



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Transfer von antitumoralen Effektoren mittels viraler Vektoren zur experimentellen Tumorthherapie

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der
Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Christine Wrede
geb. in Darmstadt

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Krebs und seine Entstehung	1
1.2 Möglichkeiten der antitumoralen Gentherapie	3
1.2.1 Apoptoseinduktion durch VPR.....	4
1.3 Regulation der Genexpression durch RNA-Interferenz	5
1.3.1 EGFR als Zielstruktur zur Tumorthherapie.....	11
1.3.2 PLK1 als Zielstruktur zur Tumorthherapie	14
1.3.3 STAT3 als Zielstruktur zur Tumorthherapie.....	16
1.4 Viraler Gentransfer zur Tumorthherapie	18
1.4.1 Murine Leukämieviren (MLV) als Transfervehikel.....	19
1.4.2 Retrovirale Vektoren	23
1.4.3 Replikationskompetente Retroviren als Vehikel	24
2. Zielsetzung.....	27
3. Material und Methoden	28
3.1 Materialien.....	28
3.1.1 Chemikalien.....	28
3.1.2 Puffer, Lösungen und Medien	30
3.1.2.1 Zellkultur	30
3.1.2.2 Molekularbiologie	31
3.1.2.3 Proteinbiochemie.....	33
3.1.2.4 Tierexperimente.....	34
3.1.3 Verbrauchsmaterial.....	34
3.1.4 Enzyme, Standards und Kits.....	35
3.1.5 Geräte und Apparaturen.....	36
3.1.6 Software.....	38
3.1.7 Bakterienstämme	39
3.1.8 Oligonukleotide	39
3.1.9 Plasmide	39
3.1.10 Antikörper.....	42
3.1.11 Zellen	43
3.2 Zellbiologische Methoden	44
3.2.1 Kultivierung von Zellen	44
3.2.2 Kultivierung von Zellen in Soft-Agar	44

3.2.3	Zellzahlbestimmung	45
3.2.3.1	Zellzahlbestimmung mit Hilfe des <i>Coulter Counters</i>	45
3.2.3.2	Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Fuchs Rosenthal-Zählkammer ...	45
3.2.4	Transfektion.....	45
3.2.4.1	Transfektion mit FuGENE®	45
3.2.4.2	Transfektion mit Polyethylenimin.....	46
3.2.5	Kryokonservierung	46
3.2.6	Test auf Mycoplasmen.....	46
3.2.7	Retrovirale Methoden	47
3.2.7.1	Virusproduktion.....	47
3.2.7.2	Vektorproduktion	47
3.2.7.3	Anreicherung von Viren und Vektoren	47
3.2.7.4	Transduktion und Infektion	48
3.2.7.5	Virus-Quantifikation durch Immunoperoxidase-Assay.....	48
3.2.8	Durchflusszytometrie.....	49
3.2.8.1	Zellzyklusanalysen	50
3.2.8.2	Färben von Zellen.....	51
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	52
3.3.1	Agarose Gelelektrophorese.....	52
3.3.2	DNA Isolierung aus Agarose.....	52
3.3.3	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen	53
3.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	53
3.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
3.3.6	Ligation von DNA	54
3.3.7	Herstellung kompetenter Bakterienstämme.....	54
3.3.8	Transformation in kompetente Bakterien	54
3.3.9	Plasmid-Präparation aus Bakterien.....	55
3.3.10	Restriktionsverdau von DNA	55
3.3.11	Auffüllen und Entfernen von überhängenden DNA-Einzelstrangenden....	56
3.3.12	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden.....	56
3.3.13	Sequenzierung von DNA.....	56
3.4	Proteinbiochemische Methoden	56
3.4.1	Isolierung von Proteinen aus Zellen	56
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	57
3.4.3	Western-Blot-Analyse	57

3.4.4	Immundetektion.....	58
3.4.5	Strippen von Membranen	58
3.5	Tierexperimentelle Methoden.....	59
3.5.1	Verwendete Tiere	59
3.5.2	Applikationstechniken	59
3.5.2.1	Intraperitoneale Injektion	59
3.5.2.2	Subkutane Injektion.....	59
3.5.2.3	Intravenöse Injektion	60
3.5.2.4	Intratumorale Injektion	60
3.5.3	Narkosetechniken	60
3.5.3.1	Inhalationsanästhesie	60
3.5.3.2	Injektionsanästhesie.....	61
3.5.4	Transplantation von subkutanen Tumoren	61
3.5.5	Messung von Tumolvolumen.....	61
3.5.6	<i>In vivo</i> Imaging.....	61
3.5.7	Rekultivierung von Tumoren	62
3.5.8	Statistische Auswertung der Experimente	62
4.	Ergebnisse.....	63
4.1	VPR-kodierendes MLV als onkolytisches Virus.....	63
4.2	Transfer von shRNA durch MLV.....	67
4.2.1	Transfer von miRNA mit Hilfe von Viruspartikeln	67
4.2.2	Herstellung von shRNA-tragenden Viren	70
4.2.3	Charakterisierung von shRNA-tragenden Viren	72
4.2.3.1	Titrierung	73
4.2.3.2	Genomische Stabilität der rekombinanten Viren.....	74
4.2.4	EGFR als therapeutisches Zielgen.....	77
4.2.5	PLK1 als therapeutisches Zielgen	78
4.2.5.1	Test der shRNAs auf Funktionalität	78
4.2.5.2	Einfluss von PLK1-Depletion auf unterschiedliche Tumor-Zelllinien	79
4.2.5.3	Einfluss von Koffein auf PLK1-Depletion.....	81
4.2.5.4	Analyse der PLK1-Depletion auf die Zellproliferation.....	82
4.2.6	<i>In vivo</i> -Applikation von shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1	86
4.2.6.1	<i>In vivo</i> -Applikation von infizierte HT1080-Zellen	86
4.2.6.2	Intravernöse Virusapplikation	91

4.2.6.3	Intratumorale Virusapplikation.....	97
4.2.7	STAT3 als therapeutisches Zielgen	105
5.	Diskussion.....	110
5.1	Der Einsatz von viralen Vektoren in der Gentherapie.....	110
5.2	Transfer von pri-miRNA mit MLV-Partikel	112
5.3	Replikationskompetente MLVs als Gentherapievehikel	114
5.3.1	Übertragung von toxischen Genen zur Tumorthherapie	115
5.3.2	Übertragung von shRNA	118
6.	Zusammenfassung	126
7.	Anhang.....	127
7.1	Sequenzen der Stabilitätstests der shRNA-Expressionskassetten	127
7.2	Abkürzungsverzeichnis und Glossar	131
7.2.1	Basen und Aminosäuren	131
7.2.2	Anglizismen.....	131
7.2.3	Sonstige Abkürzungen.....	133
7.3	Lebenslauf	142
7.4	Danksagung	144
8.	Literaturverzeichnis	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Erworbene Fähigkeiten und Eigenschaften von Krebszellen.	2
Abbildung 1-2: Behandlungsziele aller weltweiten Gentherapien in klinischen Studien.	3
Abbildung 1-3: Funktionen des VPR im Replikationszyklus des HI-Virus.....	4
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des Dicer-Protein-Komplexes mit dsRNA Substrat.	6
Abbildung 1-5: Kristallstruktur von <i>T. thermophilus</i> Ago2 mit gebundener <i>guide</i> -DNA und Ziel-RNA.	7
Abbildung 1-6: Funktionsweise von RNA-Interferenz.	8
Abbildung 1-7: Vergleich der Biogenese von miRNA und siRNA.	10
Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR).	12
Abbildung 1-9: Schematische Übersicht der Signalkaskaden nach EGFR-Aktivierung und deren Folgen.	13
Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Funktionen von PLK1 während des Zellzykluses.	15
Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der STAT3-Signalkaskade.	17
Abbildung 1-12: Verwendete Gentransfersysteme aller weltweit angemeldeten klinischen Studien. Stand 2010.	19
Abbildung 1-13: Schematische Darstellung eines retrovialen Viruspartikel und seinem Genom.	20
Abbildung 1-14: Schematische Darstellung des retroviralen Lebenszyklus.	22
Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der Verteilung eines replikationskompetenten Virus in Zellen im Vergleich zu einem nicht replizierenden Vektor.	25
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung eines typischen Durchflusszytometers.	49
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	50
Abbildung 3-3: Darstellung eines Zellzyklusprofils im Durchflusszytometer.....	51
Abbildung 3-4: Schematischer Aufbau eines <i>Semi-Dry-Blots</i>	58
Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der VPR-tragenden Plasmide.....	64
Abbildung 4-2: Sequenzvergleich der VPR-Sequenzen.....	64
Abbildung 4-3: Einfluss von VPR auf HEK293T Zellen.....	65
Abbildung 4-4: Western-Blot-Analyse von VPR-transfizierten HEK293T Zellen.....	66
Abbildung 4-5: Einfluss von VPR auf ST-IOWA Zellen.....	67
Abbildung 4-6: Schematische Arbeitshypothese zur Darstellung der Verpackung von miRNA in Vektorpartikel.....	69
Abbildung 4-7: Durchflusszytometrische Analyse von miRNA-GFP transduzierten HT1080 Zellen.	70

Abbildung 4-8: Schematische Darstellung der Lage der shRNA Bindungsstellen innerhalb der Zielgene.	71
Abbildung 4-9: Schematische Darstellung von shRNA-Expressionskassetten-tragenden aMLVs.	72
Abbildung 4-10: Bestimmung der Titer shRNA-Expressionskassette-tragender aMLVs.	74
Abbildung 4-11: PCR-Analyse zur Überprüfung der genomischen Stabilität der shRNA-Expressionskassetten in aMLVs.	76
Abbildung 4-12: Western-Blot-Analyse von pAZE-shEGFR infizierten DHΔE-Zellen.	77
Abbildung 4-13: Identifizierung funktioneller shRNAs gegen PLK1.	79
Abbildung 4-14: Test unterschiedlicher Zelllinien auf den Einfluss von PLK1-Herunterregulation.	80
Abbildung 4-15: Effekt von Koffein auf Zellen nach PLK1-Depletion.	81
Abbildung 4-16: Zellzyklusprofile von HT1080-Zellen nach Infektion mit shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1.	84
Abbildung 4-17: Anteil apoptotischer Zellen nach Infektion mit shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1.	84
Abbildung 4-18: Mikroskopische Untersuchung von HT1080-Zellen 3 Tage nach Infektion mit shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1.	85
Abbildung 4-19: Kontrolle von Virus und Zellen vor <i>in vivo</i> -Applikation.	87
Abbildung 4-20: Tumorumfang nach subkutaner Transplantation von infizierten HT1080-Zellen.	88
Abbildung 4-21: Test der isolierten Tumore auf Deletionen der miRNA-Expressionskassen mittels PCR-Analyse.	89
Abbildung 4-22: Sequenzvergleich der miRNA-Expressionskassetten nach <i>in vivo</i> -Applikation mit der Ursprungssequenz.	90
Abbildung 4-23: Tumorumfang nach intravenöser Infektion.	92
Abbildung 4-24: Quantifizierung des Tumorumfanges mittels <i>in vivo</i> -Imager.	93
Abbildung 4-25: Detektion der shRNA-Expressionskassen aus Tumorgewebe mittels PCR-Analyse.	94
Abbildung 4-26: Sequenzvergleich der miRNA-Expressionskassetten nach <i>in vivo</i> Applikation mit der Ursprungssequenz.	96
Abbildung 4-27: Tumorumfang nach intratumoraler Infektion.	98
Abbildung 4-28: Test der rekultivierten Tumore auf Infektion mittels IPA.	100
Abbildung 4-29: Detektion der shRNA-Expressionskassen aus Tumorgewebe mittels PCR-Analyse.	101
Abbildung 4-30: Sequenzvergleich der miPLK1_8-Expressionskassetten.	103
Abbildung 4-31: Sequenzvergleich der miNons-Expressionskassetten.	104
Abbildung 4-32: Identifizierung funktioneller shRNAs gegen STAT3.	106

Abbildung 4-33: Test der Zelllinien Myla, 4T1, TU 7449 und TU 9648 auf die Herunterregulation von STAT3 mittels Western-Blot-Analyse.....	107
Abbildung 4-34: Wachstum von AZE-shSTAT3-3 (nach IRES) infizierten 4T1-Zellen in Soft-Agar..	108

1. Einleitung

1.1 Krebs und seine Entstehung

Krebs ist in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2009). Es gibt mehr als zweihundert verschiedene Krebsarten, die alle denselben Auslöser – eine Veränderung des Erbguts – aufweisen. Durch die Mutationen im Erbgut verliert die Zelle ihre normale Wachstumskontrolle und kann somit unbegrenzt wachsen (Stass and Mixson, 1997; Ilyas *et al.*, 1999). Im Jahre 1914 stellte Theodor Boveri die Hypothese auf, dass die Ursache für die Krebsentstehung ein abnormer Chromatinbestand der Zelle ist, welcher durch erbliche Disposition, intrazelluläre Parasiten oder äußere Einwirkungen zustande kommt. Diese Veränderungen führen zu einem irreparablen Defekt im Zellkern der Zelle (Boveri, 2008). Diese Hypothese wurde nach heutigem Wissensstand weitgehend bestätigt.

Die Entstehung von Krebs läuft in mehreren Stufen ab, so dass eine Mutation alleine nicht ausreicht, um eine gesunde Zelle in eine Tumorzelle zu transformieren (Kinzler and Vogelstein, 1997). Die Initiation beschreibt das Auftreten der ersten Mutation, die der betroffenen Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den nicht mutierten Zellen verschafft und sich infolge dessen häufiger teilen kann (Hanahan and Weinberg, 2011). Während der Promotions-Phase wird die Entstehung eines Tumors nach vorheriger Initiation beschleunigt und verstärkt. In dieser Phase kommt es zu weiteren Mutationen der Kontrollgene (Tumorsuppressor-Gene und Protoonkogene) der betroffenen Zelle. In der Progressions-Phase verwandeln sich die Zellen schließlich in eine maligne Geschwulst. Die Progression lässt sich noch einmal unterteilen in die Tumor-Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung. Bei der Tumor-Angiogenese regt das Tumorgewebe eine eigene Blutversorgung über Kapillaren an. Die Invasion ist die Ausbreitung von Tumorzellen in das umliegende Gewebe. Der letzte Schritt der malignen Tumor-Progression ist die Metastasierung, bei der sich einzelne Tumorzellen vom Primär-Tumor lösen und in Blut und/oder Lymphgefäße eindringen (Intravasation) (Thiemen, 2008). In Abbildung 1-1 ist eine schematische Übersicht über die erworbenen Fähigkeiten und Eigenschaften von Krebszellen dargestellt.



Abbildung 1-1: Erworbene Fähigkeiten und Eigenschaften von Krebszellen (verändert nach Hanahan and Weinberg, 2011).

In der Tumorentstehung spielen die Protoonkogene und Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle (Weinberg, 1994; Weinberg, 1991). Protoonkogene kodieren meist für Wachstumsfaktoren, Transmembranproteine, die für die intrazelluläre Signalübertragung verantwortlich sind und Transkriptionsfaktoren, die für eine geregelte Genexpression benötigt werden. Durch Punktmutation, Chromosomen-Translokation oder Gen-Amplifikation werden Protoonkogene in Onkogene transformiert, welche dadurch ihre regulative Wirkung auf den Zellzyklus verlieren (Weinberg, 1994). Wird durch Mutation ein Protoonkogen zu einem Onkogen aktiviert, werden dessen Genprodukte vermehrt exprimiert, wodurch die Zelle einen enormen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen gewinnt. Tumorsuppressorgene kodieren zellwachstums-hemmende Genprodukte, die durch ihre Transformation zu einer indirekten Steigerung der Proliferationsrate führen. Genprodukte der Tumorsuppressorgene stellen einen Schutz der Zelle vor bösartigen Transformationen dar. Durch das Ausschalten dieser Tumorsuppressorgene fällt die hemmende Wirkung für eine Zellproliferation weg.

1.2 Möglichkeiten der antitumoralen Gentherapie

Gentherapie ist die Behandlung von Krankheiten durch den Transfer genetischen Materials in ein Individuum. Somit wird direkt die Krankheitsursache behandelt, im Gegensatz zu konventionellen Behandlungsmethoden, welche sich auf die Behandlung von Krankheitssymptomen beschränken. Die erste klinische Gentherapiestudie wurde im Jahre 1990 durchgeführt und diente der Behandlung von ADA-SCID (Adenosindeaminase-*severe combined immunodeficiency*), einer autosomal-rezessiv vererbten Immunschwäche bei der das Enzyms Adenosindesaminase fehlt (Blaese *et al.*, 1995). Heute werden hauptsächlich Krebserkrankungen durch Gentherapie experimentell behandelt (Abbildung 1-2). 64,5% aller weltweit angemeldeten klinischen Studien bis zum Jahre 2010 konzentrierten sich auf die Behandlung von Krebserkrankungen.

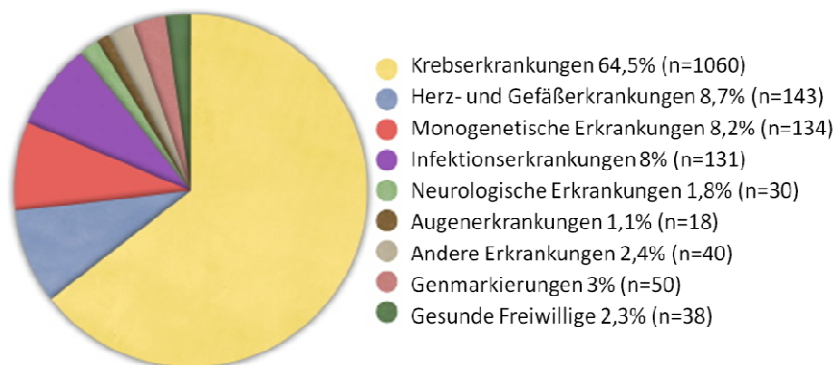


Abbildung 1-2: Behandlungsziele aller weltweiten Gentherapien in klinischen Studien. Stand 2010; verändert nach *Journal of Gene medicine* (<http://wiley.co.uk/genmed/clinical>).

Zu den gegen Tumorzellen gerichteten Strategien gehören die Korrektur von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die direkte Apoptoseinduktion, der Einsatz onkolytischer Viren sowie die Suizidgentherapie (Roth and Cristiano, 1997).

Zur erfolgreichen Durchführung eines gentherapeutischen Ansatzes sind zwei Komponenten von besonderer Bedeutung: Ein effektives therapeutisches Konstrukt, welches das Wachstum von Krebszellen hemmt oder diese tötet, und ein Vektor, der das Konstrukt an sein Ziel bringt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze für therapeutische Konstrukte verwendet, die alle durch das Murine Leukämievirus (MLV) als Transfervehikel zu ihrem Zielort gebracht werden sollten.

1.2.1 Apoptoseinduktion durch VPR

Das virale Protein R (VPR) ist ein akzessorisches Protein des humanen Immundefizienz-Virus (HIV), welches zu den späteren Produkten der HIV-Proteinsynthese gehört. Es besteht aus 96 Aminosäuren (Molekulargewicht 14kDa) und ist in den eng verwandten Virustypen HIV-1, -2 und Simian Immunodefizienz Virus (SIV) stark konserviert (Felzien *et al.*, 1998). VPR besitzt eine Reihe von unterschiedlichen Funktionen, welche die Infektiosität von HIV erheblich beeinflussen. Einige Funktionen sind die Verstärkung des Imports des viralen Prä-Integrationskomplexes in den Zellkern der Wirtszelle (Connor *et al.*, 1995), die Beeinflussung von Genexpression durch Transaktivierung der *long terminal repeats* (LTR) und den Zielgenen (Sawaya *et al.*, 2000) und die Unterstützung der Reversen Transkription (Rogel *et al.*, 1995). Außerdem induziert VPR einen Zellzyklusarrestes in der G₂-Phase was letztendlich zur Apoptose der Wirtszelle führt (Chang *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2004) (zur Beschreibung des Zellzyklus siehe auch Kapitel 3.2.8.1). In Abbildung 1-3 sind die bisher bekannten Funktionen von VPR im Replikationszyklus von HIV-1 dargestellt. Die Eigenschaft des viralen Proteins R, einen G₂-Arrest und Apoptose zu induzieren, sollte in dieser Arbeit zur Induktion von Apoptose in Tumorzellen herangezogen werden.

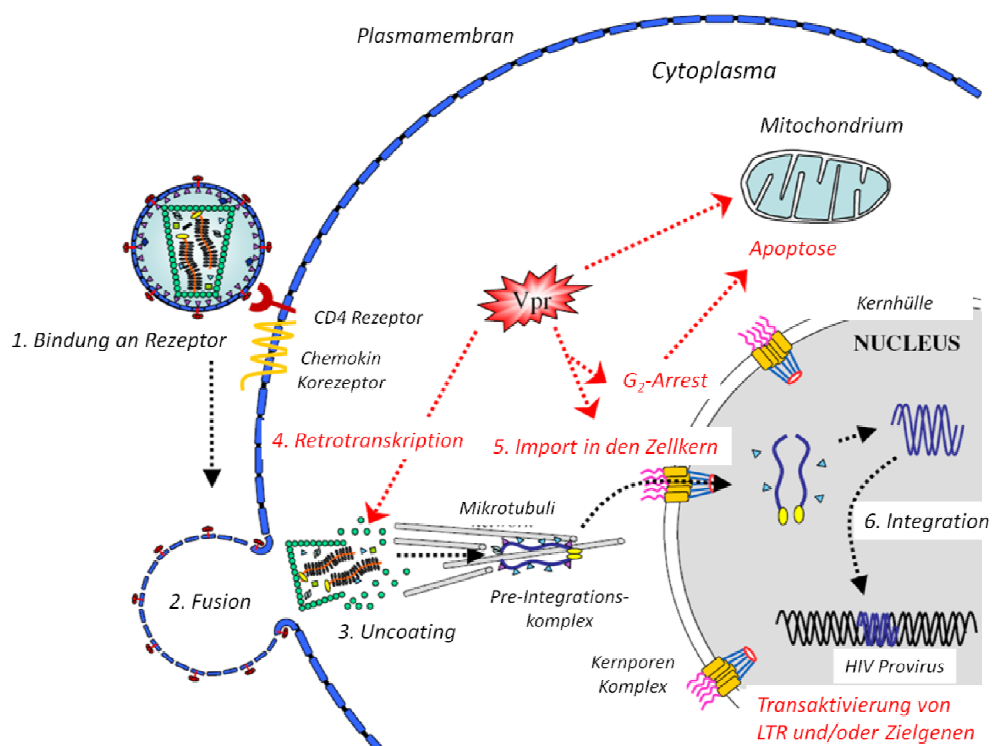


Abbildung 1-3: Funktionen des VPR im Replikationszyklus des HI-Virus. Alle bekannten Funktionen des viralen Protein R (VPR) sind in rot dargestellt (verändert nach Le and Benichou, 2005).

1.3 Regulation der Genexpression durch RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) oder posttranskriptionelles Gen-*Silencing* (PTGS) ist eine sequenzspezifische Herunterregulation eines Gens durch eine zum Zielgen komplementäre, kurze, doppelsträngige RNA. Der Vorgang wurde erstmals 1998 von Fire *et al.* in dem Nematoden *C. elegans* beobachtet, nachdem dem Nematoden doppelsträngige RNA injiziert wurde (Fire *et al.*, 1998). Für diese fundamentale Entdeckung erhielten Andrew Z. Fire und Craig C. Mello im Dezember 2006 den Nobelpreis für Medizin. Inzwischen ist bekannt, dass dieser Mechanismus in zahlreichen Organismen, wie in Pilzen und Pflanzen sowie Invertebraten bis hin zu Vertebraten hoch konserviert ist. 2001 entdeckten Elbashir *et al.*, dass mit 21 Nukleotid (nt) langen doppelsträngigen RNA-Molekülen Gen-*Silencing* auch in humanen Zelllinien möglich ist (Elbashir *et al.*, 2001a). Damit war der Weg frei, Genfunktionen in menschlichen Zellen näher zu untersuchen und neue gentherapeutische Verfahren zu entwickeln (Suckau, 2008).

Da durch RNAi Gene sehr effektiv und spezifisch herunter reguliert werden können und die Methode zudem einfach und günstig ist, gehört sie mittlerweile zum Standardprogramm in vielen Bereichen der Forschung. Auch in der angewandten Medizin stellt das posttranskriptionelle Gen-*Silencing* eine vielversprechende Alternative zu Protein-Inhibitoren dar.

Der Mechanismus von RNA-Interferenz

Der Prozess der RNAi wird in eine Initiations- und eine Effektorphase unterteilt (Bernstein *et al.*, 2001). In der Initiationsphase wird doppelsträngige RNA (dsRNA) durch eine ATP-abhängige Ribonuklease III (Dicer) in 21 bis 23nt lange dsRNA Moleküle mit 2nt langen 3'-Überhängen prozessiert (Carmell and Hannon, 2004). Die so entstandenen Effektormoleküle werden als *small interfering RNAs* (siRNAs) bezeichnet. Dicer bildet einen Komplex aus zwei RNase III Motiven, einer RNA-Helikase/ATPase Domäne, einer Domäne mit unbekannter Funktion und einer dsRNA Bindungsdomäne (Rotondo and Frendewey, 1996; Aravind and Koonin, 2001). Die meisten Dicer-Ribonukleasen besitzen außerdem ein PAZ-Motiv (Piwi, Argonaute und Zwiille Protein), welches das Ende der langen dsRNA erkennt und diese ca. 20bp davon entfernt, katalytisch spaltet (Lingel *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003; Suckau, 2008) (Abbildung 1-4).

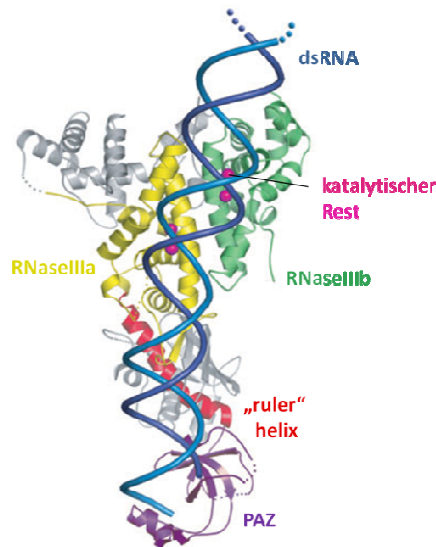


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des Dicer-Protein-Komplexes mit dsRNA Substrat (verändert nach Liu and Paroo, 2010).

Die an Dicer gebundene siRNA wird durch das *transactivating response* RNA-binding Protein (TRBP) weiter zum RNA-induced silencing complex (RISC) transferiert (Haase *et al.*, 2005; Chendrimada *et al.*, 2005).

Durch den Zusammenbau des RISC wird die Effektorphase eingeleitet. Derzeit wird folgender Mechanismus, anhand von *in vitro* Studien in *D. melanogaster* für den Zusammenschluss von RISC und siRNA, die Überführung von doppelsträngiger siRNA in ihre einzelsträngige Form und der anschließenden Zerschneidung der Ziel-mRNA, angenommen:

Zunächst lagern sich Dicer (Dcr2) und das dsRNA Bindungsprotein (R2D2) zu einem Heterodimer zusammen, welcher die siRNA bindet. Der RNA Strang, welcher sein 5'-Ende an dem weniger thermodynamisch stabilen Ende des RNA-Duplexes hat, wird bevorzugt als *guide strand* in RISC geladen (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). R2D2 bindet dabei das thermodynamisch stabilere Ende der siRNA und Dcr2 das weniger stabilere Ende (Liu *et al.*, 2006a). Zusammen bildet die siRNA und das Dcr2/R2D2-Heterodimer den RISC Loading Komplex (RLC). Durch Protein-Protein-Interaktion lagert sich das Argonaut Protein Ago2, die Kernkomponente von RISC, an den RLC (Tahbaz *et al.*, 2004). Anschließend rekrutiert Ago2 die doppelsträngige siRNA und trennt das Heterodimer wieder ab (Abbildung 1-5). Das Argonaut Protein verfügt über zwei konservierte Domänen, PAZ und Piwi, wobei Piwi das 5'-phosphorylierte Ende des *guide strand* bindet und PAZ das 3'-Ende. Die Endonuklease-Aktivität von Ago2 bewirkt die Zerschneidung des *passenger strand*. Der

verbliebene *guide strand* und Ago2 bilden nun den reifen, aktivierten RISC (Matranga *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005; Suckau, 2008).

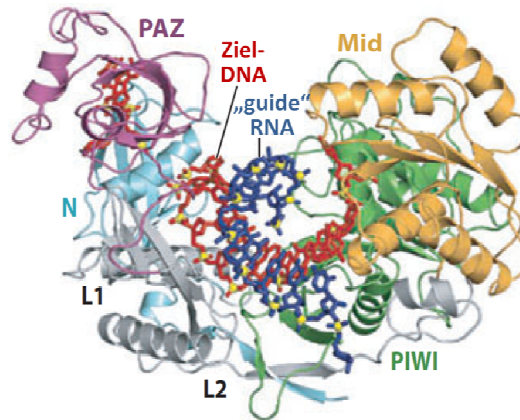


Abbildung 1-5: Kristallstruktur von *T. thermophilus* Ago2 mit gebundener *guide*-DNA und Ziel-RNA (verändert nach Wang *et al.*, 2008).

Über eine exakte Sequenzerkennung zur *antisense*-komplementären mRNA erfolgt die Bindung und die anschließende Hydrolyse der gebundenen mRNA durch die zum RISC gehörende Nuklease (Livak and Schmittgen, 2001; Chiu and Rana, 2002). Abbildung 1-6 zeigt eine schematische Darstellung des RNAi-Biosynthesewegs.

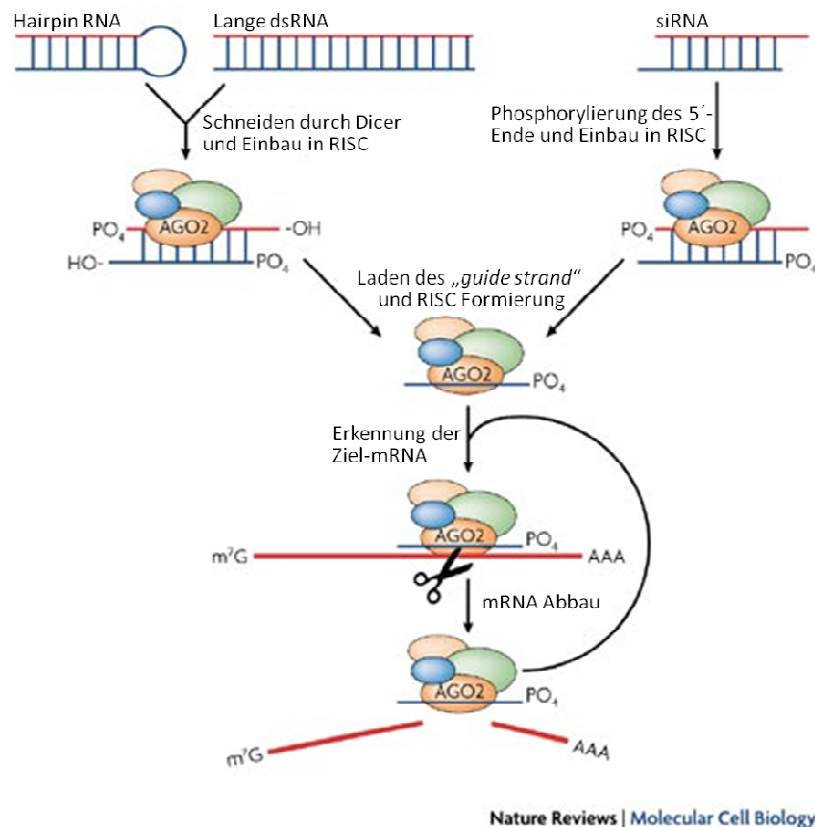


Abbildung 1-6: Funktionsweise von RNA-Interferenz. Doppelsträngige siRNA aktivieren den RISC und führen damit zur Spaltung der komplementären Ziel-mRNA. Längere dsRNA oder shRNA werden zuvor durch Dicer prozessiert (verändert nach Rana, 2007).

Gen-Silencing durch microRNAs

1993 entdeckten Lee *et al.* dass das Gen *lin-4* in *C. elegans* nicht für ein Protein kodiert (Lee *et al.*, 1993). Stattdessen identifizierten sie zwei kurze RNA-Moleküle mit einer Länge von 22 und 61nt, deren Sequenz teilweise zum 3'-UTR der mRNA von *lin-14* komplementär waren. Nach heutigem Kenntnisstand weiß man, dass es sich dabei um eine sogenannte microRNA (miRNA) und ihr längeres Vorläufermolekül (pre-miRNA) handelt. Diese hoch konservierten, endogenen RNAs sind wesentlich an der Regulation der Genexpression beteiligt und steuern somit maßgebliche zelluläre Funktionen im Körper einschließlich Proteinbiosynthese, Zelldifferenzierung und Zelltod (Bartel, 2004). Die online Datenbank miRBase verzeichnet zurzeit 1048 humane miRNAs (<http://www.mirbase.org/>, 2011), es werden jedoch ständig neue miRNAs entdeckt.

MiRNAs werden endogen exprimiert, wobei der Genlocus, der für die miRNA kodiert, unabhängig vom Zielgen ist (Bartel, 2004). Das Primär-Transkript (pri-miRNA) wird von der RNA-Polymerase II transkribiert. Eine pri-miRNA kann sowohl eine einzelne als auch einen

Cluster von mehreren miRNAs bilden, wobei ein Cluster aus unterschiedlichen miRNAs bestehen kann. Jede einzelne miRNA bildet innerhalb der pri-miRNA eine kurze Haarnadelstruktur (*short hairpin RNA*; shRNA) aus (Cullen, 2004). Die pri-miRNA wird von einem Enzymkomplex, bestehend aus einem RNase III Enzym (Drosha) und einem dsRNA Bindeprotein (DGCR8), prozessiert. Dabei entstehen ca. 65nt lange Haarnadelintermediate (pre-miRNA) mit einem 2nt langen 3'-Überhang (Lee *et al.*, 2003). Anschließend wird die pre-miRNA aktiv über Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Yi *et al.*, 2003). Im Zytoplasma entfernt Dicer die terminale Haarnadelstruktur. Die nun ca. 20bp langen dsRNA-Moleküle werden nun wie oben beschrieben in den RISC inkorporiert. Je nach Höhe der Homologie der miRNA zu ihrer Ziel-mRNA wird die mRNA schließlich degradiert oder die Translation inhibiert (Bartel, 2004). Eine weitere, aber noch nicht vollständig verstandene Möglichkeit der Gen-Herunterregulation, ist die Überführung der mRNA zusammen mit dem miRNA-RISC Komplex in Prozessierungs-Körper (P-bodies), in welchen die mRNA degradiert wird (Liu *et al.*, 2005). In Abbildung 1-7 ist ein Vergleich der Biogenese von siRNA und miRNA dargestellt.

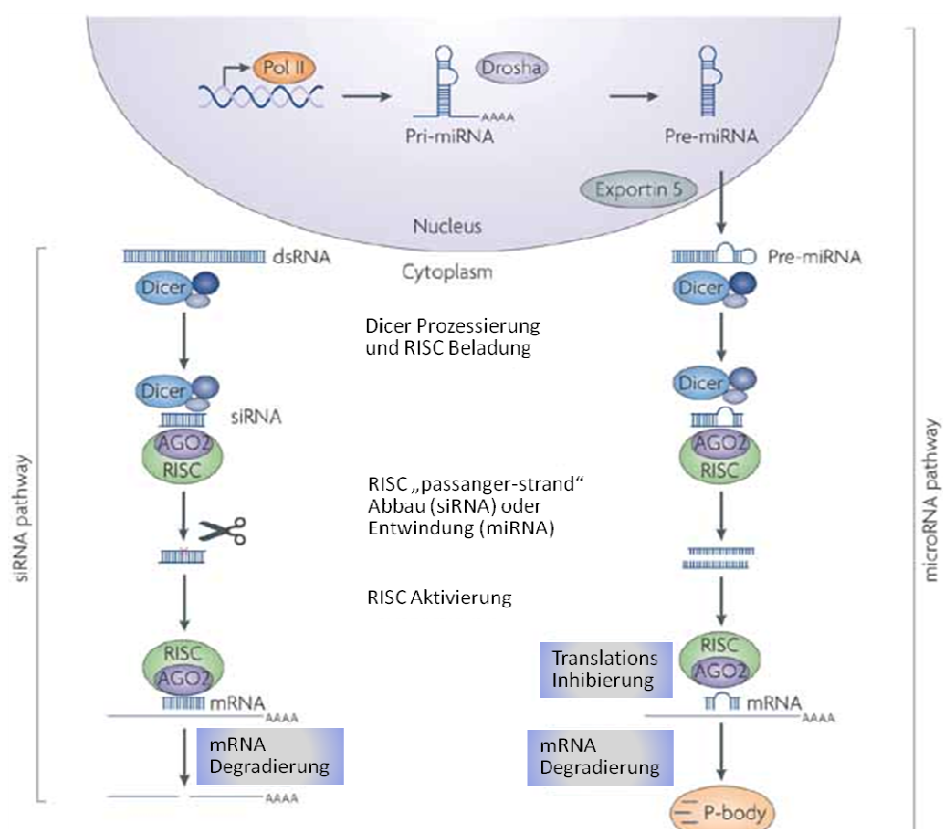


Abbildung 1-7: Vergleich der Biogenese von miRNA und siRNA. Das primäre miRNA Transkript (pri-miRNA) wird durch eine RNA Polymerase II (Pol II) transkribiert, von Drosha zu pre-miRNA prozessiert und über Exportin 5 ins Cytoplasma transportiert. Dort wird die pre-miRNA oder dsRNA von Dicer geschnitten und in Ago2-RISC inkorporiert. Der *passenger strand* wird entwunden und abgebaut, während der *guide strand* an die Ziel-mRNA bindet. Dies führt entweder zu Degradierung der mRNA oder einer Inhibierung der Translation (verändert nach de Fougères A. *et al.*, 2007).

Die Verwendung von RNAi in der Gentherapie

Da durch RNAi einzelne Gene mit einer sehr hohen Spezifität und Effizienz herunter reguliert werden können, stellt diese Methode einen sehr vielversprechenden Ansatz in humanen Therapien dar. Dabei stehen Erkrankungen im Vordergrund welche mit der Überexpression einzelner Gene korreliert sind. Dass RNAi *in vivo* angewendet werden kann, wurde erstmals in Hepatitis B Virus infizierten Säugetieren gezeigt (McCaffrey *et al.*, 2002). Darauf folgte die erste therapeutische Applikation von siRNA, in welcher siRNAs gegen die *Fas*-mRNA in einem Mausmodell mit autoimmuner Hepatitis angewandt wurde. Die behandelten Tiere konnten hierdurch vor einer Leberfibrose geschützt werden (Song *et al.*, 2003). Inzwischen laufen einige klinische Studien in den Phasen I und II und vereinzelt auch schon in Phase III (Castanotto and Rossi, 2009). Dabei richten sich die Studien beispielsweise gegen die Neovaskularisierung des Auges, das diabetische Makulaödem, RSV-Infektionen (*respiratory syncytial virus*), Hepatitis B, AIDS, ektodermale Dysplasien und gegen solide Tumore (Castanotto and Rossi, 2009; Sliva, 2006).

Die Verwendung von siRNA-Duplexen in der Gentherapie führt häufig zu ungewollten Nebenwirkungen. Um diese Nebenwirkungen zu verringern, können Thermodynamik und Bindungseigenschaften der siRNA Moleküle, durch Modifikationen des RNA-Rückgrats, beeinflusst werden (Echeverri and Perrimon, 2006; Echeverri *et al.*, 2006).

Prinzipiell gibt es viele verschiedene Ansätze der RNAi Anwendung. In einem Großteil der bisher durchgeführten klinischen Studien wurden chemisch synthetisierte, 21nt lange siRNA-Duplexe mit einem 2nt 3'-Überhang eingesetzt. Diese Methode ist aber in vielen Fällen nicht effizient genug, da die Applikation transient ist und die intrazelluläre siRNA-Konzentration während der Zellteilung verdünnt wird. Des Weiteren können die negativ geladenen siRNAs die hydrophoben Zellwände nur schwer ohne aktive Überträger durchdringen. Außerdem werden ungeschützte siRNA Moleküle generell durch RNasen abgebaut (Sliva and Schnierle, 2010).

Die intrazelluläre Expression von kurzen Haarnadel RNAs (*short hairpin RNAs*, shRNAs) führt dagegen, solange die shRNA transkribiert wird, zur dauerhaften Herunterregulation des

Zielgens und stellt somit eine ideale Anwendungsmöglichkeit dar. Um die shRNAs intrazellulär exprimieren zu können, wird ein geeigneter Vektor für den Transfer benötigt. Durch den Transfer durch Viren oder virale Vektoren kann sowohl der endosomale und lysosomale Abbau umgangen werden als auch der Transport in den Zellkern, welcher für die Expression von shRNAs nötig ist, sichergestellt werden (Sliva and Schnierle, 2010). Diese Vektoren exprimieren die shRNA meist unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III Promotors (Brummelkamp *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003). Die RNA-Transkripte, welche von dem Promotor exprimiert werden, besitzen keinen Poly(A)-Schwanz, einen definierten Transkriptionsstart und ein Terminationssignal aus fünf Uridinen. Diese Transkripte werden nach dem zweiten Uridin des Terminationssignals gespalten. Die so entstandenen Transkripte gleichen nun an den Enden einer synthetisierten siRNA und durchlaufen die RNAi Biogenese wie oben beschrieben.

Neben der intrazellulären Expression von shRNAs, bei denen die *sense* und *antisense* Stränge durch eine Schleife mit ungepaarten Nukleotiden verbunden sind, kann die intrazelluläre Expression von kurzen Haarnadelstrukturen auch durch synthetische microRNAs (miRNAs) erfolgen (Elbashir *et al.*, 2001b; Zeng *et al.*, 2002). Dabei werden die miRNAs als größere Primär-Transkripte (pri-miRNAs) exprimiert. Damit sind die künstlichen miRNAs den natürlichen, endogenen RNAi Substraten ähnlich und für die Polymerase II Transkription zugänglich (Cai *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006).

1.3.1 EGFR als Zielstruktur zur Tumorthherapie

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) wird in einer Vielzahl von Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert, wobei er eine fundamentale Rolle in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung der Zellen spielt. Abnorme Veränderungen der Expression oder Aktivierung von EGFR ist häufig mit malignen Transformationen der betroffenen Zellen korreliert.

EGFR ist ein Transmembranrezeptor, der für die Signalübertragung vom externen Milieu in das Zellinnere verantwortlich ist. Das ca. 170kDa große Protein besitzt zwei cysteinreiche Regionen in der extrazellulären Domäne, welche für die Ligandenbindung verantwortlich sind, eine Transmembrandomäne und eine Tyrosinkinase-Domäne im zytoplasmatischen Teil, welche bei Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert wird. Der wichtigste EGFR-Ligand ist

der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) (Sliva, 2006). Daneben gibt es noch sechs weitere - sogenannte *EGF related growth factors* - EGFR-Liganden (Riese and Stern, 1998). Abbildung 1-8 zeigt eine schematische Darstellung des EGFR.

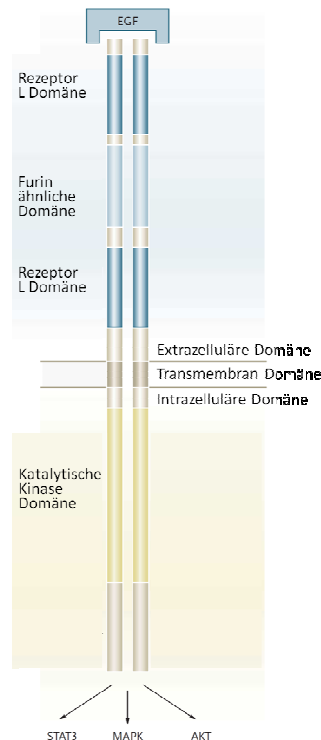


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) (verändert nach Lynch *et al.*, 2004).

Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Dimerisierung entweder von zwei EGFR (Homodimer) oder von EGFR mit einem anderen HER (*human epidermal growth factor receptor*)-Familienmitglied (Heterodimer) (Yarden and Slwkowski, 2001). Die Dimerisierung bewirkt die Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste des Rezeptors. Dadurch können Effektorproteine an den Rezeptor binden und somit aktiviert werden. Diese aktivieren wiederum verschiedene Signalwege, wie den MAP-Kinase-Weg, den Jak/STAT-Signalweg oder die anti-apoptotischen PI3-Kinase oder Akt-Signalwege. Dies führt entweder zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Proteinen wie z.B. Zyklinen aktivieren, die den Zellzyklus vorantreiben und damit zur Proliferation der Zelle führen, oder zur Inhibition von Apoptose (Sliva, 2006). In Abbildung 1-9 ist eine schematische Übersicht der Signalkaskaden nach EGFR-Aktivierung und deren Folgen gezeigt.

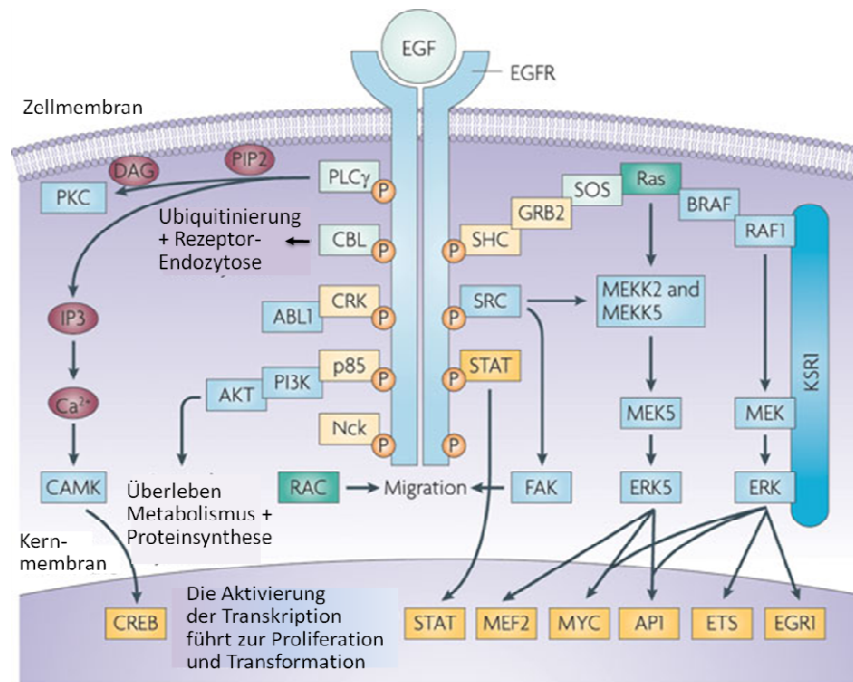


Abbildung 1-9: Schematische Übersicht der Signalkaskaden nach EGFR-Aktivierung und deren Folgen (verändert nach Kolch and Pitt, 2010).

Unter normalen Bedingungen unterliegt der EGFR einer strikten Kontrolle. Eine pathologische Veränderung dieses eng kontrollierten Systems durch Überexpression, Genamplifikation, Mutationen und/oder Aufhebung der regulatorischen Einschränkungen kann zur Hyperproliferation führen. Diese Zellen erlangen somit Wachstumsvorteile, wodurch schließlich malignes Wachstum entstehen kann.

EGFR ist in einer Vielzahl von humanen Tumoren bis zu 100fach überexprimiert. Zwischen 80 und 100% der Kopf- und Nackentumore, 25% der Mammakarzinome und Gliome, aber auch Karzinome des Kolons, des Pankreas und der Ovarien zeigen eine stark erhöhte EGFR-Expression (Nagane *et al.*, 2001; Hynes, 2000). Neben der Überexpression des Rezeptors wurden verschiedene Deletionen in der extra- und intrazellulären Domäne des EGFR in den verschiedensten Karzinomen gefunden. Eine häufig gefundene Mutante in humanen Tumoren ist EGFRvIII. Dabei handelt es sich um einen verkürzten Rezeptor, dem die Domänen I und II der extrazellulären Domäne (AS 6-273) fehlen und dieser daher nicht zur Ligandenbindung fähig ist. Allerdings besitzt diese Form des Rezeptors dadurch eine konstitutiv aktive Kinasedomäne, welche Zellproliferation unabhängig von Ligandenbindung induziert (Tang *et al.*, 2000).

Es gibt mehrere Argumente, den EGFR als Angriffspunkt für eine gerichtete Tumorthherapie auszuwählen. Die häufige Überexpression und Korrelation mit einer schlechten Prognose für den Patienten, die gute Diagnostizierung in Patientenmaterial, aber auch die Abwesenheit einer physiologischen Rolle im erwachsenen Organismus machen den EGFR zu einem relevanten Ziel der Tumorthherapie. Vielversprechende therapeutische Ansätze waren bisher der Einsatz von chemischen Inhibitoren der Kinaseaktivität des Rezeptors (*small molecule inhibitors*), monoklonale Antikörper zur Blockierung der Ligandenbindung oder die gezielte Gabe von Toxinen (de Bono and Rowinsky, 2002; Sliva, 2006). Aber auch die in dieser Arbeit verwendete RNAi-Technik gegen die EGFR-mRNA wurde bereits zur Regulierung der EGFR Expression angewandt (Zhang *et al.*, 2004).

1.3.2 PLK1 als Zielstruktur zur Tumorthherapie

Die Polo-ähnliche-Kinase 1 (*polo-like kinase 1*; PLK1) gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und ist an der Regulation der Mitose beteiligt. Eine abnorme Überexpression von PLK1 führt häufig zur unkontrollierten Teilung der betroffenen Zellen und malignen Auswachsungen.

PLK1 ist ein ca. 66kDa großes Protein mit einer katalytischen Kinase-Domäne und zwei Polo-Box-Domänen (Hamanaka *et al.*, 1994). Dabei sind die Polo-Box-Domänen für die subzelluläre Lokalisation an den mitotischen Apparat und die Zentrosomen verantwortlich und fungieren als Protein-Interaktions-Domänen (Lee *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 2002).

PLK1 ist für den mitotischen Eintritt und Austritt als auch für die Zytokinese von essenzieller Bedeutung (Archambault and Glover, 2009). PLK1 reguliert den Eintritt in die M-Phase durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Cdc25, was wiederum zu einer Aktivierung von Cdk1 führt (Karaiskou *et al.*, 1999). Des Weiteren rekrutiert PLK1 verschiedene Proteine zu den Zentrosomen, welche für die Separation und Aktivierung der Zentrosomen nötig sind. Außerdem wird PLK1 für die Ausbildung der bipolaren Spindeln benötigt (Lane and Nigg, 1996). Auch wenn auf Grund von DNA-Schäden, der Eintritt in die Mitose verhindert werden soll, spielt PLK1 eine wichtige Rolle (Sanchez *et al.*, 1999). Dabei phosphoryliert PLK1 das Protein BRCA2. Dies führt zur Dissoziation eines Multiproteinkomplexes was schließlich den

verfrühten Eintritt in die Mitose verhindert. PLK1 ist zudem wichtig für den Meta-Anaphase-Übergang und damit für das korrekte Verlassen der Mitose. Dabei reguliert PLK1 den Anaphase-promotenden-Komplex (APC), welcher für die Degradierung mitotischer Proteine verantwortlich ist (Golan *et al.*, 2002). Ferner phosphoryliert PLK1 Cohesin und markiert es damit für die Proteloyse – ein essentieller Prozess für die korrekte Separierung der Schwester-Chromatiden (Alexandru *et al.*, 2001). In der Zytokinese erfüllt PLK1 Mikrotubuli-stabilisierende Funktionen (Yarm, 2002; Eckerdt, 2003). In Abbildung 1-10 ist eine schematische Übersicht über die Funktionen von PLK1 während des Zellzykluses gezeigt.

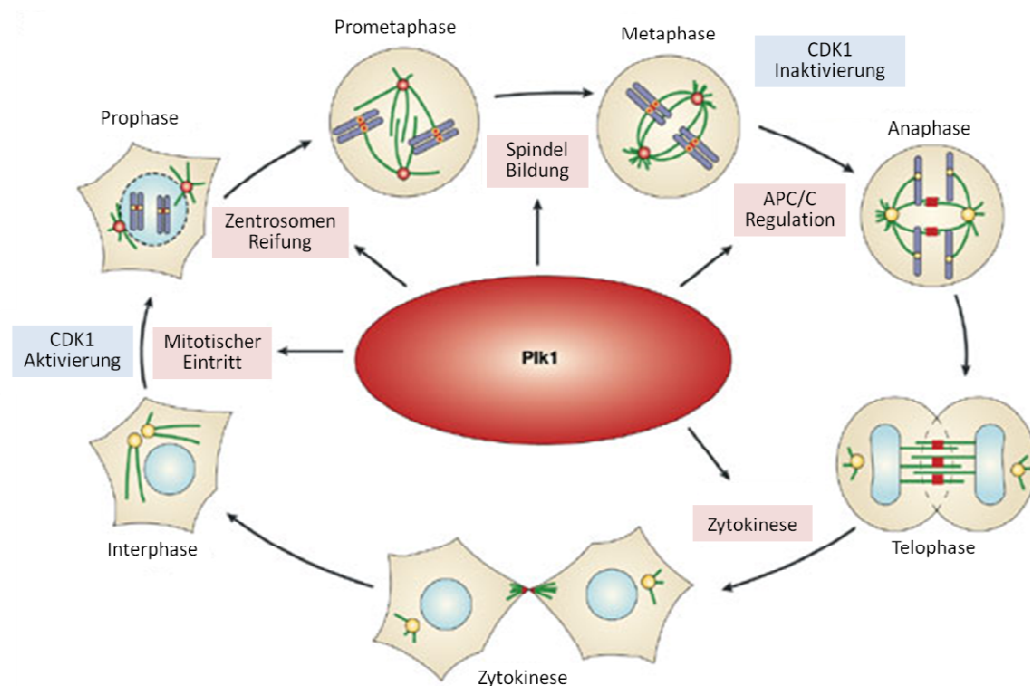


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Funktionen von PLK1 während des Zellzykluses (verändert nach Barr *et al.*, 2004).

In adultem und ausdifferenziertem Gewebe wird PLK1 unter normalen Bedingungen nicht exprimiert. Lediglich in Geweben, deren Zellen proliferieren, wie Thymus, Milz oder Hoden konnte eine schwache Expression nachgewiesen werden. Dagegen ist die PLK1-Expression in vielen primären Tumorgeweben im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich erhöht (Holtrich *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1997). Eine verstärkte PLK1-Expression konnte bisher in Lungentumoren, in Melanomen und in Karzinomen der Mundhöhle, des Dickdarms, der Leber und der Brust nachgewiesen werden (Wolf *et al.*, 1997; Knecht *et al.*, 1999; Streibhardt *et al.*, 2000; Knecht *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2003; Weichert *et al.*, 2005). Außerdem

konnte ein Zusammenhang zwischen PLK1-Expression und Metastasierungspotential gezeigt werden (Kneisel *et al.*, 2002; Ahr *et al.*, 2002).

PLK1 eignet sich somit hervorragend als Zielgen für die Tumorthherapie. Eine Inhibition von PLK1 führt zu Veränderungen der Tumorzellen und der Inhibierung der Tumorphiliferation. Nach Inhibierung von PLK1 zeigen Zellen Defekte bei der Ausbildung der Kernspindeln, ungetrennte Zentrosomen, sowie kondensierte M-Phase-Chromosomen (Lane and Nigg, 1996). Somit verbleiben die Zellen in der G₂-Phase des Zellzykluses und induzieren Apoptose (Liu and Erikson, 2003). Außerdem konnten Liu *et al.* zeigen, dass primäre Zellen im Gegensatz zu Tumorzellen auf die Inhibition von PLK1 nicht sensitiv reagieren (Liu *et al.*, 2006b).

1.3.3 STAT3 als Zielstruktur zur Tumorthherapie

STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) Proteine gehören zu einer Familie latenter, zytoplasmatischer Transkriptionsfaktoren, die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Sie sind an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung beteiligt. Bisher wurden sieben STAT-Proteine in Säugetieren identifiziert, welche alle eine konservierte Struktur aufweisen (Levy and Darnell, Jr., 2002).

STAT3 ist ein ca. 70kDa großer Transkriptionsfaktor (Heinrich *et al.*, 1998) und besitzt als wichtige funktionelle Gruppen eine DNA-bindende und eine SH2-Domäne. Die SH2-Domäne ermöglicht Rezeptorbindung, Assoziation mit den aktivierenden Janus Kinasen (JAKs) und Homo- bzw. Heterodimerisierung mit anderen STATs, die DNA-bindende Domäne ist für die Beteiligung des Proteins an der Transkription unerlässlich (Kisseleva *et al.*, 2002).

STAT3 ist an der Signalübertragung der Interleukin-6-ähnlichen Zytokine (IL-6, IL-11, *leukaemia inhibiting factor* LIF, Oncostatin M, *ciliary neurotrophic factor* und Cardiotropin 1) beteiligt (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 1998; Kisseleva *et al.*, 2002). Die Bindung von IL-6 an die gp130 Untereinheit des IL-6-Rezeptors sorgt für dessen Dimerisierung und die Aktivierung der rezeptorassoziierten Janus-Protein-Tyrosin-Kinase (JAK) durch Autophosphorylierung (Heinrich *et al.*, 1998; Podewski *et al.*, 2003). Aktivierte

JAKs phosphorylieren den Rezeptor an welchen sie gebunden sind. Hierdurch kann STAT3 an den Rezeptor binden und wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert (Stephanou, 2004). Einige onkogene Kinasen, wie v-Src oder Bcr-Abl, können STAT3 auch ohne Mitwirkung von Rezeptoren selbstständig phosphorylieren. Aktiviertes STAT3 löst sich vom Rezeptor, homodimerisiert, wandert in den Zellkern und bindet an die DNA, um dort als Transkriptionsfaktor zu fungieren (Kisseleva *et al.*, 2002). Der JAK/STAT-Signalweg wird über negative Feedback-Schleifen reguliert. SOCS (*Suppressors of Cytokine Signaling*) binden und inaktivieren JAK. Ihre Genexpression wird von den gleichen Zytokinen, die auch STAT3 aktivieren, gesteuert (Aaronson and Horvath, 2002; Hilbrandt, 2009). Eine schematische Übersicht über die STAT3-Signalkaskade ist in Abbildung 1-11 gezeigt.

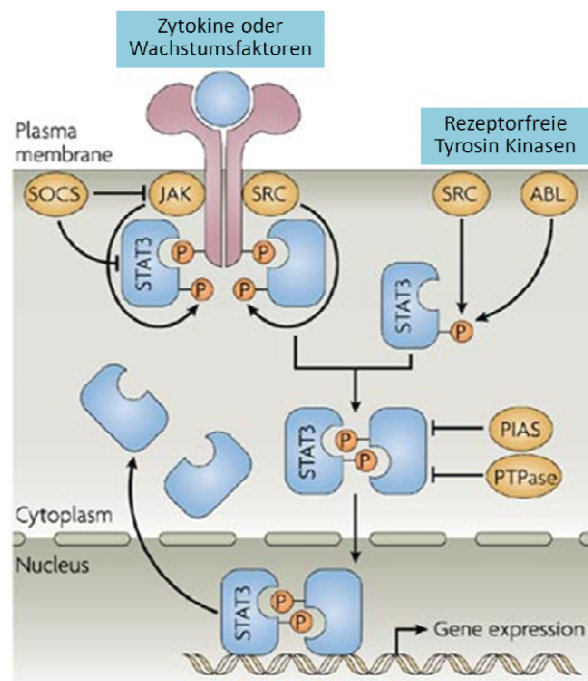


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der STAT3-Signalkaskade (verändert nach Yu *et al.*, 2007).

Unter normalen Bedingungen ist die Aktivierung der STATs ein transients und genau kontrolliert ablaufender Prozess. In Tumorzellen ist allerdings häufig eine konstitutive Aktivierung von STAT3 zu beobachten. Konstitutiv aktives STAT3 kommt in mehr als der Hälfte aller Brust- und Lungenkreiserkrankungen, in hepatozellulären Karzinomen, in multiplen Myelomen sowie in mehr als 95% aller Kopf- und Nackenkreiserkrankungen vor (Darnell, 2005).

Oft entsteht die onkogene Tyrosinkinaseaktivität durch unkontrollierte Ligandenbindung (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Grandis *et al.*, 1998). Auch onkogene Derivate einiger Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen können für eine konstitutive STAT-Aktivität in Zellen verantwortlich sein (Garcia *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1995). Aber auch eine durch Mutationen hervorgerufene Liganden-unabhängige STAT-Aktivierung ist möglich (Coppo *et al.*, 2003). Bromberg *et al.* konnten eine konstitutiv aktive Mutante von STAT3 identifizieren, die als STAT3C bezeichnet wird (Bromberg *et al.*, 1999). Dabei besitzt STAT3C die Fähigkeit, Tumore in Nacktmäusen zu erzeugen. Wird in kultivierten Zellen die Aktivität des STAT3 inhibiert, z.B. durch die Expression einer dominant negativen Variante des STAT3, kann Apoptose induziert werden (Bromberg *et al.*, 1999). Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von STAT3 zu unterdrücken, ist die Anwendung von si- oder shRNAs, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.4 Viraler Gentransfer zur Tumorthherapie

Die grundlegende Voraussetzung aller verwendeten gentherapeutischen Methoden ist die Übertragung der therapeutisch-wirkende DNA bzw. RNA zu den Zielzellen. Dabei kann der Gentransfer direkt in den Zielorganismus erfolgen (*in vivo*) oder durch das Einbringen der DNA in isolierte Körperzellen und der anschließenden Reimplantierung der Zellen (*ex vivo*) (Anderson, 1998). Um das genetische Material *in vivo* einschleusen zu können, wird ein Vehikel benötigt, welches als Vektor bezeichnet wird. Der ideale Vektor für die Gentherapie sollte folgende Eigenschaften aufweisen (Somia and Verma, 2000): Seine Herstellung sollte einfach und effizient sein. Der Transfer in die Zielzellen sollte selektiv und mit hoher Effizienz erfolgen. Die Genexpression sollte stabil und gegebenenfalls regulierbar sein. Außerdem sollte der Vektor eine ausreichende Aufnahmekapazität für die Transferegene haben, sowie keine Toxizität und Immunogenität in den Zielzellen hervorrufen. Zur Einschleusung von DNA in die Zielzellen stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung: der virale und der nicht-virale Gentransfer. Jedoch keines der zurzeit verfügbaren Vektorsysteme kann allen Anforderungen gerecht werden. Daher hängt die Wahl des verwendeten Vektorsystems immer von der jeweiligen Fragestellung ab (Sliva, 2006). Abbildung 1-12 zeigt einen Überblick der verwendeten Gentransfersysteme aller bis 2010 weltweit angemeldeten klinischen Studien.

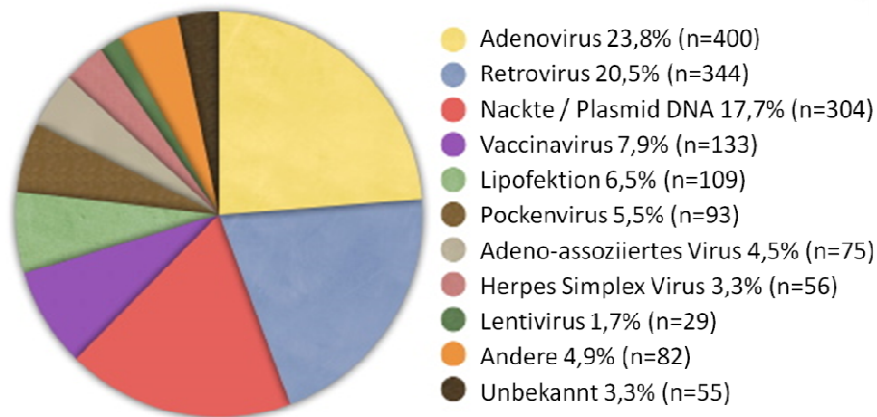


Abbildung 1-12: Verwendete Gentransfersysteme aller weltweit angemeldeten klinischen Studien. Stand 2010; verändert nach *Journal of Gene medicine* (<http://wiley.co.uk/genmed/clinical>).

1.4.1 Murine Leukämieviren (MLV) als Transfervehikel

In der Krebsgentherapie sind die retroviralen Vektoren neben den adenoviralen Vektoren die am häufigsten angewandten Gentransfersysteme (Abbildung 1-12). Sie sind in der Lage eukaryotische Zellen sehr effizient zu infizieren und das Transgen in das Genom der Wirtszellen zu inserieren. Hierdurch wird eine Expression des Transgens über einen längeren Zeitraum gewährleistet. Des Weiteren besitzen γ -Retroviren einen natürlichen Tumortropismus, da sie sich nur in teilenden Zellen verbreiten. Die meisten retroviralen Vektoren basieren auf dem murinen Leukämievirus (MLV).

Retroviren werden in 7 Genera unterteilt, α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren, Lentiviren und Spumaviren. MLV gehört zu den sehr einfach strukturierten γ -Retroviren, deren Genom nur für die Hüll- und Strukturproteine sowie die viralen Enzyme kodiert. Die α - und β -Retroviren besitzen ebenfalls ein sehr einfaches Genom. Im Gegensatz hierzu exprimieren die δ - und ε -Retroviren und Lentiviren zusätzliche regulatorische und akzessorische Proteine.

Die Genomorganisation von MLV

Charakteristisches Merkmal der Familie der Retroviren ist die Reverse Transkriptase (RT), die das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA übersetzt (Temin and Mizutani, 1970). Das Genom der Retroviren besteht aus zwei identischen RNA-Einzelsträngen, welche von der virusproduzierenden Zelle gebildet wird und somit die Charakteristika eukaryotischer messenger RNA (mRNA) (5'-Cap-Struktur, 3'-Polyadenylierung) aufweist. Die virale RNA des MLV ist ca. 7000 Basen lang (Shinnick *et al.*, 1981). Nach der reversen Transkription

durch die virale Reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA und der anschließenden Integration in das zelluläre Genom als sogenanntes Provirus, enthält die provirale DNA an beiden Enden des Genoms die so genannten *long terminal repeats* (LTR). Sie enthalten verschiedene Elemente wie Promotoren und *enhancer* die die Transkription des Provirus regulieren (Wagner, 2004). Der Leserahmen von MLV beinhaltet die Strukturproteine (Gag), die Replikationsenzyme (Pol) und die Hüllproteine (Env). Das *gag* Gen am 5'-Ende kodiert für das gag-Polypeptid, welches durch die virale Protease in die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine gespalten wird. Diese Strukturproteine bilden im reifen Viruspartikel den Core. Das *pol* Gen kodiert die für die Virusreplikation notwendigen Enzyme: die reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Integrase (IN), welche das Virusgenom in das Wirtsgenom integriert, und die virale Protease (PRO), die die als Polypeptide translatierten Gag-Pol-Proteine spaltet. Das *env* Gen kodiert die Proteine der Virushülle, welche für die Interaktion des Virus mit seinem Rezeptor an der Zelloberfläche verantwortlich sind und somit eine Fusion des Virus mit der Zellmembran ermöglichen. In Abbildung 1-13 ist ein retrovirales Viruspartikel und sein Genom schematisch dargestellt.

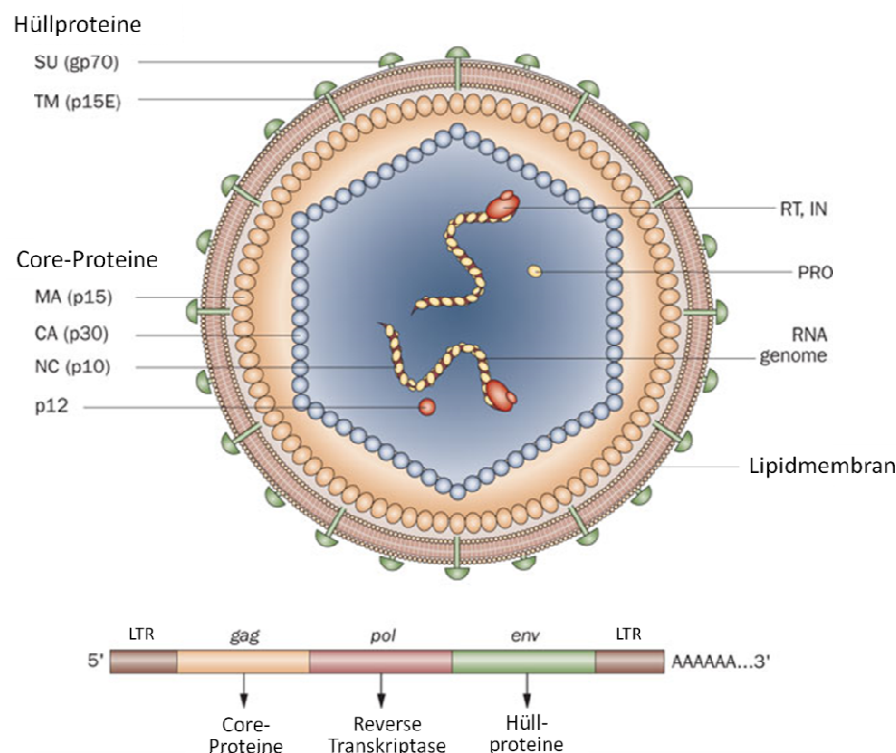


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung eines retrovirealen Viruspartikel und seinem Genom. Die viralen Core-Proteine werden vom *gag* Gen kodiert (Matrix [MA], Kapsid [CA], Nukleokapsid [NC] und p12), das *pol* Gen kodiert die viralen Enzyme (Protease [PRO], reverse Transkriptase [RT] und Integrase [IN]) und die Hüllproteine werden vom *env* Gen kodiert (Oberflächenanteil [SU] und Transmembrananteil [TM]). Das virale Partikel besitzt eine doppelte Lipidhülle und zwei RNA Genome (verändert nach Silverman *et al.*, 2010).

Der Infektionszyklus von MLV

Der Infektionszyklus von replikationsfähigen Retroviren ist in Abbildung 1-14 dargestellt. Der Zyklus kann in eine frühe und eine späte Phase eingeteilt werden (Varmus and Swanström, 1982). Die frühe Phase beginnt mit der spezifischen Bindung der viralen Hüllproteine mit den zellulären Rezeptorkomplexen (Adsorption). Nach Fusion von Virus und Zellmembran wird das retrovirale Core in die Wirtszelle aufgenommen und in das Zytoplasma entlassen. Eine Konformationsänderung innerhalb des Cores bewirkt die Aktivierung der Reversen Transkriptase, welche die doppelsträngige DNA-Kopie (virales Provirus) der genomischen viralen RNA synthetisiert (reverse Transkription). Das Provirus bleibt mit den Core-Komponenten verbunden und wird als Präintegrationskomplex einschließlich der viralen Integrase in den Kern transportiert (Bowerman *et al.*, 1989). Bei MLV erfolgt dieser Transport nur bei Auflösung der Kernmembran während der Mitose (Roe *et al.*, 1993), dies führt zu einer Begrenzung der Infektion auf sich teilende Zellen (Miller *et al.*, 1990a). Andere Retroviren wie z. B. Lentiviren besitzen Kernlokalisationssignale und können daher auch durch die intakte Kernmembran sich nicht teilender Zellen gelangen (Lewis and Emerman, 1994). Das Provirus wird nun von der viralen Integrase in das zelluläre Genom integriert. Der Ort der Integration ist nicht spezifisch und kann prinzipiell in allen Teilen des Genoms liegen. Hierbei werden Orte aktiver Transkription bevorzugt (Wu *et al.*, 2003). Durch die Promotoraktivität der 5'-LTR wird die Transkription der viralen Gene initiiert und damit die späte Phase des Infektionszykluses eingeleitet. Die Transkription der proviralen DNA erfolgt durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle. Die entstandene RNA wird partiell gespleißt und ins Zytoplasma transportiert. Die Gag-Pol-Vorläuferproteine werden von der Volllängen-RNA translatiert. Die Translation der Env-Vorläuferproteine erfolgt von der gespleißten Form der RNA. Die Vorläuferproteine werden im Zytoplasma und später auch im Virion zu reifen Proteinen prozessiert. Die Volllängen-RNA dient gleichzeitig als virale genomische RNA. Sie wird mithilfe ihres Verpackungssignals ψ in die entstehenden Virionen eingebaut (Prats *et al.*, 1990). Die Env-Vorläuferproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat prozessiert und sekretorisch zur Zellmembran transportiert (Hunter and Swanstrom, 1990). Dort werden nun auch die Gag-Pol-Vorläuferproteine gebunden. Daraufhin kommt es zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche, wobei die Viruspartikel von der zellulären Membran inklusive Env und zelleigener Oberflächenproteinen umhüllt werden. Die Reifung zu infektiösen Viren erfolgt über die Spaltung der Gag-Pol-Vorläuferproteine durch

die virale Protease (Bolognesi *et al.*, 1978; Wagner, 2004). Durch die Expression von Env an der Zelloberfläche wird die Zugänglichkeit der Virusrezeptoren verringert. Durch diese virale Interferenz wird die Superinfektion einer bereits infizierten Zelle mit weiteren Viren verhindert (Coffin *et al.*, 1997).

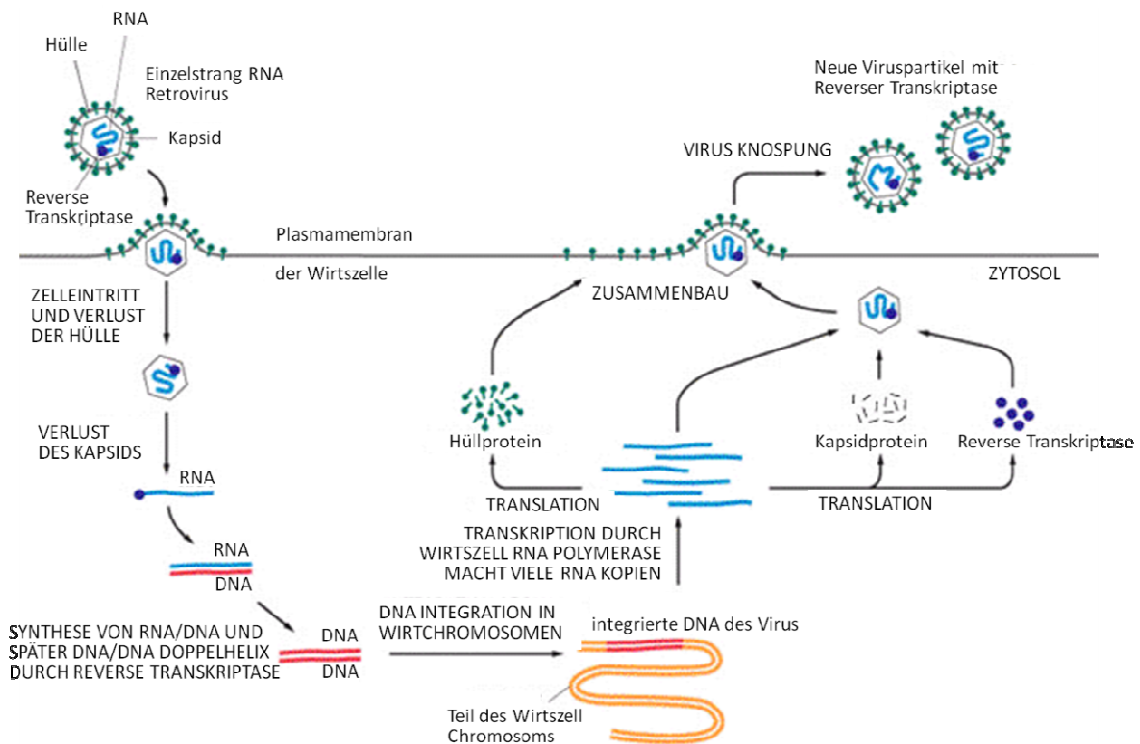


Abbildung 1-14: Schematische Darstellung des retrovirellen Lebenszyklus (Quelle (verändert): www.ibibiobase.com).

Der Wirtstropismus von MLV

Der Wirtstropismus von Retroviren ist von seinen Hüllproteinen abhängig. Dabei kann MLV unterschiedliche Env-Proteine auf seiner Oberfläche tragen, die jeweils verschiedene Virusrezeptoren erkennen. Für MLV gibt es vier verschiedene Wirtstropismus-Subgruppen (Coffin *et al.*, 1997). Das amphotrope (amphos = beide) Env-Protein infiziert Zellen über den rPit-2-Rezeptor, einen natriumabhängigen Phosphat Transporter. Der rPit-2-Rezeptor wird auf allen Säugerzellen ubiquitär exprimiert. Somit kann das amphotrope MLV alle Säugerzellen infizieren (Kavanaugh *et al.*, 1994). Das ecotrope (eco = heim) Hüllprotein kann dagegen nur Maus- und Rattenzellen über den mCAT-1-Rezeptor, einen kationischen Aminosäure-Transporter, infizieren und hat somit einen deutlich eingeschränkteren Wirtstropismus als das amphotrope Virus (Coffin *et al.*, 1997). Neben den exogenen amphotropen und ecotropen

MLVs gibt es noch zwei endogene Virus-Varianten: polytrope (poly = viel) und xenotrope (xenos = fremd) Viren. Polytrope und xenotrope MLVs benutzen beide das Glykoprotein XPR1 als Rezeptor (Battini *et al.*, 1999). Dabei bestimmen Mutationen in dessen Aminosäuresequenz, ob eine Spezies durch eines der beiden Viren infizierbar ist oder nicht (Sliva, 2006).

Risiken der retroviralen Gentherapie

Auch wenn der Einsatz von retroviralen Transfervehikeln in der Gentherapie viele Vorteile bringt, birgt er auch einige Risiken, die bei einem therapeutischen Einsatz berücksichtigt werden sollten. Die Integration des retroviralen Provirus in das Zellgenom kann zur Insertionsmutagenese führen (Temin, 1990; Li *et al.*, 2002). Hierbei werden benachbarte zelleigene Gene - im schlechtesten Fall Protoonkogene - durch die viralen Promotor- und Enhancer-Sequenzen aktiviert, ein Phänomen welches auch in der klinischen Anwendung retroviraler Vektoren zur Therapie von SCID beobachtet wurde (Blaese *et al.*, 1995). Außerdem kann innerhalb retroviraler Vektoren, die mehrere Promotoren enthalten, das so genannte Phänomen der Promotorinterferenz auftreten, wobei interne Promotoren des Vektors durch die viralen Promotor- und Enhancer-Sequenzen beeinflusst werden (Wu *et al.*, 1996). Des Weiteren wird die Stärke der Transgenexpression vom Integrationsort im Chromatin beeinflusst (Jaenisch *et al.*, 1981).

Aus diesen Gründen sollte die Replikation der Viren strikt kontrolliert werden. Dies geschieht beispielsweise durch den Einsatz von replikationsdefizienten Vektoren (vgl. Kapitel 1.4.2) oder durch Verbesserung der Zielgenauigkeit der Virusinfektion. Dabei wird versucht, den Tropismus der Retroviren durch Modifikation der Hüllproteine, auf die gewünschten Zielzellen zu beschränken und somit gesunde Zellen zu verschonen. Hier besitzt MLV einen entscheidenden Vorteil auf Grund seines natürlichen Tumortropismus, da es nur in sich teilenden Zellen replizieren kann.

1.4.2 Retrovirale Vektoren

Da Retroviren potentiell pathogen sind, werden für die meisten klinischen Anwendungen replikationsdefiziente retrovirale Vektoren verwendet. Diese beinhalten das fremde Transgen, können aber nach einer Infektion keine neuen Partikel bilden und keine viralen Gene übertragen. Um dies zu erreichen, werden die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* aus dem

Virusgenom entfernt und für die Vektorproduktion in Form von Hilfskonstrukten in *trans*, also ohne räumlichen Bezug, zur Verfügung gestellt. Diese *trans*-agierenden Elemente verfügen somit über kein virales Verpackungssignal, so dass dieses Genom nicht in den viralen Vektor verpackt wird. Das therapeutische Gen wird mit einem Vektor zur Verfügung gestellt, welcher die LTR-Strukturen des viralen Genoms aufweist und nur die notwendigen regulatorischen Sequenzen für die Verpackung in virale Partikel, reverse Transkription und Integration enthält (*cis*-agierende Elemente). Nur die genetische Information dieses Vektors wird später als virale RNA in den viralen Vektor verpackt. Auf diese Weise ist der retrovirale Vektor alleine nicht in der Lage, die für die Replikation notwendigen Proteine zu erzeugen (Wagner, 2004). Die Produktion retroviraler Vektoren erfolgt in sogenannten Verpackungszellen, welche sowohl die notwendigen Strukturgene in *trans* zur Verfügung stellen als auch das retrovirale Vektorkonstrukt enthalten (Markowitz *et al.*, 1988).

1.4.3 Replikationskompetente Retroviren als Vehikel

Für die Gentherapie von Krebserkrankungen ist eine effiziente Verteilung des therapeutischen Gens und seine dauerhafte Expression in den Tumorzellen von essenzieller Bedeutung. Dies ist durch nicht replizierende virale Vektoren nicht immer gegeben. Nach Applikation von retroviralen oder adenoviralen Vektoren konnte bisher nur eine sehr rudimentäre Transgenexpression in ca. 10% des Tumorgewebes erreicht werden (Ram *et al.*, 1997; Roth and Cristiano, 1997; Vile *et al.*, 2000). Virale Vektoren können nur eine begrenzte Zahl der Zielzellen transduzieren und sich nicht weiter ausbreiten (Sinn *et al.*, 2005). Dagegen kann durch die Anwendung von replikationskompetenten Viren eine sehr effiziente Ausbreitung des Transgens gewährleistet werden. Jede infizierte Tumorzelle wird nach Integration des Virusgenoms zu einer virusproduzierenden Zelle und kann die umliegenden Zellen weiter infizieren und somit das Transgen auf diese übertragen (Miller *et al.*, 1990a) (siehe Abbildung 1-15).

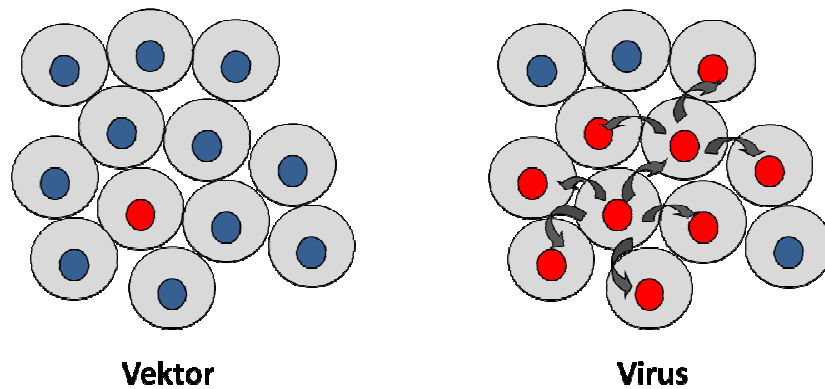


Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der Verteilung eines replikationskompetenten Virus in Zellen im Vergleich zu einem nicht replizierenden Vektor.

In den letzten Jahren wurden viele modifizierte replikationskompetente Viren zur Onkolyse eingesetzt. Beispiele hierfür sind Viren die spezifisch in Tumoren replizieren und zu deren Zelltod führen, wie das Adenovirus, das Herpes Simplex Virus, das Vaccinia Virus und viele mehr (Sliva and Schnierle, 2010). Diese Viren besitzen eine natürliche onkolytische Aktivität, da eine Infektion dieser Viren letztendlich zu einem Zelltod der Wirtszellen führt. Im Gegensatz hierzu besitzt MLV keine natürliche onkolytische Aktivität und eine Infektion ist meist frei von Symptomen. Deshalb wurden in dieser Arbeit shRNA-Expressionskassetten in das MLV-Genom eingebaut um spezifische anti-tumorale Effekte zu erreichen.

