1 Gentransfer des Vektors Ad.GFP.HTFEPGV in Anwesenheit neutralisierender Antikörper

Ziel dieser Arbeit war es, nach Identifizierung putativer Liganden, einen MTC-selektiven AdVektor zu konstruieren. Aus diesem Grund wurde initial das Peptid HTFEPGV kovalent mit Hilfe von bifunktionalem Polyethylenglykol (PEG) an einen adenoviralen Vektor gekoppelt. Dieser Vektor eignet sich zur schnellen funktionellen Analyse innerhalb des adenoviralen Kontext. Der Vektor behält dabei seinen natürlichen Tropismus und wird durch einen zusätzlichen Tropismus in Form des verwendeten Peptids ergänzt. Der verwendete AdVektor exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP) und wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe hergestellt (Pützer et al., 2000). Nach "PEGylierung" und Ligandenkopplung sollte dieser AdVektor auf seine Bindungseigenschaften hin untersucht werden. Dabei war zu klären, ob der virale Gentransfer über das Peptid vermittelt wurde oder auf anderen Effekten beruhte. Dies wurde anhand eines Konkurrenzexperimentes nachgewiesen. Um die durch das verwendete Zwei-Komponenten-System immer noch vorhandene CAR-Bindung des Virus an die Zielzelle zu blockieren, wurden TT Zellen vor der Infektion mit neutralisierendem anti-CAR Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, die mit anti-CAR Antikörper inkubiert wurden sowie Zellen ohne Antikörper als Kontrolle, mit jeweils 100 µl des "PEGylierten" Virus infiziert. Die Auswertung bezog sich auf die Menge an infizierten Zellen zur Gesamtzellzahl.

Nach Infektion von CAR-neutralisierten Zellen war eine Reduktion in der Transgenexpression im Vergleich zur GFP-Expression in nicht-neutralisierten Zellen zu beobachten. Wie aus Abb. 3.19 zu entnehmen ist, konnte die Transgenexpression durch Zugabe des spezifischen Peptids HTFEPGV (3 $\mu\text{g/ml}$) nochmals um mehr als 60% minimiert werden. Diese Daten weisen daraufhin, dass die Zellinfektion des Virus über das gekoppelte Peptid vermittelt wird. Somit konnte hier nicht nur eine Bindung, sondern auch eine Internalisierung im adenoviralen Kontext durch das im 'phage display'-Verfahren ermittelte Peptid HTFEPGV gezeigt werden.

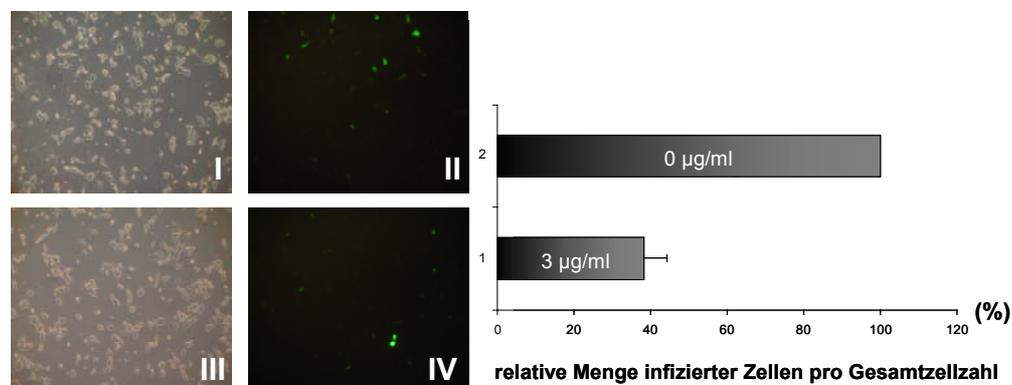


Abb. 3.19: Effekt des Peptids HTFEPGV auf die Ad.GFP.HTFEPGV-vermittelte Transgenexpression. Primäre adenovirale Zellrezeptoren (CAR) auf TT Zellen wurden zunächst durch anti-CAR Antikörper abgeblockt. TT Zellen wurden mit 100 μl des "PEGylierten" Virus in Gegenwart (III, IV) oder Abwesenheit (I, II) des analogen Peptids HTFEPGV behandelt. Nach vier Tagen wurde die GFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop bei 20facher Vergrößerung dokumentiert (II und IV). Ein repräsentativer Ausschnitt ist gezeigt. Das Verhältnis von infizierten Zellen zur Gesamtzellzahl (I und III) ist in einem Balkendiagramm (rechts) dargestellt, wobei infizierte Zellen in Abwesenheit des Peptids als 100% gesetzt werden.

3.3.2 Etablierung eines Systems zur Integration von Peptidsequenzen in das Adenovirusrückgrat

Um die Nachteile des Zwei-Komponenten-Systems viraler Modifikationen zu umgehen, ist neben der chemischen Kopplung eines Peptids an einen adenoviralen Vektor ein angestrebter Schritt dieser Arbeit, ein Virus genetisch zu verändern. Die Modifikation des Virus anhand des sogenannten Ein-Komponenten-Systems bezieht sich dabei auf die zellulären Bindestellen, die es dem Virus ermöglichen, an die Zelle anzuheften und zu internalisieren. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, sind dafür spezifische Sequenzmotive, die in der *'fiber knob'*-Region liegen, und ein Sequenzmotiv, das sich in der Pentonbasis befindet, verantwortlich. Frühere Kompetitionsstudien von Roelvink et al. (1999) zeigten, dass die Aminosäurereste P409A, Y491A, P190A, T470A, P396A, rDPE-GGG, K420A, K417G, S408E, d489-492, r487-491, Y477A, Y262A, S189E, K201A, K198G, S395E und L407G in Interaktion mit dem zellulären CAR-Rezeptor treten. Die Gruppe Steward et al. (1997) konnte über Cryo-Elektronenmikroskopie das RGD-Motiv in der Pentonbasis für eine Interaktion mit zellulären α_v -Integrinen verantwortlich machen. Bei der Integration neuer Sequenzen ist es wichtig, dass das Virus seine natürliche Konformation (Trimerisierung) behält und es zu einer optimalen Zellanheftung kommen kann. Krasnykh et al. (1998) stellten in ihrer Studie heraus, dass der sogenannte *'HI-Loop'* innerhalb des *'fiber Knob'* geeignet ist, zusätzliche Proteinsequenzen zu integrieren, ohne einen negativen Effekt auf die Trimerisierung des Fibers auszuüben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zusätzlich zum chemisch modifizierten Vektor eine Klonierungsstrategie entwickelt werden, die das zukünftige Integrieren ermittelter Peptidsequenzen in den *'fiber knob'* erleichtern sollte. Durch die Konstruktion sogenannter *'shuttle'*-Plasmide, die der Subklonierung von kurzen Sequenzen dienen, sollte das Klonieren innerhalb großer Plasmide, die zur Herstellung von Adenoviren nach dem AdEasy-System benötigt werden, umgangen werden. Die *'shuttle'*-Plasmide tragen ebenfalls alle notwendigen Modifikationen zur Deletion des natürlichen Tropismus des Virus, wodurch die Klonierungsschritte insgesamt reduziert werden.

Wie schematisch in Abb. 3.20 dargestellt, kann die Konstruktion eines modifizierten Vektors in 7 Schritte unterteilt werden. Nach Herstellung der *'shuttle'*-Plasmide sind zur Integration von neuen Peptidsequenzen nur noch 1-2 weitere Schritte notwendig.

Zunächst werden die zu verändernden Regionen aus dem AdEasy-Plasmid subkloniert oder über PCR-Techniken amplifiziert (Schritt 1, 3 und 4). Dann wird das RGD-Motiv innerhalb der Pentonbasis über zielgerichtete Mutagenese in ein LDD-Motiv umgewandelt, wodurch eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle entsteht (1). Die mutierte

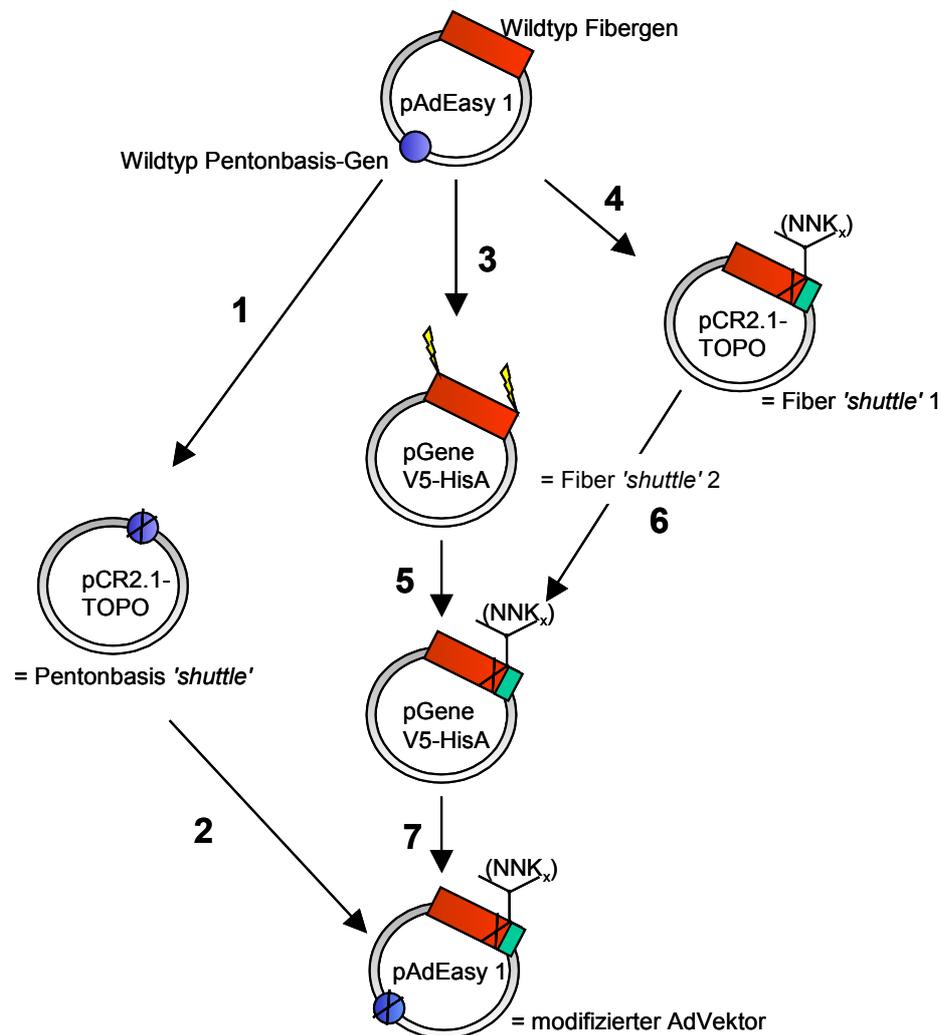


Abb. 3.20: Schematische Darstellung zur Konstruktion eines modifizierten AdVektors ausgehend vom AdEasy-System. Die Klonierung ist in 7 Schritte unterteilt: 1) Subklonierung der Penton Basis in ein 'shuttle'-Plasmid zur zielgerichteten Mutagenese des RGD-Motivs. 2) Rückklonierung der mutierten Pentonbasis in das Ad5-Genom. 3) Subklonierung einer Region, die das Wildtyp Fibergen enthält, zur Mutagenese der 5'- und 3'-Enden, um den Wildtypfiber zu entfernen. 4) Amplifizierung des Wildtyp Fibergens mit Addition eines His-Tags sowie Subklonierung in ein 'shuttle'-Plasmid zur Deletion des CAR-Bindemotivs "TAYT" und Integration einer Schnittstelle zur Subklonierung kurzer peptidkodierender Sequenzen in den 'HI-loop'. 5) Entfernen des Wildtyp Fibergens aus 'shuttle'-Plasmid 2. 6) Austausch des modifizierten Fibers gegen den Wildtyp Fiber. 7) Region, die den mutierten Fiber enthält, wird wieder in das AdEasy-Plasmid zurückgesetzt.