Replikationskompetentes MLV als Transfervehikel

Im Gegensatz zu den meisten anderen Viren replizieren Retroviren, und vor allem MLV, ohne die Lyse der Wirtszellen. Außerdem kann durch die stabile Integration des Virusgenoms eine dauerhafte Transgenexpression erreicht werden. Der Vorteil von MLV als replikationskompetentes Vehikel zur Tumor-Gentherapie gegenüber anderer Viren ist unter Anderem der natürliche Tumortropismus von MLV. Es konnte gezeigt werden, dass MLV eine Selektivität und Stabilität des Gentransfers von mehr als 99% in solide Tumore aufweist, selbst wenn es in sehr geringen Konzentrationen appliziert wurde (Tai and Kasahara, 2008a). MLV toleriert Insertionen im viralen Genom bis zu 1,3kb ohne seine Replikationsfähigkeit einzubüßen (Logg *et al.*, 2001). Es gibt bereits einige Studien über die gentherapeutische Verwendung von MLV mit inserierten Selbstmordgenen (Hiraoka *et al.*, 2007). 2006 konnten Sliva und Schnierle zeigen, dass replikationskompetente MLVs die Insertion von shRNAs-Expressionskassetten tolerieren (Sliva and Schnierle, 2006). Die rekombinanten Viren sind

genetisch stabil und sind in ihrer Replikation nicht eingeschränkt. Replikationskompetente MLVs sind somit vielversprechende Werkzeuge für den effizienten Gentransfer von anti-tumoralen shRNAs und ihrer dauerhaften Expression in Tumorzellen.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, onkolytische murine Leukämieviren (MLV) herzustellen und ihre Effektivität *in vitro* und *in vivo* zu testen. Um auch humane Tumore infizieren zu können, wurde das amphotrope MLV (aMLV) eingesetzt. Hierzu wurden folgende Ansätze gewählt:

- Das virale Protein R (VPR) des humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) sollte in das aMLV Genom eingebracht werden, um Apoptose in infizierten Tumorzellen zu induzieren. Zur Detektion von VPR sollte ein VPR-GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) in das aMLV Genom eingebracht werden.
- Außerdem sollte der Transfer von shRNAs durch MLV untersucht werden. Hierzu sollten zwei Ansätze geprüft werden:
 - Der direkte Transfer von pri-miRNA, durch deren Verpackung in MLV basierende Viruspartikel, sollte anhand von miRNAs gegen GFP untersucht werden. Hierzu sollte der Effekt dieser Vektorpartikel auf die Expression des GFP-Proteins in transduzierten Zellen untersucht werden.
 - Schließlich sollte der Transfer von anti-tumoral wirkenden shRNAs durch aMLV untersucht werden. Hierzu wurden der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR, die Proteinkinase PLK1 und der Transkriptionsfaktor STAT3 als Zielstrukturen gewählt. Die shRNAs sollten in das aMLV Genom eingebracht werden und die Funktionalität der shRNAs, sowie deren Stabilität im Virusgenom untersucht werden. Mit validierten rekombinanten aMLVs sollte der anti-tumorale Effekt zuerst *in vitro* und schließlich *in vivo* untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München
Agarose (SeaKem)	Lonza, Basel, Schweiz
<i>Low Melting Point</i> Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Azidothymidin (AZT)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
4'-6-Diamino-2-Phenylindiol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dimethylformamide	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis-Tetraacetat (EGTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
EZ-Vision	Amresco, Solon, USA
fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Geneticin (G 418)	InvivoGene, San Diego, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt

Glycin	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck, Darmstadt
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isoton	VWR, West Chester, USA
Kaliumazetat (KOAc)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid	Baxter, Unterschleißheim
LB-Agar	Merck, Darmstadt
LB-Bouillon (Miller)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Luciferin	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-chlorid (MnCl_2)	Merck, Darmstadt
Methanol (CH_3OH)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
NP40	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco; über Invitrogen, Carlsbad, USA
Pepton	Merck, Darmstadt
Polyethylenimin (PEI)	Merck, Darmstadt

Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
Puromycin	InvivoGene, San Diego, USA
RNaseA	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCL ₂)	Merck, Darmstadt
Saponin	Roth, Karlsruhe
SOB-Medium	Roth, Karlsruhe
SOC-Medium	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Titriplex III	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
Triton x-100	Merck, Darmstadt
TrueBlue	KPL, Gaithersburg, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin 250	Sigma-Aldrich, München
Trypton	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal	Merck, Darmstadt
Xylazinhydrochlorid	Baxter, Unterschleißheim

3.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

3.1.2.1 Zellkultur

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's-Medium</i>)	Biochrom, Berlin
RPMI (Roswell Park Memorial Institute-Medium)	Biochrom, Berlin
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Biochrom, Berlin

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge
Trypsin 2,5 %	Trypsin 250 mit NaOH in PBS ohne Ca und Mg	125g/l pH 7,4
PEI-Reagenz	Polyethylenimin in H ₂ O	18mM
Glucose 25%	D-(+)-Glucose, Monohydrat in H ₂ O	1,4M
Propidiumjodid-Lsg	Propidiumjodid Triton x-100 EDTA RNase A in H ₂ O	50µg/ml 0,1% (v/v) 0,1mM 50µg/ml
FACS-Puffer	BSA EDTA Natriumazid in PBS	1% (w/v) 20mM 0,03% (w/v)
Permeabilisierungslösung	Saponin in FACS-Puffer	0,5%
Fixierlösung	Paraformaldehyd in PBS	4% (w/v)

3.1.2.2 Molekularbiologie

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge
Tris/HCl	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Tris (hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid mit HCl in H ₂ O	77mM 927mM pH 6,8
TAE-Puffer 20-fach	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Essigsäure EDTA 0,5M in H ₂ O	800mM 2,3% v/v 4% v/v

EDTA 0,5M	Titriplex III mit NaOH in H ₂ O	637mM pH7,5
PBS ohne Ca und Mg	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ mit HCl in H ₂ O	138mM 2,7mM 1,5mM 8,2mM pH 7,1
TFB1-Puffer	RbCl ₂ MnCl ₂ KOAc CaCl ₂ Glycerin mit Essigsäure sterilfiltriert	100mM 50mM 30mM 10mM 13% (w/v) pH 5,8
TFB2-Puffer	CaCl ₂ MOPS pH 7,0 RbCl ₂ Glycerin mit NaOH sterilfiltriert	75mM 10mM 10mM 13% (w/v) pH 7,0
KCM	KCl MgCl ₂ CaCl ₂ in H ₂ O	500mM 250mM 150mM
LB-Medium	LB-Bouillon (Miller) in H ₂ O	25g/l
SOB-Medium	Trypton Hefeextrakt MgCl ₂ NaCl KCl in H ₂ O	20g/l 5g/l 0,95g/l 0,5g/l 0,186g/l
SOC-Medium	D-(+) Glucose in SOB-Medium	20mM

LB-Agar	Hefeextrakt Pepton NaCl Agar-Agar in H ₂ O	5g/l 10g/l 10g/l 12g/l
+ Ampicillin	Ampicillin-Stammlösung (286,5 mM in H ₂ O)	1ml/l
+ Kanamycin	Kanamycin-Stammlösung (206,6 mM in H ₂ O)	1ml/l
+ Chloramphenicol	Chloramphenicol-Stammlösung (309,6 mM in H ₂ O)	1ml/l
LB/X-Gal-Agar	Ampicillin-Stammlösung (286,5mM in H ₂ O) X-Gal 2%-Lösung (49mM in Dimethylformamide) IPTG-Lösung (100,8mM in H ₂ O) in LB-Agar	1ml/l 4,5ml/l 2ml

3.1.2.3 Proteinbiochemie

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge
Lysispuffer	NP40 Tris (hydroxymethyl)-aminomethan pH 7,5 EGTA Natriumchlorid in H ₂ O	1% (v/v) 50mM 5mM 150mM
Zu je 7 ml Lysispuffer wurde eine Protease Inhibitor Cocktail Tablette Complete gegeben.		
TBS-Puffer	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan NaCl Tween 20 mit HCl in H ₂ O	50mM 147mM 0,1% (v/v) pH 7,4
Trenngelpuffer	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan SDS in H ₂ O	1,5M 0,4% (w/v)

Sammelgelpuffer	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan SDS in H ₂ O	0,5M 0,4% (w/v)
Western-Blot-Puffer 5-fach	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Glycin SDS Methanol mit HCl in H ₂ O	125mM 950mM 2,6mM 10% (v/v) pH 8,3
SDS-Ladepuffer 4-fach	Glycerol SDS Bromphenolblau Tris-HCl (pH 6,8) In H ₂ O	40% (w/v) 8% (w/v) 0,2% 0,2M
SDS-Laufpuffer 10-fach	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan Glycin SDS in H ₂ O	250mM 1% (w/v) 1921mM

3.1.2.4 Tierexperimente

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge
Ketamin/Rompun (nach Dorothea Kreuz 31.08.2006)	Ketaminhydrochlorid Xylazinhydrochlorid in NaCl-Lsg	84,4M 4,5M

3.1.3 Verbrauchsmaterial

FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
Skalpelle	Braun, Sempach, Schweiz
Nitrozellulosemembran (RotiNC)	Roth, Karlsruhe
Whatmanpapier	Hartenstein, Würzburg
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24- und 96-Loch)	Sarstedt, Nümbrecht
Cryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Einmalspritzen	Braun, Sempach, Schweiz
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Gefäße (PP-Röhrchen)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Glasgefäße	Schott, Mainz
Kunststoffpipetten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Latexhandschuhe	Braun, Sempach, Schweiz
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen (T25, T75 und T175)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen (10cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Mundschutz (Coldex)	Attends, Schwalbach
Hautdesinfektionsmittel (Desderman)	Schülke & Mayr, Norderstedt
Oberflächendesinfektionsmittel (Terralin)	Schülke & Mayr, Norderstedt
Entsorgungsbeutel zum Autoklavieren	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Bakterien-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, 0,45µm (für Spritzen)	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter, 0,45µm (für Falcon-Gefäße)	Millipore, Bedford, USA
Zellsiebe	BD, Heidelberg

3.1.4 Enzyme, Standards und Kits

„LookOut [®] Mycoplasma PCR Detection Kit“	Sigma-Aldrich, München
Antarktische Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP-Mix	Bioline, Luckenwalde
EZ-Vision	Amresco, Solon, USA
FuGene [®] 6 – Transfection Reagent	Roche, Mannheim

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Kollagenase	Sigma-Aldrich, München
NucleoBond® Xtra Maxi Plus Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin ® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR Master Kit	Roche, Mannheim
Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche, Mannheim
Restriktions-Endonukleasen	NEB, Frankfurt am Main
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt am Main
T4-DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt am Main

3.1.5 Geräte und Apparaturen

Gerät	Typ	Firma
Autoklav	Varioklav	H+P, Oberschleissheim
Bakterieninkubator	Funktion Line	Heraeus Sorvall, Hanau
Brutschränke	BBD 6220	Hereaus, Thermo Scientific
Durchflusszytometer (FACS)	LSR II	BD, Heidelberg
Eismaschine	AF80	Scotsman, USA
Elektorasierer	Arco Typ 1854	Moser, Unterkirnach
Gelelektrophorese-Apparatur	Mini Horizontal Submarine Unit	Hoefer, Holliston, USA
Horizontalschüttler		Heidolph Instruments, Unimax 1010
<i>In vivo</i> Imager	IVIS200	Xenogen Bioscience, Cranbury, USA
Kipproller	RollerMixer SRT6	Stuart, UK

Konzentrator	Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Kühl-/ Gefrierschränke	4°C/-20°C -80°C	Liebherr, Biberach Heraeus Sorvall, Hanau
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle		Bosch, Gerlingen- Schillerhöhe
Narkosegerät	Matrx	Midmark, Versailles, USA
Ohrlochzange	DF 401	Aesculap, Tuttlingen
Schieblehre	GT-DC-01	Workzone, Hertfordshire, GB
SDS- Gelelektrophorese- Apparatur	Mini-Protean III	BioRad, München
Spannungsgeräte	Power-Pac 300 Power-Pac 3000	BioRad, München BioRad, München
Spektrophotometer	NanoDrop2000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbänke	Sterilgard III Advanced	The Baker Company, USA
Stickstoffbehälter	Chronos/Apollo	Messer, Sulzbach
Thermocycler	Professional Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Thermomixer compact Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
UV- Detektionsanlage		Intas, Göttingen
Vakuumpumpe		Labotechnik, Herne
Vortexapparatur	Vibrofix VF1 electronic	IKA, Staufen
Waagen	LA1200S	Sartorius, Göttingen

	TE214S-OCE	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder		GFL, Burgwedel
WB-Beladungshilfe	Laborspritze	Unimetrics,
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Marienfeld, Lauda Königshofen
Zellzähler	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifugen	RC 26 Plus (Rotor SLA-1500) Eppendorf 5810R (Rotor A-4-62) Biofuge fresco (Rotor 3325B) Eppendorf 5415C (Rotor F-45-18-11) Galaxy MiniStar Biofuge primoR (Rotor 7590) Megafuge 1.0 R	Heraeus Sorvall, Hanau Eppendorf, Hamburg Heraeus Sorvall, Hanau Eppendorf, Hamburg VWR, Darmstadt Heraeus Sorvall, Hanau Heraeus Sorvall, Hanau
Imaging System	Odyssey Infrared	LiCor, Bad Homburg

3.1.6 Software

Sequenzdarstellung	VectorNTI Suite 9 DNA-Star	Invitrogen, Darmstadt DNASRRAR, Madison, USA
Bilddarstellung	Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems, Münschen
FACS-Auswertung	Flowjo 7.2.4	Flowjo, Ashland, USA
WB-Auswertung	Odyssey 2.1	LiCor, Bad Homburg
Statistik-Auswertung	SAS/STAT 9.2	SAS, Cary, USA
Graphdarstellung	Office-Excel GraphPad-Prism	Microsoft, Unterschleißheim GraphPad, La Jolla, USA

3.1.7 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
HB101	F ⁻ Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>leuB6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) <i>rpsL20</i> (Str ^r) <i>xyl-5 mtl-1 recA13</i>	Sigma-Aldrich, München
Sure	<i>e14-</i> (<i>McrA-</i>) <i>D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg

3.1.8 Oligonukleotide

Kürzel	Name	Sequenz 5'→3'	Verwendungszweck	T _M
CW3	pAZE-env_fwd	CTATTTGAGACAGGCCAA GGATGG	Überprüfung der shRNA-Expressionskassette (mit integrierten Schnittstellen)	65°C
CW4	pAZE-3'-LTR_rev	GTGCATGCTAGCTTGCCA AACCTACAGG		64°C

3.1.9 Plasmide

Im Folgenden sind die Plasmide aufgelistet, welche für diese Arbeit verwendet wurden. Unter Expressionskassette ist immer ein zu exprimierendes Gen mit dem dazugehörigen Promoter zu verstehen. Dabei wurde für shRNAs stets der H1-Polymerase III-Promoter und für miRNAs stets der U6-Polymerase III-Promoter verwendet.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pAZE-GFP	amphotropes MLV mit IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	(Logg <i>et al.</i> , 2001)
pAZE-miNons	amphotropes MLV mit miNonsilencing-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	diese Arbeit
pHIT-G	Expressionsplasmid für das VSV-Glycoprotein	(Fouchier <i>et al.</i> , 1997)

pHIT-60	<i>gag/pol</i> unter CMV-Promoter	(Miller and Rosman, 1989)
pSM2-miNons	Expressionsplasmid für miNonsilencing	Open Biosystems, Huntsville, USA
pBabe-STAT3C	Expressionsplasmid für das konstitutiv aktive STAT3-FLAG	(Dechow <i>et al.</i> , 2004)
pAZE-shSTAT3-3fwd (vor IRES)	amphotropes MLV mit shStat3-Expressionskassette vor der IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shSTAT3-3 (nach IRES)	amphotropes MLV mit shStat3-Expressionskassette nach der IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shSTAT3-3fwd ΔIRES-GFP	amphotropes MLV mit shStat3-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shSTAT3-3rev (vor IRES)	amphotropes MLV mit shStat3-Expressionskassette in reverser Richtung vor der IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shEGFR-back	amphotropes MLV mit shEGFR-Expressionskassette in reverser Richtung vor der IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shEGFR-fwd (vor IRES)	amphotropes MLV mit shEGFR-Expressionskassette vor der IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shEGFR-fwd (nach IRES)	amphotropes MLV mit shEGFR nach der IRES-GFP-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pLTR-EGFR	Expressionsplasmid für EGFR	
pAZE-miEGFR_54	amphotropes MLV mit miEGFR (54)-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	diese Arbeit
pSM2-miEGFR_54	Expressionsplasmid für miEGFR (54)	Open Biosystems, Huntsville, USA

pcDNA PLK1	Expressionsplasmid für das humane PLK1-MYC Protein	Stebhardt
pAZE-shPLK1_2fwd	amphotropes MLV mit shPLK1 (2)-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shPLK1_2rev	amphotropes MLV mit shPLK1 (2)-Expressionskassette in reverser Richtung am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-shPLK1_1fwd	amphotropes MLV mit shPLK1 (1)-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	K. Sliva
pAZE-miPLK1_8	amphotropes MLV mit miPLK1 (8)-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	diese Arbeit
pAZE-miPLK1_11	amphotropes MLV mit miPLK1 (11)-Expressionskassette am 5'-Ende von Env	diese Arbeit
pSuper-shPLK1_1	Expressionsvektor für shRNA gegen PLK1 (1) unter H1-Polymerase III-Promoter	K. Sliva
pSuper-shPLK1_2	Expressionsvektor für shRNA gegen PLK1 (2) unter H1-Polymerase III-Promoter	K. Sliva
pSM2-miPLK1_11	Expressionsvektor für miRNA gegen PLK1 (11) unter U6-Polymerase III-Promoter	Open Biosystems, Huntsville, USA
pSM2-miPLK1_8	Expressionsvektor für miRNA gegen PLK1 (8) unter U6-Polymerase III-Promoter	Open Biosystems, Huntsville, USA
pAZE-VPR	amphotropes MLV mit einer IRES-VPR-GFP Kassette am 5'-Ende von Env	diese Arbeit
pEGFP-VPR	Plasmid mit einem eGFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors	NIH, USA
pSM2-mi-eGFP	Expressionsvektor für miRNA gegen eGFP unter U6-Polymerase III-Promoter	Open Biosystems, Huntsville, USA

pczCFG5-IEGZ	MLV basierendes Vektortransferplasmid mit IRES-eGFP-Zeo Kasette	(Berberich-Siebelt <i>et al.</i> , 2000; Temme <i>et al.</i> , 2003)
pczCFG5-mi-eGFP	MLV basierendes Vektortransferplasmid mit einer miRNA gegen eGFP	diese Arbeit

3.1.10 Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Verwendung	Referenz
STAT3 (# sc-482)	Polyklonaler Kaninchenantikörper	WB 1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
EGFR (# sc-03)	polyklonaler Kaninchenantikörper, IgG	WB 1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
PLK1 (# sc-17783)	monoklonaler Mausantikörper, IgG _{2a}	WB 1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Flag M2 (# F1804)	monoklonaler Mausantikörper, IgG ₁	WB 1:10 000	Sigma-Aldrich, München
MLV-p30 Gag (Zelllinie # CRL-1912)	monoklonaler Rattenantikörper, IgG ₁	IPA 1:500	ATCC, Wesel
MLV-Env 713	monoklonaler Ziegenantikörper	WB 1:1000	Quality Biotech, Camden, USA
β-Aktin (# A5441)	monoklonaler Mausantikörper, IgG ₁	WB 1:10 000	Sigma-Aldrich, München
Ratte-HRP	polyklonaler Schafantikörper, mit HRP gekoppelt, IgG	IPA 1:1000	AbD Serotec, Martinsried
Kaninchen-IRDye 680	polyklonaler Ziegenantikörper, mit IRDye 680 gekoppelt, IgG	WB 1:15 000	LiCor, Bad Homburg
Maus-IRDye 800	polyklonaler Ziegenantikörper, mit IRDye 800 gekoppelt, IgG	WB 1:15 000	LiCor, Bad Homburg

3.1.11 Zellen

Zelllinie	Bezeichnung	Kulturmedium	Referenz
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen mit Adenovirus und SV40-T-Antigen transformiert	DMEM	ATCC: CRL-1573
4T1	spontan entstandene murine Tumorzelllinie	DMEM	ATCC: CRL-2539
DHΔE	embryonale Mausfibroblasten stabil transfiziert mit EGFRvIII	DMEM + 1mg/ml G418	(Schmidt <i>et al.</i> , 1998)
Gli36	humane Glioblastom-Zelllinie	DMEM	Dr. David N.; Charlstown, USA
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie	RPMI	ATCC: CCL-2
HepG2	humane Leberkarzinom-Zelllinie	DMEM	ATCC: HB-8065
HT-1080	humane Fibrosarkom-Zelllinie	DMEM	ATCC: CCL-121
HT-1080-GFP	humane Fibrosarkom-Zelllinie die GFP stabil exprimieren	DMEM + 0,6mg/ml G418	S. Schaser
HT-1080-HLUC	humane Fibrosarkom-Zelllinie die Luciferase stabil exprimieren	DMEM + 0,6mg/ml G418	S. Schaser
MCF-7	humane Adenokarzinom-Zelllinie	RPMI	ATCC: HTB-22
NIH 3T3	embryonale Mausfibroblasten	DMEM	ATCC: CCL-92
SKOV3	humane Ovarialkarzinom-Zelllinie	RPMI + 0,1mg/ml Gentamicin	Oncotest GmbH
ST-Iowa	<i>Sus scrofa</i> (porzin) Testesfibroblasten-Zelllinie	DMEM	ATCC: CRL-1746
TU 2449	murine Glioma-Zelllinie (spontan entstanden in GFAP-v-src transgenen Mäusen)	DMEM	(Pohl <i>et al.</i> , 1999)
TU 9648	murine Glioma-Zelllinie (spontan entstanden in GFAP-v-src transgenen Mäusen)	DMEM	(Pohl <i>et al.</i> , 1999)
U2OS	humane Osteosarkom-Zelllinie	RPMI	ATCC: HTB-96

U87 CD4-CXCR4	humane Glioblastom-Zelllinie die CD4 und CXCR4 stabil exprimiert	DMEM + 300µg/ml G418 + 1µg/ml Puro	ATCC: HTB-14
Myla	humane T-Zelllinie, isoliert aus einem Patienten mit Mycosis Fungoides	RPMI	(Woetmann <i>et al.</i> , 2007)

3.2 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitsarbeitsbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 10% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden in Plastik-Gewebeflaschen, Schalen oder Platten kultiviert. Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen 1:10 passagiert. Sämtliche Kulturmedien wurden mit 10% FKS und 2mM L-Glutamin versetzt. Bei Bedarf wurde dem Medium zusätzlich Penicillin und Streptomycin zugegeben.

Zum Teilen von adherenten Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1% Trypsin proteolytisch von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in einer 1:10 Verdünnung ausgesät. Suspensionszellen wurden pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und ebenfalls in einer 1:10 Verdünnung ausgesät.

3.2.2 Kultivierung von Zellen in Soft-Agar

Viele Krebszellen können im Gegensatz zu gesunden Zellen auch ohne Zell-Zellkontakt wachsen. Dies kann im Soft-Agar untersucht werden, da hier Zellen kontaktunabhängig und damit dreidimensional wachsen.

Die Kultivierung in Soft-Agar erfolgte stets in 6-Loch Platten. Für den Agar wurde Agarose mit einem geringen Schmelzpunkt (low melting point) in Medium mit 20% FKS in der Mikrowelle geschmolzen. Zunächst wurde ein Boden mit 1,5ml 0,7%igem Agar gegossen und

für 15 Minuten bei 4°C ausgehärtet. Anschließend wurden 10⁴ Zellen pro ml in 0,35%igem, 37°C warmen Agar aufgenommen und je ein Loch mit 1ml der Zellsuspension überschichtet. Die Zellen in Soft-Agar wurden im Brutschrank inkubiert. Zwei Mal pro Woche wurde dem Ansatz 1ml Medium mit 20% FKS zugegeben.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

3.2.3.1 Zellzahlbestimmung mit Hilfe des *Coulter Counters*

Um die Zellzahl zu bestimmen wurde eine 1:1000 Verdünnung der Zellsuspension in 10ml Isoton angesetzt und die Zellzahl mit Hilfe des *Coulter Counter*-Gerät bestimmt.

3.2.3.2 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Fuchs Rosenthal-Zählkammer

Um tote Zellen auszuschließen, wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,4% in PBS) versetzt. Hierbei werden nur tote Zellen auf Grund ihrer erhöhten Membrandurchlässigkeit blau angefärbt. Das Auszählen der lebenden Zellen erfolgte in einer Fuchs Rosenthal-Zählkammer. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellen}/_{ml} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{5000}$$

3.2.4 Transfektion

3.2.4.1 Transfektion mit FuGENE®

Die Transfektion mit FuGENE® beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Sie erfolgte stets in 6-Loch Platten. Am Vortag der Transfektion wurden 10⁶ Zellen ausgesät und über Nacht zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Zu 94µl serumfreiem Medium wurden 6µl FuGENE® gegeben und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2µg DNA zugegeben und weitere 15 Minuten inkubiert. Schließlich wurde der komplette Ansatz tröpfchenweise auf ein Loch verteilt.

3.2.4.2 Transfektion mit Polyethylenimin

Für die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) wurden die Zellen einen Tag zuvor in das gewünschte Reaktionsgefäß ausgesät und über Nacht zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Für die Transfektion wurde das Medium mit serumfreiem Medium ersetzt und zwei Lösungen wie folgt hergestellt:

Reaktionsgefäß	Lösung A		Lösung B	
	DNA in H ₂ O	5% Glucose	PEI-Reagenz	5% Glucose
T-175 Flasche	70µg in 70µl	310µl	70µl	310µl
10cm Schale	22µg in 25µl	100µl	25µl	100µl
6-Loch Platte	3,8µg in 3,8µl	16,8µl	3,8µl	16,8µl

Lösungen A und B wurden jeweils 1 Minute durch Vortexen gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden Lösung A und B vereinigt, 1 Minute durch Vortexen gemischt und ebenfalls 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde das 3-fache Volumen Medium mit 1% Glukose zu dem Ansatz gegeben und der komplette Ansatz auf den Zellrasen verteilt. Die Zellen wurden für 4 bis 6 Stunden im Brutschrank inkubiert und schließlich mit 10% FKS versetzt.

3.2.5 Kryokonservierung

Zur dauerhaften Lagerung von Zellen wurden die Methode nach (Doyle *et al.*, 1988) verwendet. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen in 1,3ml FKS mit 10% DMSO aufgenommen und in Kryogefäße überführt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -120°C.

3.2.6 Test auf Mycoplasmen

Der Test auf Mycoplasmen erfolgte mit dem „LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit“ der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers. Alternativ wurde auf Mycoplasmen mit DAPI getestet. Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläschen zu einer Konfluenz von ca.

60% ausgesät und mit Methanol fixiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei RT in einer Anfärbelösung (60nM DAPI in Methanol). DAPI bindet selektiv an die DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe (Anregungswellenlänge: 340nm; Emissionswellenlänge: 489nm). Eine Mycoplasmen Kontamination zeichnet sich durch eine Anfärbung außerhalb des Zellkerns aus, im Gegensatz zu mycoplasmenfreien Zellen bei denen nur der Zellkern gefärbt wird.

3.2.7 Retrovirale Methoden

3.2.7.1 Virusproduktion

Zur Herstellung von murinen Leukämieviren (MLV) wurden HEK293T Zellen mit Virusgenom-kodierenden Plasmiden transfiziert. Nach 48 Stunden wurde der virushaltige Medium-Überstand geerntet und durch 45µm Sterilfilter filtriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.7.2 Vektorproduktion

Zur Herstellung von Vektorpartikel wurden HEK293T Zellen mit dem Transfervektor und zwei Hilfsplasmiden ko-transfiziert. Dabei kodiert ein Hilfsplasmid *gag* und *pol* und das zweite Plasmid das *env*-Protein VSV-G. Für die Transfektion wurden folgende Plasmidverhältnisse eingesetzt: 10 (Transfervektor) : 9 (*gag/pol*-Expressionsplasmid) : 1 (VSV-G-Expressionsplasmid). Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 36 Stunden der vektorhaltige Überstand geerntet. Nach der Sterilfiltration (45µm Filter) wurde der Überstand direkt auf Zellen zur Transduktion gegeben.

3.2.7.3 Anreicherung von Viren und Vektoren

Viruspartikel bzw. Vektorpartikel wurden durch langsame Sedimentation angereichert. Hierfür wurden sie für 16 Stunden bei 3345g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet (nicht sichtbar) in einem kleineren Volumen Medium oder PBS aufgenommen.

3.2.7.4 Transduktion und Infektion

Zellen wurden durch Zugabe von vektorhaltigen Zellkulturüberständen transduziert. Drei Stunden nach der Transduktion wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Die Infektion von Zellen mit replikationskompetenten Viren erfolgte entweder wie eine Transduktion oder direkt durch Transfektion von Plasmiden, die das gesamte Virusgenom kodieren.

3.2.7.5 Virus-Quantifikation durch Immunoperoxidase-Assay

Die Quantifikation von MLV wurde mittels einem Immunoperoxidase-Assay (IPA) durchgeführt. Einen Tag vor der Titration wurden 5×10^4 NIH-3T3 bzw. HT1080 Zellen in 24-Loch Platten ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden 10-fach Verdünnungen des zu titrierenden Virus in Medium angesetzt und 200 µl/Loch auf die Zellen gegeben. Nach 3 Stunden wurde das Medium durch frisches ersetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Methanol fixiert und anschließend mit PBS mit 2% BSA für 15 Minuten bei RT inkubiert. Es erfolgte die Inkubation mit 250 µl/Loch des ersten Antikörpers (Ratte anti-MLV-Gag) 1:500 verdünnt in PBS mit 1% BSA für eine Stunde bei 37°C. Nach dreimaligem waschen mit PBS wurden die Zellen mit 250 µl/Loch des Zweit-Antikörpers (anti-Ratte Peroxidase gekoppelt) 1:1000 verdünnt in PBS mit 1% BSA für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde mittels True Blue der Firma KPL für 15 Minuten bis über Nacht umgesetzt. Mit MLV infizierte Zellen zeigten eine blaue Färbung und wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Quantifizierung von Viren welche eine GFP-Expressionskassette tragen, erfolgte durch direkte Auszählung von GFP positiven Zellen. Der Titer wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{positive Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Virus Volumen (ml)}} = \text{IE/ml}$$

3.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (meist Zellen) in einem Flüssigkeitsstrom.

Die Zellen werden durch eine Kapillare gesogen und passieren verschiedene Laserstrahlen. Das dabei entstehende Streulicht wird von zwei Detektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC) ist ein Maß für das Volumen der Zellen und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter = SSC) wird von der Granularität und Struktur der Zellen beeinflusst. Des Weiteren kann emittiertes Fluoreszenzlicht mit weiteren Detektoren gemessen werden. So können beispielsweise verschiedene Proteine oder DNA mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern oder fluoreszierenden Chemikalien markiert werden und durch Anregung von Laserstrahlen analysiert werden. Durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren ist es sogar möglich mehrere Proteine gleichzeitig zu analysieren. In Abbildung 3-1 ist der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers dargestellt.

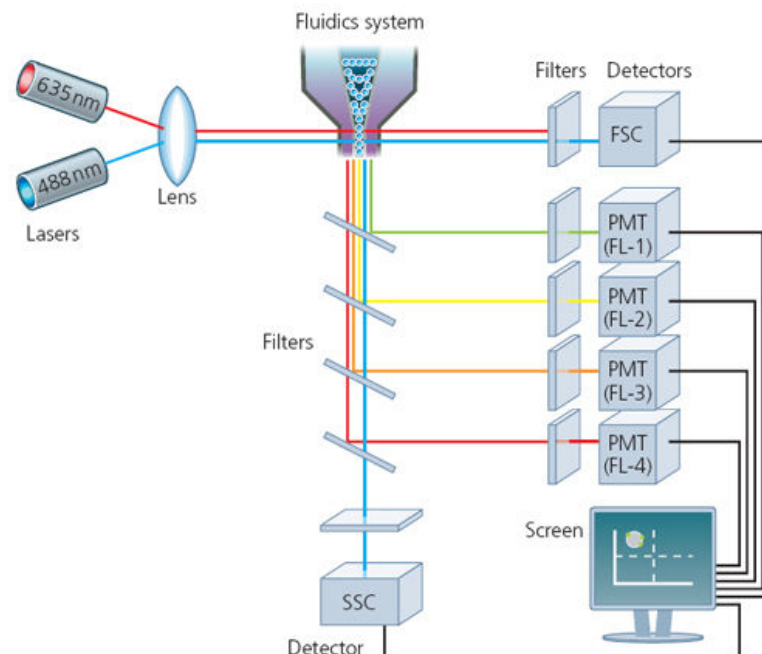


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung eines typischen Durchflusszytometers (verändert nach Rahman, 2008).

3.2.8.1 Zellzyklusanalysen

Der Zellzyklus der Zelle besteht aus der Kernteilung (Mitose oder M-Phase) und der Zwischenphase (Interphase). Die Interphase wird in die G₁-, S- und G₂-Phase unterteilt (Abbildung 3-2). Die unterschiedlichen Phasen unterscheiden sich unter Anderem in ihrem Chromosomengehalt. Die G₁-Phase schließt direkt an die Mitose an. Die Zellen fangen hier wieder an zu wachsen und die Chromosomen liegen hier in einem Chromatid vor. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Der Chromosomensatz verdoppelt sich in dieser Phase, so dass in der G₂-Phase ein zweifacher Chromosomensatz vorliegt. In dieser Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor in welcher die Teilung der Chromosomen, des Zellkerns und der Zelle stattfindet. Ausdifferenzierte Zellen verbleiben in der Regel vorerst in der G₁-Phase, welche dann als G₀-Phase bezeichnet wird, können aber auch wieder in die G₁-Phase eintreten.

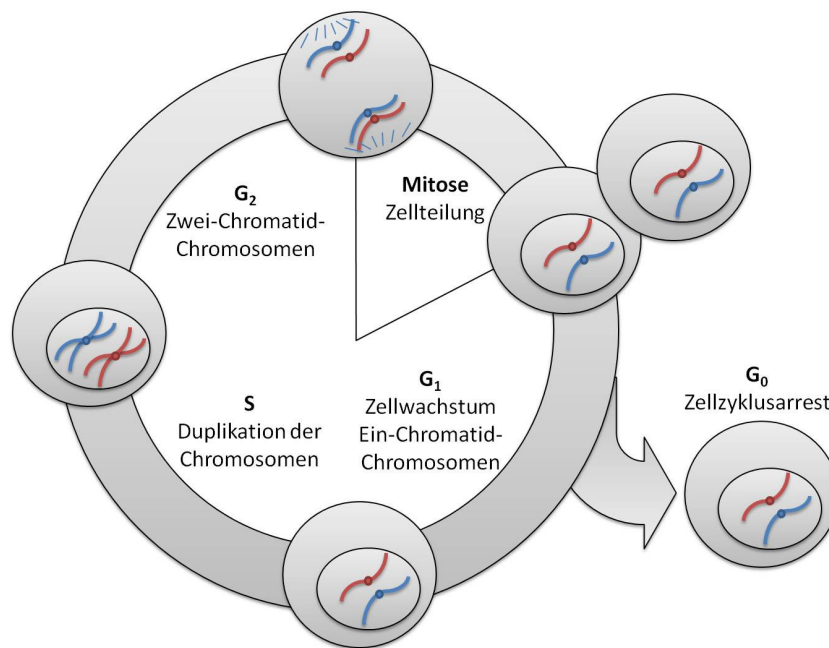


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

Für Zellzyklusanalysen wurden die Zellen trypsinisiert und zusammen mit ihrem Zellkulturüberstand in FACS-Röhrchen überführt. Nach der Pelletierung bei 470g für 5 Minuten wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurde das Pellet in 150µl PBS aufgenommen und zu der Zellsuspension langsam 350µl eiskalter 70%iger Ethanol getropft. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bis über Nacht bei 4°C wurden die Zellen nochmals pelletiert.

Nach der Trocknung des Zellpellets wurden die Zellen in 100µl Propidiumjodid-Lösung resuspendiert und für 30 bis 60 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS verdünnt und direkt im Durchflusszytometer gemessen.

Propidiumjodid färbt direkt die DNA an. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional mit dem DNA-Gehalt der Zelle. Da in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedliche Chromosomensätze vorliegen, kann man anhand der Fluoreszenzintensität jede Zelle der Phase des Zellzyklus zuordnen, in welcher sie sich gerade befindet. In Abbildung 3-3 ist ein typisches Zellzyklusprofil dargestellt. Bei apoptotischen Zellen degradiert die DNA, somit werden diese vor dem G₀/G₁-Ausschlag detektiert.

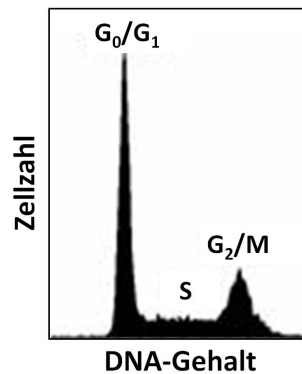


Abbildung 3-3: Darstellung eines Zellzyklusprofils im Durchflusszytometer. Die zugehörigen Zellzyklusphasen sind angegeben.

3.2.8.2 Färben von Zellen

Für die Analyse von Zellproteinen wurden die Zellen geerntet und in FACS-Röhrchen überführt. Nach der Pelletierung bei 470g für 5 Minuten wurden die Zellen mit 500-1000µl FACS-Puffer gewaschen und erneut pelletiert.

Färben von Oberflächenproteinen

Um Oberflächenproteine zu färben wurden die Zellen nun in 100µl FACS-Puffer mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (verdünnt nach Angaben des Herstellers) aufgenommen und für eine Stunde bei 4°C Dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und in 500µl PBS mit 2% PFA zum Fixieren aufgenommen. Nach

einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und in 300µl FACS-Puffer aufgenommen.

Färben von intrazellulären Proteinen

Für die Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen nach dem Waschen direkt mit 500µl PBS mit 2% PFA für 10 Minuten bei RT fixiert. Zum Permeabilisieren der Zellwände wurden die Zellen nach dem Pelletieren in 200µl Permeabilisierungslösung aufgenommen und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 100µl Permeabilisierungslösung mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper (verdünnt nach Angaben des Herstellers) aufgenommen und eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen je einmal mit Permeabilisierungslösung und FACS-Puffer gewaschen und in 300µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Zugabe von EZ-Vision der Firma Amresco auf 1-1,5%igen Agarosegelen bei einer elektrischen Spannung von 80 bis 150V. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Als Molekulargewichtstandard diente die 2-Log DNA Ladder von NEB. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera fotografiert.

3.3.2 DNA Isolierung aus Agarose

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV Beobachtung aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin® Extract II Kits“ der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers. Dabei wird die Agarose zunächst in einem Puffer gelöst und die DNA anschließend an eine Silica-Membran gebunden, gewaschen und schließlich in Wasser eluiert.

3.3.3 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Zellen wurde das „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Aufschluß der Zellen wurde die DNA an eine Silica-Membran gebunden, gewaschen und schließlich in Wasser eluiert.

3.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop2000 der Firma Thermo Scientific unter Verwendung eines Mikroliters der DNA-Lösung bestimmt. Der Nullwert wurde stets mit dem zugehörigen DNA-Puffer bestimmt.

3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der PCR angewandt (Mullis *et al.*, 1986). Es wurde das PCR Master Kit der Firma Roche verwendet. Als Matrize wurden jeweils 20-300ng DNA eingesetzt. Die Amplifikationen wurden in einem Thermocycler durchgeführt.

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

95°C	2 Minuten	Initiale Denaturierung	
95°C	15 Sekunden	Denaturierung	40 Zyklen
55-60°C	30 Sekunden	Annealing der Primer	
72°C	1 Minute	Elongation	
72°C	5 Minuten	Finale Elongation	
4°C	∞	Lagerung	

Die Annealing-Temperatur wurde der Schmelztemperatur (T_m) der Primer angepasst. Die Lagerung der Ansätze erfolgte bei 4°C.

3.3.6 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde ein ungefähres molares Verhältnis von 10 (Insert) : 1 (Vektor) eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit der T4-DNA-Ligase der Firma NEB unter Verwendung des dazugehörigen Puffers in einem Endvolumen von 30µl. Die Inkubation wurde stets bei 4°C über Nacht durchgeführt. Als Religationskontrolle wurde stets ein Ansatz ohne Insert eingesetzt.

3.3.7 Herstellung kompetenter Bakterienstämme

Um die Effizienz der Aufnahme freier DNA in Bakterien zu erhöhen, müssen Bakterien vorbereitet werden (Chung *et al.*, 1998). Für die Herstellung kompetenter Bakterienstämme wurde zunächst eine Vorkultur mit 100µl Bakterienzellen in 50ml LB-Medium im Inkubator bei 37°C über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 6ml der Vorkultur in 600ml LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 600nm bei 37°C unter schütteln kultiviert. Die Kultur wurde dann für 10 Minuten auf Eis ruhen gelassen und anschließend bei 530g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200ml TFB1-Puffer resuspendiert und für 1 bis 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet in 15ml TFB2-Puffer resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

3.3.8 Transformation in kompetente Bakterien

Unter der Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterienstämme.

Transformation durch Hitzeschock

Es wurden 100µl kompetente *E. coli* – Bakterien zunächst langsam auf Eis aufgetaut und anschließend 10µl DNA aus einem 20µl Ligationsansatz oder 10 bis 50ng Plasmid-DNA zu den Bakterien gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 500µl LB-Medium für 30 bis 90 Minuten bei 30 oder 37°C in einem Heizblock geschüttelt. Die transformierten Bakterien

wurden 1 Minute bei 5900g abzentrifugiert und 300µl des Überstands abgenommen. Die Bakterien wurden in dem restlichen Ansatz resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 30 oder 37°C inkubiert. Einzelklone wurden gepickt um eine Vorkultur aus 5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum zu beimpfen.

Transformation mit KCM

Für die Transformation mit KCM wurden 20µl KCM-Lösung mit 10µl DNA aus einem 20µl Ligationsansatz oder 10 bis 50ng Plasmid-DNA gemischt und mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 100µl auf Eis aufgetauter kompetenter *E. coli* - Bakterien vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurden die Bakterien für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt auf LB-Platten mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert. Die ausplattierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelklone wurden gepickt um eine Vorkultur aus 5ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum zu beimpfen.

3.3.9 Plasmid-Präparation aus Bakterien

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte zur analytischen DNA-Präparation (bis 10µg DNA) mit dem „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Fermentas oder zur präparativen DNA-Isolierung (bis 500µg) mit dem „NucleoBond® Xtra Maxi Plus Kit“ der Firma Macherey-Nagel. Die Präparationen erfolgten stets nach Herstelleranweisung. Abweichend vom Protokoll wurde die DNA in Wasser eluiert.

3.3.10 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktions-Endonukleasen der Firma NEB, unter den von dem Enzymhersteller empfohlenen Bedingungen, durchgeführt.

3.3.11 Auffüllen und Entfernen von überhängenden DNA-Einzelstrangenden

Durch den Verdau von DNA durch Restriktions-Endonukleasen entstehen entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder 5'- bzw. 3'- überhängende Enden (*sticky ends*). Um *sticky ends* nach Bedarf zu glätten wurde die T4-DNA-Polymerase verwendet. Diese besitzt sowohl eine 3'-5'-Exonuklease- als auch eine 5'-3'-Polymeraseaktivität und kann somit 3'-Überhänge abbauen und 5'-Überhänge auffüllen. Verdau-Ansätze wurden mit 2U T4-Polymerase pro µg DNA und 2µl 10mM dNTP-Mix versetzt und für 20 Minuten bei 11°C inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase durch eine 10-minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert.

3.3.12 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Um eine Selbstligation von linearisierten Plasmidvektoren mit komplementären Enden zu verhindern, wurden diese durch Zugabe von Antarktischer Phosphatase der Firma NEB dephosphoryliert. Nach dem Verdau von Vektoren wurde direkt zum Ansatz 1µl Antarktische Phosphatase mit dem zugehörigen Puffer gegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

3.3.13 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma Eurofins MWG (Ebersberg) durchgeführt. Es wurden 1 bis 3µg DNA im Konzentrator eingetrocknet und zusammen mit den benötigten Oligonukleotid-Primern (10pmol) eingeschickt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen DNA-Star oder Vector NTI.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen wurden die Zellen einen Tag zuvor in 6-Loch Platten ausgesät. Der Zellkultur-Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200µl Lysispuffer auf die Zellen gegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Lysispuffer inklusive der Zellen in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei 15700g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der

proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei maskiert SDS (Sodiumdodecylsulfat) die Eigenladung der Proteine mit einer negativen Ladung, so dass die Auftrennung unabhängig von der Ladung der Proteine nur auf Grund des Molekulargewichts erfolgte.

Die Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. Das Trenngel wurde mit dem Sammelgel überschichtet.

Trenngel (10 ml)	10%	Sammelgel (4 ml)	5%
H ₂ O	4ml	H ₂ O	2,7ml
30% Acryl-bisamid-Mix	3,3ml	30% Acryl-bisamid-Mix	670µl
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5ml	1,5M Tris (pH 6,8)	500µl
10% SDS	100µl	10% SDS	40µl
10% APS	100µl	10% APS	40µl
TEMED	4µl	TEMED	4µl

Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer versehen, um durch das darin enthaltene β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zu spalten. Durch zusätzliches Erhitzen für 5 Minuten auf 95°C lagen die Proteine in ungefalteter Primärstruktur vor. Als Molekulargewichtsstandard diente der „SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard“ der Firma Invitrogen. Die Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Puffer bei einer Spannung von 80 bis 120V in „MINI-PROTEAN 3“-Kammern der Firma BioRad.

3.4.3 Western-Blot-Analyse

Bei Western-Blot-Analysen werden die Proteine aus einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Auf der Membran liegen die Proteine dann frei vor und können z. B. mit Antikörpern spezifisch detektiert werden. In dieser Arbeit wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels dem *Semi-Dry* Verfahren geblottet. Die Membran wurde in

Wasser und die Whatmanpapiere in 1x Blotting-Puffer äquilibriert und der Blot wie in Abbildung 3-4 gezeigt aufgebaut. Der Transfer auf die Membran erfolgte bei 100mA für eine Stunde (ca. $1\text{mA}/\text{cm}^2$).

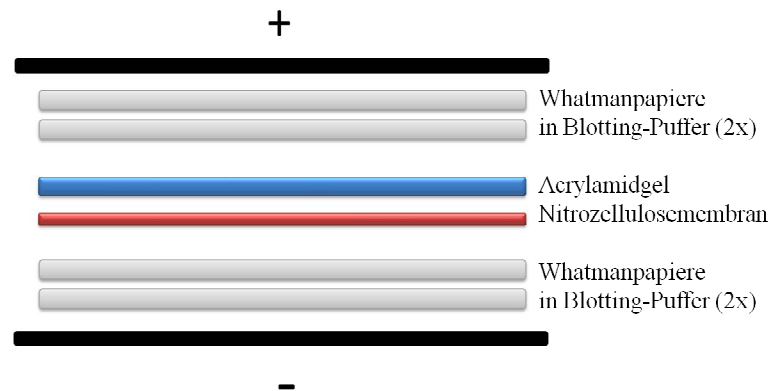


Abbildung 3-4: Schematischer Aufbau eines *Semi-Dry-Blots*

3.4.4 Immundetektion

Nach dem Blotten der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran für eine Stunde in TBS mit 5% Magermilchpulver (w/v) bei 4°C blockiert. Nach dem Blockieren erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers 1:1000 -1:10.000 verdünnt in TBS unter Rollen auf einem Kipproller bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper 1:15.000 verdünnt unter Rollen in TBS für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dieser zweite, Spezies-spezifische Antikörper war an einen im Infrarotbereich fluoreszierenden Farbstoff (IRDye 680 oder IRDye 800) gekoppelt. Die Detektion erfolgte nach dreimaligem Waschen mit dem Odyssey Infrared Imaging System.