Pentonbasis wird dann in das Ausgangsplasmid zurückkloniert und gegen die Wildtyp-Pentonbasis ausgetauscht (2). In einem weiteren Schritt erfolgt die Subklonierung einer Region, die das Fibergen enthält (3). In dem entstandenen '*shuttle*'-Plasmid 2 werden Mutationen an 5'- und 3'-Ende des Fibers vorgenommen, so dass der Wildtyp-Fiber entfernt werden kann (5). Parallel wird das Fibergen mittels PCR mit entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert, die an das 3'-terminale Ende des Gens einen sechsfachen His-Tag anhängen. Das PCR-Fragment wird ebenfalls in ein '*shuttle*'-Plasmid 1 subkloniert und dort an den beschriebenen Bindestellen modifiziert (Deletion der Region d489-492, Integration einer *Swal*-Schnittstelle in den '*HI-loop*'(4)). Der mutierte Fiber wird dann mit dem Wildtyp-Fibergen des '*shuttle*'-Plasmids 2 ausgetauscht und in einem letzten Schritt in das Ad5-Genom (pAdEasy 1), das schon die veränderte Pentonbasis enthält, zurückgesetzt.

Zur Integration kurzer kodierender Peptidsequenzen müssen letztendlich nur noch zwei Schritte durchgeführt werden. Die Sequenz wird in die integrierte Schnittstelle des modifizierten Fibers ('*shuttle*'-Plasmid 2) eingesetzt und das Fiberfragment wird in Schritt 2 wieder in das Ad5-Genom integriert.

Im Verlauf dieser Arbeit ist es gelungen alle Plasmide herzustellen, so dass eine Integration der identifizierten Peptide für zukünftige Projekte erfolgen kann. Damit ist die Basis geschaffen, um MTC-selektive genetisch modifizierte AdVektoren zu konstruieren, die eine Erweiterung bisheriger Therapiemöglichkeiten darstellen können.

4 Diskussion

Die Fortschritte in der Identifizierung molekularer und genetischer Defekte in unterschiedlichen Tumorerkrankungen haben die Gentherapie zu einer attraktiven Behandlungsmethode für eine Vielzahl von malignen Erkrankungen gemacht. In der klinischen Anwendung gentherapeutischer Studien bilden Tumorerkrankungen mit 66% die größte Zielgruppe neben monogenetischen (9,8%) und vaskulären Erkrankungen (8,3%) (Edelstein et al., 2004). Gegenüber Retroviren stellen Adenoviren das derzeit effizienteste Vektorsystem *in vivo* dar. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, große Mengen an Fremd-DNA in ihr Genom zu inkorporieren und zu hohen Titern für einen Einsatz *in vivo* generiert zu werden. Adenoviren können eine große Bandbreite von replizierenden und nicht replizierenden Zellen infizieren, vermitteln aber eine transiente Genexpression, da sie nicht ins Wirtsgenom integrieren (Kay et al., 2001; Vorburger und Hunt, 2002). Der Infektionsprozess von Adenoviren gliedert sich in zwei Interaktionsphasen: 1) Zelladhäsion über den primären Coxsackievirus B-Adenovirus Rezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997), bei der die Bindung über spezifische Aminosäurereste im 'fiber knob' erfolgt (Kirby et al., 1999; Roelvink et al., 1999); 2) Internalisierung über die Bindung an zelluläre $\alpha\beta$ -Integrine, die mit einem RGD-Motiv in der Pentonbasis des Virus interagieren (Wickham et al., 1993). Da der primäre Rezeptor CAR auf vielen Zellen weit verbreitet ist (Meier und Greber, 2003), ist der selektive Gentransfer mittels Adenoviren in ein definiertes Zielgewebe restringiert. Darüber hinaus besitzen Adenoviren einen erhöhten Lebertropismus, demzufolge ein Grossteil der systemisch applizierten Viren in der Leber lokalisiert ist (Huard et al., 1995; Alemany und Curiel, 2001). Andere Gewebe und auch Tumorzellen weisen dagegen nur eine geringe Menge des primären Rezeptors auf (Miller et al., 1998; Bauerschmitz et al., 2002; Shayakhmetov et al., 2002). Aus diesem Grund können sie nur refraktär von Adenoviren infiziert werden oder zeigen sich sogar Adenoviren gegenüber resistent.

Die erfolgreiche Behandlung des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC) beinhaltete bisher ausschließlich die chirurgische Entfernung des neoplastischen Gewebes (Orlandie et al., 2001). Ferner konnte durch eine Anwendung der Radio- oder Chemotherapie bis zu diesem Zeitpunkt keine nennenswerte Tumorrogression und ein damit verbundener Therapieerfolg beobachtet werden (Vitale et al., 2001). Mit der Etablierung eines MTC-therapierenden Vektors konnte in der Arbeitsgruppe Pützer ein alternatives Konzept zur Behandlung und Untersuchung unterschiedlicher MTC-Modelle entwickelt werden (Drosten et al., 2002).

4.1 Adenovirale Rezeptoreigenschaften unterschiedlicher MTC-Modelle

Der Tumor des medullären Schilddrüsenkarzinoms (MTC) ist durch dominant-aktivierende Mutationen im *RET*-Proto-Onkogen charakterisiert, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität führen (Asai et al., 1995). Ziel aktueller Studien ist die Inhibierung von onkogenem RET. Hierfür bieten sich adenovirale Vektoren an, da sie als hochpotente Genvehikel in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* und *in vivo* mit einer hohen Effizienz zu infizieren. Ihre Anwendung bietet außerdem für schwer transfizierbare Zellsysteme wie MTCs erhebliche Vorteile. In vorangegangenen Studien konnten dominant-negative RET-Mutanten erfolgreich mit Hilfe des adenoviralen Gentransfers eingesetzt und partielle Effekte auf das Tumorstadium von etablierten Tumor-Xenotransplantaten durch RET-Inhibierung erreicht werden (Drosten et al., 2003). Bezugnehmend auf die spezifischen proapoptischen Funktionen von dominant-negativem RET in der MTC-Zelllinie TT (Drosten et al., 2002), zeigten intratumorale Virusinjektionen eine signifikante, aber nur transiente Inhibition des Tumorstadiums. Der Advektor-vermittelte Gentransfer führte deshalb nicht zur kompletten Tumorstadiumsregression (Drosten et al., 2003). Eine Ursache ist möglicherweise eine mangelnde Infektion der Tumorzellen *in vivo*. Grund hierfür könnte wiederum die mangelnde bis unzureichende Expression adenoviraler Rezeptoren auf den Zellen sein. Deshalb wurde die Rezeptorexpression unterschiedlicher MTC-Modelle untersucht.

In früheren Studien von Kim et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Transduktionseffizienz von Adenoviren (AdCMVGFP) in der Cervixkarzinomzelllinie SiHa mit einer nicht detektierbaren Expression des primären Rezeptors CAR korreliert. Auch in Mausfibroblasten (NIH3T3) konnte eine verminderte CAR-Expression mit einer schwachen Transduktionsrate eines unmodifizierten Advektors in Verbindung gebracht werden, die durch Integration eines RGD-Motivs in den 'HI-loop' wieder aufgehoben werden konnte (Koizumi et al., 2003). Die differenzierte CAR-Proteinexpression in den hier untersuchten humanen *in vitro* und *in vivo* MTC-Modellen stellt sich allerdings etwas abweichend dar. Im Vergleich mit anderen untersuchten Zelllinien (293, H1299, VH6, Capan-2) zeigen TT Zellen eine signifikante CAR-Expression. Diese ist aber im Vergleich mit der CAR-Expression von 293 Zellen, die als Verpackungszelllinie von Adenoviren verwendet und auch in der Literatur als CAR-positiv beschrieben werden (Rein et al., 2004) weitaus geringer. VH6 Fibroblasten weisen wie auch Mausfibroblasten (NIH3T3) eine sehr geringe bis gar keine CAR-Expression auf und sind in der Regel nur mit einer erhöhten 'multiplicity of infection' (MOI) zu infizieren. Überseinstimmend mit der in TT Zellen nachgewiesenen

CAR-Expression lassen sich TT Zellen in Zellkultur gut infizieren. Auch in etablierten Tumoren, die aus in Nacktmäuse subkutan injizierten TT Zellen entstanden sind, konnte im Gegensatz zu anderen Studien, in denen Tumorzellen einen geringen CAR-Status aufwiesen (Kim et al., 2001), ein deutlicher Anstieg der CAR-Expressionslevel beobachtet werden, so dass ein durch Drost et al. (2003) beschriebener verminderter therapeutischer Effekt auf Tumoren *in vivo* höchstwahrscheinlich nicht auf eine reduzierte CAR-Expression zurückzuführen ist. Mit Blick auf die maßgeblich an der Internalisierung beteiligten α v-Integrine, die in allen untersuchten Zellsystemen wie im Xenotransplantat nachgewiesen wurden, ist im Transplantat im Vergleich zur Zelllinie eine Proteinexpressionsabnahme im Tumor auffällig. Diese Daten weisen daraufhin, dass die von Drost et al. (2003) beobachtete verminderte Tumorregression nach Infektion mit einem therapeutischen AdVektor auf eine mangelhafte Internalisierung des Virus in die Tumorzelle zurückzuführen sein könnte. Die weiteren Integrinuntereinheiten β 3 und β 5 konnten aufgrund mangelhafter Antikörper nur auf RNA-Ebene analysiert werden und geben zusätzliche Hinweise auf mögliche Transduktionsdefizite. Z.B. war das Integrin β 3 in TT Zellen sowie im Xenotransplantat in kaum detektierbaren Transkriptmengen vorhanden. Auch Integrin β 5 wies eine schwache RNA-Expression in TT Zellen auf und konnte im Tumor nicht mehr nachgewiesen werden. Das zusätzliche Fehlen dieser Integrinuntereinheiten könnte sich ebenfalls negativ auf die Infizierbarkeit der etablierten Tumoren auswirken. Hieraus ergibt sich, dass ein verminderter adenoviraler Gentransfer *in vivo* für etablierte MTC-Tumoren nicht auf einer geringen CAR-Expression beruht, sondern wahrscheinlich auf eine verminderte Integrinexpression, die auf ein restringiertes Internalisierungsverhalten des viralen Vektors hinweist, zurückzuführen ist.

Darüber hinaus sollte die adenovirale Rezeptorexpression in primären klinisch relevanten Tumoren untersucht werden. Aus diesem Grund wurden primäre MTC-Tumoren anhand des *RET*-transgenen Mausmodells CT-2A, die auf derselben *RET*-Mutation (Codon C634R) wie humane TT Zellen beruhen, im Hinblick auf ihre CAR- und Integrinexpression überprüft. Im Vergleich zu anderen Geweben (Niere, Leber und Herz) wies der Tumor eine geringe Transkriptmenge an CAR auf. Die RNA-Expression von CAR in der Lunge zeigte ähnliche Transkriptmengen wie im Tumor. In früheren Studien von Fechner et al. (1999) konnte übereinstimmend mit den in dieser Arbeit beschriebenen Daten eine geringe CAR-Expression in murinem Lungengewebe nachgewiesen werden, das ebenfalls eine niedrige Transduktionseffizienz für AdVektoren besaß. In den Studien von Drost et al. (2004) konnte, ähnlich wie am Beispiel der Lunge von Fechner et al. (1999) gezeigt wurde, nur eine partielle Infektion der Tumoren *RET*-transgener Mäuse durch gentherapeutische Adenoviren erreicht

werden. Da eine ausreichende Menge an CAR auf der Tumoroberfläche benötigt wird, um eine effiziente Infektion des Zielgewebes zu gewährleisten, könnte eine verminderte CAR-Expression auch hier auf die schlechte Transduzierbarkeit der primären MTC-Tumore hinweisen.

Dem gegenüber zeigt die RNA-Expression der untersuchten Integrine eine gleichmäßige Verteilung auf alle Gewebe, was auch durch die Daten von Fechner et al. (1999) bestätigt wird. Eine Ausnahme bildete hier das Integrin $\beta 3$, das nur in Lunge und Herz lokalisiert werden konnte. Für das transgene Mausmodell zeigt sich demnach ein anderes adenovirales Rezeptormuster als für das humane *in vivo* MTC-Modell. Im murinen Modell, das die Eigenschaften primärer MTC-Tumoren aufweist, könnte demnach eine verminderte CAR-Expression für eine mangelhafte Infizierbarkeit verantwortlich sein. Dagegen sind Integrine in ausreichender Menge auf der Tumoroberfläche vorhanden, so dass eine Einschränkung der Internalisierungsfähigkeit wie im humanen *in vivo* Modell hier wahrscheinlich keine Rolle spielt. Auf der Grundlage dieser Daten kann der Einsatz selektiv modifizierter Adenoviren zur Verbesserung des Gentransfers in MTCs beitragen. Ein solcher Ansatz kann darauf basieren, dass ein korrespondierender auf der Tumoroberfläche ausreichend exprimierter Rezeptor die adenovirale Infektion der Zielzelle anstelle des CAR-Rezeptors vermittelt.