3.4.5 Strippen von Membranen

Sollten noch weitere Proteine auf der Nitrozellulosemembran detektiert werden, wurden die bereits gebundenen Antikörper mit Hilfe von NaOH wieder herunter gewaschen. Hierzu wurde die Membran erst für 5 Minuten in Wasser gewaschen und dann für 5 Minuten in 0,2M NaOH geschwenkt. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurde die Membran für eine Stunde

in TBS mit 5% Magermilchpulver (w/v) blockiert. Im Anschluss daran konnte eine erneute Immundetektion erfolgen.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Verwendete Tiere

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Mäuse des Stamms C.B-17/IcrHanTMHsd-Prkdc^{scid} der Firma Harlan (Borchen) verwendet. SCID- (*severe combined immunodeficiency*) Stämme zeichnen sich dadurch aus, dass sie erhebliche Mängel des Immunsystems aufweisen. Dies bedeutet insbesondere, dass sie keine funktionalen T- und B-Zellen haben. Auf Grund dessen werden transplantierte humane Tumorzellen nicht abgestoßen, was diese Mäuse zu einem geeigneten Tumormodel macht. Die Mäuse wurden gemäß der Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) in der Tierhaltungsanlage des Paul-Ehrlich Instituts gehalten. Alle Eingriffe erfolgten entsprechend tierschutzrechtlichen Standards.

3.5.2 Applikationstechniken

3.5.2.1 Intraperitoneale Injektion

Zur intraperitonealen Applikation wurden die Mäuse im Genick genommen und der Schwanz wurde mit den Fingern der gleichen Hand zurückgehalten. Um die Organe von der Einstichstelle zu entfernen, wurden die Mäuse mit dem Kopf nach unten gehalten. Die Injektion erfolgte unter Verwendung von Omnican F 1ml Einmalspritzen mit integrierter Kanüle in einem 45° Winkel in die Bauchhöhle.

3.5.2.2 Subkutane Injektion

Zur subkutanen Injektion von Zellen wurden Omnifix-F1 1ml Einmalspritzen mit einer 0,6 x 25mm Sterican Einmal-Injektions-Kanüle verwendet. Es wurden 100µl einer Lösung durch Anheben der Haut lateral zum Abdomen langsam unter die Haut appliziert. Um zu vermeiden,

dass die Lösung durch das Einstichloch wieder austritt, wurde die Kanüle erst ca. 5 Sekunden nach der Injektion entfernt.

3.5.2.3 Intravenöse Injektion

Die intravenöse Injektion von Lösungen erfolgte in die Schwanzvene mit einer Omnican F 1ml Einmalspritze mit integrierter Kanüle. Die Mäuse wurden zunächst unter Rotlicht erwärmt um die Vene zu erweitern. Anschließend wurden die Mäuse in einer Plastikröhre fixiert und 250µl einer Lösung durch flaches einstechen direkt in die Vene appliziert.

3.5.2.4 Intratumorale Injektion

Um Flüssigkeiten direkt in subkutane Tumore zu applizieren wurde eine Omnican F 1ml Einmalspritze mit integrierter Kanüle verwendet. Es wurden stets 50µl einer Lösung unter Inhalationsnarkose durch einstechen in den Tumor injiziert. Dabei wurde die Nadel in zwei Richtungen des Tumors geschoben und je die Hälfte der Lösung appliziert ohne sie komplett aus dem Tumor zu ziehen.

3.5.3 Narkosetechniken

3.5.3.1 Inhalationsanästhesie

Für eine kurzzeitige Betäubung der Tiere wurde Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyldifluoromethyl-ether) verwendet. Dies ist ein Inhalationsanästhetikum welches nach Inhalation zu einer Allgemeinanästhesie führt. Es führt zu einem dosisabhängigen Verlust des Bewusstseins, einer Unterdrückung der willkürlichen Bewegung, Änderung der sympathischen Reflexe sowie eine Dämpfung der Atmung und des Herzkreislaufs. Isofluran hat keine oder nur vernachlässigbare analgetische Eigenschaften.

Die Inhalationsnarkose wurde unter Verwendung des Narkosegeräts „Matrx“ der Firma Midmark eingeleitet.

3.5.3.2 Injektionsanästhesie

Für längere Eingriffe wurden die Tiere mit einer Injektionsnarkose betäubt. Das Narkosemittel bestehend aus Ketamin und Xylazin (vergl.: 3.1.2.4) wurde mit 100µl pro 10g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Ungefähr 5 Minuten nach der Applikation setzte die Betäubung ein. Um eine Auskühlung zu vermeiden wurden die Tiere für die Dauer der Narkose auf eine Wärmeplatte bei 36°C gelegt.

3.5.4 Transplantation von subkutanen Tumoren

Tumore wurden subkutan in die rechte Flanke von Mäusen injiziert. Hierfür wurden die Mäuse einen Tag vor der Injektion unter Inhalationsnarkose durch Ohrlochmarkieren und Rasieren der Flanke mit einem Elektrorasierer vorbereitet. Pro Maus wurde je eine T175 Zellkulturflasche mit HT1080 Zellen am vorherigen Tag ausgesät. Am Tag der Transplantation wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in PBS mit 10% FKS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 470g für 5 Minuten pelletiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und erneutem Abzentrifugieren der Zellen. Schließlich wurden die Zellen ausgezählt und mit PBS zu 5×10^5 Zellen/100µl verdünnt. Unter Injektionsanästhesie wurden je Maus 100µl der Zellsuspension subkutan in die Flanke injiziert.

3.5.5 Messung von Tumolvolumen

Zur Bestimmung des Tumolvolumens wurde die Länge und Breite des Tumors mit einer Schieblehre bestimmt. Das Tumolvolumen wurde mittels folgender Formel errechnet:

$$\text{Tumolvolumen (mm}^3\text{)} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,52$$

Das Tumolvolumen wurde alle 2 bis 3 Tage gemessen. Sobald die Tumore nekrotisch wurden erfolgte die Tötung der Tiere durch Dislokation des Genicks unter Inhalationsnarkose.

3.5.6 In vivo Imaging

Um das Tumorwachstum genauer zu verfolgen, wurden Luciferase exprimierende Zellen transplantiert. Spritzt man diesen Tieren Luciferin setzt die Luciferase dieses zu Oxyluciferin

um und emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 562nm. Diese Bio-Lumineszenz kann man mit einem *in vivo* Imager detektieren.

Das D-Luciferin gelöst in PBS wurde auf Raumtemperatur gebracht und 150µg pro 1g Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Anschließend erfolgte die Inhalationsanästhesie wie in 3.5.3.1 beschrieben. Genau 10 Minuten nach Luciferin-Injektion erfolgte die Aufnahme der Biolumineszenzsignale mit dem „IVIS200 Imaging System“.

3.5.7 Rekultivierung von Tumoren

Um die Tumore genauer zu untersuchen wurden diese nach der Tötung des Tieres komplett isoliert und unter sterilen Bedingungen rekultiviert. Zur Rekultivierung wurde der Tumor zerkleinert, in Zellkulturmedium mit 3% Kollagenase aufgenommen und in Zellkulturschalen überführt. Sollte die retrovirale Infektion der Tumorzellen untersucht werden, wurde dem Zellkulturmedium 10µM AZT – ein Reverse Transkriptase Inhibitor - zugesetzt um eine weitere Verbreitung der Viren zu verhindern. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden größere Tumorteile, die von der Kollagenase nicht zersetzt wurden durch Zellsiebe abgetrennt. Der filtrierte Überstand wurde bei 470g zentrifugiert und das Pellet wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben ausgesät und kultiviert.

3.5.8 Statistische Auswertung der Experimente

Die statistische Auswertung des Tumorwachstums wurde durch Kay-Martin Hanschmann (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt. Dabei wurde ein exakter 2-seitiger Wilcoxon Test angewandt. Die Auswertungen erfolgten mit der SAS/STAT Software, Version 9.2, SAS System für Windows.

4. Ergebnisse

Der Einsatz von Vektoren basierend auf dem murinen Leukämievirus (MLV) in der Gentherapie ist weit verbreitet und gut erforscht. Dabei konnte mit nicht replizierenden Vektoren jedoch kein durchschlagender Erfolg in der Therapie von soliden Tumoren erzielt werden, da nicht alle Tumorzellen transduziert werden können. Dagegen besitzen replikationskompetente MLVs das Potenzial das Transgen effizient in den Tumorzellen zu verteilen, da sie in das Wirtszellgenom integrieren und replizieren. Außerdem besitzt MLV einen natürlichen Tumortropismus, da es nur in sich teilenden Zellen replizieren kann. Es wurde bereits gezeigt, dass MLV eine Insertion bis zu 1,3kb am 3'-Ende des Env, ohne Einschränkung der Replikation toleriert und stabil ist (Logg *et al.*, 2001). Ziel dieser Arbeit war es, durch die Klonierung von antitumoral wirkenden Effektoren in das replikationskompetente amphotrope MLV onkolytisch wirkende Viren herzustellen und deren Effektivität *in vitro* und *in vivo* zu testen.

4.1 VPR-kodierendes MLV als onkolytisches Virus

Ein möglicher Ansatz das Murine Leukämie Virus genetisch so zu modifizieren, dass es eine onkolytische Wirkung entwickelt, ist die Expression von Genen, die direkt einen Zelltod in der infizierten Zelle hervorrufen. Das virale Protein R (VPR) des humanen immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) ist ein akzessorisches Protein, welches mit vielen zellulären und viralen Proteinen interagiert. Es induziert sowohl einen G₂-Arrest als auch Apoptose in der exprimierenden Zelle.

In dieser Arbeit sollte eine VPR-Expressionskassette in das amphotrope MLV (aMLV) kloniert werden und anschließend der Einfluss dieses Virus auf humane Zellen untersucht werden. Um die Detektion von VPR zu erleichtern wurde ein VPR-GFP-Fusionsprotein unter der Kontrolle einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) verwendet, welches von der Firma Geneart (Regensburg) synthetisiert wurde. Die IRES-VPR-GFP-Kassette wurde über die Klonierungsschnittstellen BsiWI und NotI in das pAZE-GFP-Plasmid kloniert. Eine schematische Darstellung des entstandenen Virus pAZE-VPR ist in Abbildung 4-1 dargestellt. Des Weiteren wurde das pEGFP-VPR-Plasmid als Positivkontrolle von NIH AIDS Reagent (www.aidsreagent.org) bezogen (Abbildung 4-1).

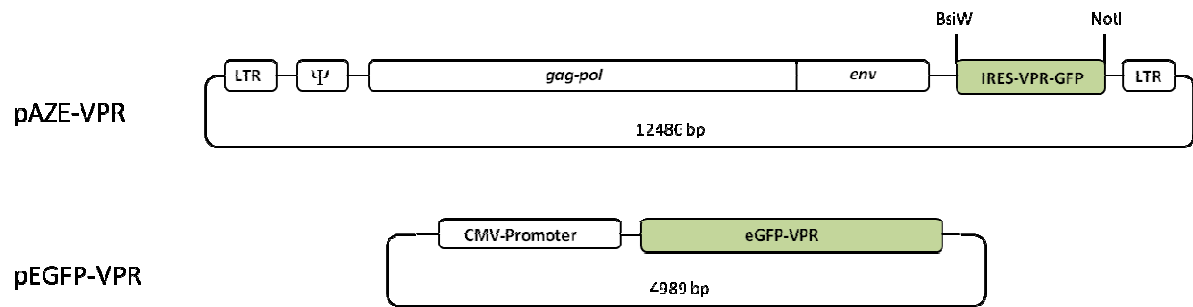


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der VPR-tragenden Plasmide. Oben: aMLV mit einer IRES-VPR-GFP-Kassette am 3'-Ende des *env* Gens. Unten: Plasmid mit einem eGFP-VPR unter Kontrolle eines CMV-Promotors.

In Abbildung 4-2 ist ein Sequenzabgleich der synthetisierten VPR-Sequenzen dargestellt. Die Sequenz des pEGFP-VPR Plasmids ist aus dem HIV Klon pNL4-3 entnommen, sie enthält zwei Aminosäureaustausche. Dagegen wurde die Sequenz des VPR dieser Arbeit dem HIV Klon p92RW008A16 entnommen. Die Proteinsequenz dieses VPR ist im Vergleich zum HIV Klon pNL4-3 um 17 Aminosäuren am N-terminalen Ende verkürzt.

pNL4-3 VPR :	MEQAPEDQGPOREPYNEW	TLELLEELKSEAVRHFPRIWLHNLGRHIYETY	: 50
pEGFP-VPR :	MEQAPEDQGPOREPYNEW	TLELLEELKSEAVRHFPRIWLHNLGCHIYETY	: 49
p92RW008A16 VPR :	MEQAPEDQGPOREPYNEW	MLELLEDLKYEAVRHFPRPWLHGLGQIYNTY	: 49
pAZE-VPR :	-----	MLELLEDLKYEAVRHFPRPWLHGLGQIYNTY	: 32
pNL4-3 VPR :	GDTWAGVEAIIRILQQLPFIHFRIGCRHSRIGVTRQRRARNGASRS*	: 96	
pEGFP-VPR :	GDTWAGVEAIIRILQQLPFIHFRIGCRHSRIGVTRQRRARNGASRS*	: 95	
p92RW008A16 VPR :	GDTWEGVEAIIRILQQLFVHFRIGCQHSRIGIVRGRRVRDGSGRS*	: 95	
pAZE-VPR :	GDTWEGVEAIIRILQQLFVHFRIGCQHSRIGIVRGRRVRDGSGRS-	: 78	

Abbildung 4-2: Sequenzvergleich der VPR-Sequenzen.

Um den Effekt der beiden VPR-Varianten auf humane Zellen zu testen, wurden HEK293T Zellen mit je 2µg pAZE-VPR, pEGFP-VPR und pAZE-GFP als Transfektionskontrolle transfiziert. Ausserdem wurden untransfizierte Zellen analysiert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. In Abbildung 4-3 ist jeweils rechts die fluoreszenzmikroskopische Analyse dargestellt und links sind die Zellen im Durchlicht dargestellt.

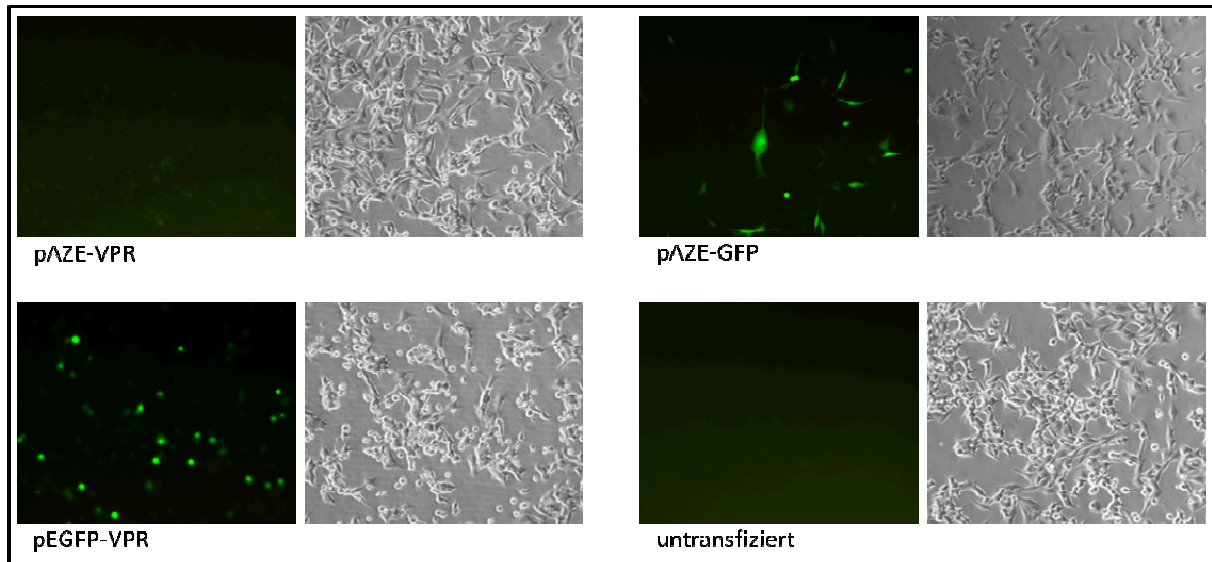


Abbildung 4-3: Einfluss von VPR auf HEK293T Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion mit den VPR-tragenden Plasmiden fluoreszenzmikroskopisch (links) und lichtmikroskopisch (rechts) dargestellt.

HEK293T Zellen die mit pAZE-GFP transfiziert waren, zeigten weder grüne Fluoreszenz, noch morphologische Auffälligkeiten. Sie wuchsen in einem dichten Zellrasen und blieben an dem Flaschenboden haften. Im Gegensatz dazu konnten deutlich grün gefärbte Zellen bei pEGFP-VPR transfizierten Zellen detektiert werden. Auch morphologisch konnte beobachtet werden, dass die Zellen sich aus ihrem Zellverbund lösten und abkugelten, was ein Zeichen für apoptotische Zellen ist. Dabei fällt besonders auf, dass nur abgekugelte Zellen eine GFP Fluoreszenz zeigten. Zellen die mit pAZE-GFP transfiziert wurden zeigten eine grüne Fluoreszenz und sowohl pAZE-GFP transfizierte HEK293T Zellen als auch untransfizierte Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen.

Um genauer untersuchen zu können, warum pAZE-VPR keinen Effekt auf die Zellen hatte wurden die Zellen zwei Tage nach Transfektion lysiert und mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 4-4).

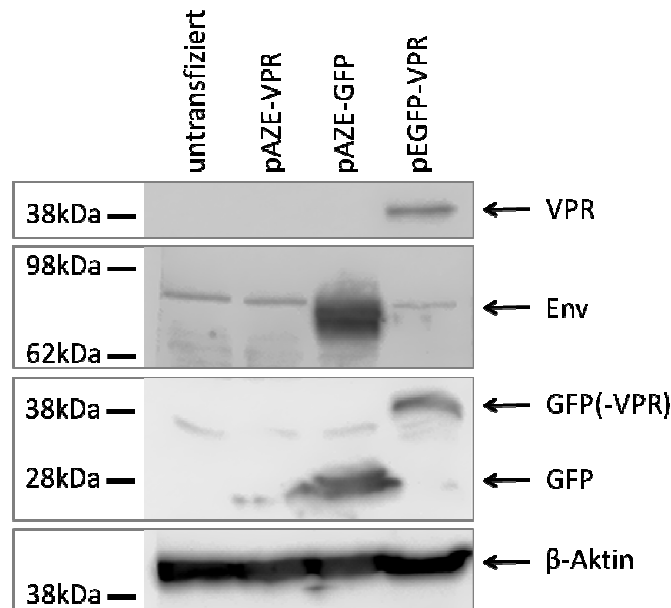


Abbildung 4-4: Western-Blot-Analyse von VPR-transfizierten HEK293T Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion lysiert und Gesamtzelllysate zur Western-Blot-Analyse herangezogen. Die Detektion erfolgte mittels Antikörpern gegen VPR, Env, GFP oder β -Aktin. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HEK293T Zellen.

Lysate von transfizierten HEK293T Zellen mit pAZE-VPR, pEGFP-VPR, pAZE-GFP und nicht transfizierte HEK293T Zellen wurden in der Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen VPR, Env oder GFP analysiert. Ein Antikörper gegen β -Aktin wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung verwendet. Abbildung 4-4 zeigt die Ergebnisse zwei Tage nach Transfektion. Nach Transfektion von pAZE-VPR konnten weder VPR (40kDa), Env (85kDa) noch GFP (26kDa) Proteinbanden detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass das Plasmid nicht funktionsfähig ist. Dagegen konnte nach Transfektion von pEGFP-VPR, VPR und GFP detektiert werden. Da VPR und GFP als Fusionsprotein vorliegen, erhöhte sich das Molekulargewicht auf 40kDa. Nach Transfektion mit pAZE-GFP konnten sowohl Env als auch GFP nachgewiesen werden. Die untransfizierte Kontrolle zeigte keine spezifischen Signale.

In Abbildung 4-3 wurde bereits gezeigt, dass VPR Zellen in Apoptose führen kann. Um ein onkolytisches Virus herzustellen, wird allerdings eine Zelllinie benötigt, die resistent gegenüber der apoptotischen Wirkung des Virus ist, da eine Anzucht des Virus sonst nicht möglich ist. ST-IOWA Zellen sind Schweinefibroblasten die bereits als resistent gegen VPR-induzierte Apoptose beschrieben wurden (Matsuda *et al.*, 2009). Um zu testen, ob dies

tatsächlich zutrifft, wurden ST-IOWA Zellen mit 2µg pEGFP-VPR transfiziert und mikroskopisch analysiert.

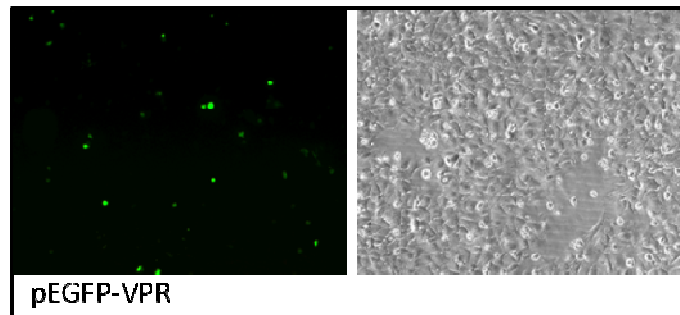


Abbildung 4-5: Einfluss von VPR auf ST-IOWA Zellen. Die Zellen wurden mit pEGFP-VPR transfiziert und zwei Tage nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch (rechts) und lichtmikroskopisch (links) analysiert.

In Abbildung 4-5 ist die mikroskopische Analyse zwei Tage nach Transfektion mit pEGFP-VPR gezeigt. Die Zellen zeigten zum Teil eine deutliche grüne Fluoreszenz (Abb. 5, links), lösten ihren Zellkontakt und kugelten sich ab (Abb.5, rechts). Abbildung 4-5 zeigt deutlich, dass alle grün fluoreszierenden Zellen abgekugelt waren und somit apoptotisch sind. Von einer Umklonierung des EGFP-VPR in das amphotrope MLV Genom wurde daher abgesehen und die Idee der onkolytischen Viren basierend auf VPR verworfen.

4.2 Transfer von shRNA durch MLV

Ein weiterer möglicher Ansatz zur onkolytischen Gentherapie ist das Einbringen von shRNAs (*short hairpin* RNAs = kurze Harnadelstruktur RNAs). Es wurden hierzu zwei Ansätze untersucht. Zum Einen der direkte Transfer von pri-miRNA durch Verpackung der RNA in MLV basierende Viruspartikel und zum Anderen der Transfer von shRNA-Expressionskassetten durch replikationskompetente MLVs.

4.2.1 Transfer von miRNA mit Hilfe von Viruspartikeln

Zernecke *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass micro RNAs (miRNAs) von der Zelle in Vesikel (sogenannte apoptotische Körperchen) verpackt werden können und so zu benachbarten Zellen transferiert werden (Zernecke *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dies

auch durch MLV-basierende virale Vektoren möglich ist. Um replikationsdefiziente Vektoren zu erhalten, werden die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* aus dem Virusgenom entfernt und für die Vektorproduktion durch Hilfsplasmide *in trans* (ohne räumlichen Bezug) zur Verfügung gestellt. Somit verfügen diese Gene über kein virales Verpackungssignal (ψ), so dass dieses Genom nicht in die viralen Partikel verpackt wird. Dagegen werden das therapeutische Gen sowie die für die reverse Transkription und Integration benötigten Gene durch einen Vektor mit den typischen LTR-Regionen und einem Verpackungssignal bereitgestellt. Somit wird nur die genetische Information dieses Vektors in die viralen Partikel verpackt, die für die Replikation notwendigen Strukturen fehlen jedoch.

In Abbildung 4-6 ist schematisch die Arbeitshypothese dargestellt. Zur grundlegenden Untersuchung des Prinzips sollte eine Verpackungssignal enthaltende pri-miRNA gegen GFP in einem Vektor verpackt werden, mit welchem dann GFP-positive Zellen transduziert werden sollten. Dort sollte die pri-miRNA gegen GFP freigesetzt werden und somit durch RNA Interferenz eine Reduktion der GFP-Fluoreszenz herbeigeführt werden. Hierzu wurde eine miRNA gegen GFP aus dem pSM2-mi-eGFP-Plasmid über die Schnittstellen EcoRI und XhoI in den Vektor pczCFG5-IEGZ kloniert. Das daraus resultierende Plasmid, pczCFG5-mi-eGFP, enthält ein Verpackungssignal und die LTR-Regionen und stellt somit das *cis*-agierende Element dar.

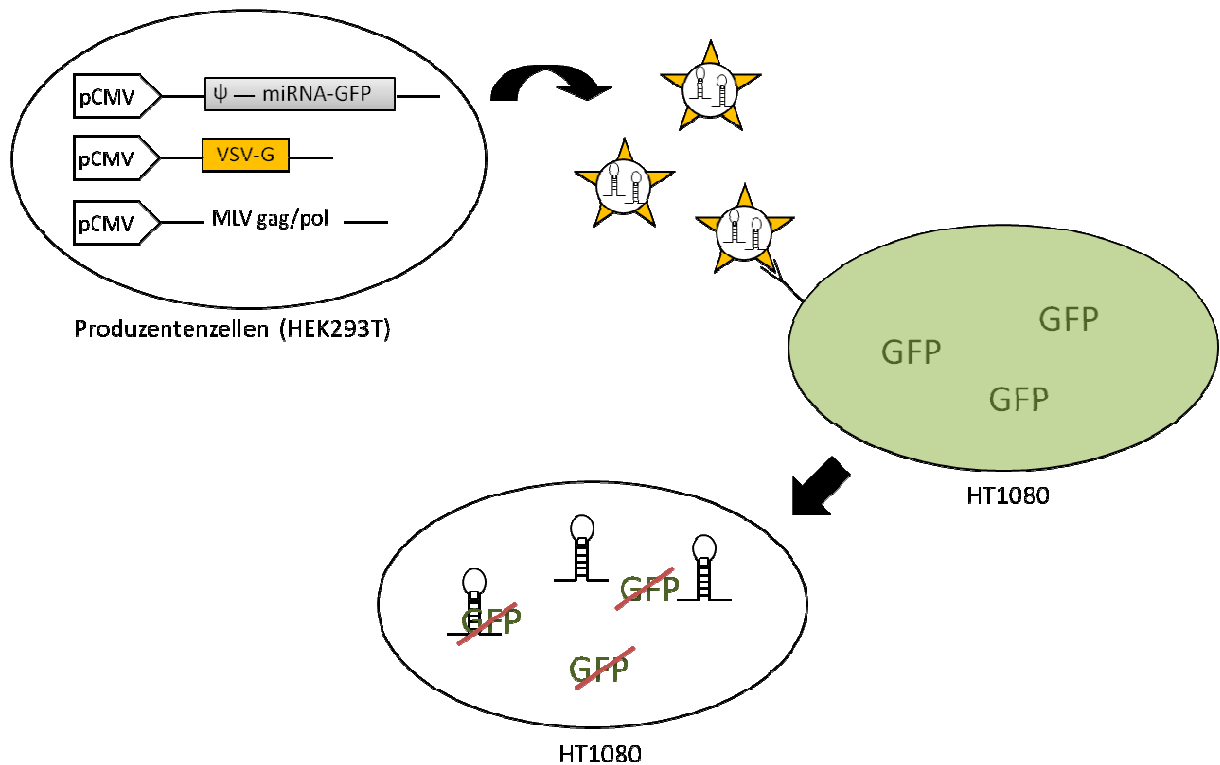


Abbildung 4-6: Schematische Arbeitshypothese zur Darstellung der Verpackung von miRNA in Vektorpartikel.

Zunächst wurden die Vektorpartikel hergestellt. Hierzu wurden HEK293T Zellen mit dem Transferplasmid pczCFG5-mi-eGFP und zwei sogenannten Hilfsplasmiden, die für die Strukturgene des Vektors kodieren, ko-transfiziert. Dabei kodierte das Hilfsplasmid pHIT-G für das Hüllprotein des VSV (Vesicular Stomatitis Virus) und das Hilfsplasmid pHIT-60 für die Gag- und Pol-Proteine des MLVs. Dabei wurde ein Verhältnis der Plasmide von 10 (Transfervektor) : 9 (pHIT-60) : 1 (pHIT-G) eingesetzt. Als Transfektions- und Transduktionskontrolle wurde stets ein GFP-kodierendes Transferplasmid (pczCFG5-IEGZ) mit den Hilfsplasmiden ko-transfiziert. GFP sollte somit in die Viruspartikel verpackt und in das Genom transduzierter Zellen integriert werden. Drei Tage nach Transfektion wurden die Vektoren geerntet und HT1080 Zellen welche GFP exprimieren und HT1080 welche negativ für GFP waren damit transduziert. Weitere drei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf grüne Fluoreszenz untersucht (Abbildung 4-7).

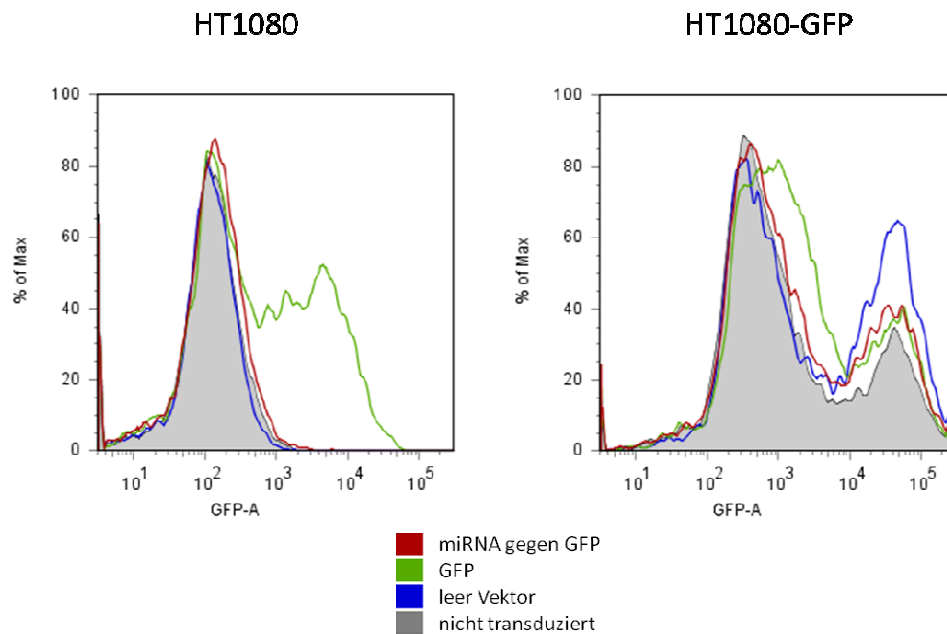


Abbildung 4-7: Durchflusszytometrische Analyse von miRNA-GFP transduzierten HT1080 Zellen. HT1080-Zellen (links) und GFP exprimierende HT1080-Zellen (rechts) wurden mit viralen Partikeln transduziert und nach drei Tagen auf ihre GFP Expression mittels durchflusszytometrischen Analysen untersucht. rot: Vektor mit gegen GFP gerichteter miRNA, grün: GFP kodierender Vektor, blau: leerer Kontroll-Vektor, grau: nicht transduzierte Zellen.

Die Transduktion der gegen GFP gerichteten miRNA (in Rot) führte nicht zu einer Abnahme der GFP-Expression im Vergleich zu Leer-Vektor (in Blau) oder untransduzierten (Grau hinterlegt) HT1080-GFP Zellen (Abbildung 4-7). Die Transduktionseffizienz wurde durch Transduktion von HT1080 Zellen mit GFP kodierenden Vektoren (in Grün) gemessen und betrug 51,9%. Der Transfer von miRNA mit viralen Partikeln war trotz mehrfacher Versuchswiederholung immer erfolglos.

4.2.2 Herstellung von shRNA-tragenden Viren

Da der direkte Transfer von pri-miRNAs keinen Effekt zeigte, sollten die shRNAs nun durch den Transfer von shRNA-Expressionskassetten über replikationskompetente aMLVs in die Zielzellen übertragen werden. Hierdurch sollte eine effiziente Verteilung der shRNA in den Zielzellen erreicht werden.

Um onkolytische Viren durch den Einbau von shRNA-Expressionskassetten zu erhalten, ist die Wahl der Zielsequenzen für die shRNAs von großer Bedeutung. Dabei ist darauf zu

achten, dass Tumorwachstum, Tumorerproliferation oder Tumoringenese in Zusammenhang mit einer Überexpression oder konstitutiven Aktivierung der Zielgene steht. Ausserdem muss die Herunterregulation eines einzigen Gens ausreichen um einen Phänotyp auszulösen.

Für diese Arbeit wurden als Zielgen der Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR (epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor), die Proteinkinase PLK1 (Polo-like-Kinase 1) und der Transkriptionsfaktor STAT3 (Signalüberträger und Aktivator der Transkription 3) gewählt.

Bei der Wahl von geeigneten shRNA Sequenzen wurde sowohl auf bereits in der Literatur beschriebene Sequenzen (shRNAs), als auch auf kommerziell erhältliche Sequenzen (miRNAs) der Firma Open Biosystems (USA) zurückgegriffen. Abbildung 4-8 zeigt eine schematische Darstellung der Zielproteine und der Lage der Zielsequenzen der shRNAs. Mehrere EGFR und PLK1 spezifische shRNAs wurden getestet um die effizientesten shRNAs zu identifizieren. Eine effiziente shRNA gegen STAT3 wurde bereits etabliert (Sliva and Schnierle, 2006).

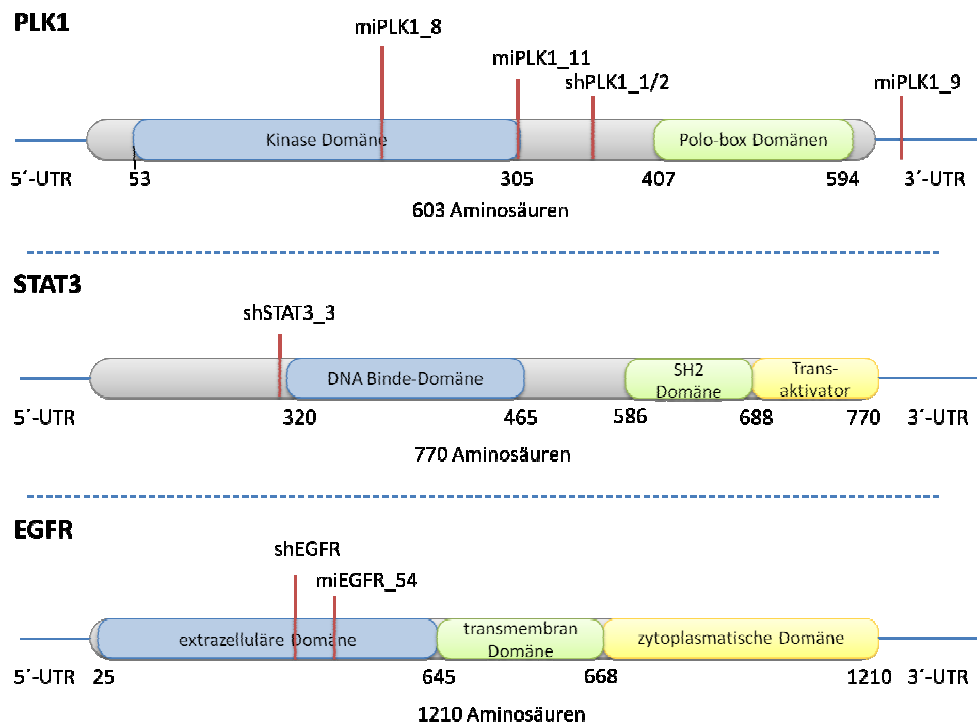


Abbildung 4-8: Schematische Darstellung der Lage der shRNA Bindungsstellen innerhalb der Zielgene. Lage der shRNAs gegen PLK1: miPLK1_8: AS 212-217; miPLK1_11: AS 304-309; shPLK1_1 und shPLK1_2: AS 316-366 (um ein Basenpaar verschoben); miPLK1_9: im 3'-UTR; Lage der shRNAs gegen STAT3: shSTAT3_3: AS 275-280; Lage der shRNAs gegen EGFR: shEGFR: AS 336-341; miEGFR_54: AS 416-421. AS=Aminosäure

Der Gen-Transfer durch replikationskompetente Viren ist im Gegensatz zu Vektoren um ein Vielfaches effizienter, da jede infizierte Zelle weitere Viren produziert und benachbarte Zellen infizieren kann. In das aMLV Genom wurde eine shRNA unter Kontrolle eines Polymerase III Promoters kloniert. Abbildung 4-9 zeigt eine schematische Darstellung der shRNA-Kassetten-tragenden MLVs. Es wurden sowohl shRNA als auch miRNA-Sequenzen verwendet. Dabei werden die Konsensussequenzen der miRNAs durch die typischen Drosha-Erkennungssequenzen flankiert. Die miRNAs wurden von dem U6- und shRNAs von dem H1-Polymerase III Promotor exprimiert. Die Klonierung erfolgte entweder über die Restriktionsschnittstellen BsiWI und NotI in das pAZE-GFP Genom, wobei die IRES-GFP-Expressionskassette entfällt, oder jeweils nur über BsiWI oder NotI um die shRNA-Expressionskassette vor oder nach die IRES-GFP-Kassette zu klonieren.

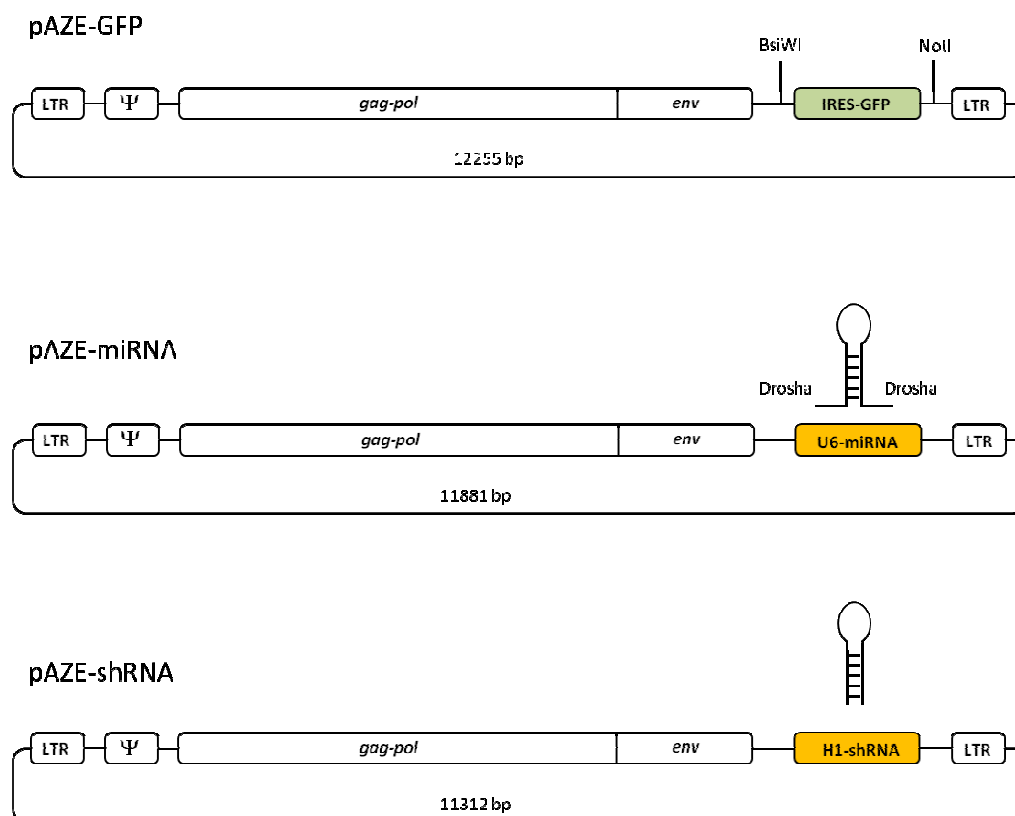


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung von shRNA-Expressionskassetten-tragenden aMLVs.

4.2.3 Charakterisierung von shRNA-tragenden Viren

Das Genom von murinen Leukämie Viren ist in seiner Größe stark limitiert, da sonst keine effiziente Verpackung des Virusgenoms in die Viruspartikel gewährleistet werden kann.

Somit werden Insertionen, die für den Lebenszyklus des Virus nicht von essentieller Bedeutung sind oft innerhalb weniger Replikationszyklen aus dem Genom deletiert. Für MLV wurde bereits beschrieben, dass eine Insertion von bis zu 1,3kb möglich ist, ohne die virale Fitness zu beeinträchtigen (Logg *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob die Insertion der shRNA-Expressionskassetten, den Virustiter beeinträchtigt oder die shRNA-Expressionskassette möglicherweise nach einigen Replikationszyklen deletiert wird, wurden die rekombinanten Viren sowohl titriert als auch die Stabilität der shRNA-Expressionskassetten über mehrere Infektionsrunden untersucht.

4.2.3.1 Titrierung

Um die Titer nach Infektion mit den verschiedenen rekombinanten murinen Leukämiviren zu untersuchen, wurden zunächst HEK293T Zellen mit 2µg der jeweiligen Virusgenome transfiziert. Eine Woche nach Transfektion wurden die virushaltigen Medienüberstände geerntet und HT1080 Zellen in einer Verdünnungsreihe infiziert. Die infizierten Zellen wurden am folgenden Tag mittels Immunoperoxidase-Assay (IPA) in Duplets untersucht. In Abbildung 4-10 sind die Ergebnisse der Titrierung zusammen gefasst. Die Titer wurden folgendermaßen bestimmt:

$$\frac{\text{positive Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Virus Volumen (ml)}} = \text{IE/ml}$$

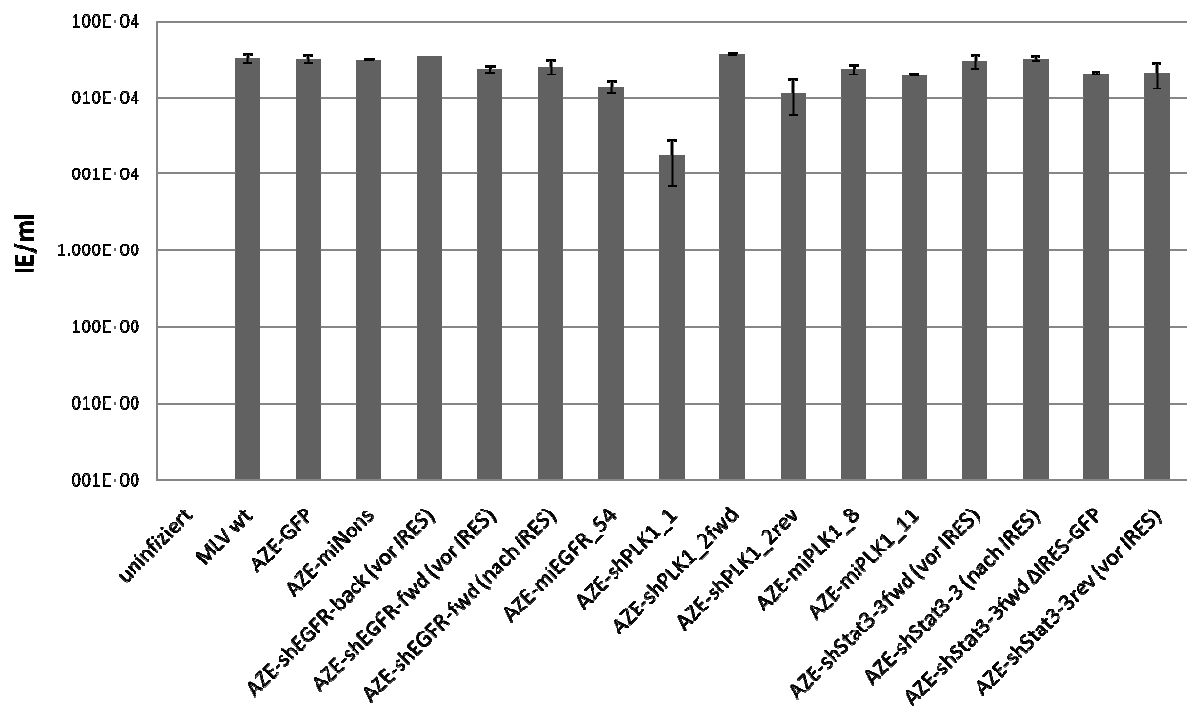


Abbildung 4-10: Bestimmung der Titer shRNA-Expressionskassette-tragender aMLVs. HT1080 Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe mit den jeweiligen Viren infiziert und am folgenden Tag mittels Immunoperoxidase-Assay in Duplets untersucht.