4.2 Identifizierung spezifischer Peptidliganden

Den differenzierten Rezeptoreigenschaften des humanen *in vitro* und *in vivo* Modells sowie der reduzierten CAR-Expression in murinen Primärtumoren zur Folge, wurde eine alternative Methode zur Verbesserung des selektiven Gentransfers im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die Identifizierung MTC-spezifischer Liganden erfolgte über die sogenannte '*phage display*'-Technik, die in hochpotenten Phagenbibliotheken eine Vielzahl an Peptidsequenzen zur Tumorzellinteraktion zu Verfügung stellt (Rodi et al., 1999; Landon und Deutscher, 2003). '*Phage display*' konnte bisher erfolgreich bei der Identifizierung spezifischer Liganden für das vaskuläre Endothelium eingesetzt werden (Pasqualini und Ruoslahti, 1996; Arap et al., 1998; White et al., 2001; Arap et al., 2002a).

Die Durchführung des *in vivo* '*phage display*' in Ergänzung zum *in vitro* Ansatz sollte eine Selektion von Peptiden ermöglichen, die an den Tumor in seiner "natürlichen" Umgebung binden können (Arap et al., 1998; Arap et al., 2002a). Zur Verifizierung MTC-selektiver Liganden wurde das sogenannte '*biopanning*' (2.2.6.2 und 2.2.6.3) in mehreren Amplifikationsrunden durchgeführt, wobei bereits nach der zweiten

Amplifikation in allen drei Systemen ein starker Anstieg des Phagentiters zu beobachten war. Dieser Anstieg stellt eine Anreicherung spezifisch gebundener Phagen in den Zielzellen bzw. -geweben dar und kann mit Daten aus vorangegangenen Studien (Rajotte et al., 1998; Nicklin et al., 2000) verglichen werden. In dieser Arbeit wurde allerdings im Gegensatz zur Literatur schon ein früher signifikanter Titeranstieg nach der zweiten Amplifikationsrunde gefunden. Bei der Analyse des *in vitro* MTC-Modells konnte ein 7facher Anstieg verzeichnet werden. In beiden *in vivo* MTC-Modellen zeigte sich ein deutlich höherer Titeranstieg (Xenotransplantat 20fach; *RET*-transgenes Modell 3000fach), wobei der Titeranstieg im murinen MTC-Modell um 2 Potenzen höher lag als im Xenotransplantat-Modell. In früheren Experimenten von Nicklin et al. (2000) konnte von der ersten bis zur vierten Amplifikationsrunde ein 60facher Titeranstieg für ein vaskuläres Endothelzell-Modell *in vitro* verifiziert werden. Ähnliche Daten zeigen die *in vitro* Untersuchungen von Rasmussen et al. (2002) für kolorektale und Brust-karzinomzelllinien. Durch eine Variation des 'biopannings', indem zuvor auf unspezifischen Zelllinien nichtselektive Phagenkandidaten beseitigt wurden, konnte hier noch eine Steigerung des Titeranstiegs erreicht werden. Mit den ersten *in vivo*-Analysen von Pasqualini und Ruoslahti (1996) wurden erstmals spezifische Liganden unterschiedlicher Organe über 'phage display'-Techniken isoliert. Titrationsanalysen zeigten eine 6-13fache Anreicherung spezifischer Phagen im Zielgewebe. Auch in folgenden Studien verwies eine Erhöhung des Titers im Zielgewebe auf spezifisch bindende Phagen (Rajotte et al., 1998; Essler und Ruoslahti, 2002).

In den Untersuchungen, die zu den humanen MTC-Modellen durchgeführt wurden, wurden aus insgesamt 300 Phagenklonen in einem etablierten 'enzyme linked immunosorbent assay' (ELISA) die jeweiligen Phagen mit der höchsten Bindeaffinität zu TT Zellen (15-22fach höher als der Wildtyp M13) für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zunächst wurden die bestbindenden Kandidaten sequenziert und auf verschiedene Sequenzmotive hin untersucht. Dabei wurden insgesamt 35 verschiedene Peptidsequenzen ermittelt, wobei die Sequenz HTFEPGV mit einer sehr hohen Frequenz (35fach) im *in vitro* und *in vivo* Ansatz isoliert werden konnte. Neben diesem Phagen wurden weitere Phagen doppelt identifiziert (PPEAMHL, KAMSWYA, TSPTNRS, APSQTYH, HGKYFVS und NTHMTAF). Andere Phagen können abhängig von internen Konsensusmotiven zu Clustern zusammengefasst werden (z.B. 'PST', 'AM', 'MS' und 'AQL'). Im Hinblick auf eine geringere CAR-Expression in TT Zellen im Vergleich zu etablierten Tumoren, kann man annehmen, dass *in vitro* identifizierte Peptide wahrscheinlich nicht effizient genug sind, um *in vivo* als Liganden eingesetzt

zu werden. Ein Grund dafür kann z.B. eine Veränderung der zellulären Rezeptoren im wachsenden Tumor sein, die anhand der Rezeptoranalysen in dieser Arbeit herausgestellt wurden. Deshalb ist es bemerkenswert, dass sowohl unter *in vitro* als auch unter *in vivo* Bedingungen die Peptidsequenz HTFEPGV gefunden wurde. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass der zu diesem Peptid korrespondierende Rezeptor sowohl auf TT Zellen als auch im Tumor in ausreichender Menge auf der Zelloberfläche vorhanden ist.

Im murinen MTC-Modell konnte wie oben beschrieben ein 3000facher Titeranstieg innerhalb zweier Amplifikationsrunden nachgewiesen werden. Bei Sequenzierung von 14 zufällig ausgewählten Phagen wurde deutlich, dass die Anwesenheit des Phagen SRESPHP innerhalb des zweiten Amplifikationsschrittes auf fast 100% anstieg, so dass davon auszugehen ist, dass dies mit dem Titeranstieg korreliert. Diese Tatsache zeigt, dass dieser Phage eine hohe Bindungsaffinität zum Zielgewebe aufweist. Dieser Phage konnte ebenfalls im *in vitro* MTC-Modell der TT Zelllinie nachgewiesen werden. Für dieses Modell wies der Phage allerdings keine herausragende Bindungsaffinität auf, so dass davon auszugehen ist, dass der korrespondierende Rezeptor auf humanen TT Zellen im Gegensatz zu murinen Primärtumoren nicht ausreichend vorhanden ist.

In anschließenden Spezifitätsanalysen wurden die identifizierten Phagen auf ihre Bindungsselektivität hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der aus humanen MTC-Modellen isolierte Phage HTFEPGV mit erhöhter Selektivität an TT Zellen bindet. Zum Vergleich wurden die Phagen LFAQLGP mit dem Sequenzmotiv `AQL`, KAMSWYA (zweifaches Erscheinen) und TPRTQKA als Negativkontrolle aufgrund negativen Bindeverhaltens im ELISA ausgewählt. Alle Phagen wurden auf vier unterschiedlichen Zelllinien in einer Titrationsanalyse getestet. Die Resultate zeigen, dass der Phage HTFEPGV eine stärkere Bindung an TT Zellen gegenüber anderen "nicht-MTC-Zellen" besitzt. Weitere Untersuchungen im ELISA konnten diese Aussage bestätigen. Diese Zielzellselektivität des Phagen HTFEPGV zeichnet diesen Peptidliganden als potentiellen Kandidaten für einen selektiven adenoviralen Gentransfer aus. Die Untersuchungen von Nicklin et al. (2000) zeigten ähnliche Ergebnisse für die Identifizierung vaskulärer Endothelzell-Liganden. Über die Titration auf unterschiedlichen Zelllinien konnte hier verdeutlicht werden, dass der *in vitro* identifizierte Phage spezifisch an die Zielzellen bindet. Des Weiteren wurde dieser Phage über eine Antikörperperfusion und später durch genetische Integration in das Adenoviruskapsid im adenoviralen Kontext untersucht und zeigte auch hier positive Ergebnisse (Nicklin et al., 2000; Nicklin et al., 2001).

In anschließenden Analysen wurde der Phage HTFEPGV mit zwei anderen Phagen (TPRTQKA und LFAQLGP) im Xenotransplantat-Modell verglichen. Hierbei sollte geklärt werden, ob der Phage HTFEPGV selektiver bzw. spezifischer im Vergleich mit einem Phagen mit negativem Bindeverhalten gegenüber TT Zellen und einem eventuell zweiten positiven Kandidaten an den im Nacktmausmodell etablierten Tumor binden kann. Auch *in vivo* konnte die stärkste Bindung des Phagen HTFEPGV an das Zielgewebe beobachtet werden. Vergleichende Analysen des vaskulären Endothelgewebes zeigten ähnliche Resultate (Pasqualini und Ruoslahti, 1996; Pasqualini et al., 1997; Rajotte et al., 1998). Zusammenfassend kann man den Phagen HTFEPGV als potenziellen MTC-Liganden bezeichnen, da dieser gegenüber anderen untersuchten Phagen eine deutlich höhere Bindeaffinität und –selektivität für TT Zellen *in vitro* und für etablierte Tumore *in vivo* aufweist.

Um die Gewebsspezifität des im murinen MTC-Modell identifizierten Phagen SRESPHP zu testen, wurde der Phage direkt systemisch über die Schwanzvene in den Kreislauf appliziert. Neben dem Tumor wurden weitere Organe wie die Niere, die Leber, die Lunge und das Herz untersucht. Die Ergebnisse demonstrieren eine hohe Selektivität des Phagen SRESPHP für den Tumor gegenüber den anderen Geweben. Die Bindeaffinität war dabei im Tumor um 80% höher als in Niere und Lunge. Auch in Gegenüberstellung mit der Leber wies der Tumor eine 50% höhere Menge an gebundenen Phagen auf. Der Vergleich mit dem Herzen zeigte eine 90% höhere Bindeaffinität für den Tumor. Auch in immunhistologischen Nachweisen, in denen die Gewebe der gleichen Maus wie im Titrationsversuch verwendet wurden, konnte die stärkste Immunreaktion gegen M13-Phagen bzw. die größte Anreicherung des injizierten Phagen SRESPHP im Tumor detektiert werden, wohingegen in allen anderen untersuchten Geweben eine schwächere Immunreaktion zu beobachten war. Die Lokalisation der Phagen kann hierbei an der Invasionsfront der Tumore ausgemacht werden, sowie in einzelnen Makrophagen innerhalb des Tumors und auch an einzelnen Tumorzellen. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen aus der Titration. Von besonderer Bedeutung hierbei ist, dass die Bindung in der Leber stark reduziert war. Wie frühere Untersuchungen zeigten, weisen Adenoviren einen starken Lebertropismus auf (Huard et al., 1995; Alemany und Curiel, 2001). Die Resultate sprechen daher für die Verwendung der identifizierten Peptidsequenz im adenoviralen Kontext und machen auch diese Sequenz zu einem möglichen potentiellen Peptidliganden.

Darüber hinaus war zu klären, ob die Phagen-Zell-Interaktion tatsächlich auf den von den untersuchten Phagen vermittelten Peptiden beruht. Dazu wurden mikroskopische Untersuchungen auf Ein-Zell-Ebene für beide Phagen HTFEPGV und SRESPHP

durchgeführt. Auch für den Phagen SRESPHP wurde die TT Zelllinie ausgewählt, da zur Zeit keine weiteren MTC-Zelllinien existieren. In vorangegangenen Untersuchungen mittels ELISA demonstrierte der Phage SRESPHP gegenüber dem Wildtyp eine höhere Bindeaffinität und somit konnte die TT Zelllinie hier zur Untersuchung beider Phagen herangezogen werden. Die Resultate zeigen für beide Kandidaten ein stärkeres Bindeverhalten im Vergleich zum Wildtyp, der kein Fusionspeptid in seinem Hüllprotein besitzt. Demnach wird deutlich, dass die Phagenbindung an die Zielzelle über das Peptid vermittelt wird. Dies konnte durch Konkurrenzexperimente bestätigt werden, bei denen analoge synthetische Peptide eingesetzt wurden. Der Phage HTFEPGV wurde zunächst *in vitro* auf TT Zellen getestet. Bei Konkurrenz des Phagen mit seinem analogen Peptid konnte eine dosisabhängige Inhibierung der Phagen-Zell-Interaktion um 80% beobachtet werden. Bei Zugabe von unspezifischem Peptid (TPRTQKA) erfolgte keine Inhibierung der Phagenbindung, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Bindung des Phagen über das Peptid erfolgt und sogar spezifisch von einem Peptid (HTFEPGV) abhängt. Diese Daten korrelieren mit den Daten aus der immunzytochemischen Untersuchung. Durch den Nachweis, dass das unspezifische Peptid (TPRTQKA) schon *in vitro* keine Bindung an TT Zellen zeigte, wurde zur *in vivo* Analyse nur ein Konkurrenzversuch mit dem analogen Peptid durchgeführt. Auch unter *in vivo* Bedingungen wurde die Phagen-Zell-Interaktion von 85-100% inhibiert, so dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass die Bindung des Phagen an die Zelle bzw. Tumoroberfläche auf dem Peptid beruht.