Alle untersuchten Viren hatten einen Titer von etwa 5×10^5 IE/ml vergleichbar zu Wildtyp-MLV. Als einzige Ausnahme konnte für das Virus AZE-shPLK1_1 ein geringerer Titer von etwa 1×10^4 IE/ml gemessen werden.

4.2.3.2 Genomische Stabilität der rekombinanten Viren

Da Retroviren eine hohe Mutationsrate haben, sollte die Stabilität der shRNA-Expressionskassetten untersucht werden. Hierfür wurden HT1080-Zellen mit $2 \mu\text{g}$ der jeweiligen Virusplasmide transfiziert und für 7 Tage passagiert um eine vollständige Durchinfektion zu erreichen. An Tag 7 wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände abgenommen, sterilfiltriert und auf frisch ausgesäte HT1080-Zellen gegeben. Diese Prozedur wurde für sechs Infektionsrunden wiederholt. Für das ecotrope Virus ZAP-GFPenv-shSTAT3 erfolgte die gleiche Prozedur auf 3T3-Zellen. Jeweils am Tag der Abnahme der Zellkulturüberstände zur Neuinfektion wurde genomische DNA aus den infizierten Zellen isoliert und mittels PCR-Analyse die Anwesenheit der shRNA-Expressionskassette untersucht. Als positiv Kontrolle (+) für die PCR wurde das jeweilige Virusplasmid

verwendet. Abbildung 4-11 A zeigt schematisch die Lager der PCR-Primer. Diese flankierten die shRNA-Expressionskassette, so dass diese komplett amplifiziert werden konnte. Eine Deletion in der shRNA-Expressionskassette sollte sich durch eine oder mehrere PCR-Banden mit niedrigerem Molekulargewicht äußern. Die erwartete Größe der PCR-Banden betrug für miRNA-Expressionskassetten-tragende Viren 986bp, für shRNA-Expressionskassetten-tragende Viren 667bp, für shRNA-Expressionskassetten-tragende Viren mit zusätzlicher IRES-GFP-Kassette 1948bp und für das AZE-GFP Virus 1605bp.

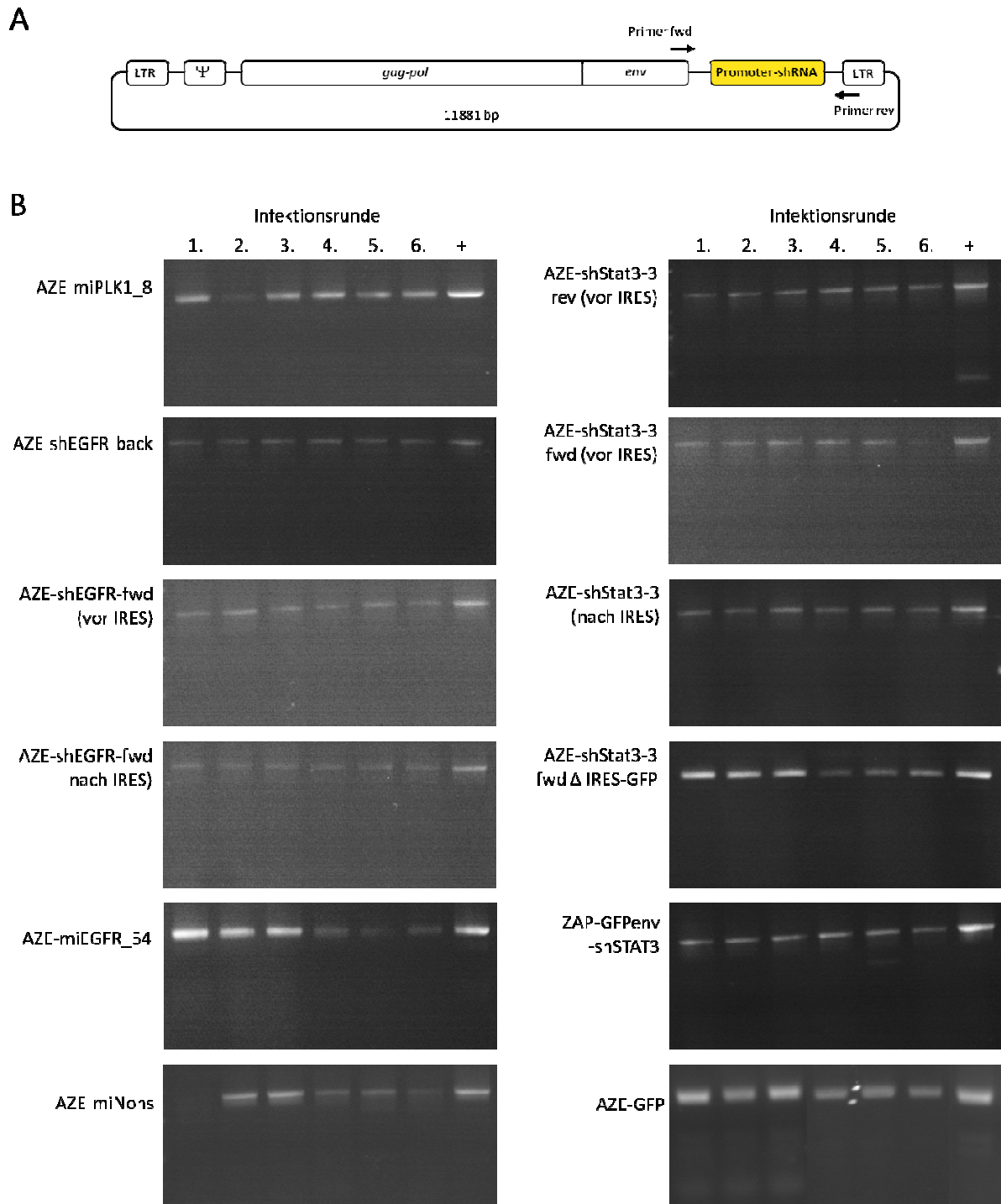


Abbildung 4-11: PCR-Analyse zur Überprüfung der genomischen Stabilität der shRNA-Expressionskassetten in aMLVs. A: Schematische Darstellung der Lage der PCR-Primer. B: HT1080-Zellen (bzw. 3T3-Zellen bei ZAP-GFPenv-shSTAT3) wurden in 6 Runden infiziert. Nach jeder Infektionsrunde wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert und mittels PCR-Analyse die Expressionskassette untersucht.

In Abbildung 4-11 B sind die Ergebnisse der PCR-Analyse dargestellt. Jedes untersuchte rekombinante Virus weist in allen sechs Infektionsrunden eine Bande in der erwarteten Größe auf. Es sind keine kleineren Banden entstanden. Um auch Punktmutationen auszuschließen,

wurde jeweils die Bande der sechsten Infektionsrunde aus dem Agarosegel isoliert, sequenziert und mit der Ursprungssequenz verglichen (Ergebnisse im Anhang, Kapitel 7.1). Auch in der Sequenzanalyse wurden keine Mutationen oder Deletionen festgestellt. Somit waren die Expressionskassetten stabil und im Virusgenom toleriert.

4.2.4 EGFR als therapeutisches Zielgen

Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR ist ein transmembraner Rezeptor und ist für die Übertragung von Informationen vom externen Milieu in das Zellinnere verantwortlich, welche das Zellwachstum unterstützen. Eine Überexpression oder eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors führt häufig zur Entstehung von Tumoren. Eine Herunterregulation von EGFR durch shRNAs stellt somit einen möglichen Ansatz zur Tumorthherapie dar.

Um die Effektivität von shRNA-tragenden aMLVs gegen EGFR zu testen wurden DHΔE-Zellen mit einer MOI von 10 infiziert und drei Tage nach Infektion zur Western-Blot-Analyse herangezogen. DHΔE-Zellen sind 3T3-Zellen welche eine konstitutiv aktive Mutante (EGFRvIII) des EGFR stabil exprimieren (siehe Kapitel 1.3.1). Als Negativkontrolle wurde mit aMLV mit einer shRNA ohne Funktion (miNons) infiziert.

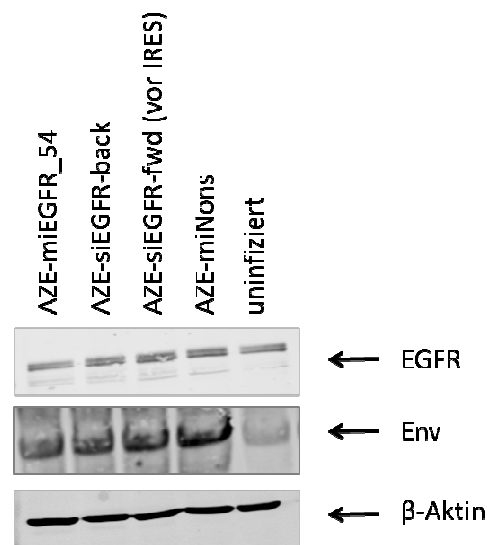


Abbildung 4-12: Western-Blot-Analyse von pAZE-shEGFR infizierten DHΔE-Zellen. DHΔE-Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit den jeweiligen Viren infiziert und zwei Tage nach Infektion mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen EGFR. Die Kontrolle auf Infektion erfolgte mit einem Antikörper gegen Env. Als Ladekontrolle erfolgte die Detektion mittels β-Aktin-Antikörper.

Abbildung 4-12 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Die Expression von EGFR (ca. 170kDa) wurde mit einem entsprechenden Antikörper detektiert. Zur Kontrolle der Infektion wurde die Membran zusätzlich mit einem Antikörper gegen das Env-Protein von MLV (ca. 85kDa) inkubiert. Die Detektion von β -Aktin (42kDa) erfolgte zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung. Es konnte keine Reduktion der Proteinexpression von EGFRvIII nach Infektion gezeigt werden. Die shRNA-tragenden aMLVs gegen EGFR sind nicht funktionell.

4.2.5 PLK1 als therapeutisches Zielgen

Die Proteinkinase *Polo-like-Kinase 1* (PLK1) besitzt eine regulatorische Funktion während der Zellteilung. In Tumoren wird PLK1 oft überexprimiert, was zu einem verstärkten Zellwachstum führt. Kinase-Inhibitoren für das Enzym gelten daher als möglicher Therapieansatz gegen bestimmte Krebsarten.

4.2.5.1 Test der shRNAs auf Funktionalität

Die Funktionalität von shRNAs hängt oft von deren Sequenz ab. Daher sollten unterschiedliche shRNAs gegen PLK1 auf ihre Effektivität der Herunterregulation des Proteins untersucht werden. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit 1 μ g eines Myc-tag markierten PLK1-Expressionsplasmid (pcDNA-PLK1) und 1 μ g jeweils eines rekombinanten Virusplasmids ko-transfiziert. Des Weiteren wurden die shRNA-tragenden Vorläuferplasmide ko-transfiziert um die Effektivität der replikationskompetenten Viren im Vergleich zu nicht replizierenden Plasmiden zu verdeutlichen. Als Negativkontrollen wurden Zellen mit pAZE-miNons und pAZE-GFP ko-transfiziert und Zellen nur mit dem pcDNA-PLK1 Plasmid transfiziert. Zwei Tage nach der Ko-transfektion wurden die Zellen lysiert und die Gesamtproteinextrakte mittels Western-Blot-Analyse auf die Proteinexpression von PLK1 untersucht. Da das PLK1-Expressionsplasmid für ein Myc gekoppeltes PLK1-Protein kodiert, war es möglich ausschließlich die exogene PLK1-Expression mittels eines Myc-Antikörpers zu untersuchen (ca. 66kDa).

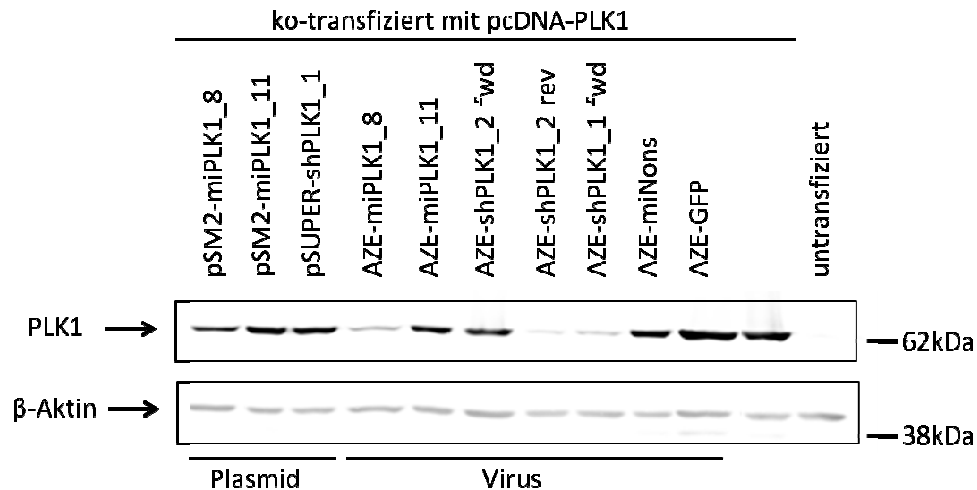


Abbildung 4-13: Identifizierung funktioneller shRNAs gegen PLK1. HEK293T-Zellen wurden mit einem Myc-tag markierten PLK1-Expressionsplasmid (pcDNA-PLK1) und den jeweiligen shRNA-tragenden Plasmiden gegen PLK1 ko-transfiziert und zwei Tagen nach Transfektion mittels Western-Blot Analyse auf die PLK1 Expression untersucht. Zur Detektion von PLK1 wurde ein Antikörper gegen Myc verwendet, die Ladekontrolle erfolgte mittels eines Antikörpers gegen β -Aktin.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sind in Abbildung 4-13 gezeigt. Die Proteinexpression konnte durch AZE-miPLK1_8, AZE-shPLK1_2rev und AZE-shPLK1_1fwd deutlich verringert werden. Dies war nur in mit Virusplasmiden transfizierten Zellen zu beobachten. Die Plasmide pSM2-miPLK1_8 bzw. pSUPER-shPLK1_1 tragen dieselbe shRNA-Expressionskassette gegen PLK1 wie AZE-miPLK1-8 bzw. AZE-shPLK1_1, es konnte jedoch keine Verringerung der PLK1-Expression gezeigt werden. In die letzte Spur wurden Zelllysate untransfizierter Zellen aufgetragen. Hier konnte keine Proteinbande für PLK1 detektiert werden. Dies verdeutlicht, dass nur exogene Proteinexpression detektiert wurde. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung wurde die Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin inkubiert (ca. 42kDa).

4.2.5.2 Einfluss von PLK1-Depletion auf unterschiedliche Tumor-Zelllinien

PLK1 besitzt eine essentielle Rolle im Zellzyklus und ist hier vor allem in den Zentrosomenzyklus, die Spindelbildung und die Chromosomensegregation involviert. Eine Hemmung des Enzyms führt daher zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase und der Einleitung von Apoptose. Dieser Effekt ist allerdings von vielen physiologischen Bedingungen innerhalb der Zelle abhängig und nicht in allen Zelllinien gegeben. Um eine geeignete Model-Zelllinie für spätere *in vivo*-Untersuchungen zu finden wurden fünf

unterschiedliche Zelllinien mit den rekombinanten aMLVs mit einer MOI von 10 infiziert und zwei Tage nach Infektion zu Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie herangezogen. Die Zelllinien HeLa, MCF-7, SKOV3, U2OS und HT1080 wurden analysiert.

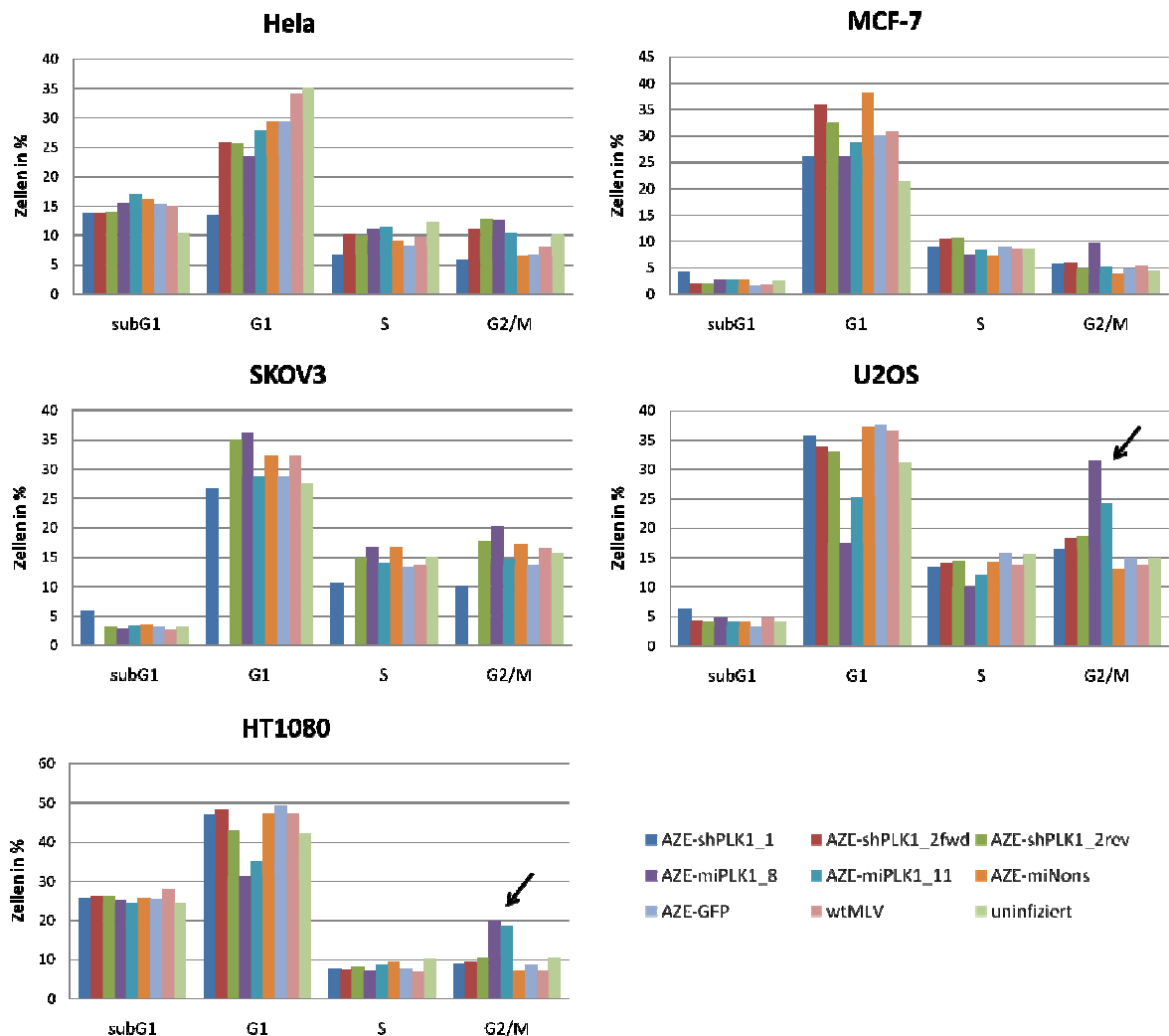


Abbildung 4-14: Test unterschiedlicher Zelllinien auf den Einfluss von PLK1-Herunterregulation. HeLa-, MCF-7-, SKOV3-, U2OS- und HT1080-Zellen wurden jeweils mit den shPLK1-tragenden Viren mit einer MOI von 10 infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde der Zellzyklus der infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Pfeile markieren Zellen in einem G₂/M Arrest. Die Zellen waren wie folgt infiziert: blau: AZE-shPLK1_1; rot: AZE-shPLK1_2fwd; grün: AZE-shPLK1_2rev; lila: AZE-miPLK1_8; türkis: AZE-miPLK1_11; orange: AZE-miNons; hellblau: AZE-GFP; rosa: wtMLV; hellgrün: uninfiziert.

In Abbildung 4-14 ist deutlich zu sehen, dass HT1080 Zellen und U2OS Zellen nach Infektion mit AZE-miPLK1_8 und AZE-miPLK1_11 in der G₂/M-Phase des Zellzyklus arretieren (Abbildung 4-14, Pfeil). Die Viren mit anderen shRNAs gegen PLK1 zeigten keinen Effekt auf den Zellzyklus. Des Weiteren konnte kein spezifischer Effekt auf den

Zellzyklus in den Zelllinien Hela, MCF-7 und SKOV3 gezeigt werden. Auch die Kontrollviren AZE-miNons, AZE-GFP und wtMLV sowie uninfizierte Zellen zeigten erwartungsgemäß in keiner der untersuchten Zelllinien einen spezifischen Effekt auf den Zellzyklus.

Da ein Tiermodell mit HT1080-Zellen in unserem Labor etabliert war, wurden diese Zellen für weitere Versuche gewählt.

4.2.5.3 Einfluss von Koffein auf PLK1-Depletion

Liu und Erikson konnten zeigen, dass der apoptotische Effekt nach PLK1 Inhibition mit Zugabe von Koffein noch verstärkt wird (Liu and Erikson, 2003). Um zu untersuchen, ob dies auch in HT1080-Zellen der Fall ist, wurden die Zellen mit einer MOI von 10 mit den rekombinanten MLVs gegen PLK1 infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurde dem Zellkulturmedium 2mM Koffein für 24 Stunden zugesetzt. Es wurden Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie 2, 3 und 4 Tage nach Infektion durchgeführt. Abbildung 4-15 zeigt den prozentuellen Anteil der apoptotischen Zellen.

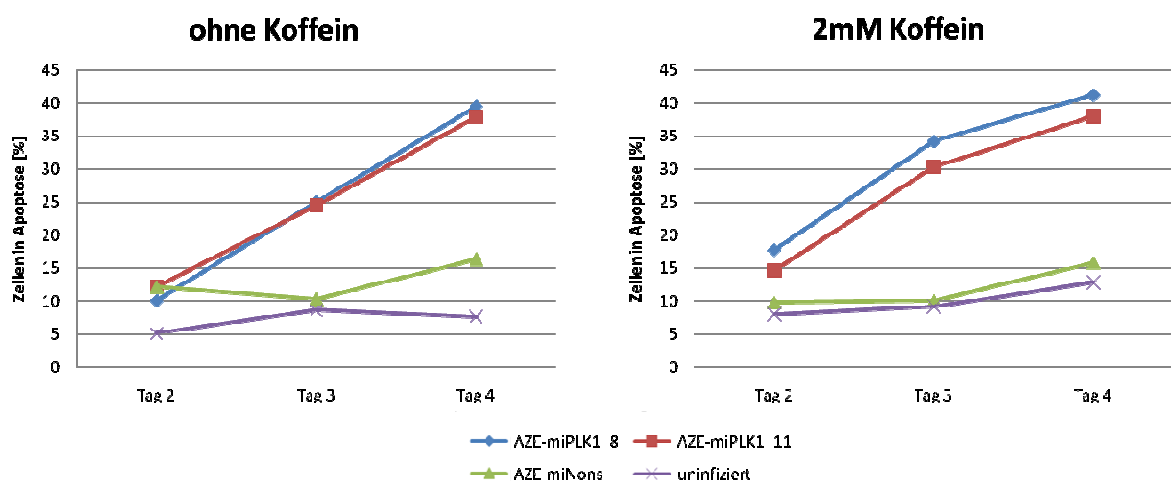


Abbildung 4-15: Effekt von Koffein auf Zellen nach PLK1-Depletion. HT1080-Zellen wurden mit AZE-miPLK1_8 (blau), AZE-miPLK1_11 (rot) oder AZE-miNons (grün) mit einer MOI von 10 infiziert. 24h nach Infektion erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen in Zellkulturmedium mit 2mM Koffein (rechts) oder ohne Koffein (links). 2, 3 und 4 Tage nach Infektion wurde der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie untersucht und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen dargestellt. Nicht infizierte Zellen wurden als Kontrolle untersucht (lila).

Abbildung 4-15 zeigt deutlich, dass Koffein die Apoptose der Zellen nach PLK1-Herunterregulation beschleunigt. Vier Tage nach Infektion konnte allerdings kein Unterschied mehr zwischen Koffein behandelten Zellen und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die Induktion von Apoptose wird somit nur beschleunigt, aber nicht verstärkt. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher auf die Behandlung mit Koffein verzichtet.

4.2.5.4 Analyse der PLK1-Depletion auf die Zellproliferation

Wie bereits beschrieben führt eine Herunterregulation von PLK1 zu einem G₂-Arrest und der Induktion von Apoptose (Abbildung 4-14). Dies wurde in HT1080-Zellen daher genauer analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit einer MOI von 10 mit den rekombinanten Viren die eine gegen PLK1 gerichtete miRNA exprimieren infiziert und Zellzyklusprofile mittels Durchflusszytometrie 3, 4 und 5 Tage nach Infektion erstellt (Abbildung 4-16).

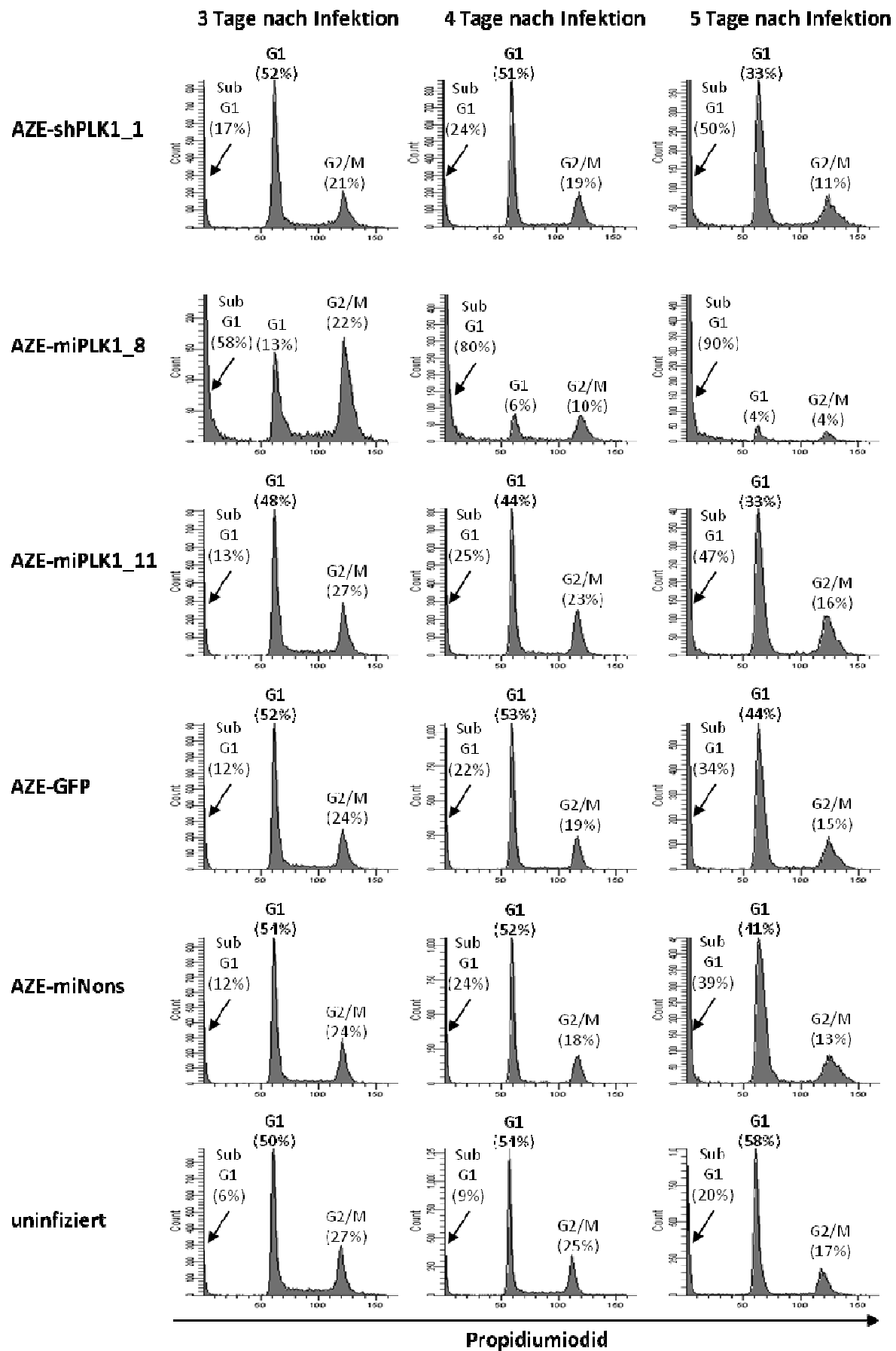


Abbildung 4-16: Zellzyklusprofile von HT1080-Zellen nach Infektion mit shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1. HT1080-Zellen wurden mit den jeweiligen shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1 mit einer MOI von 10 infiziert und Zellzyklusprofile mittels Durchflusszytometrie 3, 4 und 5 Tage nach Infektion erstellt.

Zellen, die mit dem Virus AZE-miPLK1_8 infiziert wurden, zeigten an Tag 3 ein Verhältnis der Zellen in der G₁-Phase zu Zellen in der G₂/M-Phase von ca. 1:2 und waren somit in der G₂/M-Phase arretierten. An Tag 5 waren bereits 90% apoptotische Zellen zu beobachten (Abbildung 4-16 und Abbildung 4-17). Die Zellzyklusprofile der Zellen, welche mit den Viren AZE-shPLK1_1, AZE-miPLK1_11 und den Kontrollviren AZE-miNons und AZE-GFP infiziert waren, sowie uninfizierte Zellen zeigten dagegen mit einem Verhältnis der G₁-Phase zur G₂/M-Phase von ca. 2:1 keine Arretierung im Zellzyklus und keine Apoptose.

In Abbildung 4-17 sind die prozentualen Anteile der apoptotischen Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

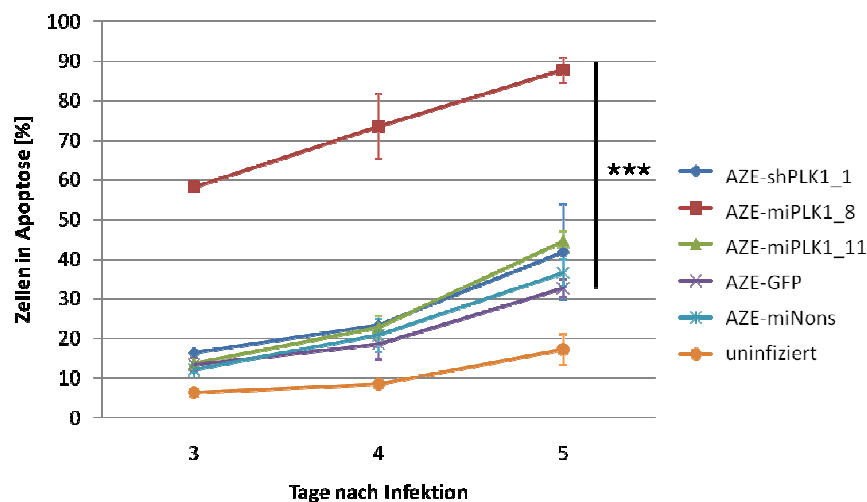


Abbildung 4-17: Anteil apoptotischer Zellen nach Infektion mit shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1. HT1080-Zellen wurden mit den jeweiligen shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1 mit einer MOI von 10 infiziert und Zellzyklusprofile mittels Durchflusszytometrie 3, 4 und 5 Tage nach Infektion erstellt. Die prozentualen Anteile der apoptotischen Zellen wurden aus zwei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Sternchen markieren die Signifikanz zwischen AZE-miPLK1_8 und AZE-miNons infizierten Zellen. ***p < 0,0001

AZE-miPLK1_8 infizierte Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$) der apoptotischen Zellen (87%) in Bezug auf Zellen welche mit dem Kontrollvirus AZE-miNons infiziert waren.

Die infizierten HT1080-Zellen wurden außerdem drei Tage nach Infektion mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht.

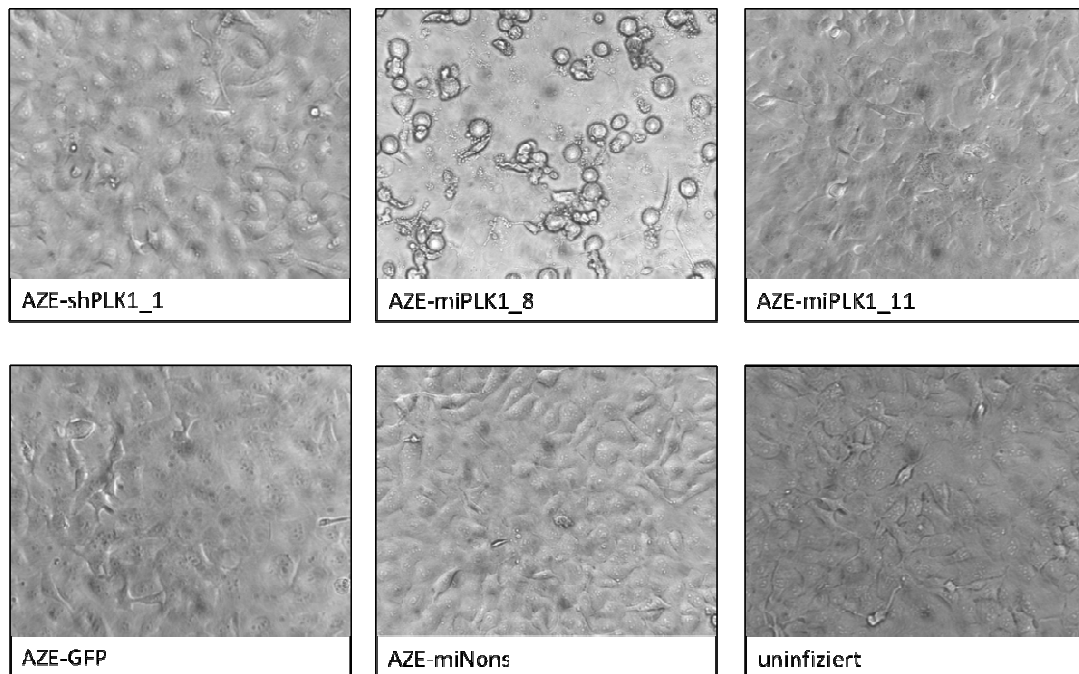


Abbildung 4-18: Mikroskopische Untersuchung von HT1080-Zellen 3 Tage nach Infektion mit shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1.

In Abbildung 4-18 ist die morphologische Veränderung von shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1-infizierte Zellen zu sehen. AZE-miPLK1_8 infizierte Zellen lösten ihren Zell-Zellkontakt und kugelten sich ab, beides Merkmale für apoptotische Zellen. Im Gegensatz hierzu, zeigten Zellen welche mit den Viren AZE-shPLK1_1, AZE-miPLK1_11 und den Kontrollviren AZE-miNons und AZE-GFP infiziert waren, sowie uninizierte Zellen keine morphologischen Veränderungen.

Für weitere Untersuchungen des *in vivo*-Effekts der PLK1-Inhibition wurde das Virus AZE-miPLK1_8 verwendet, da mit diesem sowohl eine Reduktion der PLK1 Proteinexpression als auch ein Zellzyklusarrest und Apoptose erreicht werden konnte.

4.2.6 *In vivo*-Applikation von shRNA-tragenden MLVs gegen PLK1

In vitro konnte gezeigt werden, dass das amphotrope MLV, welches die micro RNA-Kassette 8 gegen PLK1 (pAZE-miPLK1_8) kodiert, erfolgreich das PLK1-Protein herunterregulieren konnte und damit einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase und Apoptose induziert. Durch diese Eigenschaften und seinen natürlichen Tumortropismus, könnte dieses rekombinante Virus ein hervorragendes Werkzeug im Kampf gegen PLK1-überexprimierende Tumore darstellen. Dies sollte nun *in vivo* getestet werden. Hierzu wurden drei unterschiedliche Versuchsbedingungen untersucht.

4.2.6.1 *In vivo*-Applikation von infizierte HT1080-Zellen

Zunächst wurden vorinfizierte HT1080-Tumore in SCID-Mäuse transplantiert. Dies stellt eine vereinfachte Methode dar, da eine spätere Infektion der Tiere nicht erfolgen muss und die Viren bereits direkt am Wirkungsort sind. Für eine klinische Anwendung ist diese Methode jedoch ausgeschlossen.

Für die Applikation von vorinfizierten HT1080-Zellen in SCID-Mäuse wurden die Viren AZE-miPLK1_8 und als Negativkontrolle AZE-miNons zunächst in HEK293T-Zellen produziert. Direkt nach der Abnahme der virushaltigen Zellkulturüberständen wurde genomische DNA aus den virusproduzierenden HEK293T-Zellen isoliert und der 3'-Bereich des integrierten Virusgenom auf die Gegenwart der miRNA-Expressionskassette mittels PCR-Analysen untersucht (siehe auch Abbildung 4-11 für die Lage der PCR-Primer). Außerdem wurden die PCR-Produkte sequenziert (Abbildung 4-19 A). Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Viren keine Mutationen oder Deletionen innerhalb der miRNA-Expressionskassette aufwiesen, wurden HT1080-Zellen mit einer MOI von ca. 50 infiziert um eine Infektion aller Zellen zu garantieren. Die Infektion aller Zellen wurde durch Färben der Zellen mit einem MLV-Gag-spezifischen Antikörper in Immun-Peroxidase-Assays (IPA) nachgewiesen (Abbildung 4-19 B).

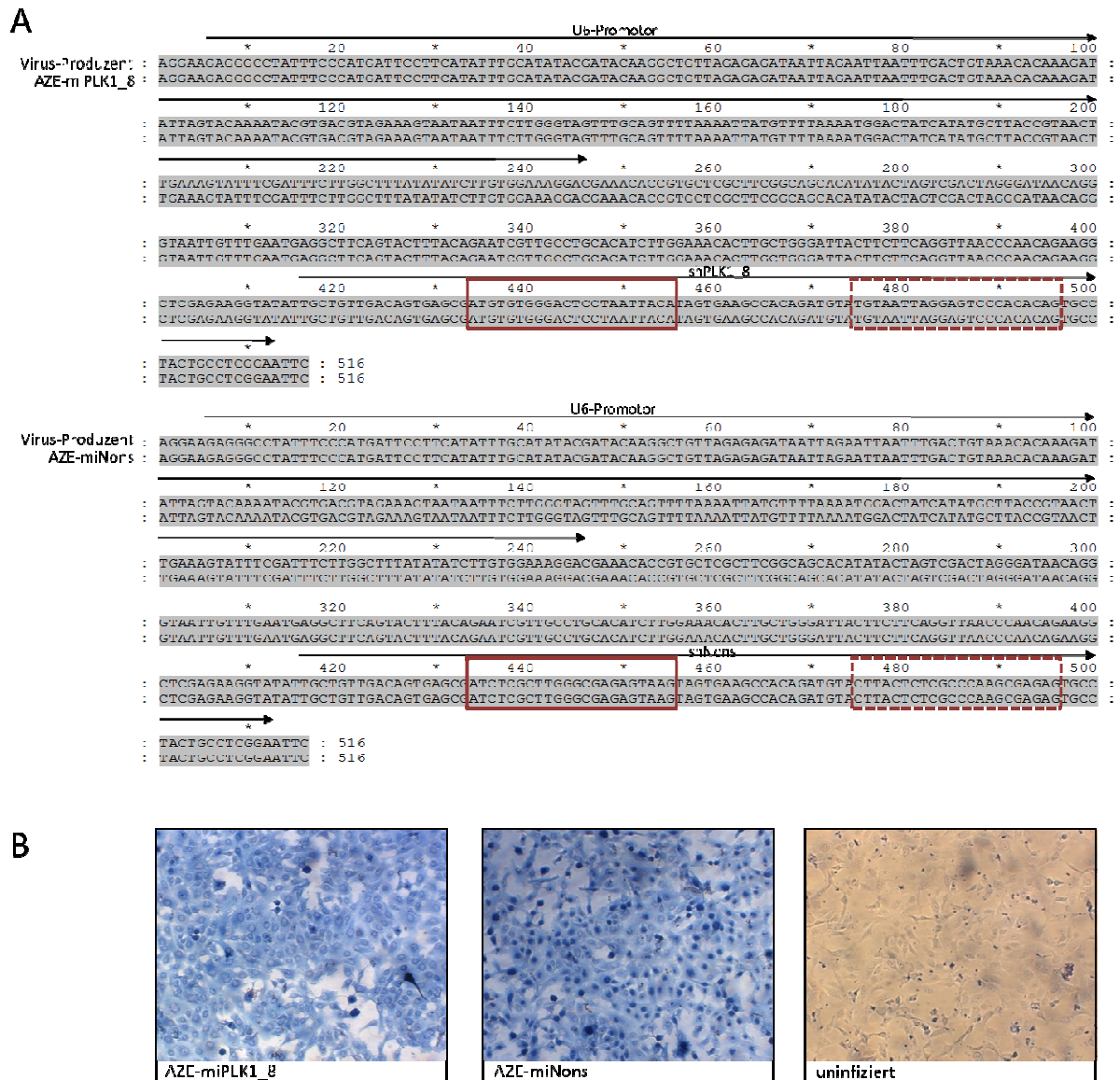


Abbildung 4-19: Kontrolle von Virus und Zellen vor *in vivo*-Applikation. A: Sequenzanalyse der genomischen DNA der Produzentenzellen auf das integrierte Provirus vor Infektion. B: Test der zu transplantierenden Zellen auf Infektion durch Färben des MLV-Gag-Proteins mittels IPA. Infizierte Zellen zeichnen sich durch eine blau/violette Färbung aus.

Abbildung 4-19 zeigt die Kontrolle der miRNA-Kassetten von AZE-miPLK1_8 und AZE-miNons in den Produzentenzellen (A) und die Infektion von HT1080-Zellen vor subkutaner Applikation in SCID-Mäuse (B). Es wurde nachgewiesen, dass die rekombinanten Viren vor der Infektion von HT1080-Zellen stabil waren und die HT1080-Zellen vor der Applikation zu 100% infiziert waren.

DNA (gDNA) isoliert und die shRNA-Expressionskassetten mittels PCR-Analyse amplifiziert (siehe auch Abbildung 4-11 für die Lage der PCR-Primer).

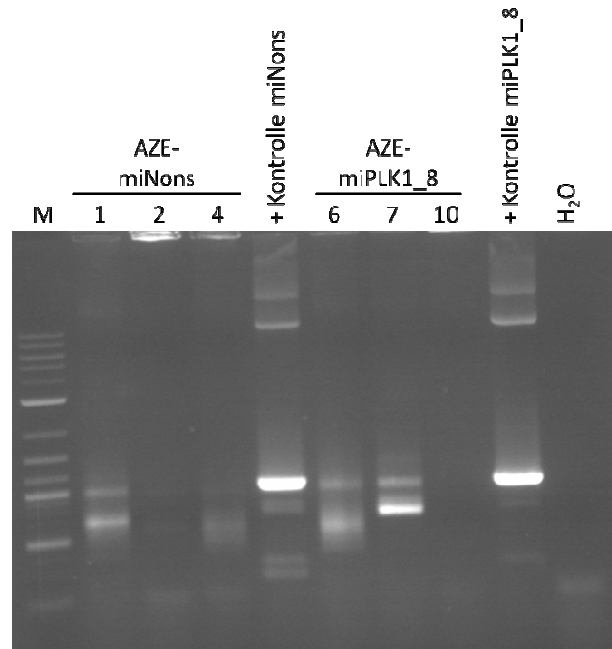


Abbildung 4-21: Test der isolierten Tumore auf Deletionen der miRNA-Expressionskassen mittels PCR-Analyse. Analysiert wurden gDNA aus je 3 Tumoren der einzelnen Versuchsgruppen. 1, 2 und 4 entspricht AZE-miNons infizierten Tumoren, 6, 7 und 10 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Tumoren. Als Positivkontrolle diente die entsprechende Plasmid-DNA.

Abbildung 4-21 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analyse. 1, 2 und 4 entspricht AZE-miNons infizierten Tumoren, 6, 7 und 10 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Tumoren. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die shRNA-Expressionskassette flankieren. Als Positivkontrolle (+) für die PCR wurden die jeweilige Plasmid-DNA verwendet und die amplifizierten Fragmente sollten eine Größe von 986bp haben. Die PCR-Analyse der Tumore aus den Mäusen 2 und 10 war negativ. Dies könnte auf geringe DNA-Ausbeute aus den relativ kleinen Tumoren zurückzuführen sein. Die PCR-Analysen der gDNA-Proben der Tumore aus den Mäusen 1 und 4, sowie den Mäusen 6 und 7 ergaben sowohl PCR-Fragmente der erwarteten Größe als auch PCR-Fragmente mit geringerer Größe. Dies spricht für Deletionen innerhalb der miRNA-Expressionskassette.

Um diese Mutationen genauer zu untersuchen, wurden die verkürzten PCR-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und in den Klonierungsvektor pGEM-Teasy kloniert. Anschließend

wurden Einzelklone sequenziert und die Sequenzen mit der Ursprungssequenz verglichen (Abbildung 4-22).

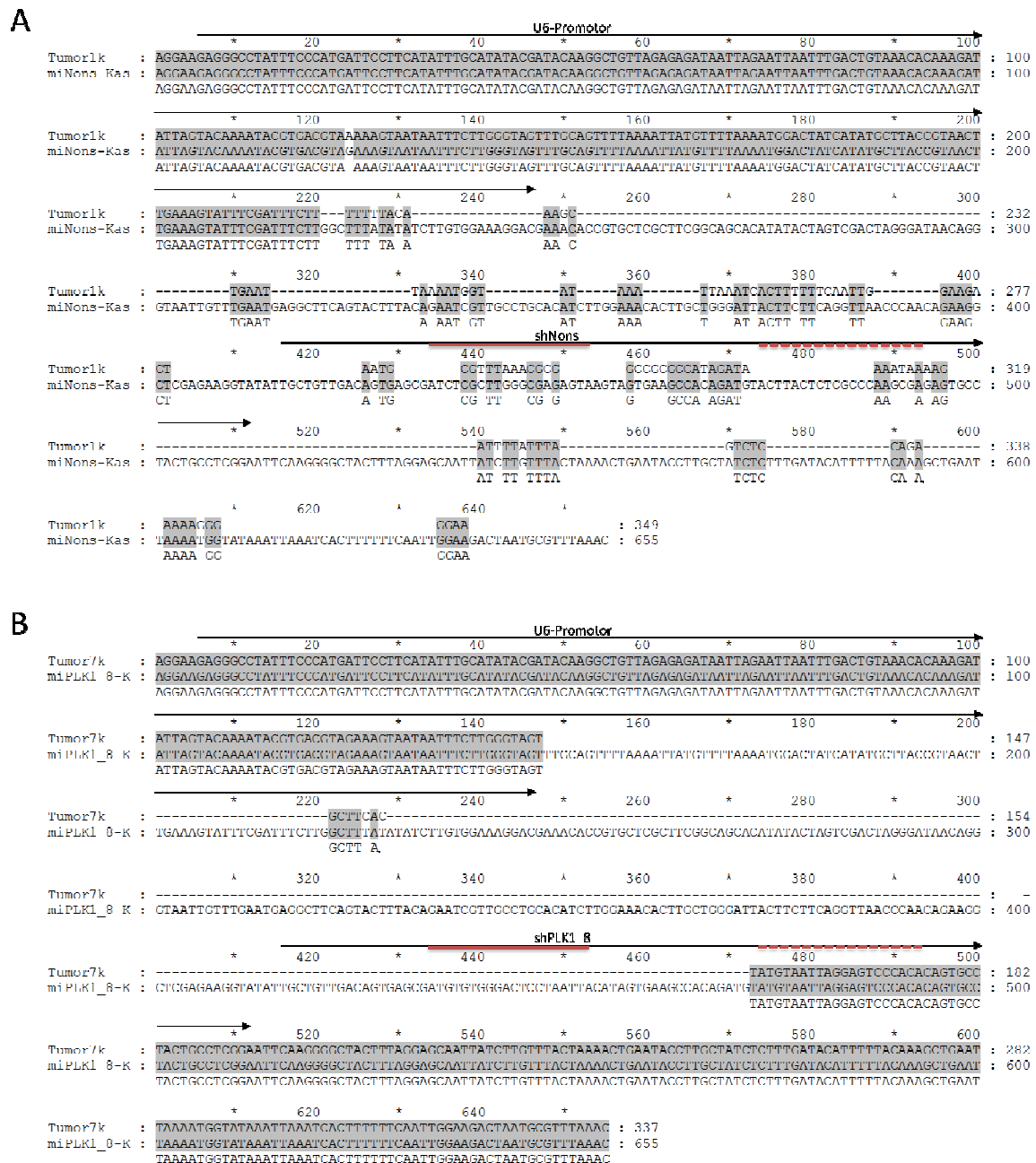


Abbildung 4-22: Sequenzvergleich der miRNA-Expressionskassetten nach *in vivo*-Applikation mit der Ursprungssequenz.

Abbildung 4-22 zeigt die Sequenzanalyse der miRNA-Expressionskassetten nach *in vivo*-Applikation. Es wurde sowohl in vorwärts als auch in entgegengesetzter Richtung sequenziert und die beiden Sequenzen stimmten miteinander überein. Die Sequenzanalyse zeigt deutliche

Mutationen. In der Sequenz aus dem Tumor der Maus 7, welche mit dem Virus AZE-miPLK1_8 infiziert war, konnte eine Deletion des 3'-Ende des Promotors bis zur Mitte der miRNA-Expressionskassette nachgewiesen werden. Die übrige analysierte Virussequenz zeigte keine Deletionen. In der Sequenz aus dem Tumor der Maus 1, welche mit dem Virus AZE-miNons infiziert war, ist die Sequenz ab dem 3'-Ende des Promotors fast vollständig mutiert. In beiden Fällen war die Sequenz der miRNA nicht mehr nachweisbar.

4.2.6.2 Intravernöse Virusapplikation

Nachdem die *in vivo*-Applikation von vorinfizierten Zellen in SCID-Mäuse einen Trend zu verringertem Tumorwachstum zeigte, einige der Tumore aber nicht anwuchsen, wurde ein Versuchsansatz gewählt, der es zum Einem zulässt, nur tumortragende Mäuse zu behandeln und zum Anderen einen realistischen therapeutischen Ansatz für die klinische Situation darstellt. 5×10^5 HT1080-Luc-Zellen (HT1080-Zellen die *Firefly*-Luciferase exprimieren), welche die Analyse der Tumorgroße mittels *in vivo-Imagings* erlauben, wurden zunächst subkutan transplantiert. Nachdem alle Tumore angewachsen waren, wurden sechs Tage nach Transplantation 3×10^5 IE AZE-miPLK1_8 bzw. AZE-miNons intravenös in je drei der tumortragenden Mäuse appliziert. Nach 48 Stunden erfolgte eine zweite intravenöse Applikation von 3×10^5 IE Viren. Das Tumolvolumen wurde alle zwei bis drei Tage gemessen. 21 Tage nach der ersten Virus Applikation wurden die Mäuse getötet und die Tumore zur weiteren Untersuchung entnommen. In Abbildung 4-23 A ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

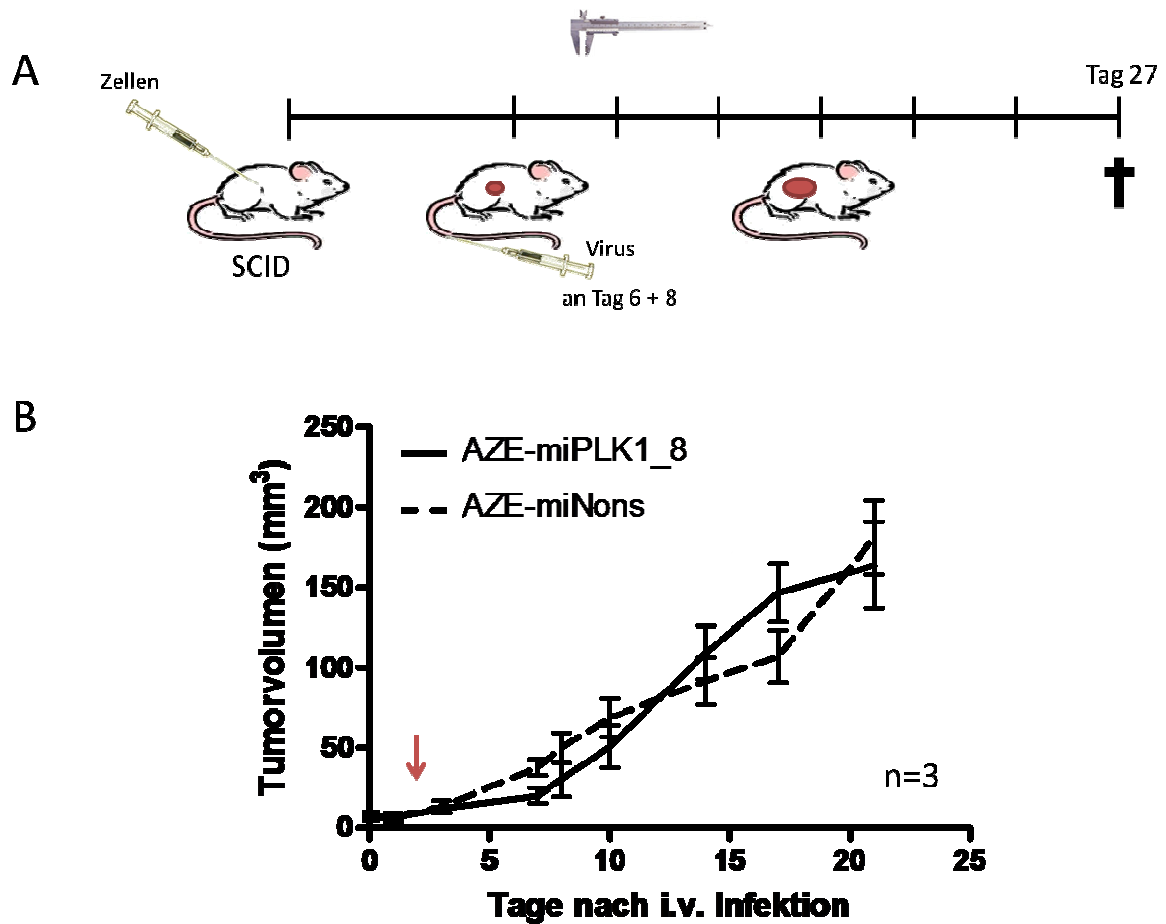


Abbildung 4-23: Tumorstadium nach intravenöser Infektion. Nach subkutaner Transplantation von 5×10^5 HT1080-Zellen in SCID-Mäuse, wurde jeweils 3 Mäusen 3×10^5 IE des Virus AZE-miPLK1_8 bzw. AZE-miNons intravenös appliziert. A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. B: Verlauf des Tumorstadiums über 21 Tage nach Infektion. Der rote Pfeil markiert die zweite Virusapplikation.

Abbildung 4-23 B zeigt den Verlauf der Tumorstadium nach intravenöser Applikation von AZE-miPLK1_8 bzw. AZE-miNons. Die Applikation von AZE-miPLK1_8 zeigte keinen Einfluss auf das Tumorstadium im Vergleich zu der AZE-miNons Kontrollinfektion.

Die Transplantation von Luciferase exprimierenden Zellen erlaubte die Analyse der Tumorstadium mittels *in vivo-Imaging*. Den Mäusen wurde hierfür Luciferin intraperitoneal injiziert. Luciferin wird von Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt und emittiert somit grünes Licht mit einer Wellenlänge von 562nm, welches durch einen *in vivo-Imager* (IVIS200, Xenogen Bioscience) detektiert wurde. Eine Quantifizierung der Tumorstadium ist damit wesentlich genauer als die Messung mit einer Schieblehre.

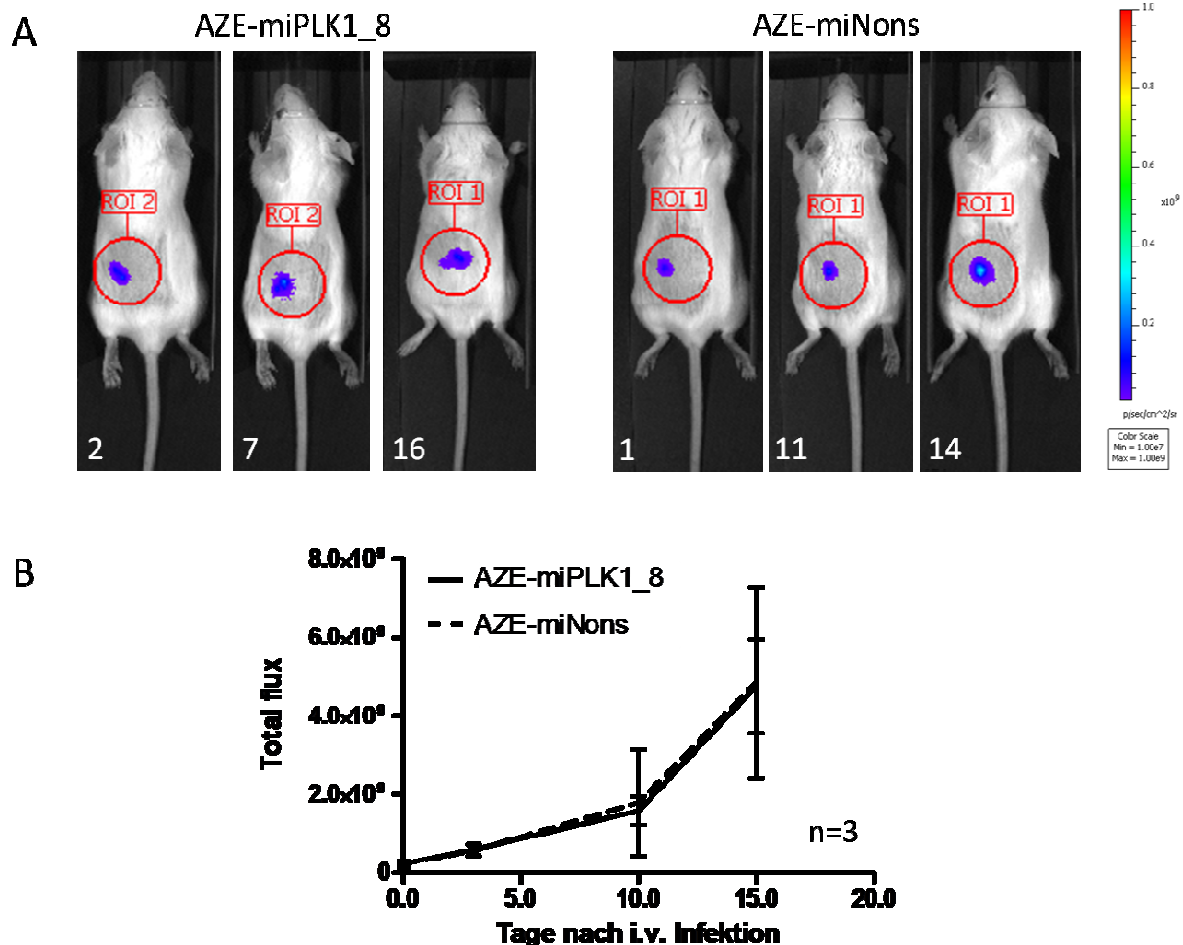


Abbildung 4-24: Quantifizierung des Tumorumens mittels *in vivo-Imager*. Je drei Mäusen mit Luciferase-exprimierenden Tumoren wurde Luciferin an Tag 3, 10 und 15 nach Infektion appliziert und die entstehenden Lichtsignale mittels *in vivo-Imager* aufgenommen. A: Aufnahme der Lichtsignale. 2, 7 und 16 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Mäusen, 1, 11 und 14 entspricht AZE-miNons infizierten Mäusen. Die Bedeutung der Farbverläufe ist in der Skala rechts dargestellt. B: Verlauf der Lichtsignale über die Zeit.

Abbildung 4-24 zeigt die Ergebnisse des *in vivo-Imagings*. Abbildung 4-24 A zeigt die Lichtsignale, welche vom *Imaging*-System aufgenommen wurden. Der Farbverlauf wird durch die Skala rechts im Bild verdeutlicht. Je größer der Tumor ist, umso mehr Luciferase wird exprimiert und desto stärker ist das Lichtsignal, da mehr Oxyluciferin durch die Umsetzung von Luciferin entsteht. In Abbildung 4-24 B ist der Verlauf der Lichtsignale bis zum Tag 15 nach Infektion dargestellt. Auch hier konnte kein unterschiedliches Wachstum der Tumore in den beiden Versuchsgruppen gemessen werden.

Es wurde bereits beschrieben, dass eine Infektion subkutaner Tumore mit aMLV nach systemischer Applikation stattfindet (Duerner *et al.*, 2008). Um dies auch in diesem Versuch

zu überprüfen, wurden die Tumore nach Tötung der Tiere am Tag 27 entnommen. Aus dem Gewebe wurde genomische DNA isoliert und die shRNA-Expressionskassetten mittels PCR amplifiziert (Abbildung 4-25).

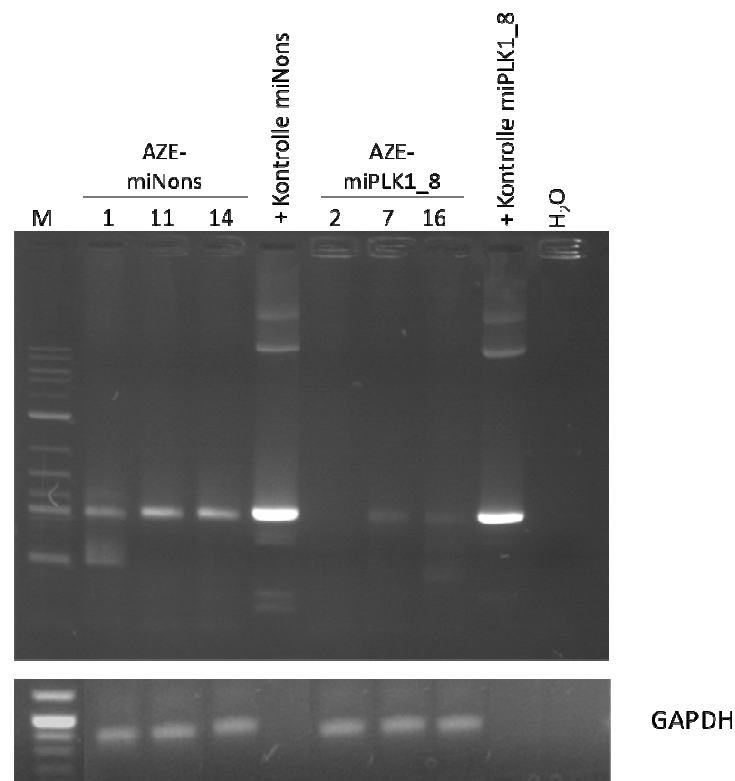


Abbildung 4-25: Detektion der shRNA-Expressionskassen aus Tumorgewebe mittels PCR-Analyse. Analysiert wurden gDNA aus je 3 Tumoren der einzelnen Versuchsgruppen. 1, 11 und 14 entspricht AZE-miNons infizierten Mäusen, 2, 7 und 16 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Mäusen. Als Positivkontrolle diente die entsprechende Plasmid-DNA. Zur Kontrolle der verwendeten gDNA-Menge diente die PCR-Analyse von GAPDH (unten).

Abbildung 4-25 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analyse der Tumore. 1, 11 und 14 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Mäusen und 2, 7 und 16 entspricht AZE-miNons infizierten Mäusen. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die shRNA-Expressionskassette flankieren. Als Positivkontrolle für die PCR wurden die jeweilige Plasmid-DNA verwendet. Die erwartete Fragmentgröße war 986bp. Als Referenz für die verwendete gDNA-Menge wurde eine PCR mit Primern für GAPDH durchgeführt.

Die PCR-Analyse der gDNA aus AZE-miNons infizierten Tumoren, zeigt eindeutige Banden in der erwarteten Größe. Des Weiteren sind bei Maus 1 auch PCR-Fragmente in geringerer Größe entstanden. Dies spricht für ein bis mehrere Deletionen innerhalb der miRNA-

Expressionskassette. Bei der PCR-Reaktion der Proben aus AZE-miPLK1_8 infizierten Mäusen (2, 7 und 16) sind keine oder nur sehr schwache PCR-Fragmente entstanden. In Maus 2 scheint keine Infektion der Tumorzellen stattgefunden zu haben. In den Proben der Mäuse 7 und 16 konnten schwache Banden in der erwarteten Größe und kleinere Banden detektiert werden. Die GAPDH Kontrolle zeigt, dass für die PCR-Reaktion in allen Proben die gleiche Menge an gesamt gDNA eingesetzt wurde.

Um die PCR-Fragmente genauer zu untersuchen, wurden die PCR-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert und in den Klonierungsvektor pGEM-Teasy kloniert. Anschließend wurden Einzelklone sequenziert und die Sequenzen mit der Ursprungssequenz verglichen und auf Mutationen untersucht (Abbildung 4-22).



Abbildung 4-26 zeigt den Sequenzvergleich nach intravenöser *in vivo*-Applikation von AZE-miPLK1_8 und AZE-miNons mit der Ursprungssequenz. Es wurde sowohl in vorwärts als auch in entgegengesetzter Richtung sequenziert und die beiden Sequenzen stimmten miteinander überein. Die Promotor-Region, sowie die miRNA-Kassette waren in beiden Virusvarianten vollständig mutiert.

4.2.6.3 Intratumorale Virusapplikation

Da die Infektion der Tumore nach systemischer Applikation der Viren vermutlich nicht vollständig war oder die Replikation von AZE-miPLK1_8 *in vivo* eingeschränkt ist, sollten die rekombinanten Viren nun direkt in den Tumor appliziert werden. Somit wurde eine direkte Infektion gewährleistet. 5×10^5 HT1080-Zellen wurden zunächst subkutan transplantiert. Bei einer ungefähren Tumorgroße von 30 mm^3 wurden 10^6 IE AZE-miPLK1_8 bzw. AZE-miNons intratumoral in je neun tumortragende Mäuse appliziert. 12 Tage nach der ersten Virusapplikation erfolgte eine zweite intratumorale Applikation von 10^6 IE Viren. Das Tumorstadium wurde über 25 Tage nach Virusapplikation gemessen. 25 Tage nach der ersten Virusapplikation wurden die Mäuse getötet und die Tumore entnommen und rekultiviert. In Abbildung 4-27 A ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

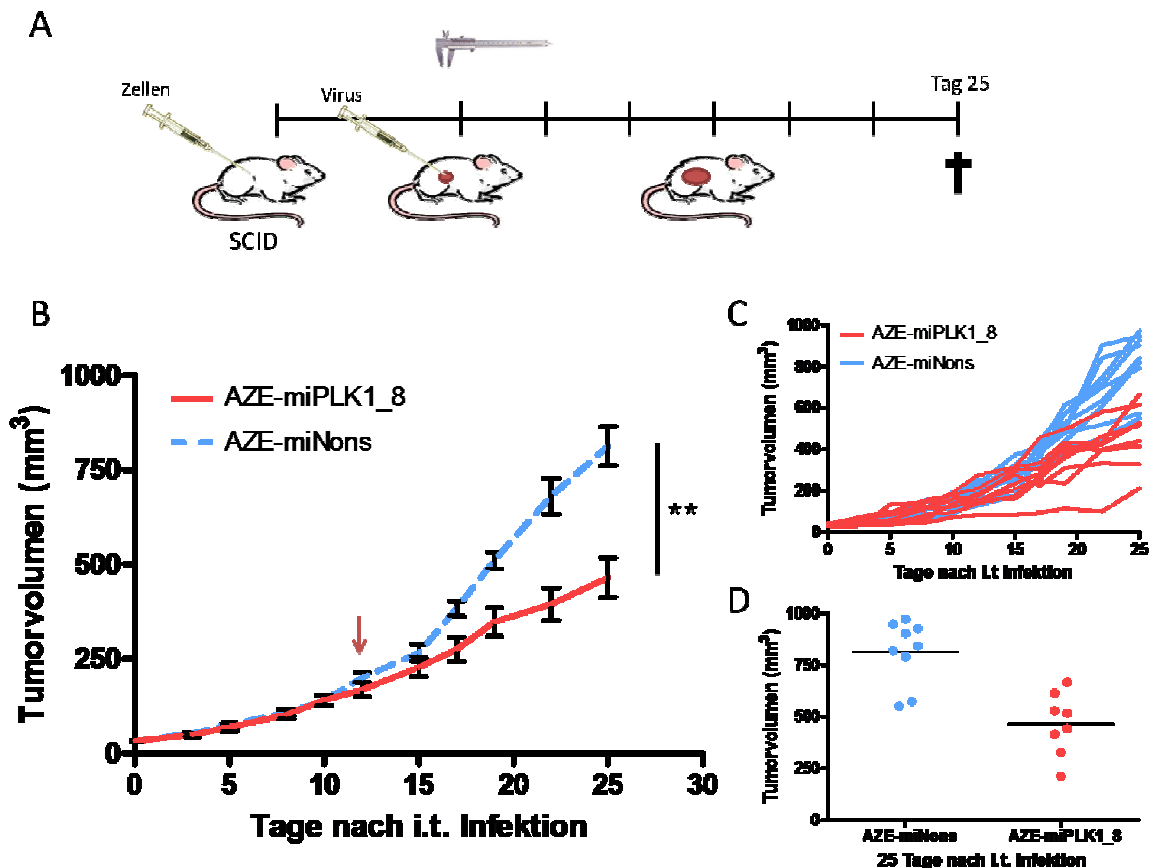


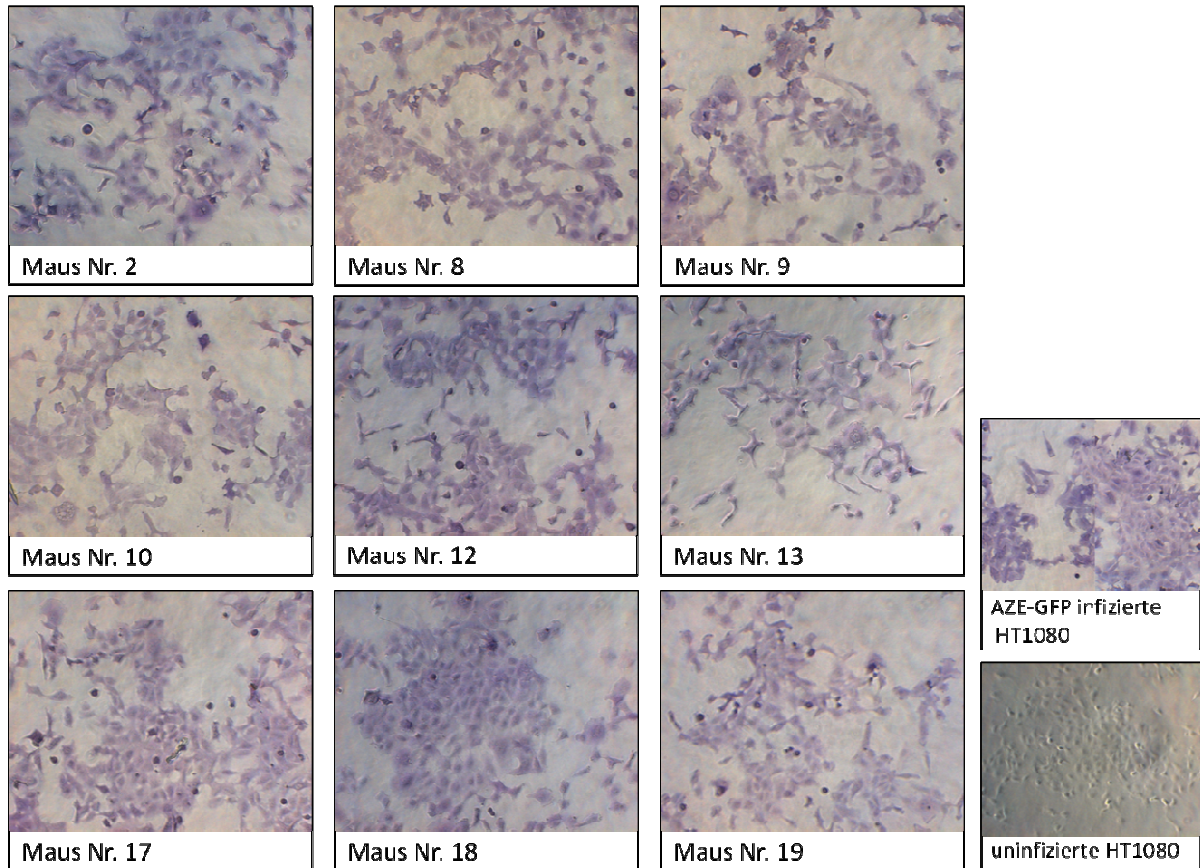
Abbildung 4-27: Tumorstadium nach intratumoraler Infektion. Nach subkutaner Transplantation von 5×10^5 HT1080-Zellen in SCID-Mäuse, wurde jeweils 9 Mäusen 10^6 IE des AZE-miPLK1_8 bzw. AZE-miNons intratumoral appliziert. A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. B: Verlauf des Tumorstadiums über 25 Tage nach Infektion. Der rote Pfeil markiert die zweite Virusapplikation. $**p = 0,0019$ C: Verlauf des Tumorstadiums der einzelnen Mäuse über 25 Tage nach Infektion. D: Tumorstadium an Tag 25 nach intratumoraler Infektion. Rot: Tumor infiziert mit AZE-miPLK1_8; blau: Tumor infiziert mit AZE-miNons.

Abbildung 4-27 zeigt den Verlauf des Tumorstadiums nach intratumoraler Virusapplikation. Tumore, welche mit AZE-miPLK1_8 infiziert waren, zeigten ein signifikant verringertes Wachstum im Vergleich zu AZE-miNons infizierten Tumoren ($**p = 0,0019$). Die durchschnittliche Tumorstadiumgröße an Tag 25 nach Infektion war bei AZE-miPLK1_8 infizierten Tumoren ca. 1/3 geringer im Vergleich zu AZE-miNons infizierten Tumoren (Abbildung 4-27 D).

Die Infektion der Tumore wurde mit rekultivierten Tumorzellen durchgeführt. Um auszuschließen, dass eine weitere Infektion der Zellen *in vivo* stattfindet, wurde dem Zellkulturmedium der Reverse-Transkriptase-Inhibitor AZT zugesetzt. Die Infektionsrate

wurde durch Färbung des MLV-Gag-Proteins mittels Immun-Peroxidase-Assay (IPA) untersucht (Abbildung 4-28).

AZE-miPLK1_8



AZE-miNons

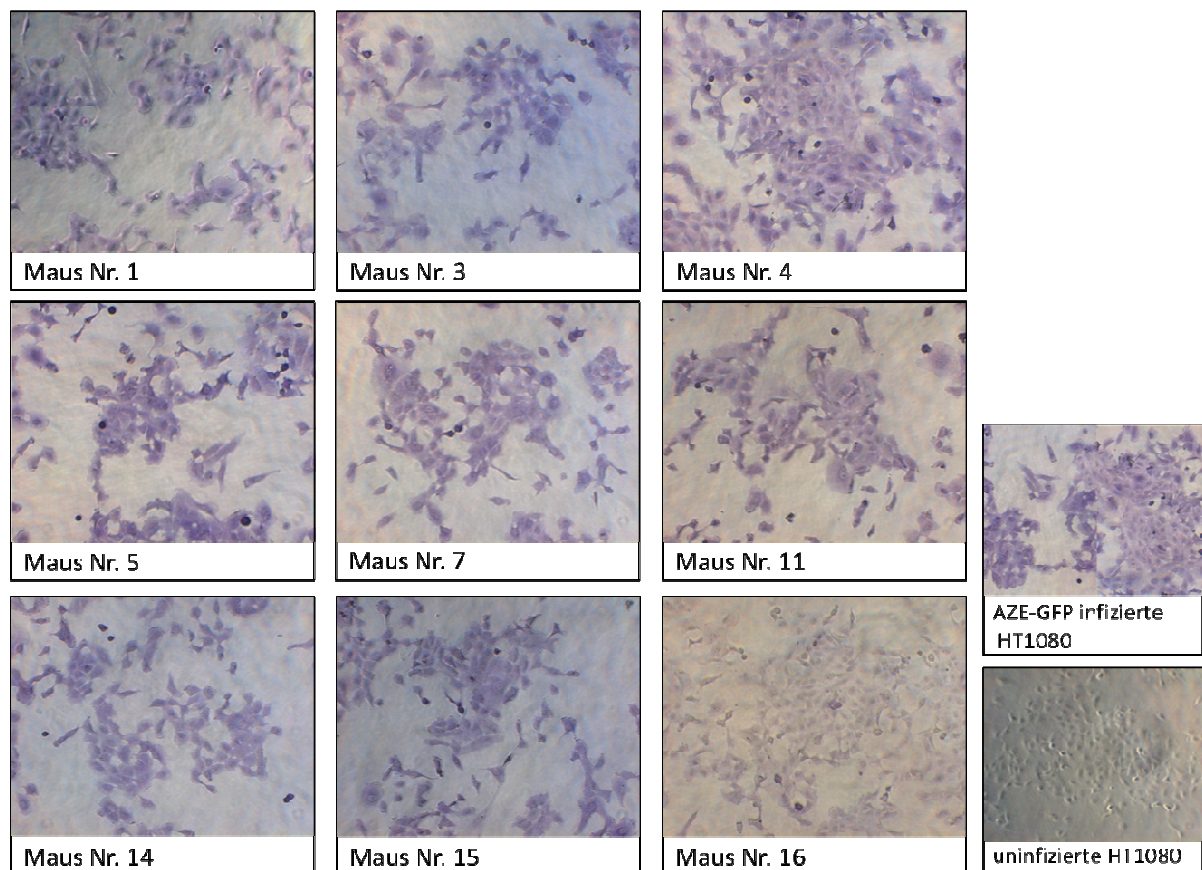


Abbildung 4-28: Test der rekultivierten Tumore auf Infektion mittels IPA. Die Infektion wurde mittels IPA mit einem MLV-Gag-spezifischen Antikörper untersucht. Infizierte Zellen zeichnen sich durch eine blau/violette Färbung aus.

Abbildung 4-28 zeigt die Ergebnisse des Tests auf MLV Infektion. Eine blau/violette Färbung stellt den Nachweis einer MLV Infektion dar. Alle Tumore, bis auf den Tumor aus Maus Nummer 16, welche das AZE-miNons appliziert bekam, waren vollständig durchinfiziert. Für den Tumor der Maus Nummer 16 konnte eine Infektionsrate von ca. 3% bestimmt werden. Als Positivkontrolle wurden AZE-GFP infizierte Zellen, die eine durchgehende grüne Fluoreszenz aufwiesen, untersucht. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen.

Die Stabilität der miRNA-Expressionskassetten wurde auch hier durch PCR-Analyse der miRNA-Expressionskassette an gDNA untersucht (Abbildung 4-29).

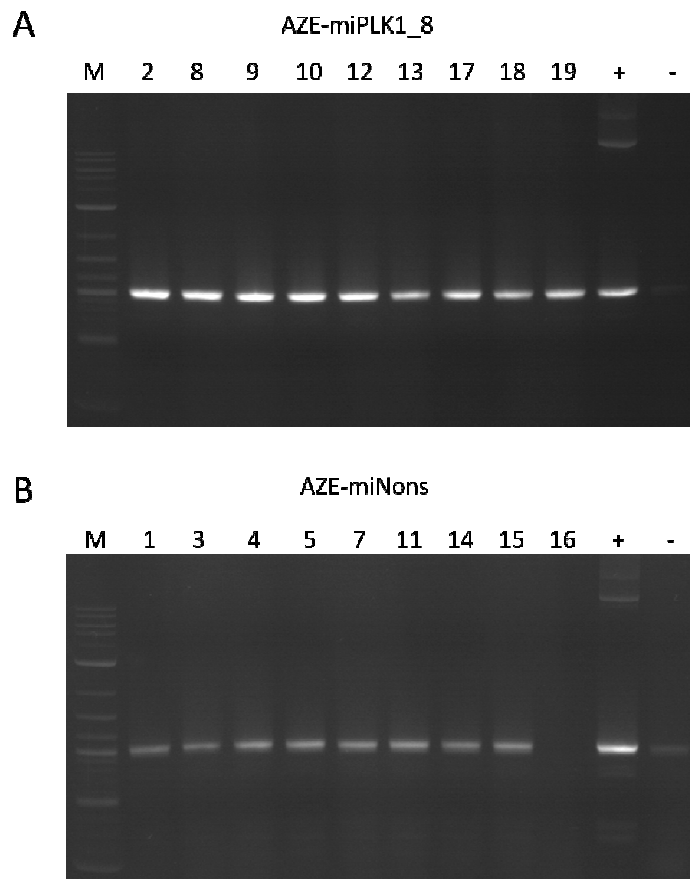


Abbildung 4-29: Detektion der shRNA-Expressionskassen aus Tumorgewebe mittels PCR-Analyse. Analysiert wurden gDNA aus je 9 Tumoren der einzelnen Versuchsgruppen. 2, 8, 9, 10, 12, 13, 17, 18 und 19 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Mäusen (A), 1, 3, 4, 5, 7, 11, 14, 15 und 16 entspricht AZE-miNons infizierten Mäusen (B). Als Positivkontrolle diente die entsprechende Plasmid-DNA.

Abbildung 4-29 zeigt die Ergebnisse der PCR-Analyse der Tumore. 2, 8, 9, 10, 12, 13, 17, 18 und 19 entspricht AZE-miPLK1_8 infizierten Mäusen und 1, 3, 4, 5, 7, 11, 14, 15 und 16 entspricht AZE-miNons infizierten Mäusen. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die shRNA-Expressionskassette flankieren. Als Positivkontrolle für die PCR wurden die Plasmid-DNA verwendet. Die erwartete Fragmentgröße war 986bp. Alle PCR-Fragmente zeigten die erwartete Größe. Es konnten keine Banden mit geringerer Größe detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die shRNA-Expressionskassette nach intratumoraler Applikation *in vivo* stabil ist. Aus dem Tumor der Maus Nummer 16 konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Dies ist vermutlich auf die geringe Infektionsrate von 3% zurückzuführen.

Die PCR-Fragmente wurden zusätzlich aus dem Agarosegel isoliert und direkt sequenziert und die Sequenzen wurden mit der Ursprungssequenz verglichen (Abbildung 4-30 und Abbildung 4-31).

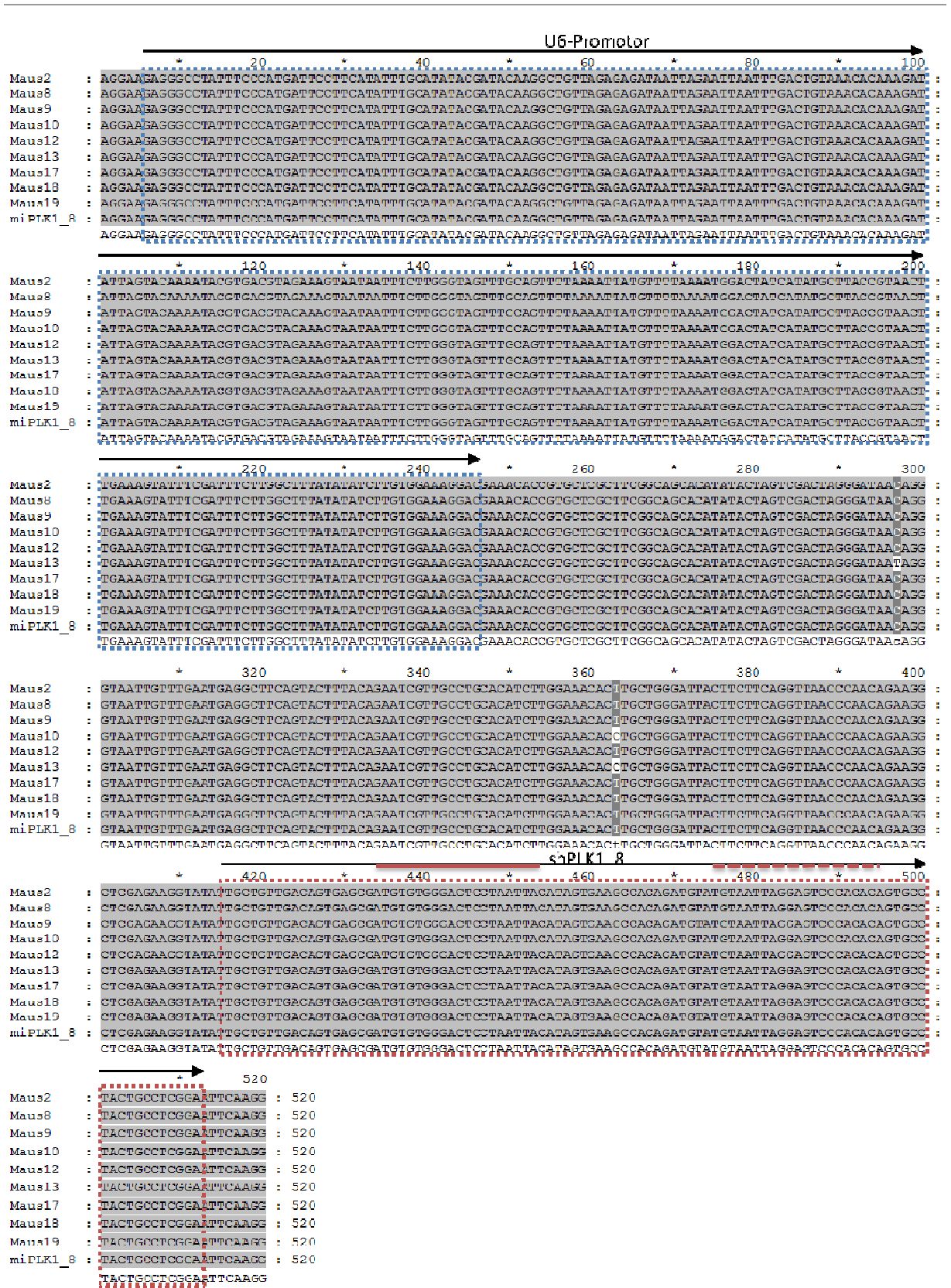


Abbildung 4-30: Sequenzvergleich der miPLK1 8-Expressionskassetten.