Im murinen MTC-Modell wurde die Konkurrenz *in vivo* durchgeführt. Neben dem Tumor wurde zum Vergleich die Leber als Kontrollorgan verwendet. Bei diesem Versuch wurde die dosisabhängige Inhibierung der Phagen im Tumor deutlich demonstriert. Im Gegensatz dazu konnte in der Leber ein unspezifisches Konkurrenzverhalten herausgestellt werden. Im Tumor konnte die Phagenbindung bis zu 65% inhibiert werden. In der Leber dagegen kam es bei Zugabe von 100 µg des analogen Peptids zu einer 95%igen Inhibition, die allerdings bei Gabe von 500 µg Peptid wieder aufgehoben wurde. Hier stieg die detektierte Phagenmenge sogar über den Ausgangswert (Phage in Abwesenheit des Peptids) hinaus an. Diese Unspezifität konnte 1999 ebenfalls bei Romanczuk et al. beobachtet werden. Hier konnte ein zuvor über '*phage display*' identifiziertes Peptid, das für Atemwegsepithelzellen spezifisch war, an einen Adenovirus über bifunktionales Polyethylenglycol (PEG) gekoppelt werden. Bei einem durchgeführten Konkurrenzversuch auf Nicht-Zielzellen (HeLa Zellen) konnte durch das analoge Peptid nur eine unspezifische Inhibierung der Virus-Zell-Interaktion detektiert werden, da bei Dosiserhöhung die Inhibierung wieder

abnahm. Die Autoren verweisen hier auf die Unspezifität ihres Peptids für HeLa Zellen, die auch über eine verminderte Transduktionseffizienz gegenüber den Zielzellen nachgewiesen werden konnte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Liganden zu finden, die in der Lage sind, an die Virusoberfläche gekoppelt eine Internalisierung in die Zielzellen zu vermitteln. Mit Blick auf diesen Aspekt konnte zuvor in dieser Arbeit eine geringe Menge an α v-Integrin im Xenotransplantat-Modell gefunden werden. Aufgrund vorangegangener Studien von Drosten et al. (2003) wurde angenommen, dass unzureichende Antitumoraktivität in Verbindung mit verringerter Internalisierungsfähigkeit des Vektors gebracht werden konnte. Daraufhin wurden die identifizierten Liganden in immunozytochemischen Analysen auf ihre Internalisierungsfähigkeiten hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass beide Phagen HTFEPGV sowie SRESPHP in der Lage waren in TT Zellen *in vitro* zu internalisieren. Als Internalisierungskontrolle diente hier ein Phage RGD-4C, der das α v-Integrin-Bindemotiv RGD trägt (Ardelt et al., 2003). In früheren Experimenten konnten mit diesem Phagen in α v-Integrin-positiven Zellen eine erfolgreiche Internalisierung gezeigt werden, so dass sich diese Kontrolle auch in α v-Integrin-positiven TT Zellen eignete. Darüber hinaus konnte für den Phagen SRESPHP mittels immunohistochemischer Nachweise eine Internalisierung *in vivo* gezeigt werden. Seine Lokalisation konnte an der Invasionsfront des Tumors ausgemacht werden sowie innerhalb einiger Tumorzellen. Auf dieser Tatsache basierend, könnte bei Einsatz eines mit diesem Peptid modifizierten AdVektors mit anti-tumoraler Wirkung direkt die "Versorgung", d.h. die einwandernden Blutgefäße, des Tumors beeinflusst werden. Dies könnte sich positiv auf eine Tumorregression auswirken.

Beide Phagen aus unterschiedlichen MTC-Modellen (human und murin) weisen eine erhöhte Zielzellspezifität gegenüber anderen Zellen und Geweben, aber auch im Vergleich zu anderen Phagenkandidaten auf. Die Bindung beider Phagen an die Zielzellen zeigt eine Abhängigkeit zum phagenexprimierten Peptid und verweist wiederum auf eine Spezifität für die Zielzellen. Da beide Phagen bzw. Peptide zur Internalisierung befähigt sind, kommen sie für eine Adenovirusmodifikation in Frage.

4.3 Spezies- und Zellspezifität identifizierter Peptidliganden

Eine weitere interessante Fragestellung ergibt sich aus der Tatsache, dass in unterschiedlichen MTC-Modellen unterschiedliche Peptidsequenzen gefunden wurden. Aus diesem Grund wurde der Phage HTFEPGV ebenfalls im *RET*-transgenen Mausmodell auf seine Bindung hin getestet. Hier konnte demonstriert werden, dass die Identifizierung spezifischer Liganden vom System abhängig ist. Der Phage HTFEPGV

konnte im Vergleich mit weiteren untersuchten Geweben nur in geringen Mengen an den Maus-Schilddrüsentumor binden. Durch seine starke Bindung an die Leber und Niere wurde hier deutlich, dass der Phage HTFEPGV im murinen MTC-Modell seine Tumorselektivität verliert. Auch die hohe Affinität zur Leber ist wie bereits erwähnt ein negativer Aspekt im Hinblick auf selektiven adenoviralen Gentransfer. Obwohl unterschiedliche Liganden und Rezeptoren, die aus unterschiedlichen Mausmodellen isoliert wurden, zur Identifizierung putativer humaner Homologe dienten (Pasqualini et al., 1997; Pasqualini et al., 2000), ist es möglich, dass nicht alle identifizierten Liganden in murinen und humanen Modellen angewendet werden können (Arap et al., 2002b). Am Beispiel des Prostata-spezifischen Membranantigens (PSMA) kann diese Divergenz zwischen Maus und Mensch illustriert werden. Diese wird als Spezies-Spezifität bezeichnet. Selektive Expression von PSMA kann in humanem Prostatagewebe nachgewiesen werden, aber nicht in murinem Prostatagewebe; stattdessen wird das murine Homolog im Gehirn und in der Niere exprimiert (Bacich et al., 2001). Ferner ist PSMA ein Marker für Endothelzellen der humanen Tumorblutgefäße (Chang et al., 1999), während das murine PSMA in tumorassoziierten Blutgefäßen nicht detektierbar ist. Arap et al. (2002b) führten aus diesem Grund das erste '*phage display*' in einem Patienten durch und konnten somit eine molekulare Karte des humanen Blutgefäßsystems erstellen. Aus diesen Grundlagen lassen sich zahllose '*targeting*'-Strategien ableiten. Es gibt dennoch neue Tendenzen, die Mausmodelle für eine weitere klinische Anwendung gentherapeutischer Studien wieder attraktiver machen. Die Tatsachen, dass der identifizierte Phage SRESPHP in einem klinisch relevanten *in vivo* System isoliert wurde, macht ihn zusätzlich zu einem potenziellen Kandidaten für weiterführende klinische Studien. Im *RET*-transgenen Mausmodell befindet sich der Schilddrüsentumor in einer "natürlichen" orthotopen Umgebung, die mit humanen Primärtumoren vergleichbar ist und im Xenotransplantat-Modell nicht gegeben ist. Fakt ist außerdem, dass der Phage zusätzlich auf TT Zellen gefunden wurde. Die verminderte Bindeselektivität *in vitro* könnte eventuell mit der Peptidstruktur korrelieren, die vielleicht im *in vivo*-Modell besser mit korrespondierenden Rezeptoren interagieren kann. Ob sich gleiche korrespondierende Rezeptoren zu diesem Phagen sowohl auf humanen TT Zellen als auch auf murinen MTC-Tumoren befinden, bleibt zu klären. In zukünftigen Untersuchungen könnte dieser Rezeptor ebenfalls über '*phage display*'-Techniken bestimmt werden, wie es z.B. durch die Studien von Essler und Ruoslahti (2002) am Beispiel von Aminopeptidase P gezeigt ist. Hier wurde gezeigt, dass zuvor für malignes Brustgewebe ein Phage identifiziert werden konnte. Um den genauen Rezeptor dieses Phagen zu ermitteln, wurde umgekehrt ein '*biopanning*' mit einer

cDNA-Phagenbank auf dem identifizierten Phagen durchgeführt. Dabei wies ein cDNA-Klon eine Homologie zu Aminopeptidase P auf.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Speziespezifität der identifizierten MTC-Liganden muss dennoch kritisch überdacht werden. Zwar stellt das *RET*-transgene Mausmodell ein klinisch bedeutsames Modell zur Untersuchung des medullären Schilddrüsenkarzinoms dar, dennoch kann das ermittelte Peptid unter Umständen nicht in humanen MTCs angewendet werden, wofür auch die Daten zur Speziesabhängigkeit des Peptids HTFEPGV sprechen. Dieses mögliche Problem der Speziesabhängigkeit des Liganden kann nur durch ein Peptid-*'screening'*, das direkt in Patienten durchgeführt wird, gelöst werden. Eine Grundlage dafür wurde von Arap et al. (2002b) mit der Erstellung einer molekularen Karte des menschlichen Blutgefäßsystems bereits geschaffen.

4.4 Verhalten der Liganden im adenoviralen Kontext

Die von O'Riordan et al. (1999) entwickelte Methode zur Kopplung von reaktivem Polyethylenglykol an Adenoviren wurde ebenfalls 1999 von Romanczuk et al. weiterentwickelt, um kurze Peptidsequenzen mit einem adenoviralen Vektor zu verknüpfen und damit ein schnelles *'screening'* identifizierter Peptide im adenoviralen Kontext zu erlauben. In dieser Studie konnte ein ebenfalls mittels *'phage display'* identifiziertes Peptid an einen AdVektor fusioniert werden. Dieser modifizierte Vektor wies in unterschiedlichen Tests eine Zielzellspezifität auf, die auf das fusionierte Peptid zurückzuführen war. Um die Eigenschaften der in dieser Arbeit identifizierten Liganden im adenoviralen Kontext zu untersuchen, wurde zur schnellen Analyse der Phage HTFEPGV als sogenannter "Prototyp" über reaktives PEG an einen adenoviralen Vektor, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Transgen exprimierte, gekoppelt. Durch Kompetitionsversuche mit dem analogen synthetischen Peptid, konnte hier wie auch bei Romanczuk et al. (1999) gezeigt werden, dass bei Verwendung neutralisierender Antikörper die Bindung an die Zelle über das Peptid vermittelt wird. Da dieses System aber die Nachteile eines Zwei-Komponenten-Systems, wie z.B. Instabilität des Konjugates für *in vivo* Experimente, aufweist und auch der natürliche Tropismus von Adenoviren erhalten bleibt und durch das konjugierte Peptid nur erweitert wird, bietet eine genetische Modifizierung die Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen. Mit diesem Ein-Komponenten-System wird zum einen der native Tropismus deletiert und durch einen neuen ersetzt, zum anderen die Stabilität des Vektors gewährleistet.