104

In den Abbildung 4-30 und Abbildung 4-31 ist der Sequenzvergleich der shRNA-Expressionskassetten nach intratumoraler *in vivo* Applikation mit der Ursprungssequenz dargestellt. Keine der Sequenzen wies Deletionen auf. In den Sequenzen der AZE-miPLK1_8 infizierten Tumore konnten drei Punktmutationen zwischen der Promotor-Region und der miRNA festgestellt werden. Dabei fanden zwei der Mutationen in Maus Nummer 13 und eine Mutation in Maus Nummer 10 statt. Alle weiteren Sequenzen der AZE-miPLK1_8 infizierten Mäuse wiesen keine Mutationen auf. In den Sequenzen der AZE-miNons infizierten Tumore wurden 5 Punktmutationen festgestellt. Dabei wurde in der Sequenz von Maus Nummer 11 eine Punktmutation zwischen der Promotor-Region und der miRNA detektiert. Für Maus Nummer 3 wurden 4 Punktmutationen in der Promotor-Region festgestellt und Maus Nummer 1 wies eine Punktmutation innerhalb der Promotor-Region auf. Alle weiteren Sequenzen der AZE-miNons infizierten Mäuse wiesen keine Mutationen auf.

4.2.7 STAT3 als therapeutisches Zielgen

Der Signalüberträger und Aktivator der Transkription STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Signalübertragung von Interleukin-ähnlichen Zytokinen beteiligt ist. STAT3 ist somit an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung von Zellen beteiligt. Eine Überexpression oder konstitutive Aktivierung führt häufig zu Krebserkrankungen. So konnte beispielsweise in 95% aller Kopf- und Nackenkrebserkrankungen konstitutiv aktives STAT3 nachgewiesen werden (Darnell, 2005). Eine Herunterregulation von STAT3 durch shRNAs stellt somit einen weiteren möglichen Ansatz zur Tumorthherapie dar.

Zuerst sollte untersucht werden, ob die Richtung in welche die shRNA gegen STAT3 in aMLV kloniert wurde (*forward* = *fwd* oder *revers* = *rev*) oder eine zusätzliche IRES-GFP-Kassette innerhalb der 3'-Region des Env einen Einfluss auf die Effektivität der Herunterregulation hat. Hierzu wurden unterschiedliche rekombinante aMLV Varianten untersucht. Dabei wurde die shRNA-Expressionskassette gegen STAT3 sowohl *forward* als auch *revers* entweder vor oder hinter die IRES-GFP-Kassette in pAZE-GFP kloniert oder die IRES-GFP-Kassette wurde durch die shSTAT3-Expressionskassette ersetzt.

Um die unterschiedlichen, rekombinanten Virusvarianten gegen STAT3 auf ihre Effektivität der Herunterregulation des Proteins zu untersuchen wurden HEK293T-Zellen mit 1µg eines STAT3-Expressionsplasmids (pBabe-STAT3C) und 1µg jeweils eines rekombinanten

Virusplasmids ko-transfiziert. Als Negativkontrollen wurden Zellen mit pAZE-miNons und pAZE-GFP ko-transfiziert und Zellen alleine mit dem pBabe-STAT3C Plasmid transfiziert. Zwei Tage nach der ko-Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Gesamtproteinextrakte mittels Western-Blot-Analyse auf die Proteinexpression von STAT3 untersucht (ca. 91kDa) (Abbildung 4-32).

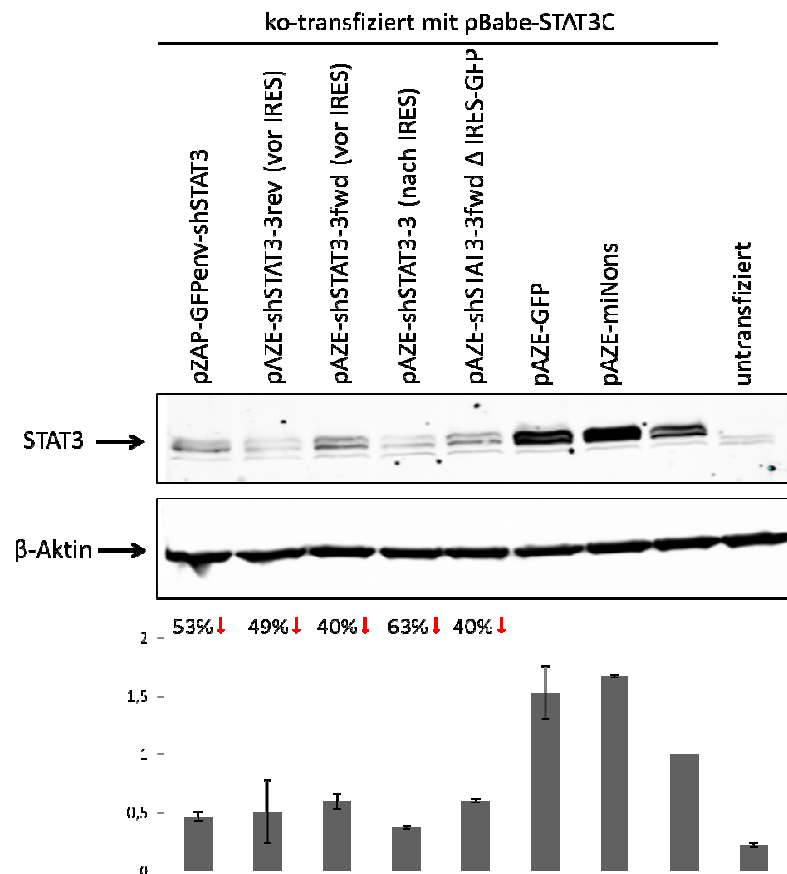


Abbildung 4-32: Identifizierung funktioneller shRNAs gegen STAT3. Oben: Western-Blot-Analyse von ko-transfizierten HEK293T-Zellen mit einem STAT3C-Expressionsplasmid (pBabe-STAT3C) und den shSTAT3-tragenden aMLV-Varianten. Die Detektion erfolgte mit einem STAT3-spezifischen Antikörper. Die Detektion von β -Aktin erfolgte als Ladekontrolle. Unten: Quantifizierung der Banden aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine Herunterregulation von STAT3 konnte durch alle gegen STAT3 gerichteten shRNA-tragenden Virusvarianten erreicht werden. Die stärkste Herunterregulation mit 63% wurde durch die Transfektion mit pAZE-shSTAT3-3 (nach IRES) erreicht. Für weitere Untersuchungen wurde daher nur pAZE-shSTAT3-3 (nach IRES) verwendet. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung wurde die Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin inkubiert (ca. 42kDa).

Um eine geeignete Model-Zelllinie für spätere Untersuchungen zu finden, wurden vier unterschiedliche Zelllinien mit AZE-shSTAT3-3 (nach IRES) mit einer MOI von 10 infiziert und drei Tage nach Infektion zur Western-Blot-Analyse herangezogen. Für die Analysen wurden die transformierten Zelllinien Myla, 4T1, TU 7449 und TU 9648 herangezogen. Als Negativkontrollen wurden Zellen mit AZE-miNons und AZE-GFP infiziert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung wurde die Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin inkubiert (ca. 42kDa) (Abbildung 4-33).

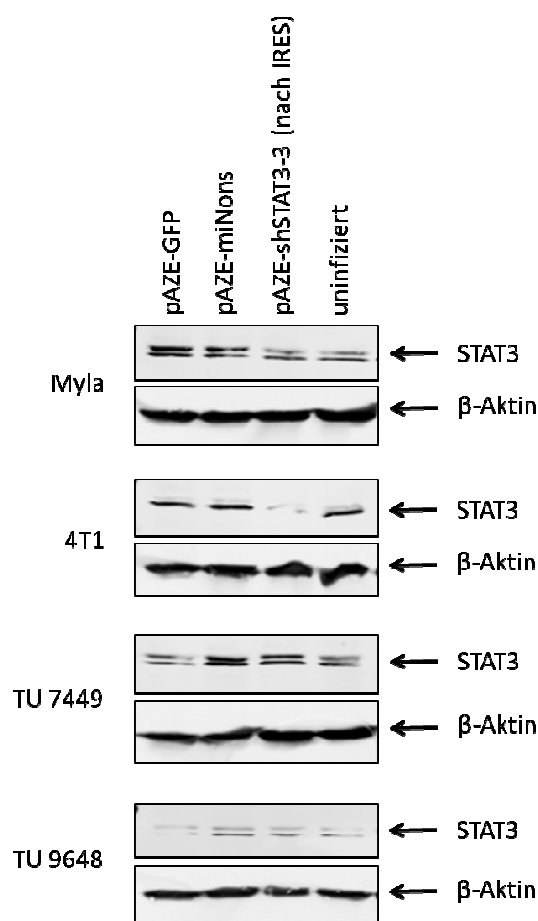


Abbildung 4-33: Test der Zelllinien Myla, 4T1, TU 7449 und TU 9648 auf die Herunterregulation von STAT3 mittels Western-Blot-Analyse. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und 3 Tage nach Infektion zu Western-Blot-Analysen herangezogen. Die Detektion erfolgte mit einem STAT3-spezifischen Antikörper. Die Detektion von β -Aktin erfolgte als Ladekontrolle.

Die Infektion mit AZE-shSTAT3-3 (nach IRES) zeigte keinen Effekt in Myla-, Tu 7449- und TU 9648-Zellen. Dagegen wurde in 4T1-Zellen die Expression des STAT3-Proteins fast vollständig herunterreguliert. Diese Zelllinie wurde für alle weiteren Arbeiten verwendet.

Transformierte Zellen wachsen in Soft-Agar in dreidimensionalen Kolonien. Eine Herunterregulation des STAT3-Proteins sollte das dreidimensionale Wachstum in Soft-Agar hemmen. 4T1-Zellen wurden mit AZE-shSTAT3-3 (nach IRES), sowie mit AZE-GFP oder AZE-miNons als Negativkontrolle mit einer MOI von 10 infiziert und 24 Stunden nach Infektion in Soft-Agar ausgesät und kultiviert. Drei Wochen nach der Infektion erfolgte eine mikroskopische Analyse der entstandenen dreidimensionalen Zellklone (Abbildung 4-34).

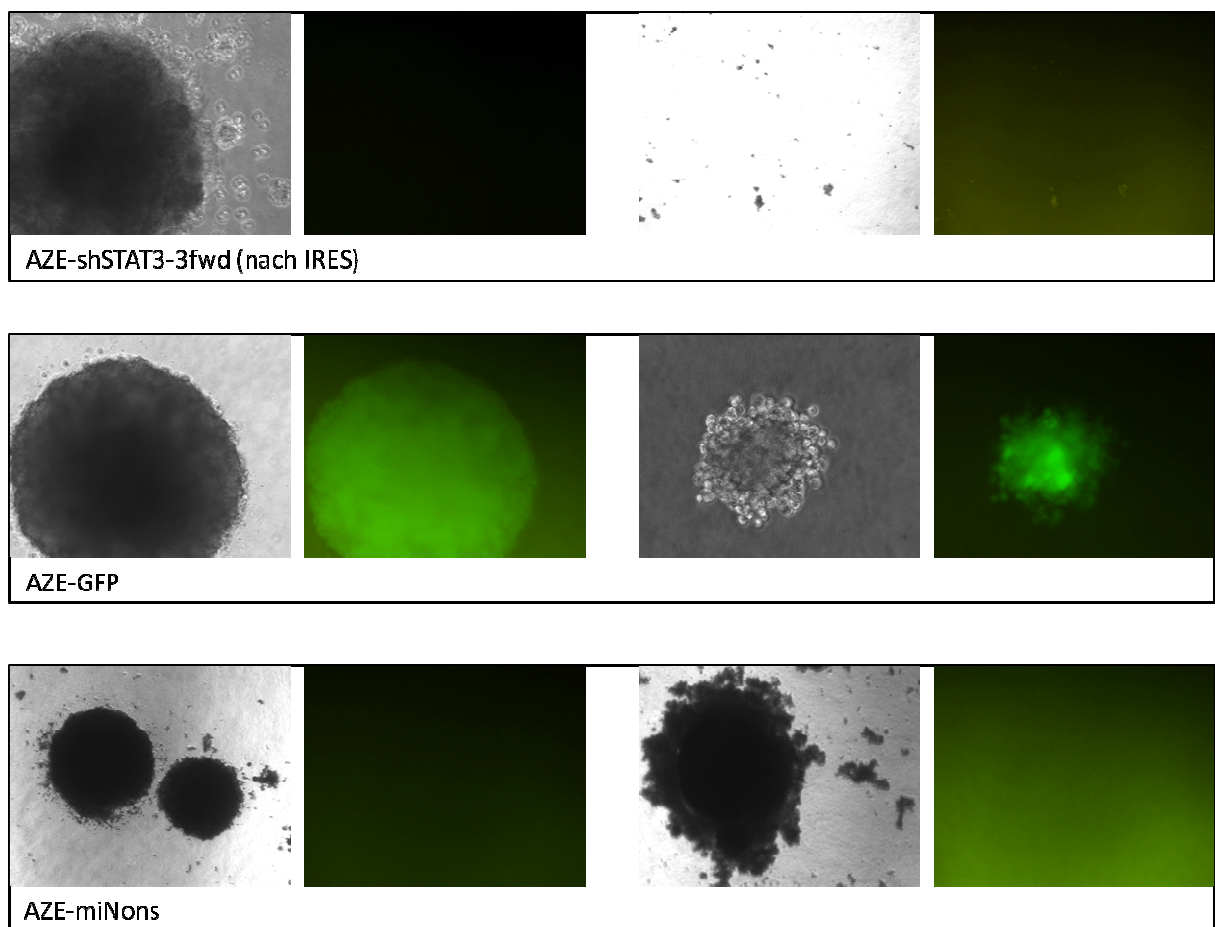


Abbildung 4-34: Wachstum von AZE-shSTAT3-3 (nach IRES) infizierten 4T1-Zellen in Soft-Agar. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und drei Wochen nach Infektion lichtmikroskopisch (links) und fluoreszenzmikroskopisch (rechts) mit einer 100-fachen Vergrößerung analysiert.

Abbildung 4-34 zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse von pAZE-siSTAT3_3 (nach IRES) infizierten 4T1-Zellen in Soft-Agar. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 100-fachen Vergrößerung. Die Zellen wurden sowohl im Durchlicht analysiert als auch fluoreszenzmikroskopisch. Da das pAZE-shSTAT3-3 (nach IRES) eine GFP-

Expressionskassette trägt, zeigten infizierte Zellen unter UV-Bestrahlung grüne Fluoreszenz. In den Soft-Agar-Kulturschalen in welchen pAZE-shSTAT3-3 (nach IRES) infizierte 4T1-Zellen kultiviert wurden, wuchsen, im Vergleich zu AZE-GFP oder AZE-miNons kontrollinfizierten Zellen, deutlich weniger Kolonien heran. Diese Kolonien zeigten keine grüne Fluoreszenz und waren somit vermutlich nicht infiziert. Alle Kolonien der AZE-GFP infizierten Zellen zeigten eine deutliche grüne Fluoreszenz. Die Kolonien der pAZE-miNons infizierten Zellen fluoreszierten nicht.

5. Diskussion

5.1 Der Einsatz von viralen Vektoren in der Gentherapie

Die Therapie von Krebserkrankungen stellt auch heute noch ein großes Problem dar. Der Heilerfolg liegt laut dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) je nach Art der Krebserkrankung nur bei ca. 50% (<http://www.krebsinformationsdienst.de>). Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten mit Krebs reichten 2006 von sehr günstigen Raten um 90% für den Lippenkrebs, das maligne Melanom der Haut, den Hodenkrebs und den Prostatakrebs bis hin zu ungünstigen Raten unterhalb von 10% bei Krebs der Bauchspeicheldrüse (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. und Robert Koch-Institut, 2010). Zudem wird die Therapie mit konventionellen Methoden, wie die operative Entfernung des Tumors, die Chemotherapie, Hormon- und Immuntherapie, sowie die Bestrahlung von zahlreichen Nebenwirkungen begleitet. Eine vielversprechende Erweiterung stellt die Gentherapie dar.

Für die Gentherapie wird ein wirkungsvoller therapeutischer Effektor, welcher das Wachstum von Krebszellen hemmt oder diese tötet, sowie ein effizienter Vektor, der den Effektor an sein Ziel bringt, benötigt. Verschiedene gentherapeutische Studien sind bereits seit Beginn der 1980er Jahre durchgeführt worden, bei denen unterschiedliche virale Vektoren zum Einsatz kamen. Der Erfolg der Gentherapie hängt dabei entscheidend von der Effizienz des Gentransfers ab (Dalba *et al.*, 2005). Retrovirale Vektoren sind neben den adenoviralen Vektoren die zurzeit am häufigsten verwendeten Vektoren in der Krebs-Gentherapie (<http://wiley.co.uk/genmed/clinical>). Durch ihre Fähigkeit zur Integration des Virusgenoms in das Wirtsgenom, wird die Expression des Transgens über einen langen Zeitraum gewährleistet. Außerdem benötigen simple Retroviren wie MLV eine Teilung der Wirtszelle zur Infektion, was sie selektiv für das schnell teilende Tumorgewebe macht (Miller *et al.*, 1990b). Zudem besitzen sie keinen zytopathischen Effekt und lösen keine Immunantwort aus, was eine systemische Applikation ermöglicht. Diese Eigenschaft kombiniert mit der einfachen Genomstruktur, welche es ermöglicht die retroviralen Vektoren relativ einfach zu manipulieren, machen diese Vektoren zu einem interessanten Werkzeug in der Krebs-Gentherapie.

Neben den obengenannten Vorteilen retroviraler Vektoren, bergen diese jedoch, auf Grund ihrer Integration in das Wirtsgenom, das Risiko der Insertionsmutagenese (Temin, 1990; Li *et al.*, 2002). So war beispielsweise die Gentherapie der lebensbedrohlichen, erblichen Immunschwächekrankheit SCID-X1 (*Severe Combined Immunodeficiency Disease*) mit retroviralen Vektoren zunächst erfolgreich, führte jedoch später zu Leukämien in drei von elf behandelten Kindern (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Hierfür war die Insertion des viralen Vektorgenoms in das Protoonkogen LMO2 in den modifizierten Blutstammzellen verantwortlich. Das Risiko der Insertionsmutagenese tritt jedoch vorwiegend dann auf, wenn die proliferierende Zellpopulation eines immundefizienten Patienten einen selektiven Wachstumsvorteil durch die vorgenommene Genkorrekturen erhält (Tai and Kasahara, 2008b). Dagegen soll in der Krebs-Gentherapie die Applikation der Vektoren in das Tumorgewebe zu einem Wachstumsnachteil und schließlich zum Absterben der Zielzellen führen.

Um die Sicherheit retroviraler Vektoren dennoch zu erhöhen, werden zurzeit geeignete *Targeting*strategien (gerichtetes Zielen) erforscht, welche sicherstellen sollen, dass die Vektoren selektiv nur spezielle Tumorzellen transduzieren können. Somit könnte das Risiko, dass normales Gewebe transduziert wird und die damit verbundenen Nebenwirkungen, weiter verringert werden. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, Retroviren so zu modifizieren, dass sie gezielt in bestimmte Zellen gelenkt werden. Die wohl einfachste Methode hierfür ist die Pseudotypisierung, bei der das (für den Tropismus verantwortliche) natürliche Hüllprotein durch ein fremdes Protein mit einem anderen Tropismus ersetzt wird (Zavada, 1982; Frecha *et al.*, 2008). Da jedoch nur eine begrenzte Anzahl an natürlichen viralen Hüllproteinen mit eingeschränkten zelltypspezifischen Tropismen bekannt sind, sind die Möglichkeiten hier sehr limitiert. Ein weiterer Ansatz ist das *envelope engineering*, bei dem der Tropismus durch Modifikationen des Hüllproteins beeinflusst wird. Hier gab es in den letzten Jahren zahlreiche Studien in denen Spezifität vermittelnde Adaptermoleküle entweder an das Hüllprotein angehängt wurden (Roux *et al.*, 1989), sowie *targeting* Liganden oder *single-chain* Antikörper Sequenzen direkt in das Hüllprotein eingebracht wurden (Kasahara *et al.*, 1994; Cosset *et al.*, 1995; Somia *et al.*, 1995). Die Spezifität solcher modifizierter Vektoren wurde jedoch generell von einer starken Reduktion der Transduktionsrate begleitet, da die Virus-Zellmembran-Fusion in diesem System gestört ist (Frecha *et al.*, 2008): Das für retrovirale Vektoren wohl effizienteste *Targetingsystem* ist die Maskierung der natürlichen

Rezeptorbindestelle, welches auf Protease-aktivierbaren Hüllproteinen basiert. In diesem System wird das Virus erst infektiös wenn die an Env gebundene Blockierungsdomäne durch sekretierte oder membrangebundene Proteasen gespalten wird (Peng et al., 1997). Wird die Blockierungsdomäne nun so gewählt, dass sie von spezifisch in Tumorzellen aktiven Proteasen gespalten wird, ist die Selektivität der Viren bis zu 500fach höher im Vergleich zu Viren ohne entsprechende Modifikationen (Duerner *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene onkolytische Effektormoleküle verwendet, die durch das replikationskompetente Murine Leukemie Virus (MLV) als Transfervehikel zu ihrem Zielort gebracht wurden um dort ihre anti-tumoralen Eigenschaften zu entfalten. Der Vorteil bei der Verwendung von replizierenden Viren ist die effiziente Verteilung in den Zielzellen (siehe Replikationskompetente MLVs als Gentherapievehikel 5.3). Trotz der geäußerten Sicherheitsbedenken bei der Verwendung von Viren als Genvektor, besteht auf Grund des natürlichen Tumortropismus von Retroviren nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, dass Zellen außerhalb des proliferierenden Tumorgewebes infiziert werden. Die Insertionsmutagenese sollte somit nur ein geringes Problem in der Krebs-Gentherapie mit retroviralen Vektoren darstellen, so dass in der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung zusätzlicher *Targeting*strategien verzichtet wurde. Die hiervon erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

5.2 Transfer von pri-miRNA mit MLV-Partikel

Kürzlich konnte von Zerneck *et al.* gezeigt werden, dass micro RNAs (miRNAs) von apoptotischen Zellen in sogenannte apoptotische Körperchen verpackt werden und so zu benachbarten Zellen transferiert werden können (Zerneck *et al.*, 2009). Dabei entstehen während der Apoptose Ausstülpungen der Plasma- und der Kernmembran, die sich dann als apoptotische Körperchen abschnüren. Diese Vesikel werden dann, inklusive der darin enthaltenen miRNAs, von benachbarten Zellen durch Phagozytose aufgenommen. Zerneck *et al.* konnten zeigen, dass die micro RNA 126 in solche apoptotischen Körperchen verpackt wird und dadurch, über den oben beschriebenen Mechanismus, in benachbarte Zellen gelangt. Dort induziert sie, durch negatives Feedback, die Translation des Chemokins CXCL12, welches sowohl als Signal zur Mobilisierung von Vorläuferzellen, als auch als anti-apoptotischer Faktor agiert. Hierdurch können die Zellen vaskulär vor Atherosklerose durch

die Stabilisierung der sogenannten Plaques (Veränderungen der Gefäßwand) geschützt werden, was wiederum zu geringeren Läsionen führt (Zernecke *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob pri-miRNAs auch durch Verpackung in MLV-basierende Vektorpartikel in Zellen eingebracht werden können und dort ihre Funktion erfüllen. In diesem Fall könnte eine onkolytisch wirkende miRNA zur Tumorthherapie über MLV-Partikel in die Zielzellen eingebracht werden, ohne dass eine Integration des miRNA Gens erfolgt. Um diese Methode prinzipiell zu testen, wurde eine gegen GFP gerichtete miRNA mit der Sequenz des MLV-basierenden Verpackungssignals versehen, damit diese RNA in die viralen Partikel aufgenommen werden kann. Nach Herstellung der Partikel und der anschließenden Transduktion von GFP-positiven Zellen, konnte jedoch kein negativer Effekt auf die grüne Fluoreszenz der Zielzellen beobachtet werden.

Dabei stellt sich die Frage, ob die pri-miRNA tatsächlich in die Viruspartikel aufgenommen wurde. Möglicherweise wird die pri-miRNA in der Produktionszelle vor der Verpackung durch Drosha prozessiert, was zum Verlust des Verpackungssignals führen würde und somit keine Inkorporation in die Viruspartikel erfolgen würde. Eine weitere Schwierigkeit dieses Systems ist der Transport der miRNA in den Zellkern der Empfängerzellen, welcher für eine funktionstüchtige Biogenese der micro RNA von essenzieller Bedeutung ist. Pri-miRNA wird im Nukleus durch Drosha in pre-miRNA geschnitten und anschließend durch Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert. Ohne diese Prozessierung kann die miRNA nicht in den RISC geladen werden und eine Translationsinhibierung ist unmöglich. Die Viruspartikel entlassen die verpackte miRNA direkt in das Zytoplasma. Die pri-miRNA muss somit erst in den Zellkern gelangen, um in den miRNA Biogeneseweg eingeschleust werden zu können. Auch hier wäre es von Vorteil, wenn anstelle von pri-miRNAs, die bereits prozessierten pre-miRNAs transferiert werden würden. Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung des Systems wäre also die Herstellung von miRNA-Transferplasmiden welche das Verpackungssignal nicht vor den Drosha Erkennungssequenzen, sondern direkt vor der miRNA-Sequenz tragen, so dass dieses bei einer Prozessierung erhalten bleibt.

Auch Kosaka *et al.* konnten zeigen, dass miRNAs von der Zelle durch Exosomen zu benachbarten Zellen transferiert werden können und die miRNAs dann in der Empfängerzelle

die Translation ihrer Zielgenen unterdrücken (Kosaka *et al.*, 2010). Hierfür wurden pri-miRNAs in Zellen transfiziert und anschließend das Zellkulturmedium aufbereitet und auf frische Zellen gegeben. Während die Transfektion von nackter pri-miRNA keinen Effekt hatte, konnten deutliche Effekte durch die Behandlung mit miRNA enthaltenen Exosomen erzielt werden (Kosaka *et al.*, 2010). Der Mechanismus, über den die miRNAs in die Exosomen inkorporiert werden, ist hierbei jedoch noch weitestgehend unbekannt. Weshalb auch in diesem Fall unklar ist, ob ein Transfer von pri-miRNA oder von prozessierten miRNAs erfolgte.

5.3 Replikationskompetente MLVs als Gentherapievehikel

In klinischen Studien zur Krebs-Gentherapie sind die am häufigsten verwendeten Gentransfervehikel replikationsinkompetente adenovirale und retrovirale Vektoren. In Vektorsystemen werden die viralen Proteine in *trans* zur Verfügung gestellt und nur das Transgen kodierende Vektorgenom in das virale Partikel aufgenommen. Die Transduktionseffizienz dieser Vektoren ist jedoch für die klinische Applikation häufig nicht ausreichend, da sich replikationsinkompetente Vektoren nicht auf andere Zielzellen ausbreiten können (Hiraoka *et al.*, 2006). Daher kommen immer häufiger auch replikationskompetente Viren als Vehikel in der Gentherapie zum Einsatz. Die Verwendung von replikationskompetenten Viren ist im Vergleich zu replikationsinkompetenten Vektoren wesentlich effizienter, da jede infizierte Tumorzelle zu einer virusproduzierenden Zelle wird, was zur weiteren Vermehrung und somit zur Verbreitung der Viren über die initiale Applikation hinaus führt (Hiraoka *et al.*, 2006).

Tatsächlich kann die Idee, replikationskompetente Viren als onkolytisches Mittel zu verwenden, bis ins Jahr 1904 zurückverfolgt werden. Die ursprüngliche Idee basiert auf der Beobachtung eines Rückgangs von Leukämie nach einer Influenza Infektion (Dock, 1904). Nachdem in den 50er Jahren Methoden zur Zellkultur und molekularen Biologie verfügbar wurden, wurden auch zwischen 1950 und 1970 verschiedene Viren in Tumor-Patienten getestet (Russell, 1994; Sinkovics and Horvath, 2000). Dabei kamen sowohl wildtyp-, attenuierte- oder in Zellkultur adaptierte Viren, welche eine Selektivität für Tumorzellen aufwiesen, wie z.B. Adenoviren, Mumps Viren, Vaccinia Viren, Myxoviren und West Nil Viren, zum Einsatz (Curiel and Rancourt, 1997). Doch diese ersten Versuche zeigten nur

geringe klinische Effekte, da das Immunsystem die Viren beseitigte und Tumor-Rekrudeszenzen auftraten (Tai and Kasahara, 2008b). Heute wurden verschiedene replizierende Viren bereits in onkolytischen klinischen Studien getestet (Tai and Kasahara, 2008b). Der Großteil der eingesetzten Viren besitzt eine natürliche onkolytische Aktivität, da eine Infektion zur Lyse der Wirtszelle führt. Beispiele hierfür sind Adenoviren, Herpes Simplex Viren, Vaccinia Viren und Paramyxoviren (Sliva and Schnierle, 2010).

Retroviren wie das Murine Leukämievirus replizieren ohne zytopatischen Effekt. Ein entscheidender Vorteil von MLV in der Krebs-Gentherapie ist die dauerhafte Expression des Transgens durch die Integration in das Wirtsgenom. Zudem besitzt MLV eine geringe Immunogenität (Ram *et al.*, 1993) und repliziert nur in teilungsaktiven Zellen und besitzt somit einen natürlichen Tumortropismus (Culver *et al.*, 1992). Es ist daher der ideale Gentransfervektor, zur Vermittlung von anti-tumoralen Genen an Tumorzellen.

5.3.1 Übertragung von toxischen Genen zur Tumorthherapie

Da MLV nach Infektion keine Lyse der Wirtszelle hervorruft, muss ein anti-tumoral wirkendes Gen in das Virusgenom eingebracht werden, wenn eine onkolytische Wirkung erzielt werden soll.

Vielversprechende Ergebnisse wurden bisher in der Gentherapie mit der Suizidgentherapie in verschiedenen Tumoren erzielt. 2010 waren ca. 7,2% aller verwendeten Transgene zur Gentherapie in klinischen Studien Suizidgene. Dabei werden nach Transfer eines Suizidgens in die Tumorzelle Prozesse aktiviert, die den Zelltod auslösen (Lal *et al.*, 2000). Hierbei kodiert das in die Zelle eingebrachte Suizidgen für ein Enzym, welches nach systemischer Applikation einer inaktiven Substanz verstoffwechselt und dabei in seine toxische Form umgewandelt wird, was schließlich zum Zelltod führt (Lal *et al.*, 2000; Portsmouth *et al.*, 2007). Das am häufigsten verwendete Suizidgen in der Gentherapie ist die Thymidinkinase des Herpes-Simplex Virus (HSV-TK). HSV-TK wandelt Ganciclovir in sein toxisches Triphosphat um, was schließlich zum Tod der Zelle führt (Aghi *et al.*, 2000).

Suizidgene konnten bereits erfolgreich mittels amphotropen MLV (aMLV) in Tumorzellen eingebracht werden, und führten zu einem reduzierten Tumorwachstum und zu verringerter

Sterblichkeit im Mausmodell. Dabei wurde die Zytosin Deaminase (CD) aus Hefe, welche die nicht-toxische Substanz 5-Fluorozytosin (5FC) in seine toxische Form 5-Fluorouracil umsetzt (Hiraoka *et al.*, 2007) oder die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), welche die glykosidische Spaltung von Purin-Ribonukleosid Substanzen katalysiert (Tai *et al.*, 2010), in die 3'-UTR Region von aMLV inseriert. Beide Virus-Varianten führten dabei nach Infektion zu effizienten Zelltod *in vitro* und zu signifikanter Tumordinhibition *in vivo* (Hiraoka *et al.*, 2007; Tai *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Suizidgen-Therapieansätzen wurde in vorliegender Arbeit das virale Protein R (VPR) des Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) auf sein onkolytisches Potenzial hin untersucht. VPR erfüllt eine Reihe an Funktionen während des HIV Replikationszyklus. Unter Anderem induziert VPR einen Zellzyklusarrest in der G₂-Phase was letztendlich zur Apoptose führt (Chang *et al.*, 2004). Somit bewirkt VPR den direkten Zelltod ohne *Prodrug*-Intermediate. Um sich die Induktion von Apoptose zur anti-tumoralen Gentherapie zunutze zu machen, wurde VPR in der vorliegenden Arbeit durch MLV in die Tumorzellen eingebracht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass VPR-exprimierende Zellen, bereits nach zwei Tagen apoptotisch waren. Während diese Tatsache das große onkolytische Potenzial dieses Systems darstellt, führt das onkolytische Profil dieses Systems zu Problemen bei der Kopplung mit MLV und dessen Virusproduktion, da die Zellen, welche zur Produktion verwendet werden, ebenfalls Apoptose unterlaufen. Die Zelllinie, in welcher die Viren sich vermehren sollen, muss somit gegen die Induktion von Apoptose durch VPR resistent sein. Eine Anzucht der Viren ist sonst nicht oder nur bedingt möglich. In dieser Arbeit wurde konträr zu bereits publizierten Daten (Matsuda *et al.*, 2009) gezeigt, dass die Schweinefibroblasen Zelllinie ST-IOWA sensitiv auf VPR-Expression reagiert und eine Expression von VPR in diesen Zellen zu deren Absterben führt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Ursache der Resistenz einiger Zelllinien gegenüber VPR weitestgehend ungeklärt, es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Resistenz spezies-spezifisch ist (Matsuda *et al.*, 2003). So sind alle bis heute untersuchten Primatenzellen, sowie einige feline und bovine Zellen sensitiv auf VPR-induzierte Apoptose, wobei die meisten nicht-primaten Zellen eine VPR Resistenz aufweisen. Dabei ist unklar, ob die sensitiven Spezies einen oder mehrere Wirtsfaktoren exprimieren, die sie anfällig für die VPR induzierte Apoptose machen, oder im Umkehrschluss die resistenten Spezies einen oder mehrere Faktoren exprimieren, die VPR entgegenwirken (Matsuda *et al.*, 2003). Beispielsweise

exprimieren Tumorzellen anti-apoptotische Gene. Ob dies zu einer Resistenz gegenüber VPR-induziertem Zelltod führt bleibt zu untersuchen.

Der Mangel an einer geeigneten Virusanzucht-Zelllinie führte in dieser Arbeit vorerst zur Einstellung der Forschung an onkolytisch wirkenden MLVs basierend auf VPR. Dieses System besitzt allerdings ein großes Potenzial. So könnten zum Einen verschiedene Zelllinien auf den Einfluss von VPR untersucht werden, um eine gegenüber VPR-induzierter Apoptose resistente Zelllinie zu finden. Zum Anderen könnte die Expression von VPR in den virusproduzierenden Zellen durch die Kontrolle eines induzierbaren Promotors unterbunden und dadurch erst nach erfolgreicher Virusproduktion in den Tumorzellen aktiviert werden. Induzierbare Promotoren zeigen eine niedrige basale Expressionsaktivität, nach Induktion steigt die Aktivität stark an und es kommt zu einer starken Genexpression (Saez *et al.*, 1997). Als Induktor können hierbei pharmakologische Präparate, Hormone, Wachstumsfaktoren oder bestimmte physiologische Bedingungen dienen (Primrose and Twyman, 2006). Im Fall von VPR-exprimierenden MLVs müsste untersucht werden, ob die basale Expressionsaktivität bereits einen apoptotischen Einfluss auf die virusproduzierenden Zellen hat.

Darüber hinaus sind einige Promotoren beschrieben worden, die eine tumor-spezifische Aktivität zeigen, aber im Normalgewebe nicht aktiv sind (Nettelbeck *et al.*, 2000). Der Vorteil solcher Promotoren wäre ein zusätzlicher Sicherheitsaspekt, da eine Expression des Transgens tatsächlich nur im Tumorgewebe stattfinden kann. Ein Beispiel für solch einen Promotor ist der Cox2-Promotor, für welchen eine tumor-spezifische Reportergenexpression nachgewiesen werden konnte (Yamamoto *et al.*, 2001). Cox2 ist die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase. Die biologische Funktion der Cyclooxygenase besteht in der Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen. Die Cox2-Expression ist in den meisten Geweben unter physiologischen Bedingungen sehr gering (DuBois *et al.*, 1998). Es konnte jedoch eine erhöhte Cox2-Expression in einer Reihe von Karzinomen, wie dem Prostatakarzinom, dem Lungenkarzinom, dem Pankreaskarzinom, dem Ösophaguskarzinom, dem Dickdarmkarzinom und dem Magenkarzinom, festgestellt werden (Williams *et al.*, 1999).

Der Einsatz von induzierbaren Promotoren könnte somit ein adäquates Mittel darstellen, um toxische Gene-tragende MLVs herzustellen und Apoptose gezielt in Tumorzellen zu

induzieren. Dabei könnte allerdings die Größe des Promotors zu Problemen führen. Auf Grund einer zusätzlich benötigten Bindestelle für den Promotor-Induktor sind induzierbare Promotoren in der Regel größer als nicht induzierbare Promotoren. Die Insertionskapazität von MLV ist jedoch limitiert (Logg *et al.*, 2001) und die Wahrscheinlichkeit von Mutationen bis hin zur kompletten Deletion des Transgens im Virusgenom steigt mit zunehmender Insertionsgröße.

5.3.2 Übertragung von shRNA

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) erwies sich in den letzten Jahren als eine nützliche und zeitsparende Methode in der modernen Genforschung. Die Anwendung der RNAi ermöglicht es, auf schnelle und elegante Art gezielt Gene vorübergehend oder längerfristig auszuschalten und die dadurch hervorgerufenen Veränderungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen. Aber nicht nur in der Aufklärung von Genfunktionen kommt RNAi zur Anwendung, sondern auch in der Tumorthherapie besitzt die Inhibition von Tumorgenen durch *small interfering*- (si-) oder *short hairpin*- (sh-) RNAs großes therapeutisches Potenzial. Dabei ist die effiziente und zielgerichtete Übertragung von si/shRNAs in das Zielgewebe essentiell. Die Übertragung durch retrovirale Vektoren unter einem RNA-Polymerase III-Promotor kann dieses Problem, auf Grund niedriger Transduktionsraten, nicht ausreichend beheben (Rainov and Ren, 2003). Zur erfolgreichen Krebs-Gentherapie, muss die therapeutisch wirkende si/shRNA möglichst in alle Tumorzellen eingebracht werden. Um dies zu erreichen, wurden in dieser Arbeit shRNAs unter Kontrolle eines H1-Promotors oder *micro*- (mi-) RNAs unter Kontrolle eines U6-Promotors als therapeutische Effektormoleküle in die 3'-untranslatierte Region (UTR) von replikationskompetenten amphotropen MLVs kloniert und durch Infektion in die Zielzellen übertragen. Als Zielstrukturen wurden der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR, die Proteinkinase PLK1 sowie der Transkriptionsfaktor STAT3 verwendet.

Die Insertion von sh/miRNA-Expressionskassetten hat keinen Einfluss auf die Virus-Replikation

Nach erfolgreicher Herstellung aller sh/miRNA-Expressionskassetten-tragenden MLVs, wurde ihre Replikation untersucht. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass die Insertion von shRNA oder miRNA die virale Fitness beeinflusst. Mögliche Faktoren, die hierbei eine Rolle

spielen könnten, sind die Bindung der sh/miRNA an die eigene Sequenz im Virusgenom (*self-targeting*). Dies würde zum Translationsstopp des Virusgenoms führen und eine weitere Replikation verhindern (Liu *et al.*, 2010). Da jedoch die sh/miRNA-Expressionskassetten in der vorliegenden Arbeit in den untranslatierten Bereich von MLV kloniert wurden, sollte dies keinen Einfluss auf die Virus-Replikation haben. Des Weiteren könnte die Haarnadelstruktur (bestehend aus doppelsträngiger RNA) vom zellulären Enzym Dicer, oder im Falle von miRNA auch vom zellulären Enzym Drosha, erkannt und gespalten werden, was ebenfalls die Replikation erheblich stören würde (Liu *et al.*, 2010). Außerdem könnte durch das Einbringen einer RNAi-Kassette der nukleäre Export der RNA, die Verpackung der genomischen RNA in das Virus oder die Reverse Transkription gestört werden (Suo and Johnson, 1997; Klasens *et al.*, 1999).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass ecotropes MLV die Insertion einer shRNA-Expressionskassette toleriert und diese Insertion die virale Replikation nicht negativ beeinflusst (Sliva and Schnierle, 2006). Da ecotrope MLVs jedoch nur Maus- und Rattenzellen infizieren können, ist eine Anwendung in der humanen Tumorthherapie nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde daher das amphotrope MLV (aMLV) als Vektor zur Übertragung von RNAi-Kassetten untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch das amphotrope MLV durch Insertion sowohl einer shRNA- als auch einer miRNA-Expressionskassette im Vergleich zu wildtyp MLV nicht in seiner Replikation in HT1080-Zellen eingeschränkt ist. Die Virustiter aller verwendeten Virusvarianten waren identisch. Auch die Insertion einer IRES-GFP-Kassette zusätzlich zu einer shRNA-Expressionskassette zeigte keinen signifikanten negativen Effekt auf die Virusreplikation. Ein Einfluss der oben genannten Faktoren scheint somit nicht gegeben, oder jedoch nur in einem so geringen Ausmaß vorzuliegen, dass der retrovirale Replikationszyklus dadurch nicht signifikant beeinträchtigt wird.

Genetische Stabilität der sh/miRNA-Expressionskassette in aMLV

Ein limitierender Faktor für die Verwendung von MLV als Gentransfervektor ist die Insertionskapazität für therapeutische Transgene in das virale Genom. Retroviren zeichnen sich durch eine hohe Rekombinationsrate aus, wodurch sie sich sehr schnell an Veränderungen ihrer Umgebung adaptieren können. Dies bedeutet jedoch auch, dass

Insertionen von exogenen Sequenzen in der Regel innerhalb weniger Replikationszyklen deletiert werden, da die Genomgröße evolutorisch optimal ist. Logg *et al.* konnten jedoch zeigen, dass Insertionen bis zu etwa 1,3kb in der 3'-untranslatierten Region (UTR) von MLV für bis zu acht Infektionsrunden erhalten blieben ohne die Replikationsfähigkeit zu beeinflussen (Logg *et al.*, 2001). Spätestens nach der achten Infektionsrunde traten jedoch Deletionen im Virusgenom auf (Logg *et al.*, 2001). Für eine Verwendung dieser modifizierten Viren in der Tumorthherapie, sollte die Stabilität über einige wenige Runden jedoch ausreichen. Die Viren sollen im Tumorgewebe replizieren, die shRNA-Expressionskassette verteilen und somit die Zellen zum Absterben bringen. Je nach initialer Virusdosis, sollten hierfür 3 bis 4 Infektionsrunden ausreichen, um das gesamte Tumorgewebe zu infizieren.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche shRNA- oder miRNA-Expressionskassetten in die 3'-UTR von amphotropem MLV (aMLV) inseriert. Dabei wurden die miRNA-Expressionskassetten in Leserichtung der viralen Genprodukte (*forward*), und die shRNA-Expressionskassetten sowohl in *forward* als auch in *reverser* (entgegengesetzt) Leserichtung inseriert. Außerdem trugen einige Varianten zur besseren visuellen Kontrolle der Replikation zusätzlich eine IRES-GFP-Expressionskassette in der 3'-UTR. Die Insertionsgröße betrug somit 338bp bis 1,6kb. Es konnte über PCR-Analysen gezeigt werden, dass die Insertionen *in vitro* für mindestens sechs Infektionsrunden stabil im Virusgenom bleiben und die Viren zu vergleichbaren Titern wie das Wildtyp-MLV replizierten. Dies zeigt, dass aMLV auch bis zu 300bp größere Insertionen als die bereits publizierten 1,3kb toleriert (Logg *et al.*, 2001). Dabei hatte die Orientierung der shRNA-Expressionskassette keinen Einfluss auf die Virusstabilität. Dagegen wurde in einer im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kooperation gezeigt, dass die Insertion von miRNA-Expressionskassetten in *reverser* Orientierung in einer Deletion von 138bp im U6-Promotor resultiert (Schaser *et al.*, 2011). Dies ist vermutlich auf eine Behinderung der Transkription des viralen Genoms vom 5'-LTR durch die miRNA Transkription vom U6-Promotor zurückzuführen (Schaser *et al.*, 2011). Der U6-Promotor besitzt eine höhere Aktivität als der H1-Promotor (Makinen *et al.*, 2006), welcher in dieser Arbeit für die Transkription der shRNA verwendet wurde. Für diesen Ansatz konnten Sliva und Schnierle bereits die Stabilität der Expressionskassette beschreiben (Sliva and Schnierle, 2006).