Deshalb wurde zur Integration identifizierter Peptidliganden in das Adenoviruskapsid, die in verschiedenen Untersuchungen in der Literatur beschrieben ist (Einfeld und Roelvink, 2002; Karnerva und Hemminki, 2004), eine Klonierungsstrategie entwickelt, die zunächst eine Deletion bzw. Mutation des natürlichen Tropismus vorsieht mit einer anschließenden Integration eines zielzellspezifischen Tropismus. Zur Mutation des α v-Integrin-Bindemotivs RGD wurde an dieselbe Stelle eine *Xba* I-Schnittstelle eingefügt, die das RGD-Motiv in ein LDD-Motiv konvertiert. Dieses Motiv konnte bisher mit keiner Integrinbindung in Verbindung gebracht werden (Ruoslahti, 1996; Koivunen et al., 2001). Neben einer weiteren Integrationsstelle im *'fiber knob'* kann auch diese Schnittstelle zur Integration von Peptiden dienen. Zur Inhibierung der natürlichen CAR-Bindung wurde zunächst eine Deletion der Aminosäuren 489-492 im *'fiber knob'* ausgewählt (Roelvink et al., 1999), da mit dieser Deletion zusätzlich z.B. Fusionen mit bispezifischen Antikörpern erfolgen können, weil der Fiber immer noch in der Lage ist, den Antikörper zu binden (van Beusechem et al., 2002). Dabei löst diese Deletion eine minimale Konformationsänderung im Fiberprotein aus, so dass dieses nicht mehr an CAR binden, aber immer noch trimerisieren kann. Die Integration gewebspezifischer Liganden soll hier über eine integrierte Schnittstelle im *'HI-loop'* erfolgen. Als erstes bleibt dabei zu klären, ob die ermittelten Peptidsequenzen in der Lage sind, ihre Konformation im Viruskontext beizubehalten und dem Fiber die Möglichkeit zur Trimerisierung geben. Xia et al. (2000) konnten 10 verschiedene Liganden, die selektiv für einen Transferrin-Rezeptor waren, in den *'HI-loop'* integrieren. Nur zwei dieser modifizierten Viren ließen sich generieren und amplifizieren. In anderen Fällen kam es aber zu keinerlei Schwierigkeiten bei der Integration spezifischer Liganden (Nicklin et al. 2001).

4.5 Ausblick und zukünftige Therapiemöglichkeiten

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten demonstrieren für die identifizierten Peptidliganden geeignete Bindungseigenschaften, die den jeweiligen Peptidliganden für das untersuchte MTC-System spezifisch machen. Aufgrund der Internalisierungseigenschaften und der Tumorspezifität *in vivo* konnte mit diesem Ansatz eine weitere Grundlage für einen MTC-gerichteten adenoviralen Gentransfer geschaffen werden. Die hier dargestellten Resultate bieten weitere zukünftige Perspektiven:

- 1) Die Transduktion von MTC-Xenotransplantaten durch adenovirale Vektoren, die dem Gentransfer von dominant-negativen *RET* Proto-Onkogen Mutanten dienen (Drosten et al., 2003), können durch eine zusätzliche Kapsidintegration des Liganden HTFEPGV verbessert werden. Diese Integration bietet zusätzlich die Möglichkeit, einen selektiven Gentransfer nach systemischer Applikation durchzuführen und kann eine Ergänzung zum C-Zell-selektiven Promotor (Messina et al., 2000) darstellen. Nach demselben Prinzip könnte auch die Tumortherapie im *RET*-transgenen Mausmodell erfolgen.
- 2) Die Peptidliganden könnten ferner an Anti-Tumorwirkstoffe wie z.B. Doxorubicin gekoppelt werden (Arap et al., 1998), um die systemische Administration dieses Wirkstoffes zu verbessern. Auch hier wäre eine Kombinationstherapie mit dem unter Punkt 1 beschriebenen AdVektor möglich.

5 Zusammenfassung

Adenoviren zeichnen sich durch ihre Eigenschaft aus, eine Vielzahl von Zellen effizient zu infizieren. Dabei hängt die Transduzierbarkeit vieler Zellen von der Expression des primären Rezeptors CAR ab. Tumorzellen weisen in vielen Fällen eine geringe Menge an CAR auf ihrer Zelloberfläche auf, was sie für die adenovirale Transduktion refraktär macht. Zur Umgehung dieses Nachteils wurden verschiedene Strategien ausgearbeitet. Die Identifizierung neuer tumorselektiver Liganden, die mit Adenoviren fusioniert werden können, um diesen einen neuen Tropismus zu verleihen, steht hierbei im Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit wurde das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) als Tumormodell verwendet. Aufgrund der starken Metastasierungseigenschaften und der Tatsache, dass im *in vivo* Xenotransplantat-Modell adenoviral vermittelte antitumorale Effekte zu keiner vollständigen Tumorregression führten, bietet sich dieses Modell für sogenannte '*targeting*'-Strategien an.

Zur Identifizierung neuer MTC-spezifischer Liganden wurden '*phage display*'-Techniken in unterschiedlichen MTC-Modellen etabliert. In humanen TT Zellen und in etablierten Tumoren konnte die Peptidsequenz HTFEPGV isoliert werden. Eine andere Peptidsequenz, SRESPHP, wurde in Primärtumoren anhand des *RET*-transgenen Mausmodells ermittelt. Beide Sequenzen zeigten eine hohe peptidbedingte Selektivität für das verwendete System und sind in der Lage, zusätzlich zu ihrer Tumorspezifität *in vivo* eine peptidabhängige Internalisierung in die Zielzellen zu vermitteln. Darüber hinaus konnte die Peptidsequenz HTFEPGV sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gefunden werden, was dafür spricht, dass der zu diesem Liganden korrespondierende Rezeptor auch in etablierten Tumoren vorhanden ist und somit HTFEPGV für eine gerichtete adenovirale Therapie *in vivo* geeignet ist. Erste Untersuchungen des Peptids HTFEPGV im adenoviralen Kontext weisen auf seine Funktionalität als neuer MTC-Ligand für den adenoviralen Gentransfer hin. Mit der Etablierung einer Klonierungsstrategie zur Herstellung genetisch modifizierter Adenoviren ist die Basis für eine vereinfachte Integration tumorspezifischer Peptidliganden geschaffen worden.

Die Identifizierung neuer MTC-Liganden stellt die Grundlage für die Konstruktion selektiver adenoviraler Vektoren dar. Ferner entsteht die Möglichkeit eine systemische Vektortherapie durchzuführen, die für dieses Tumormodell notwendig ist.

6 Literaturverzeichnis

- Alemaný R., Balague, C. und Curiel, D.T. (2000a)** Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*, **18**, 723-727.
- Alemaný, R., Suzuki, K. und Curiel, D.T. (2000b)** Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol*, **81**, 2605-2609.
- Alemaný, R. und Curiel, D.T. (2001)** CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther*, **8**, 1347-1353.
- Anders, M., Hansen, R., Ding, R.X., Rauen, K.A., Bissell, M.J. und Korn, W.M. (2003)** Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1943-1948.
- Arap, W., Pasqualini, R. und Ruoslahti, E. (1998)** Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, **279**, 377-380.
- Arap, W., Haedicke, W., Bernasconi, M., Kain, R., Rajotte, D., Krajewski, S., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., Pasqualini, R. und Ruoslahti, E. (2002a)** Targeting the prostate for destruction through a vascular address. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1527-1531.
- Arap, W., Kolonin, M.G., Trepel, M., Lahdenranta, J., Cardo-Vila, M., Giordano, R.J., Mintz, P.J., Ardelt, P.U., Yao, V.J., Vidal, C.I., Chen, L., Flamm, A., Valtanen, H., Weavind, L.M., Hicks, M.E., Pollock, R.E., Botz, G.H., Bucana, C.D., Koivunen, E., Cahill, D., Troncoso, P., Baggerly, K.A., Pentz, R.D., Do, K.A., Logothetis, C.J. und Pasqualini, R. (2002b)** Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med*, **8**, 121-127.
- Ardelt, P.U., Wood, C.G., Chen, L., Mintz, P.J., Moya, C., Arap, M.A., Wright, K.C., Pasqualini, R. und Arap, W. (2003)** Targeting urothelium: ex vivo assay standardization and selection of internalizing ligands. *J Urol*, **169**, 1535-1540.
- Armentano, D., Sookdeo, C.C., Hehir, K.M., Gregory, R.J., St George, J.A., Prince, G.A., Wadsworth, S.C. und Smith, A.E. (1995)** Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion. *Hum Gene Ther*, **6**, 1343-1353.
- Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H. und Wadell, G. (2000a)** Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol*, **74**, 42-48.
- Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Olfat, F. und Wadell, G. (2000b)** Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus alpha(v) integrins. *J Virol*, **74**, 7691-7693.
- Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Nilsson, J., Pring-Akerblom, P. und Wadell, G. (2002)** Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology*, **302**, 33-43.
- Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M. und Takahashi, M. (1995)** Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol*, **15**, 1613-1619.

- Bacich, D.J., Pinto, J.T., Tong, W.P. und Heston, W.D. (2001)** Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase. *Mamm Genome*, **12**, 117-123.
- Barker, S.D., Coolidge, C.J., Kanerva, A., Hakkarainen, T., Yamamoto, M., Liu, B., Rivera, A.A., Bhoola, S.M., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., Curiel, D.T. und Hemminki, A. (2003)** The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy. *J Gene Med*, **5**, 300-310.
- Barnett, B.G., Crews, C.J. und Douglas, J.T. (2002)** Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta*, **1575**, 1-14.
- Bauerschmitz, G.J., Barker, S.D. und Hemminki, A. (2002a)** Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review). *Int J Oncol*, **21**, 1161-1174.
- Bauerschmitz, G.J., Lam, J.T., Kanerva, A., Suzuki, K., Nettelbeck, D.M., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Mikheeva, G.V., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., Dall, P., Alemany, R., Curiel, D.T. und Hemminki, A. (2002b)** Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res*, **62**, 1266-1270.
- Bayley S.T. und Mymryk J.S. (1994)** Adenovirus E1A proteins and transformation: A review. *Int J. Oncol.* **5**, 425-444.
- Belousova, N., Krendelchtchikova, V., Curiel, D.T. und Krasnykh, V. (2002)** Modulation of adenovirus vector tropism via incorporation of polypeptide ligands into the fiber protein. *J Virol*, **76**, 8621-8631.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. und Finberg, R.W. (1997)** Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**, 1320-1323.
- Bilbao, G., Contreras, J.L., Dmitriev, I., Smyth, C.A., Jenkins, S., Eckhoff, D., Thomas, F., Thomas, J. und Curiel, D.T. (2002)** Genetically modified adenovirus vector containing an RGD peptide in the HI loop of the fiber knob improves gene transfer to nonhuman primate isolated pancreatic islets. *Am J Transplant*, **2**, 237-243.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. und McCormick, F. (1996)** An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.
- Bocciardi, R., Mograbi, B., Pasini, B., Borrello, M.G., Pierotti, M.A., Bourget, I., Fischer, S., Romeo, G. und Rossi, B. (1997)** The multiple endocrine neoplasia type 2B point mutation switches the specificity of the Ret tyrosine kinase towards cellular substrates that are susceptible to interact with Crk and Nck. *Oncogene*, **15**, 2257-2265.
- Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C. und Bordignon, C. (1997)** HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, **276**, 1719-1724.

- Bramson, J.L., Graham, F.L. und Gauldie, J. (1995)** The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr Opin Biotechnol*, **6**, 590-595.
- Brody, S.L. und Crystal, R.G. (1994)** Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci*, **716**, 90-101; discussion 101-103.
- Carson, S.D. und Chapman, N.M. (2001)** Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins. *Biochemistry*, **40**, 14324-14329.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. und Fischer, A. (2000)** Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **288**, 669-672.
- Chang, S.S., Reuter, V.E., Heston, W.D., Bander, N.H., Grauer, L.S. und Gaudin, P.B. (1999)** Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res*, **59**, 3192-3198.
- Chardonnet, Y. und Dales, S. (1970)** Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology*, **40**, 462-477.
- Check, E. (2002)** A tragic setback. *Nature*, **420**, 116-118.
- Chen, L., Anton, M. und Graham, F.L. (1996)** Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre. *Somat Cell Mol Genet*, **22**, 477-488.
- Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R. und Wilson, J. (1999)** Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*, **6**, 1574-1583.
- Chroboczek, J., Bieber, F. und Jacrot, B. (1992)** The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology*, **186**, 280-285.
- Coffin, J., Hughes, S.H., Varmus, H.E. und Miller, A.D. (2000)** eds Retroviruses. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview)
- Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T. und Bergelson, J.M. (2001)** The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15191-15196.
- Contreras, J.L., Wu, H., Smyth, C.A., Eckstein, C.P., Young, C.J., Seki, T., Bilbao, G., Curiel, D.T. und Eckhoff, D.E. (2003)** Double genetic modification of adenovirus fiber with RGD polylysine motifs significantly enhances gene transfer to isolated human pancreatic islets. *Transplantation*, **76**, 252-261.
- Cranston, A.N. und Ponder, B.A. (2003)** Modulation of medullary thyroid carcinoma penetrance suggests the presence of modifier genes in a RET transgenic mouse model. *Cancer Res*, **63**, 4777-4780.
- Croyle, M.A., Yu, Q.C. und Wilson, J.M. (2000)** Development of a rapid method for the PEGylation of adenoviruses with enhanced transduction and improved stability under harsh storage conditions. *Hum Gene Ther*, **11**, 1713-1722.

- Dai, Y., Schwarz, E.M., Gu, D., Zhang, W.W., Sarvetnick, N. und Verma, I.M. (1995)** Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1401-1405.
- Dechecchi, M.C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M. und Cabrini, G. (2001)** Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol*, **75**, 8772-8780.
- DeMatteo, R.P., Chu, G., Ahn, M., Chang, E., Burke, C., Raper, S.E., Barker, C.F. und Markmann, J.F. (1997)** Immunologic barriers to hepatic adenoviral gene therapy for transplantation. *Transplantation*, **63**, 315-319.
- Dmitriev, I., Kashentseva, E., Rogers, B.E., Krasnykh, V. und Curiel, D.T. (2000)** Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J Virol*, **74**, 6875-6884.
- Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C.R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N. und Curiel, D.T. (1998)** An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol*, **72**, 9706-9713.
- Doerfler, W., Stabel, S., Ibelgaufts, H., Sutter, D., Neumann, R., Deuring, R., Scheidtmann, K.H. und Winterhoff, U. (1980)** Viruses as tools for studies on the molecular biology of mammalian cells. *Arzneimittelforschung*, **30**, 558-569.
- Don, H.P., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S. (1991)** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4008.
- Douglas, J.T., Rogers, B.E., Rosenfeld, M.E., Michael, S.I., Feng, M. und Curiel, D.T. (1996)** Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol*, **14**, 1574-1578.
- Drapkin, P.T., O'Riordan, C.R., Yi, S.M., Chiorini, J.A., Cardella, J., Zabner, J. und Welsh, M.J. (2000)** Targeting the urokinase plasminogen activator receptor enhances gene transfer to human airway epithelia. *J Clin Invest*, **105**, 589-596.
- Drosten, M., Frilling, A., Stiewe, T. und Pützer, B.M. (2002)** A new therapeutic approach in medullary thyroid cancer treatment: inhibition of oncogenic RET signaling by adenoviral vector-mediated expression of a dominant-negative RET mutant. *Surgery*, **132**, 991-997; discussion 997.
- Drosten, M. und Pützer, B.M. (2003)** Gene therapeutic approaches for medullary thyroid carcinoma treatment. *J Mol Med*, **81**, 411-419.
- Drosten, M., Stiewe, T. und Pützer, B.M. (2003)** Antitumor capacity of a dominant-negative RET proto-oncogene mutant in a medullary thyroid carcinoma model. *Hum Gene Ther*, **14**, 971-982.

- Drosten, M., Hilken, G., Böckmann, M., Rödicker, F., Mise, N., Cranston, A.N., Dahmen, U., Ponder, B.A. und Pützer, B.M. (2004)** Role of MEN2A-derived RET in maintenance and proliferation of medullary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 1231-1239.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J. und Edelstein, R.M. (2004)** Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med*, **6**, 597-602.
- Ederly, P., Lyonnet, S., Mulligan, L.M., Pelet, A., Dow, E., Abel, L., Holder, S., Nihoul-Fekete, C., Ponder, B.A. und Munnich, A. (1994)** Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, **367**, 378-380.
- Einfeld, D.A., Schroeder, R., Roelvink, P.W., Lizonova, A., King, C.R., Kovetski, I. und Wickham, T.J. (2001)** Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol*, **75**, 11284-11291.
- Einfeld, D.A. und Roelvink, P.W. (2002)** Advances towards targetable adenovirus vectors for gene therapy. *Curr Opin Mol Ther*, **4**, 444-451.
- Eng, C. und Mulligan, L.M. (1997)** Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes, related sporadic tumours, and hirschsprung disease. *Hum Mutat*, **9**, 97-109.
- Eng, C. (1999)** RET proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol*, **17**, 380-393.
- Engelhardt, J.F., Ye, X., Doranz, B. und Wilson, J.M. (1994)** Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6196-6200.
- Essler, M. und Ruoslahti, E. (2002)** Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2252-2257.
- Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D. und Hoeben, R.C. (1998)** New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, **9**, 1909-1917.
- Fang, B., Eisensmith, R.C., Wang, H., Kay, M.A., Cross, R.E., Landen, C.N., Gordon, G., Bellinger, D.A., Read, M.S., Hu, P.C. und et al. (1995)** Gene therapy for hemophilia B: host immunosuppression prolongs the therapeutic effect of adenovirus-mediated factor IX expression. *Hum Gene Ther*, **6**, 1039-1044.
- Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R.G., van Veghel, R., Houtsmuller, A.B., Schultheiss, H.-P., Lamers, J.M.J. und Poller, W. (1999)** Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther*, **6**, 1520-1535.

- Fisher, K.J., Choi, H., Burda, J., Chen, S.J. und Wilson, J.M. (1996)** Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, **217**, 11-22.
- Gao, G.P., Yang, Y. und Wilson, J.M. (1996)** Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*, **70**, 8934-8943.
- Gimm, O. (2001)** Thyroid cancer. *Cancer Lett*, **163**, 143-156.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977)** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Graham, F.L. und Prevec, L. (1991)**. Manipulation of adenovirus vectors. *In Methods in Molecular Biology: Gen Transfer and Expression Protocols*. E.J. Murray ed. (The Humana Press, Inc., Clifton, N.J.)Vol. 7, 109-128
- Guerette, B., Vilquin, J.T., Gingras, M., Gravel, C., Wood, K.J. und Tremblay, J.P. (1996)** Prevention of immune reactions triggered by first-generation adenoviral vectors by monoclonal antibodies and CTLA4Ig. *Hum Gene Ther*, **7**, 1455-1463.
- Habib, N., Salama, H., Abd El Latif Abu Median, A., Isac Anis, I., Abd Al Aziz, R.A., Sarraf, C., Mitry, R., Havlik, R., Seth, P., Hartwigsen, J., Bhushan, R., Nicholls, J. und Jensen, S. (2002)** Clinical trial of E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther*, **9**, 254-259.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M. und Fischer, A. (2003)** A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, **348**, 255-256.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000)** The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hansford, J.R. und Mulligan, L.M. (2000)** Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet*, **37**, 817-827.
- Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. und Phipps, M.L. (1997)** Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol*, **71**, 1842-1849.
- Havenga, M.J., Lemckert, A.A., Ophorst, O.J., van Meijer, M., Germeraad, W.T., Grimbergen, J., van Den Doel, M.A., Vogels, R., van Deutekom, J., Janson, A.A., de Bruijn, J.D., Uytdehaag, F., Quax, P.H., Logtenberg, T., Mehtali, M. und Bout, A. (2002)** Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol*, **76**, 4612-4620.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1998)** A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2509-2514.
- Hemminki, A., Dmitriev, I., Liu, B., Desmond, R.A., Alemany, R. und Curiel, D.T. (2001)** Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule. *Cancer Res*, **61**, 6377-6381.

- Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P.L., Bergelson, J.M., Hackett, N.R., Finberg, R.W., Wickham, T.J., Kovesdi, I., Roelvink, P. und Crystal, R.G. (1999)** CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest*, **103**, 579-587.
- Hitt, M.M., Bett, A.J., Prevec, L. und Graham, F.L. (1994).** Construction and propagation of human adenovirus vectors. In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. J.E. Celis, ed. (Academic Press, San Diego) 479-490
- Hitt M., Bett A.J., Addison C.L., et al. (1995)** Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Methods Mol Genet*; **7**, 13-30
- Hohlweg, U., Hosel, M., Dorn, A., Webb, D., Hilger-Eversheim, K., Remus, R., Schmitz, B., Buettner, R., Schramme, A., Corzilius, L., Niemann, A. und Doerfler, W. (2003)** Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res*, **98**, 45-56.
- Hohlweg, U., Dorn, A., Hosel, M., Webb, D., Buettner, R. und Doerfler, W. (2004)** Tumorigenesis by adenovirus type 12 in newborn Syrian hamsters. *Curr Top Microbiol Immunol*, **273**, 215-244.
- Hong, S.S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D.T. und Boulanger, P.A. (1997)** Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J*, **16**, 2294-2306.
- Horwitz, M.S. (1990)** Adenoviridae and their replication. In *Fundamental Virology* (B. Fields et al., Eds.), pp. 1679-1721- Raven Press Ltd. , New York. (771-813)
- Huang, S., Kamata, T., Takada, Y., Ruggeri, Z.M. und Nemerow, G.R. (1996)** Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol*, **70**, 4502-4508.
- Huard, J., Lochmuller, H., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B. und Karpati, G. (1995)** The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther*, **2**, 107-115.
- Hynes, R.O. (1992)** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.
- Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K.J. und Wilson, J.M. (1998)** Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol*, **72**, 4212-4223.
- Kaiser, J. (2003)** Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science*, **299**, 495.
- Kanerva, A., Mikheeva, G.V., Krasnykh, V., Coolidge, C.J., Lam, J.T., Mahasreshti, P.J., Barker, S.D., Straughn, M., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., Hemminki, A. und Curiel, D.T. (2002)** Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, **8**, 275-280.

- Kanerva, A., Bauerschmitz, G.J., Yamamoto, M., Lam, J.T., Alvarez, R.D., Siegal, G.P., Curiel, D.T. und Hemminki, A. (2004)** A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma. *Gene Ther*, **11**, 552-559.
- Kanerva, A. und Hemminki, A. (2004)** Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer*, **110**, 475-480.
- Kaplan, J.M. und Smith, A.E. (1997)** Transient immunosuppression with deoxyspergualin improves longevity of transgene expression and ability to readminister adenoviral vector to the mouse lung. *Hum Gene Ther*, **8**, 1095-1104.
- Kashentseva, E.A., Seki, T., Curiel, D.T. und Dmitriev, I.P. (2002)** Adenovirus targeting to c-erbB-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain. *Cancer Res*, **62**, 609-616.
- Kay, M.A., Holterman, A.X., Meuse, L., Gown, A., Ochs, H.D., Linsley, P.S. und Wilson, C.B. (1995)** Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4lg administration. *Nat Genet*, **11**, 191-197.
- Kay, M.A., Glorioso, J.C. und Naldini, L. (2001)** Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, **7**, 33-40.
- Khuri, F.R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I.F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R.H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A.M., Bruso, P., Kaye, S.B., Hong, W.K. und Kirn, D.H. (2000)** a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med*, **6**, 879-885.
- Kim, J., Smith, T., Idamakanti, N., Mulgrew, K., Kaloss, M., Kylefjord, H., Ryan, P.C., Kaleko, M. und Stevenson, S.C. (2002)** Targeting adenoviral vectors by using the extracellular domain of the coxsackie-adenovirus receptor: improved potency via trimerization. *J Virol*, **76**, 1892-1903.
- Kirby, I., Davison, E., Beavil, A.J., Soh, C.P., Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Kovesdi, I., Sutton, B.J. und Santis, G. (1999)** Mutations in the DG loop of adenovirus type 5 fiber knob protein abolish high-affinity binding to its cellular receptor CAR. *J Virol*, **73**, 9508-9514.
- Kirn D. (2002)** Replication-selective oncolytic adenovirus E1-region mutants: virotherapy for cancer. In *Adenoviral Vectors for Gene therapy*, Curiel D.T., Douglas J.T. (eds) (Academic Press: San Diego), 329-48.
- Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.H., Chan, S. und Caskey, C.T. (1996)** A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5731-5736.
- Koivunen, E., Gay, D.A. und Ruoslahti, E. (1993)** Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. *J Biol Chem*, **268**, 20205-20210.

- Koivunen, E., Ranta, T.M., Annala, A., Taube, S., Uppala, A., Jokinen, M., van Willigen, G., Ihanus, E. und Gahmberg, C.G. (2001)** Inhibition of beta(2) integrin-mediated leukocyte cell adhesion by leucine-leucine-glycine motif-containing peptides. *J Cell Biol*, **153**, 905-916.
- Koizumi, N., Mizuguchi, H., Utoguchi, N., Watanabe, Y. und Hayakawa, T. (2003)** Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med*, **5**, 267-276.
- Korn, T., Nettelbeck, D.M., Volkel, T., Muller, R. und Kontermann, R.E. (2004)** Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J Gene Med*, **6**, 642-651.
- Krasnykh, V.N., Mikheeva, G.V., Douglas, J.T. und Curiel, D.T. (1996)** Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol*, **70**, 6839-6846.
- Krasnykh, V., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Miller, C.R., Belousova, N. und Curiel, D.T. (1998)** Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol*, **72**, 1844-1852.
- Krasnykh, V., Belousova, N., Korokhov, N., Mikheeva, G. und Curiel, D.T. (2001)** Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. *J Virol*, **75**, 4176-4183.
- Kuball, J., Wen, S.F., Leissner, J., Atkins, D., Meinhardt, P., Quijano, E., Engler, H., Hutchins, B., Maneval, D.C., Grace, M.J., Fritz, M.A., Storkel, S., Thuroff, J.W., Huber, C. und Schuler, M. (2002)** Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. *J Clin Oncol*, **20**, 957-965.
- Kumar-Singh, R. und Farber, D.B. (1998)** Encapsidated adenovirus mini-chromosome-mediated delivery of genes to the retina: application to the rescue of photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet*, **7**, 1893-1900.
- Kuriyama, S., Tominaga, K., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yamazaki, M., Nagao, S., Toyokawa, Y., Okamoto, S. und Fukui, H. (2000)** Immunomodulation with FK506 around the time of intravenous re-administration of an adenoviral vector facilitates gene transfer into primed rat liver. *Int J Cancer*, **85**, 839-844.
- Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J.A. und Ruoslahti, E. (2002)** A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med*, **8**, 751-755.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamfers, M.L., Grill, J., Dirven, C.M., Van Beusechem, V.W., Geogerger, B., Van Den Berg, J., Alemany, R., Fueyo, J., Curiel, D.T., Vassal, G., Pinedo, H.M., Vandertop, W.P. und Gerritsen, W.R. (2002)** Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy. *Cancer Res*, **62**, 5736-5742.

- Lanciotti, J., Song, A., Doukas, J., Sosnowski, B., Pierce, G., Gregory, R., Wadsworth, S. und O'Riordan, C. (2003)** Targeting adenoviral vectors using heterofunctional polyethylene glycol FGF2 conjugates. *Mol Ther*, **8**, 99-107.
- Landon, L.A. und Deutscher, S.L. (2003)** Combinatorial discovery of tumor targeting peptides using phage display. *J Cell Biochem*, **90**, 509-517.
- Leissner, P., Legrand, V., Schlesinger, Y., Hadji, D.A., van Raaij, M., Cusack, S., Pavirani, A. und Mehtali, M. (2001)** Influence of adenoviral fiber mutations on viral encapsidation, infectivity and in vivo tropism. *Gene Ther*, **8**, 49-57.
- Leone, S.S., Horoszewicz, J.S., Shimaoka, K., Friedman, M., Kawinski, E., Song, M.J., Zeigel, R., Chu, T.M., Baylin, S. und Mirand, E.A. (1981)** A new cell line for study of human medullary thyroid carcinoma. In *Advances in thyroid neoplasia*. Andreoli, M., Monaco, F., Robbins, J., eds Rome:Field Educational Italia, 95-108.
- Liu, T.C., Hallden, G., Wang, Y., Brooks, G., Francis, J., Lemoine, N. und Kirn, D. (2004)** An E1B-19 kDa gene deletion mutant adenovirus demonstrates tumor necrosis factor-enhanced cancer selectivity and enhanced oncolytic potency. *Mol Ther*, **9**, 786-803.
- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A. und Mehtali, M. (1998)** In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol*, **72**, 2022-2032.
- Mack, C.A., Song, W.R., Carpenter, H., Wickham, T.J., Kovesdi, I., Harvey, B.G., Magovern, C.J., Isom, O.W., Rosengart, T., Falck-Pedersen, E., Hackett, N.R., Crystal, R.G. und Mastrangeli, A. (1997)** Circumvention of anti-adenovirus neutralizing immunity by administration of an adenoviral vector of an alternate serotype. *Hum Gene Ther*, **8**, 99-109.
- Magnusson, M.K., Hong, S.S., Boulanger, P. und Lindholm, L. (2001)** Genetic retargeting of adenovirus: novel strategy employing "deknobbing" of the fiber. *J Virol*, **75**, 7280-7289.
- Mastrangeli, A., Harvey, B.G., Yao, J., Wolff, G., Kovesdi, I., Crystal, R.G. und Falck-Pedersen, E. (1996)** "Sero-switch" adenovirus-mediated in vivo gene transfer: circumvention of anti-adenovirus humoral immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype. *Hum Gene Ther*, **7**, 79-87.
- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M. und Nemerow, G. (1994)** Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol*, **68**, 6811-6814.
- Mathias, P., Galleno, M. und Nemerow, G.R. (1998)** Interactions of soluble recombinant integrin alphav beta5 with human adenoviruses. *J Virol*, **72**, 8669-8675.
- Meier, O. und Greber, U.F. (2003)** Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*, **5**, 451-462.
- Messina, M., Yu, D.M.T., Learoyd, D.L., Both, G.W., Molloy, P.L. und Robinson, B.G. (2000)** High level, tissue-specific expression of a modified calcitonin/calcitonin gene-related peptide promoter in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* **164**, 219-224.

- Michael, S.I., Hong, J.S., Curiel, D.T. und Engler, J.A. (1995)** Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther*, **2**, 660-668.
- Miller, C.R., Buchsbaum, D.J., Reynolds, P.N., Douglas, J.T., Gillespie, G.Y., Mayo, M.S., Raben, D. und Curiel, D.T. (1998)** Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res*, **58**, 5738-5748.
- Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Kay, M.A. und Hayakawa, T. (2001)** A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther*, **8**, 730-735.
- Mizuguchi, H., Koizumi, N., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N., Watanabe, Y. und Hayakawa, T. (2002)** CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther*, **9**, 769-776.
- Morral, N., Parks, R.J., Zhou, H., Langston, C., Schiedner, G., Quinones, J., Graham, F.L., Kochanek, S. und Beaudet, A.L. (1998)** High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of alpha1-antitrypsin with negligible toxicity. *Hum Gene Ther*, **9**, 2709-2716.
- Morsy, M.A., Gu, M., Motzel, S., Zhao, J., Lin, J., Su, Q., Allen, H., Franlin, L., Parks, R.J., Graham, F.L., Kochanek, S., Bett, A.J. und Caskey, C.T. (1998)** An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7866-7871.
- Muller, O.J., Kaul, F., Weitzman, M.D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A. und Trepel, M. (2003)** Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol*, **21**, 1040-1046.
- Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K. und Papi, L. (1993)** Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, **363**, 458-460.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1992)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Nakamura, T., Sato, K. und Hamada, H. (2003)** Reduction of natural adenovirus tropism to the liver by both ablation of fiber-coxsackievirus and adenovirus receptor interaction and use of replaceable short fiber. *J Virol*, **77**, 2512-2521.
- Nemerow, G.R. und Stewart, P.L. (1999)** Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 725-734.

- Nettelbeck, D.M., Rivera, A.A., Kupsch, J., Dieckmann, D., Douglas, J.T., Kontermann, R.E., Alemany, R. und Curiel, D.T. (2004)** Retargeting of adenoviral infection to melanoma: combining genetic ablation of native tropism with a recombinant bispecific single-chain diabody (scDb) adapter that binds to fiber knob and HMWMAA. *Int J Cancer*, **108**, 136-145.
- Nicklin, S.A., White, S.J., Watkins, S.J., Hawkins, R.E. und Baker, A.H. (2000)** Selective targeting of gene transfer to vascular endothelial cells by use of peptides isolated by phage display. *Circulation*, **102**, 231-237.
- Nicklin, S.A., Von Seggern, D.J., Work, L.M., Pek, D.C., Dominiczak, A.F., Nemerow, G.R. und Baker, A.H. (2001)** Ablating adenovirus type 5 fiber-CAR binding and HI loop insertion of the SIGYPLP peptide generate an endothelial cell-selective adenovirus. *Mol Ther*, **4**, 534-542.
- Nicklin, S.A., White, S.J., Nicol, C.G., Von Seggern, D.J. und Baker, A.H. (2004)** In vitro and in vivo characterisation of endothelial cell selective adenoviral vectors. *J Gene Med*, **6**, 300-308.
- O'Riordan, C.R., Lachapelle, A., Delgado, C., Parkes, V., Wadsworth, S.C., Smith, A.E. und Francis, G.E. (1999)** PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*, **10**, 1349-1358.
- Orlandi, F., Caraci, P., Mussa, A., Saggiorato, E., Pancani, G. und Angeli, A. (2001)** Treatment of medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr Relat Cancer*, **8**, 135-147.
- Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A. und Graham, F.L. (1996)** A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13565-13570.
- Pasqualini, R., Koivunen, E. und Ruoslahti, E. (1995)** A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol*, **130**, 1189-1196.
- Pasqualini, R. und Ruoslahti, E. (1996)** Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, **380**, 364-366.
- Pasqualini, R., Koivunen, E. und Ruoslahti, E. (1997)** Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol*, **15**, 542-546.
- Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R.A., Shapiro, L.H., Arap, W. und Ruoslahti, E. (2000)** Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*, **60**, 722-727.
- Pasqualini, R., McDonald, D.M. und Arap, W. (2001)** Vascular targeting and antigen presentation. *Nat Immunol*, **2**, 567-568.
- Patterson, S. und Russell, W.C. (1983)** Ultrastructural and immunofluorescence studies of early events in adenovirus-HeLa cell interactions. *J Gen Virol*, **64**, 1091-1099.

- Pereboev, A., Pereboeva, L. und Curiel, D.T. (2001)** Phage display of adenovirus type 5 fiber knob as a tool for specific ligand selection and validation. *J Virol*, **75**, 7107-7113.
- Poller, W., Schneider-Rasp, S., Liebert, U., Merklein, F., Thalheimer, P., Haack, A., Schwaab, R., Schmitt, C. und Brackmann, H.H. (1996)** Stabilization of transgene expression by incorporation of E3 region genes into an adenoviral factor IX vector and by transient anti-CD4 treatment of the host. *Gene Ther*, **3**, 521-530.
- Pützer, B.M., Stiewe, T., Crespo, F. und Esche, H. (2000)** Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther*, **7**, 1317-1325.
- Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M., Koivunen, E., Pasqualini, R. und Ruoslahti, E. (1998)** Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest*, **102**, 430-437.
- Rajotte, D. und Ruoslahti, E. (1999)** Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. *J Biol Chem*, **274**, 11593-11598.
- Rancourt, C., Rogers, B.E., Sosnowski, B.A., Wang, M., Piche, A., Pierce, G.F., Alvarez, R.D., Siegal, G.P., Douglas, J.T. und Curiel, D.T. (1998)** Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, **4**, 2455-2461.
- Rasmussen, U.B., Schreiber, V., Schultz, H., Mischler, F. und Schughart, K. (2002)** Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. *Cancer Gene Ther*, **9**, 606-612.
- Rein, D.T., Breidenbach, M., Wu, H., Han, T., Haviv, Y.S., Wang, M., Kirby, T.O., Kawakami, Y., Dall, P., Alvarez, R.D. und Curiel, D.T. (2004)** Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int J Cancer*, **111**, 698-704.
- Reynolds, P.N., Zinn, K.R., Gavrilyuk, V.D., Balyasnikova, I.V., Rogers, B.E., Buchsbaum, D.J., Wang, M.H., Miletich, D.J., Grizzle, W.E., Douglas, J.T., Danilov, S.M. und Curiel, D.T. (2000)** A targetable, injectable adenoviral vector for selective gene delivery to pulmonary endothelium in vivo. *Mol Ther*, **2**, 562-578.
- Reynolds, L., Jones, K., Winton, D.J., Cranston, A., Houghton, C., Howard, L., Ponder, B.A. und Smith, D.P. (2001)** C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene*, **20**, 3986-3994.
- Roberts, R.J., O'Neill, K.E. und Yen, C.T. (1984)** DNA sequences from the adenovirus 2 genome. *J Biol Chem*, **259**, 13968-13975.
- Rodi, D.J. und Makowski, L. (1999)** Phage-display technology-finding a needle in a vat molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 87-93.

- Roelvink, P.W., Kovesdi, I. und Wickham, T.J. (1996)** Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment. *J Virol*, **70**, 7614-7621.
- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I. und Wickham, T.J. (1998)** The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*, **72**, 7909-7915.
- Roelvink, P.W., Mi Lee, G., Einfeld, D.A., Kovesdi, I. und Wickham, T.J. (1999)** Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science*, **286**, 1568-1571.
- Romanczuk, H., Galer, C.E., Zabner, J., Barsomian, G., Wadsworth, S.C. und O'Riordan, C.R. (1999)** Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum Gene Ther*, **10**, 2615-2626.
- Roy-Chowdhury, J. und Horwitz, M.S. (2002)** Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. *Mol Ther*, **5**, 340-344.
- Ruoslahti, E. (1996)** RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 697-715.
- Ruoslahti, E. (2000)** Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol*, **10**, 435-442.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)**. Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Santoro, M., Carlomagno, F., Romano, A., Bottaro, D.P., Dathan, N.A., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B. und Kraus, M.H. (1995)** Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*, **267**, 381-383.
- Sawchuk, S.J., Boivin, G.P., Duwel, L.E., Ball, W., Bove, K., Trapnell, B. und Hirsch, R. (1996)** Anti-T cell receptor monoclonal antibody prolongs transgene expression following adenovirus-mediated in vivo gene transfer to mouse synovium. *Hum Gene Ther*, **7**, 499-506.
- Schiedner, G., Morral, N., Parks, R.J., Wu, Y., Koopmans, S.C., Langston, C., Graham, F.L., Beaudet, A.L. und Kochanek, S. (1998)** Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*, **18**, 180-183.
- Schiedner, G., Hertel, S. und Kochanek, S. (2000)** Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther*, **11**, 2105-2116.
- Scott, J.K. und Smith, G.P. (1990)** Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, **249**, 386-390.

- Shayakhmetov, D.M., Li, Z.Y., Ni, S. und Lieber, A. (2002)** Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. *Cancer Res*, **62**, 1063-1068.
- Shenk T. (1996)** Adenoviridae: The viruses and their replication. In 'Fields' Virology" (B.N. Fields, D.M. Knipe, und P.M. Howöey, eds) 3rd Ed.,. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 2111-2171
- Smith, G.P. und Scott, J.K. (1993)** Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol*, **217**, 228-257.
- Smith, T.A., White, B.D., Gardner, J.M., Kaleko, M. und McClelland, A. (1996)** Transient immunosuppression permits successful repetitive intravenous administration of an adenovirus vector. *Gene Ther*, **3**, 496-502.
- Smith, T., Idamakanti, N., Kylefjord, H., Rollence, M., King, L., Kaloss, M., Kaleko, M. und Stevenson, S.C. (2002)** In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Mol Ther*, **5**, 770-779.
- Smith, T.A., Idamakanti, N., Marshall-Neff, J., Rollence, M.L., Wright, P., Kaloss, M., King, L., Mech, C., Dinges, L., Iverson, W.O., Sherer, A.D., Markovits, J.E., Lyons, R.M., Kaleko, M. und Stevenson, S.C. (2003a)** Receptor interactions involved in adenoviral-mediated gene delivery after systemic administration in non-human primates. *Hum Gene Ther*, **14**, 1595-1604.
- Smith, T.A., Idamakanti, N., Rollence, M.L., Marshall-Neff, J., Kim, J., Mulgrew, K., Nemerow, G.R., Kaleko, M. und Stevenson, S.C. (2003b)** Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther*, **14**, 777-787.
- Somia, N. und Verma, I.M. (2000)** Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*, **1**, 91-99.
- Stewart, P.L., Burnett, R.M., Cyrklaff, M. und Fuller, S.D. (1991)** Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*, **67**, 145-154.
- Stewart, P.L., Chiu, C.Y., Huang, S., Muir, T., Zhao, Y., Chait, B., Mathias, P. und Nemerow, G.R. (1997)** Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *Embo J*, **16**, 1189-1198.
- Svensson, U. (1985)** Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells. *J Virol*, **55**, 442-449.
- Tollefson, A.E., Hermiston, T.W., Lichtenstein, D.L., Colle, C.F., Tripp, R.A., Dimitrov, T., Toth, K., Wells, C.E. Doherty, P.C. und Wold, W.S: (1998)** Forced degradation of FAS inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature*, **16**, 726-730.
- Thomas, C.E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M.G. und Lowenstein, P.R. (2000)** Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7482-7487.

- Tomko, R.P., Xu, R. und Philipson, L. (1997)** HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3352-3356.
- Trepel, M., Grifman, M., Weitzman, M.D. und Pasqualini, R. (2000)** Molecular adaptors for vascular-targeted adenoviral gene delivery. *Hum Gene Ther*, **11**, 1971-1981.
- Umana, P., Gerdes, C.A., Stone, D., Davis, J.R., Ward, D., Castro, M.G. und Lowenstein, P.R. (2001)** Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol*, **19**, 582-585.
- van Beusechem, V.W., Grill, J., Mastenbroek, D.C., Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Haisma, H.J., Lamfers, M.L., Dirven, C.M., Pinedo, H.M. und Gerritsen, W.R. (2002)** Efficient and selective gene transfer into primary human brain tumors by using single-chain antibody-targeted adenoviral vectors with native tropism abolished. *J Virol*, **76**, 2753-2762.
- Verma, I.M. und Somia, N. (1997)** Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*, **389**, 239-242.
- Vigne, E., Dedieu, J.F., Brie, A., Gillaudeau, A., Briot, D., Benihoud, K., Latta-Mahieu, M., Saulnier, P., Perricaudet, M. und Yeh, P. (2003)** Genetic manipulations of adenovirus type 5 fiber resulting in liver tropism attenuation. *Gene Ther*, **10**, 153-162.
- Vitale, G., Caraglia, M., Ciccarelli, A., Lupoli, G., Abbruzzese, A. und Tagliaferri, P. (2001)** Current approaches and perspectives in the therapy of medullary thyroid carcinoma. *Cancer*, **91**, 1797-1808.
- Vorburger, S.A. und Hunt, K.K. (2002)** Adenoviral gene therapy. *Oncologist*, **7**, 46-59.
- Walters, R.W., Grunst, T., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Welsh, M.J. und Zabner, J. (1999)** Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem*, **274**, 10219-10226.
- Wang, Q., Greenburg, G., Bunch, D., Farson, D. und Finer, M.H. (1997)** Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther*, **4**, 393-400.
- White, S.J., Nicklin, S.A., Sawamura, T. und Baker, A.H. (2001)** Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension*, **37**, 449-455.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresh, D.A. und Nemerow, G.R. (1993)** Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**, 309-319.
- Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Brough, D.E. und Kovesdi, I. (1996)** Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat Biotechnol*, **14**, 1570-1573.

- Wickham, T.J., Tzeng, E., Shears, L.L., 2nd, Roelvink, P.W., Li, Y., Lee, G.M., Brough, D.E., Lizonova, A. und Kovesdi, I. (1997)** Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol*, **71**, 8221-8229.
- Wold, W.S., Tollefson, A.E. und Hermiston, T.W. (1995)** E3 transcription unit of adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, **199** (Pt 1), 237-274.
- Wolff, G., Worgall, S., van Rooijen, N., Song, W.R., Harvey, B.G. und Crystal, R.G. (1997)** Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ. *J Virol*, **71**, 624-629.
- Worgall, S., Busch, A., Rivara, M., Bonnyay, D., Leopold, P.L., Merritt, R., Hackett, N.R., Rovelink, P.W., Bruder, J.T., Wickham, T.J., Kovesdi, I. und Crystal, R.G. (2004)** Modification to the capsid of the adenovirus vector that enhances dendritic cell infection and transgene-specific cellular immune responses. *J Virol*, **78**, 2572-2580.
- Xia, H., Anderson, B., Qinwen, M. und Davidson, B.L. (2000)** Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain micropillary endothelium, *J Virol*, **74**, 11359-11366.
- Yamamoto, M., Alemany, R., Adachi, Y., Grizzle, W.E. und Curiel, D.T. (2001)** Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol Ther*, **3**, 385-394.
- Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E. und Wilson, J.M. (1994)** Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4407-4411.
- Yang, Y., Li, Q., Ertl, H.C. und Wilson, J.M. (1995)** Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol*, **69**, 2004-2015.

Danksagungen

Ich danke an erster Stelle Frau Prof. Dr. Dr. B. Pützer für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für ihr Interesse an dieser Arbeit, ihre stets sachliche Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit eigene Ideen in dieses Projekt mit einfließen zu lassen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Esche für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen durchzuführen.

Mein Dank gilt ebenfalls allen ehemaligen und jetzigen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pützer, Dr. Matthias Drosten, Dr. Zhenpeng Li, Nikica Mise, Annett Niemetz, Tomas Racek, Dr. Florian Rödicker, Dr. Anke Schmidt, Dr. Jens Stanelle, Dr. Thorsten Stiewe, Hoang Tu-Rapp und Sebastian Tuve. Für die Unterstützung bei vielen alltäglichen Arbeiten und die gute Laune im Labor möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen technischen Assistentinnen Ulrike Brauer, Gabi Hessler, Bärbel Pollmeier, Anja Stoll, Carmen Theseling und Sonja Zimmermann bedanken.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie danke ich Herrn Peter Babioch. Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Gero Hilken für die Unterstützung bei der Durchführung tierexperimenteller Arbeiten.

Weiterhin danke ich Silvia Davies und Grit Haberer für alle administrativen Dinge während der Promotion sowie den Mitarbeitern der AG III des Instituts für Zellbiologie für die gute Zusammenarbeit.

Besonders danke ich Gisela Bukow, Yvonne Wiencek und Dr. Jens Stanelle für ihre stete Diskussionsbereitschaft und kritischen Anmerkungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre andauernde Hilfsbereitschaft herzlich bedanken. Nicht zuletzt gilt mein Dank meinem Freund Jean-Bernard Bukow für seine Unterstützung.

Publikationen

Pützer BM, **Böckmann M**, Stiewe T und Esche H (2002). Tumor targeting. Editor(s): Sauerwein W, Moss R, Wittig A: Research and development in neutron capture therapy; *Int Proc Div Oncol*. pp 831-840.

Drosten M, Hilken G, **Böckmann M**, Rödicker F, Mise N, Cranston AN, Dahmen U, Ponder BA und Pützer BM (2004). Role of MEN2A-derived RET in maintenance and proliferation of medullary thyroid carcinoma. *J Nat Cancer Inst*. **96**:1231-1239.

Böckmann M, Drosten M und Pützer BM (2004). Discovery of targeting peptides for selective therapy of medullary thyroid carcinoma. *J Gene Med.*: In press.

Schmidt A, **Böckmann M**, Racek T und Pützer BM (2004). Analysis of adenoviral vector infection in adult neural stem cells. Submitted in *Exp. Neurology*.

Publizierte 'abstracts':

Böckmann M und Pützer (2003). Update on adenoviruses and retargeting. *J Gene Med* **5**(3): 15.

Böckmann M, Drosten M und Pützer BM (2004). Discovery of targeting peptides for selective therapy of medullary thyroid carcinoma. *Mol Ther*. **9**: 236, 622 Suppl. 1.

Drosten M, Hilken G, Rödicker F, **Böckmann M**, Mise N, Cranston AN, Frilling A, Ponder BA und Pützer BM (2004). Loss of neoplastic phenotype by specific inhibition of RET oncogene signalling in a transgenic model of primary medullary thyroid carcinoma. *Mol Ther*. **9**: 361, 943 Suppl. 1.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Miriam Böckmann
 Geburtsdatum: 30.03.1976
 Geburtsort: Bochum
 Familienstand: ledig
 Wohnsitz: Oberstr. 14
 44892 Bochum

Schulbildung

1982-1986 Maischützengrundschule in Bochum
 1986-1995 Hildegardis-Gymnasium in Bochum
 1995 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10.1995-10.2000 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
 10.2000 Abschluss des Studiums: Diplom
 Thema der Diplomarbeit: "Struktur- und Funktionsanalysen eines Mitglieds der Kern-Genfamilie für plastidäre Sigma-Transkriptionsfaktoren"
 seit 04.2001 Dissertation am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen

Berufliche Tätigkeit

07.1999-010.2000 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Zellphysiologie und Molekularbiologie
 11.2000-03.2001 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Zellphysiologie und Molekularbiologie
 04.2001-03.2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen
 04.2004-09.2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Vektorologie und Experimentelle Gentherapie des Universitätsklinikums Rostock

Essen, den 06.10.2004

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gem. § 6, Abs. 2, Nr.7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Liganden des medullären Schilddrüsenkarzinoms zur Entwicklung tumorselektiver Adenoviren" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Miriam Böckmann befürworte.

Essen, den 06.10.04

Prof. Dr. Dr. B. Pützer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 06.10.04

Miriam Böckmann

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 06.10.04

Miriam Böckmann