Für einen Einsatz der rekombinanten Viren in der Tumorthherapie sollte eine Stabilität über 6 Infektionsrunden theoretisch ausreichen, um das Tumorgewebe vollständig zu infizieren und die RNAi-Expressionskassette somit im gesamten Tumor zu verteilen. Tatsächlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nach intratumoraler Applikation von gegen PLK1 gerichteten miRNA-Expressionskassetten-tragenden aMLVs *in vivo*, das gesamte Tumorgewebe infiziert war und die rekombinanten Viren genetisch stabil waren. In weiteren *in vivo* Ansätzen, in welchen entweder vorinfizierte Tumorzellen subkutan appliziert wurden, oder die rekombinanten Viren intravenös verabreicht wurden, konnte diese genetische Stabilität nicht nachgewiesen werden. In beiden Fällen waren die miRNA-Expressionskassetten vollständig mutiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der große Selektionsdruck auf die rekombinanten Retroviren sein. Die Expression von miRNA gegen PLK1 resultiert in Apoptose der Zellen. Möglicherweise geschieht dies zu einem zu frühen Zeitpunkt, so dass die Replikation der rekombinanten Viren erheblich gestört ist, was letztlich zur Mutation oder sogar kompletten Deletion der miRNA-Expressionskassette führt. Dies verdeutlicht die besondere Bedeutung der Wahl eines geeigneten Zielgens. Die Expression einer sh/miRNA von aMLV sollte das Wachstum der Tumor-Zielzellen inhibieren, darf jedoch die Virusreplikation nicht in dem Maße stören, dass der Selektionsdruck auf die rekombinanten Viren zu groß wird. Da jedoch auch die *nonsilencing* miRNA-Kontrolle (miRNA ohne Funktion) mutierte, ist es eher wahrscheinlich, dass die Insertionen in diesen Fällen aus anderen Gründen nicht im Virusgenom toleriert wurden. In einer Kooperation konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinante aMLVs mit shRNA-Expressionskassetten gegen Luciferase als auch *nonsilencing* shRNA-Expressionskassetten, nach systemischer Applikation stabil waren (Schaser *et al.*, 2011). Im Vergleich hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit eine ca. 50fach geringere Virusdosis intravenös appliziert. Möglicherweise sind bei einer systemischen Applikation von geringen Virustitern, mehr als sechs Infektionsrunden nötig, bis die Viren die Zielzellen erreicht, wobei die Mutationswahrscheinlichkeit mit jeder Replikationsrunde steigt.

Der Grund für die Mutationen in vorinfizierten Tumoren konnte leider nicht geklärt werden. Die Zellen wurden vor subkutaner Applikation auf Infektion und Stabilität überprüft. Somit wurde sichergestellt, dass die Zellen zu 100% mit nicht mutierten Viren infiziert waren. Die Mutationen nach Abschluss des Experiments sind somit entweder auf Veränderungen des integrierten Virusgenoms in der Wirtszelle nach der Tumorapplikation zurückzuführen, oder

auf Superinfektion der Zellen. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da eine Superinfektion durch die virale Interferenz, bei der die Expression von Env an der Zelloberfläche die Zugänglichkeit des rPit-2-Rezeptors hemmt, verhindert wird (Coffin *et al.*, 1997). Möglicherweise wurde der Tumor bei der Entnahme mit umliegendem Gewebe kontaminiert, welches erst *in vivo* durch die Replikation der Viren infiziert wurde. Während dieser Replikation könnte es zu den beobachteten Mutationen gekommen sein. Auch dies ist jedoch unwahrscheinlich, da zum Einen das Tumorgewebe deutlich vom umliegenden Gewebe abgegrenzt ist und zum Anderen eine Infektion von normalem Gewebe auf Grund des Virus-Tropismus auf sich teilende Zellen nicht erfolgen kann. Das Szenario der vorinfizierten Tumorzellen ist jedoch für eine mögliche Tumorthherapie auszuschließen. Für einen möglichen Therapieansatz von antitumoralen miRNA-Expressionskassetten-tragenden MLVs, ist die intratumorale Applikation am denkbarsten. Die Viren werden dabei direkt an ihren Wirkungsort gebracht und somit die Wahrscheinlichkeit für Mutationen verringert.

Verifizierung von funktionstüchtigen sh/miRNAs

Die Effizienz der Herunterregulation der Ziel-mRNA durch sh- oder miRNAs hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dabei spielen beispielsweise die Bindungseffizienz der sh/miRNA, die Länge der Schleife (*loop*) welche *sense* und *antisense* Strang verbindet oder die Wahl des Promotors für die sh/miRNA Expression eine Rolle. Außerdem wurde in den letzten Jahren beschrieben, dass miRNAs eine bis zu 80fach höhere Effizienz aufweisen können als shRNAs (Boden *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche shRNAs oder miRNAs gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), die Polo-ähnliche Kinase 1 (PLK1) und den Transkriptionsfaktor STAT3 auf ihre Effizienz hin untersucht. Dabei wurden die shRNA von einem H1-Promotor und miRNAs von einem U6-Promotor (beides Polymerase III Promotoren) exprimiert und durch replikationsfähige aMLVs übertragen. Durch keine in dieser Arbeit verwendeten sh- und miRNAs gegen EGFR konnte die Proteinexpression gehemmt werden. Dabei waren die Sequenzen der sh-/miRNAs zu 100% homolog zur EGFR-Sequenz. Weitere Untersuchungen der Tumorthherapie durch Inhibierung von EGFR wurden daher in dieser Arbeit eingestellt. Dagegen konnten sowohl für PLK1 als auch für STAT3 funktionstüchtige sh- und miRNAs gefunden werden. Dabei konnte kein bedeutender

Unterschied zwischen sh- und miRNA gefunden werden und für weiterführende Arbeiten wurde die jeweils effektivste shRNA (für STAT3) oder miRNA (für PLK1) gewählt. Ferner wurde untersucht, ob die Orientierung, in welche die shRNA in das Virusgenom eingebracht wurde, einen Einfluss auf die Effektivität der Herunterregulation hat. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 5'-3' Orientierung und der entgegengesetzten 3'-5' Orientierung festgestellt werden. Außerdem zeigte die Behandlung von Zellen mit einer *nonsilencing* miRNA keinen Effekt auf die jeweiligen Zielproteinlevel. Die Ergebnisse belegen eine hohe Effizienz der identifizierten miRNA gegen PLK1 und der shRNA gegen STAT3.

Der Vergleich von Transfektion mit RNAi-Expressionskassette-tragenden Plasmiden und der Infektion von Zellen mit modifizierten aMLV in Zellen, welche mit PLK1-Expressionsplasmid ko-transfiziert waren, zeigte deutliche Unterschiede des Effekts der sh/miRNAs auf ihre entsprechenden Zielproteinlevel. Während die Transfektion mit Plasmiden auf Grund der geringen Effizienz kaum einen Einfluss auf die exogene Proteinexpression von PLK1 zeigte, konnte durch die Infektion mit sh/miRNA-Expressionskassetten-tragenden aMLVs die exogene Proteinexpression von PLK1 deutlich verringert werden. Dies verdeutlicht den großen Vorteil des Einsatzes von replikationskompetenten MLVs. Eine einfache Transfektion von Plasmiden ist im Gegensatz zu replizierenden Viren nicht ausreichend, um die sh/miRNA effizient in den Zielzellen zu verteilen, um so eine Inhibition des Zielproteins in allen Zellen zu erreichen.

Induktion von Apoptose und reduziertes Tumorwachstum durch Inhibition von PLK1 und Wachstumsnachteil nach Inhibition von STAT3

Für eine Anwendung von RNAi in der Tumorthherapie muss die Inhibition des Zielgens einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Dabei muss ein Zusammenhang zwischen Tumorwachstum, Tumorphiliferation oder Tumorangiogenese und der Überexpression des Zielgens bestehen. Das in dieser Arbeit verwendete Zielgen PLK1 ist eine Proteinkinase und spielt eine entscheidende Rolle im Zellzyklus, wobei eine Hemmung des Enzyms zu einem Zellzyklusarrest in der G₂-Phase und zur Induktion von Apoptose führt (Liu and Erikson, 2003). Da dieser Effekt von vielen physiologischen Bedingungen innerhalb der Zelle abhängt, wurde in dieser Arbeit eine geeignete Modelzelllinie ermittelt. Während kein spezifischer

Effekt auf humane Zervixkarzinomzellen (HeLa), Adenokarzinomzellen (MCF-7) oder Ovarialkarzinomzellen (SKOV3) nach PLK1-Inhibierung erreicht werden konnte, arretierten humane Osteosarkomzellen (U2OS) und Fibrosarcomzellen (HT1080) in der G₂-Phase des Zellzykluses nach Infektion mit miPLK1-aMLVs. Auch das *in vivo* Wachstum von subkutanen HT1080-Tumoren in SCID-Mäusen konnte durch intratumorale Virusapplikation signifikant inhibiert werden. Außerdem konnte keine offensichtliche, virusbedingte Toxizität, in Mäusen festgestellt werden. Auch in anderen *in vivo* Studien in Mäusen mit humanen Tumortransplantaten konnte bereits gezeigt werden, dass die Herunterregulation von PLK1 durch shRNAs oder durch andere Inhibitoren, in einen mitotischen Arrest resultiert, was schließlich zur Apoptose der Tumorzellen führt (Spankuch-Schmitt *et al.*, 2002; Steegmaier *et al.*, 2007). Die Übertragung solcher Inhibitoren ist jedoch für die klinische Applikation häufig nicht ausreichend, da sie nicht effizient in den Zielzellen verteilt werden (Hiraoka *et al.*, 2006). Cogswell *et al.* induzierten Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien mittels der Übertragung eines dominant negativen PLK1-Gens durch Adenoviren (Cogswell *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte nun, durch die Verwendung von replikationskompetenten aMLVs, eine shRNA gegen PLK1 effizient in die Zielzellen übertragen werden und somit eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums *in vivo* erreicht werden (Schaser *et al.*, 2011).

Als alternatives Zielgen zu PLK1 wurde der Signalüberträger und Aktivator der Transkription STAT3 in dieser Arbeit untersucht. Dieser ist ein Transkriptionsfaktor, welcher sowohl an der Regulation des Zellwachstums als auch der Zelldifferenzierung beteiligt ist. In einer Reihe von Tumorerkrankungen ist eine konstitutive Aktivierung von STAT3 beobachtet worden (Darnell, 2005). In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass nach Infektion mit rekombinanten aMLVs mit einer shRNA-Expressionskassette gegen STAT3, die entsprechende STAT3 Proteinexpression in den spontan entstandenen murinen Tumorzellen 4T1 reduziert war. Außerdem konnte durch diese Herunterregulation der STAT3-Proteinlevel das Zellwachstum zu dreidimensionalen Zellklonen in Soft-Agar inhibiert werden. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von STAT3 in Tumoren mit konstitutiv aktiviertem STAT3, den direkten Zelltod hervorruft (Yu and Jove, 2004) und das Zellwachstum *in vivo* inhibiert (Niu *et al.*, 1999; Chiarle *et al.*, 2005). Außerdem besitzt STAT3 immunsupprimierende Eigenschaften und eine Inhibierung in Immunzellen kann zur anti-Tumor Immunität durch die Unterdrückung von negativen Immunregulatoren (z.B.:

regulatorische T-Zellen) und Aktivierung von Effektorzellen (z.B.: natürliche Killerzellen oder CD8⁺ T-Zellen) führen (Kortylewski *et al.*, 2005). STAT3 besitzt somit ein großes Potenzial als Zielgen für die Tumorthherapie durch shRNA-Expressionskassette-tragende aMLVs.

Auf Grund der Replikationskompetenz von MLV und der damit verbundenen effizienten Verteilung des Transgens im Zielgewebe, sowie der Eigenschaft nur in sich teilenden Zellen zu replizieren und der somit resultierenden Fähigkeit die transgene sh/miRNA spezifisch in Tumorgewebe zu exprimieren, stellt MLV ein hervorragendes Werkzeug in der modernen Tumorthherapie dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sh/miRNA-Expressionskassetten bis zu einer Größe von 1,6kb stabil in die 3'-UTR von Env des amphotropen MLV eingebracht werden können und dies die Replikation der Viren nicht negativ beeinflusst. Die Infektion mit diesen modifizierten Viren führte zu einer deutlichen Verringerung der entsprechenden Proteinlevel. Außerdem konnte durch das Einbringen von antitumoralen sh/miRNA-Expressionskassetten das Tumorwachstum sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gehemmt werden. Somit konnte erstmals der effiziente Transfer von RNAi-Expressionskassette durch aMLV auch *in vivo* gezeigt werden. Dies stellt einen weiteren Schritt in Richtung Anwendung von replikationskompetenten MLVs als onkolytische Viren dar.

6. Zusammenfassung

Retrovirale Vektoren basierend auf dem murinen Leukämievirus (MLV) gehören zu den zurzeit am häufigsten verwendeten Vektoren in der Gentherapie. MLV besitzt einen natürlichen Tropismus für sich teilende Zellen und ist somit besonders für die Krebs-Gentherapie geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst der direkte Transport von pri-miRNA durch deren Aufnahme in MLV-Partikel untersucht, aber keine positiven Effekte beobachtet. Dabei blieb unklar, ob keine Verpackung der pri-miRNA erfolgte, oder die pri-miRNA nach Transduktion der Zellen nicht funktionell war.

Replizierende MLVs sind eine vielversprechende Alternative zu replikationsinkompetenten Vektoren. Sie können das Transgen im gewünschten Gewebe verteilen und durch Integration ins Genom stabil exprimieren. Es wurden verschiedene Ansätze zur Herstellung von onkolytisch wirkenden MLVs untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der Einsatz des viralen Proteins R (VPR) als toxisches Gen eine Anzucht VPR-kodierender Viren erschwert, da bereits die VPR-exprimierenden Zellen abgetötet werden. Das Ergebnis zeigt den Bedarf weiterer Optimierungen, z.B. durch geeignete Anzuchtzellen oder induzierbare Promotoren zur Transgenexpression.

Es konnte gezeigt werden, dass Expressionskassetten mit antitumoralen sh/miRNAs als therapeutisches Effektormolekül gegen die Proteinkinase PLK1 und den Transkriptionsfaktor STAT3 erfolgreich durch replizierende MLVs in Zielzellen übertragen werden und die Herabregulation der Genprodukte zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumorzellen führt. Dabei konnten Expressionskassetten bis zu einer Größe von 1,6kb stabil in die 3'-UTR von Env inseriert werden. Es konnte ein reduziertes Tumorwachstum von HT1080-Zellen in SCID-Mäusen nach intratumoraler Applikation von aMLV, welches für eine miRNA gegen PLK1 kodiert, erreicht werden ohne dass die Viren mutierten (Schaser *et al.*, 2011). Durch eine intravenöse Verabreichung der Viren oder der Applikation von vorinfizierten Tumorzellen in SCID-Mäuse mutierten die miRNA-Expressionskassetten aus ungeklärten Gründen vollständig. Durch die Balance zwischen Virusverbreitung und induziertem Zelltod sind modifizierte MLVs eine perfekte Waffe gegen entartete Zellen.

7. Anhang

7.1 Sequenzen der Stabilitätstests der shRNA-Expressionskassetten

HT1080-Zellen wurden in 6 Runden mit den jeweiligen Virusvarianten infiziert. Nach jeder Infektionsrunde wurde genomische DNA aus den Zellen isoliert und mittels PCR-Analyse die Expressionskassette untersucht. Um Punktmutationen auszuschließen, wurde jeweils die Bande der sechsten Infektionsrunde aus dem Agarosegel isoliert, sequenziert und mit der Ursprungssequenz verglichen.

Vergleich der miPLK1_8-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6		ACCAA CACCG CCTAT TTCCCATGAT TCCTT CATAT TTGCA TATAC GATACAAGG CTCTT ACAGA CATAAT TACAATTAA TTTGACTCTAAACAC AAAGAT : 1 00										
pAZC-miPLK1_8		AGGAA GAGGG CCTAT TTCCCATGAT TCCTT CATAT TTGCA TATAC GATACAAGG CTCTT ACAGA CATAAT TACAATTAA TTTGACTCTAAACAC AAAGAT : 1 00										
		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
		ATTAGTACAA AATAC GTGAC GTAGA AAGTAATAAT TTCTT GGGTAGT TTG CAGT TTAAAAATTA TGLTT TAAAA TGGAC TATCATATGCTTACG GTAAC : 2 00										
		ATTACTACAA AATAC CTCAC CTACA AACTAATAAT TTCTT CGCTA CTTTG CAGT TTAAAAATTA TGLTT TAAAA TGGAC TATCATATGCTTACG GTAAC : 2 00										
		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
		TCAAA CTATT TCGAT TTCTT CGCTT TATAT ATCTT CTGCA AAGCA CCAAA CACC CTGCT CGCTT CGGCA GCACA TATAC TAGTC GACTA CCGAT AACAGG : 3 00										
		TGAAA GTATT TCGAT TTCTT GGGTT TATAT ATCTT GTGGA AAGGA CGAAA CACC GTGCT CGCTT CGGCA GCACA TATAC TAGTC GACTA GGGAT AACAGG : 3 00										
		*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
		GTAAT TGTATT GAATGAGGCTTCAGT ACCTT ACAGA ATCGT TGGCT GCACA TCTT GGAAA CACCT GCTGGGATTA CTCTT TCAGG TTAAC CCAAC AGAAGG : 4 00										
		GTAAT TGTATT GAATGAGGCTTCAGT ACCTT ACAGA ATCGT TGGCT GCACA TCTT GGAAA CACCT GCTGGGATTA CTCTT TCAGG TTAAC CCAAC AGAAGG : 4 00										
		*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
		CTCCA CAACG TATAT TTCTT GTGAC ACTCA CCGAT CTCTT CGGCT CCAAT TAC ATACT GAAAC CACAG ATCTA TCTAA TTAGCAGCTCC CACAC ACTGCC : 5 00										
		CTCCA CAACG TATAT TTCTT GTGAC ACTCA CCGAT CTCTT CGGCT CCAAT TAC ATACT GAAAC CACAG ATCTA TCTAA TTAGCAGCTCC CACAC ACTGCC : 5 00										
		*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
		TACTG CCTCG GAATT CAAGGGGCTA CTTTA GGAGC AATTA TCTTG TTATC TAAAC TGAATACC TTGCT ATCTC TTTGA TACAT TTTTA CAAAG CTGAAT : 6 00										
		TACTG CCTCG GAATT CAAGGGGCTA CTTTA GGAGC AATTA TCTTG TTATC TAAAC TGAATACC TTGCT ATCTC TTTGA TACAT TTTTA CAAAG CTGAAT : 6 00										
		*	620	*	640	*						
		TAAAA TGGTA TAAAT TAAAT CACTT TTTTC AATTG GAAGA CTAAT GCGTT TAAAC : 6 55										
		TAAAA TGGTA TAAAT TAAAT CACTT TTTTC AATTG GAAGA CTAAT GCGTT TAAAC : 6 55										

Vergleich der siEGFR-fwd (vor IRES)-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6		GCGCG TCTAGAACTA GTGGATCCCC CGGGC TGCAG GAATT CGAAC GCTGA CGTCA TCCAA CCGCG TCCAA GGAAT CGCGG GCCCA GTGTC ACTAG GCGGGG : 1 00										
pAZC-siEGFR-fwd (vor IRES)		GCGCG TCTAGAACTA GTGGATCCCC CGGGC TGCAG GAATT CGAAC GCTGA CGTCA TCCAA CCGCG TCCAA GGAAT CGCGG GCCCA GTGTC ACTAG GCGGGG : 1 00										
		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
		ACACC CAGCG CGCGT GCGGC CTGGC AGGAA GATGG CTGTG AGGGA CAGGGGAGT GCGCG CCGTC AATAT TTGCA TGTGG CTATG TGTTC TGGGA AATCA C : 2 00										
		ACACC CAGCG CGCGT GCGGC CTGGC AGGAA GATGG CTGTG AGGGA CAGGGGAGT GCGCG CCGTC AATAT TTGCA TGTGG CTATG TGTTC TGGGA AATCA C : 2 00										
		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
		CATAA ACCGTGAAATG TCTTT GGATT TCGGA ATCTT ATAAG TTCTG TATGA GACC ACAGA TCCCC GTGTG TAACG GAATA CTTAT TCAACACATA CCTAT T : 3 00										
		CATAA ACCGTGAAATG TCTTT GGATT TCGGA ATCTT ATAAG TTCTG TATGA GACC ACAGA TCCCC GTGTG TAACG GAATA GGTAT TCAAGAGATA CCTAT T : 3 00										
		*	320	*								
		CCGTT ACACA CTTTT TGGAAAAGCT TATCG ATACC GT : 3 37										
		CCGTT ACACA CTTTT TGGAAAAGCT TATCG ATACC GT : 3 37										

Vergleich der miEGFR_54-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6	GATCC CCCCGAGTCC AACAC CCGTG GGAAT CCAT GGGCA CCATG GCGCC TCGC TCACAA AATG CTTTC GCGTC GCGCA GACAC TGCTC GGTAG TTTCGG : 100										
pAZE-miEGFR 54	GATCC CCCCGAGTCC AACAC CCGTG GGAAT CCAT GGGCA CCATG GCGCC TCGC TCACAA AATG CTTTC GCGTC GCGCA GACAC TGCTC GGTAG TTTCGG : 100										
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
	CCATC ACCCT TTGAG TAAGA CCGCC COTCT GAACC CTCGG CCGCC CCGCG GCGC CAGTG CAAGC ACGCC CAGCC AAAAC CCACC ACCGACCGCA CCGTCA : 200										
	CGATC AGCGT TTGAG TAAGA CCGCC COTCT GAACC CTCGG CCGCC CCGCG GCGC CAGTG CAAGC ACGCC CAGCC AAAAC CCACC ACCGACCGCA CCGTCA : 200										
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
	CUGCG CCGCG AGCGC GCGCC AGGGT CCGGC AGGAA GAGGG CTTAT TTCCCATGATTCCTTCATA TTTCATATA CGATA CAAGGCCTGTAGAGA GATAAT : 300										
	CUGCG CCGCG AGCGC GCGCC AGGGT CCGGC AGGAA GAGGG CTTAT TTCCCATGATTCCTTCATA TTTCATATA CGATA CAAGGCCTGTAGAGA GATAAT : 300										
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
	TAGAATTTAATTTTGAC TGTAAACACA AAGAT ATTAG TACAA AATAC GTGAC GTAGAAAGT AATAA TTTCCTGGGTAGTTT GCAGT TTTAA AATTA TGTTT : 400										
	TAGAATTTAATTTTGAC TGTAAACACA AAGAT ATTAG TACAA AATAC GTGAC GTAGAAAGT AATAA TTTCCTGGGTAGTTT GCAGT TTTAA AATTA TGTTT : 400										
	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
	AAAAATCGACTATCAT ATGCT TACCG TAACT TCAAA CTATT TCCAT TTCTT GCGT TTATA TATCT TGTGG AAACG ACGAA ACACC GTGCT CCGTT CCGCA C : 500										
	AAAAATCGACTATCAT ATGCT TACCG TAACT TCAAA CTATT TCCAT TTCTT GCGT TTATA TATCT TGTGG AAACG ACGAA ACACC GTGCT CCGTT CCGCA C : 500										
	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
	CACATATACTAGTGGACTAG GGAATAACAGG GTAAATGTTTGT TTGAATGAGGCT TCAGTACTT TACAG AATCG TTGCG TGCGC ATCTT GGAAC CACTT GCTGGG : 600										
	CACATATACTAGTGGACTAG GGAATAACAGG GTAAATGTTTGT TTGAATGAGGCT TCAGTACTT TACAG AATCG TTGCG TGCGC ATCTT GGAAC CACTT GCTGGG : 600										
	*	620	*	640	*	660	*	680	*	700	
	ATTAC TTCTT CAGCT TAACC CAACA CAAGC CTCGA CAAGC TATAT TCGTG TTGA CAGCTC ACGCA CCACC TCCAT CCGTT TCAGAAATAGT CAAGC CACAGA : 700										
	ATTAC TTCTT CAGCT TAACC CAACA CAAGC CTCGA CAAGC TATAT TCGTG TTGA CAGCTC ACGCA CCACC TCCAT CCGTT TCAGAAATAGT CAAGC CACAGA : 700										
	*	720	*	740	*	760	*				
	TGATTTCTCA AAGGC ATGGA GTCGC TACTG CCGCG GAATT CAAGG GCGT ACTTT AGSAG CAATTATCTT GTTTA : 779										
	TGATTTCTCA AAGGC ATGGA GTCGC TACTG CCGCG GAATT CAAGG GCGT ACTTT AGSAG CAATTATCTT GTTTA : 779										

Vergleich der siSTAT3-3 rev (vor IRES)-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6	GACCTGTATCTGATTAAGTTTTC CAAAA ACTTC ACAGCC GCGCA AAAAA TCTCTTGAA TTCTT TCGCT GGTCT CAAGC GCGAT CTGTG GTCTC ATACA GAACCT : 100										
pAZE-siSTAT3-3 rev (vor IRES)	GACCTGTATCTGATTAAGTTTTC CAAAA ACTTC ACAGCC GCGCA AAAAA TCTCTTGAA TTCTT TCGCT GGTCT CAAGC GCGAT CTGTG GTCTC ATACA GAACCT : 100										
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
	ATAGATTTCC CAAAT CCAAA GACAT TTCAC GTTTA TGGTGATTTT CCAGAACACATAGC GACAT GCAAA TATTG CAGGG CCGCA CTCGC CTGTC CTTCA C : 200										
	ATAGATTTCC CAAAT CCAAA GACAT TTCAC GTTTA TGGTGATTTT CCAGAACACATAGC GACAT GCAAA TATTG CAGGG CCGCA CTCGC CTGTC CTTCA C : 200										
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
	AGCCATCTTTC CTGCC AGGGC GCAGC CCGCG TGGGT GTTCC CGGCT AGTGA CACT GGGCC CCGCA TTCTT TGGAG CCGGT TGATG ACGTC AGCGT TCGAAT : 300										
	AGCCATCTTTC CTGCC AGGGC GCAGC CCGCG TGGGT GTTCC CGGCT AGTGA CACT GGGCC CCGCA TTCTT TGGAG CCGGT TGATG ACGTC AGCGT TCGAAT : 300										
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
	TCTTG CAGCC CCGCC CATCC ACTAG TTCTA CAGCC CCGCT ACTTT ACTCG CCGA ACGCC CTTCG AATAA CCGCC CTCTG CCGTT CTCTATATCT TATTTT : 400										
	TCTTG CAGCC CCGCC CATCC ACTAG TTCTA CAGCC CCGCT ACTTT ACTCG CCGA ACGCC CTTCG AATAA CCGCC CTCTG CCGTT CTCTATATCT TATTTT : 400										
	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
	CCAGCATATT CCGCT CTTTT CCGAA TGTCA CCGCC CCGAA ACGTC CCGCT CTCT TCTTC ACGAC CATTG CTAGC CCGCT TTCCG CTCTG CCGAA AGCAAT : 500										
	CCAGCATATT CCGCT CTTTT CCGAA TGTCA CCGCC CCGAA ACGTC CCGCT CTCT TCTTC ACGAC CATTG CTAGC CCGCT TTCCG CTCTG CCGAA AGCAAT : 500										
	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
	CCAAG CTCTG TTCAA TCTCT TCAAG CAAGC ACTTC CTCTG CAAGC TTCTT CAAC AAAAA CAAGC TCTCTAGCCACCGTT TCCAG CCAAG CCAAG CCGCCA : 600										
	CCAAG CTCTG TTCAA TCTCT TCAAG CAAGC ACTTC CTCTG CAAGC TTCTT CAAC AAAAA CAAGC TCTCTAGCCACCGTT TCCAG CCAAG CCAAG CCGCCA : 600										
	*	620	*	640	*	660	*	680	*	700	
	CCTGG CGACA GGTGC CTCTG CCGCC AAAAG CCACG TGTAT AAGAT ACACC TGCA AAGGC GGCAC AACCC CAGTG CCAAG TTGTGAGTTG GATAG TTGTGG : 700										
	CCTGG CGACA GGTGC CTCTG CCGCC AAAAG CCACG TGTAT AAGAT ACACC TGCA AAGGC GGCAC AACCC CAGTG CCAAG TTGTGAGTTG GATAG TTGTGG : 700										
	*	720	*	740	*						
	AAAGA GTTCAA ATGCTTCTTCAAGCTTATTTCAAC AAGGCGCTTGA AGGATTTGCCAGA : 757										
	AAAGA GTTCAA ATGCTTCTTCAAGCTTATTTCAAC AAGGCGCTTGA AGGATTTGCCAGA : 757										

Vergleich der siSTAT3-3 fwd (vor IRES)-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6	GGCGG CTCTA GAACT AGTGG ATCCC CCGGG CTGCA GGAAT TCGAA CGCTG ACGT CATCA ACCCG CTCGA AGGAA TCGCG GGGCC AGTGT CACTA GCGGG										: 100
pAZI-siSTAT3-3 fwd(vor IRES)	GGCGG CTCTA GAACT AGTGG ATCCC CCGGG CTGCA GGAAT TCGAA CGCTG ACGT CATCA ACCCG CTCGA AGGAA TCGCG GGGCC AGTGT CACTA GCGGG										: 100
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
	AACAC CCAGC GCGCG TCGCG CCTGG CAGGA AGATG GCTGT GAGGG ACAGG GGAG TGGCG CCGTG CAATA TTTGC ATGTC GCTAT GTGTT CTGGG AATCA										: 200
	AACAC CCAGC GCGCG TCGCG CCTGG CAGGA AGATG GCTGT GAGGG ACAGG GGAG TGGCG CCGTG CAATA TTTGC ATGTC GCTAT GTGTT CTGGG AATCA										: 200
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
	CCATA AACGT GAAAT GTCTT TGGAT TTGGG AATCT TATAA GTTCT GTATG AGAC CACAG ATCCC CTTTC AGACC CGCCA ACAA TTCAA GAGAT TTGTTG										: 300
	CCATA AACGT GAAAT GTCTT TGGAT TTGGG AATCT TATAA GTTCT GTATG AGAC CACAG ATCCC CTTTC AGACC CGCCA ACAA TTCAA GAGAT TTGTTG										: 300
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
	GCGGG TCTGA AGTTT TTGGA AACTT TATCG ATACC GTGCT ACGTT ACTGG CCGA AGCCG CTTGG AATAA GGCCG GTGTG CGTTT GTCTA TATGT TATTTT										: 400
	GCGGG TCTGA AGTTT TTGGA AACTT TATCG ATACC GTGCT ACGTT ACTGG CCGA AGCCG CTTGG AATAA GGCCG GTGTG CGTTT GTCTA TATGT TATTTT										: 400
	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
	CCACC ATATT GCGGT CTTTT GGCAG TGTGA GGGCC CGGAA ACCTG GCGCT GTCTT TCTTG ACCAG CATTC CTAGG GGTCT TTCCC CTCTC GCCAA AGGAA										: 500
	CCACC ATATT GCGGT CTTTT GGCAG TGTGA GGGCC CGGAA ACCTG GCGCT GTCTT TCTTG ACCAG CATTC CTAGG GGTCT TTCCC CTCTC GCCAA AGGAA										: 500
	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
	GGAAG GTCTG TTGAA TGTGG TGAAG GAAAG AGTTG CTCTG GAAGC TTCTT GAAG ACAAA CAAAG TCTGT AGCGA CCGTT TGCAG GCAGC GGAAG CCGCCA										: 600
	GGAAG GTCTG TTGAA TGTGG TGAAG GAAAG AGTTG CTCTG GAAGC TTCTT GAAG ACAAA CAAAG TCTGT AGCGA CCGTT TGCAG GCAGC GGAAG CCGCCA										: 600
	*	620	*	640	*	660	*	680	*	700	
	CCTGG CGACA GGTGC CTCTG CCGCC AAAAG CCACG TGTAT AAGAT ACACC TGCA AAGGC GGCAC AACCC CAGTG CCACG TTGTG AGTTG GATAG TTGTGG										: 700
	CCTGG CGACA GGTGC CTCTG CCGCC AAAAG CCACG TGTAT AAGAT ACACC TGCA AAGGC GGCAC AACCC CAGTG CCACG TTGTG AGTTG GATAG TTGTGG										: 700
	*	720	*	740							
	AAAGA GTCAA ATGGC TCTCC TCAAG CGTAT TCAAC AAGGG GCTGAA										: 746
	AAAGA GTCAA ATGGC TCTCC TCAAG CGTAT TCAAC AAGGG GCTGAA										: 746

Vergleich der siSTAT3-3 (nach IRES)-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6	ACGTTACTGG CUGAA GCGCG TTGGAATAAG GCGCG TGTGC GTTTG TCTATATGT TATTTTCCAC CATAT TGCCG TCTTT TGGCAATGTGAGGGC CCGGAA : 100										
pAZI-siSTAT3-3 (nach IRES)	ACGTTACTGG CUGAA GCGCG TTGGAATAAG GCGCG TGTGC GTTTG TCTATATGT TATTTTCCAC CATAT TGCCG TCTTT TGGCAATGTGAGGGC CCGGAA : 100										
	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
	ACCTGGCCCT GTCTT CTGGA CGAGC ATTCC TAGGG GTCTT TCCCC TCTCG CCAA AGGAA TGCAA GGTCT GTTGA ATGTC GTGAA GGAAG CAGTT CCTCTG : 200										
	ACCTGGCCCT GTCTT CTGGA CGAGC ATTCC TAGGG GTCTT TCCCC TCTCG CCAA AGGAA TGCAA GGTCT GTTGA ATGTC GTGAA GGAAG CAGTT CCTCTG : 200										
	*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
	GANGCTTCTT GAAGA CAAAC AACGT CTGTA GCGAC CCTTT GCGAG CAGCG GAAC CCCCC ACGTG GCGAC AGGTG CCTCT GCGGC CAAAG GCCAC GTGTAT : 300										
	GAAGC TTCTT GAAGA CAAAC AACGT CTGTA GCGAC CCTTT GCGAG CAGCG GAAC CCCCC ACGTG GCGAC AGGTG CCTCT GCGGC CAAAG GCCAC GTGTAT : 300										
	*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
	AAGATACACC TGCAAAGGCG GCACAACCCAGTGC CACGT TGTGA GTTGGATAG TTGTG GAAAGAGTCA AATGGCTCTC CTCAA GCGTA TTCAA CAAGGG : 400										
	AAGATACACC TGCAAAGGCG GCACAACCCAGTGC CACGT TGTGA GTTGGATAG TTGTG GAAAGAGTCA AATGGCTCTC CTCAA GCGTA TTCAA CAAGGG : 400										
	*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
	GCTGAAGGAT GCCCA GAAGG TACCC CATTG TATGG GATCT GATCT GGGGC CTCG GTGCA CATGCTTTAC ATGTG TTTAG TCGAG GTTAA AAAA CGTCTA : 500										
	GCTGAAGGAT GCCCA GAAGG TACCC CATTG TATGG GATCT GATCT GGGGC CTCG GTGCA CATGCTTTAC ATGTG TTTAG TCGAG GTTAA AAAA CGTCTA : 500										
	*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
	GCGCC CCGCA ACCAC CCGCA CCGTG TTTTC CTTTG AAAAA CACCA TAATA CCAT CCGCA TTGCA ACAA GCGCC AGGAG CTGTT CACCG GCGTG GTGCCC : 600										
	GCGCC CCGCA ACCAC CCGCA CCGTG TTTTC CTTTG AAAAA CACCA TAATA CCAT CCGCA TTGCA ACAA GCGCC AGGAG CTGTT CACCG GCGTG GTGCCC : 600										
	*	620	*	640	*	660	*	680	*	700	
	ATCCT GGTGC AGCTG GACGG CGAAG TAAAC GGCCA CAAGT TCAGC GTGTC CCGC GAGGG CGAGG GCGAT GGCAC CTACG GCAAG CTGAC CCTGA AGTTCA : 700										
	ATCCT GGTGC AGCTG GACGG CGAAG TAAAC GGCCA CAAGT TCAGC GTGTC CCGC GAGGG CGAGG GCGAT GGCAC CTACG GCAAG CTGAC CCTGA AGTTCA : 700										
	*	720	*	740	*	760	*	780	*	800	
	TTCTGC ACCAC CCGCA AGCTG CCGGT GCGCT GCGCC ACCCT CGTGA CCACC TTGA CCTAC GCGGT GCAGT GCTTC GCGCC CTACC CCGAC CACAT GAAGCA : 800										
	TTCTGC ACCAC CCGCA AGCTG CCGGT GCGCT GCGCC ACCCT CGTGA CCACC TTGA CCTAC GCGGT GCAGT GCTTC GCGCC CTACC CCGAC CACAT GAAGCA : 800										
	*										
	GCACGACTTC TTCAA GTC : 818										
	CCACGACTTC TTCAA GTC : 818										

Vergleich der siSTAT3-3 fwd Δ IRES-GFP-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6	GGCCG CTCTA GAACT AGTGG ATCCC CCGGG CTGCA GGAAT TCGAA CGCTG ACCT CATCA ACCCG CTCCA AGGAA TCGCG GGCCC AGTGT CACTA GGCGGG											: 100
pAZC-siSTAT3-3	GGCCG CTCTA GAACT AGTGG ATCCC CCGGG CTGCA GGAAT TCGAA CGCTG ACCT CATCA ACCCG CTCCA AGGAA TCGCG GGCCC AGTGT CACTA GGCGGG											: 100
fwd Δ IRES-GFP												
		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
	AAACAC CCAGC GCGCG TCGGC CCTGG CAGGA AGATG GCTGT GAGGG ACAGG GGAG TGGCG CCCCG CAATA TTGCA ATGTC GCTAT GTGTT CTGGG AAAATCA											: 200
	AAACAC CCAGC GCGCG TCGGC CCTGG CAGGA AGATG GCTGT GAGGG ACAGG GGAG TGGCG CCCCG CAATA TTGCA ATGTC GCTAT GTGTT CTGGG AAAATCA											: 200
		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
	CCATA AACGT GAAAT GTCTT TGGAT TTGGG AATCT TATAA GTTCT GTATG AGAC CACAG ATCCC CTTTC AGACU CCGCA ACAAA TTCAA GAGAT TTGTTG											: 300
	CCATA AACCT GAAAT GTCTT TGGAT TTGGG AATCT TATAA GTTCT GTATG AGAC CACAG ATCCC CTTTC AGACU CCGCA ACAAA TTCAA GAGAT TTGTTG											: 300
		*	320	*								
	GCGGTCTGAAGTTT TTGGA AACTTATCG ATACC GTC											: 330
	GCGGTCTGAAGTTT TTGGA AACTTATCG ATACC GTC											: 338

Vergleich der IRES-GFP-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

		*	20	*	40	*	60	*	80	*	100	
Runde 6	CCCAT AGAGT ACGAG CCATG ACGTA CGT TA CTGGC CGAAG CCGCT TGGAA TAAG GCGCG GTGTC GTTTG TCTAT ATGTT ATTTT CCACC ATATT GCGGT C											: 100
pAZC-GFP	CCCAT AGAGT ACGAG CCATG ACGTA CGT TA CTGGC CGAAG CCGCT TGGAA TAAG GCGCG GTGTC GTTTG TCTAT ATGTT ATTTT CCACC ATATT GCGGT C											: 100
		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	
	TTTTG GCAAT GTGAG GGCCC GGAAA CCTGG CCGTG TCTTC TTGAC GAGCA TTCC TAGGG GTCTT TCCCC TCTCG CCAAA GGAAT GCAAG GTCTG TTGAAT											: 200
	TTTTG GCAAT GTGAG GGCCC GGAAA CCTGG CCGTG TCTTC TTGAC GAGCA TTCC TAGGG GTCTT TCCCC TCTCG CCAAA GGAAT GCAAG GTCTG TTGAAT											: 200
		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300	
	GTGCT GAAGG AAGCA GTTCC TCTGG AAGCT TCTTG AAGAC AAACA ACCTC TGTA GCGAC CCTTT GCAGG CAGCG GAAC CCCCC CCTGG CGACA GGTGCC											: 300
	GTGCT GAAGG AAGCA GTTCC TCTGG AAGCT TCTTG AAGAC AAACA ACCTC TGTA GCGAC CCTTT GCAGG CAGCG GAAC CCCCC CCTGG CGACA GGTGCC											: 300
		*	320	*	340	*	360	*	380	*	400	
	TCTGC GGCCA AAGC CACGT GTATA AGATA CACCT GCAAA GCGCG CACAA CCCC AGTGC CACGT TGTGA GTTGG ATAGT TGTGGAAGA GTCAA ATGCC T											: 400
	TCTGC GGCCA AAGC CACGT GTATA AGATA CACCT GCAAA GCGCG CACAA CCCC AGTGC CACGT TGTGA GTTGG ATAGT TGTGGAAGA GTCAA ATGCC T											: 400
		*	420	*	440	*	460	*	480	*	500	
	CTCCT CAAGC GTATT CAACA AGGGG CTGAA GGATG CCCAG AAGGT ACCCC ATTG TATGG GATCT GATCT GGGGC CTGGG TGACAC ATGCT TTACA TGTGT T											: 500
	CTCCT CAAGC GTATT CAACA AGGGG CTGAA GGATG CCCAG AAGGT ACCCC ATTG TATGG GATCT GATCT GGGGC CTGGG TGACAC ATGCT TTACA TGTGT T											: 500
		*	520	*	540	*	560	*	580	*	600	
	TAGTC GAGGT TAAAAA AAGC TCTAG GCGCC CCGAA CCAAG GGGAC GTGGT TTTC CTTTG AAAAA CAAGA TAATA CCATG GCCAT TCGAA CAAAG GCGGAG											: 600
	TAGTC GAGGT TAAAAA AAGC TCTAG GCGCC CCGAA CCAAG GGGAC GTGGT TTTC CTTTG AAAAA CAAGA TAATA CCATG GCCAT TCGAA CAAAG GCGGAG											: 600
		*	620	*	640	*	660	*	680	*	700	
	GAGCT GTTCA CCGGG GTGGT GCCA TCTTG GTGCA GCTGG ACAGC GACGT AAAC GGCCA CAAAT TCAGC GTGTC CGCGG AGGGC GAGGG CGATG CCACT T											: 700
	GAGCT GTTCA CCGGG GTGGT GCCA TCTTG GTGCA GCTGG ACAGC GACGT AAAC GGCCA CAAAT TCAGC GTGTC CGCGG AGGGC GAGGG CGATG CCACT T											: 700
		*	720	*	740	*	760	*	780	*	800	
	ACGGC AAGCT GACCC TGAAG TTCAT CTGCA CCAAC GGCAG GCTGC CCGTG CCCT GGGCC ACCCT CGTGA CCACC TTGAC CTAAG GCGTG CAGTG CTTTCG C											: 800
	ACGGC AAGCT GACCC TGAAG TTCAT CTGCA CCAAC GGCAG GCTGC CCGTG CCCT GGGCC ACCCT CGTGA CCACC TTGAC CTAAG GCGTG CAGTG CTTTCG C											: 800
		*	820	*	840	*	860	*	880	*	900	
	CCGCT ACCCG GACCA CATGA AGCAG CACGA CTTCT TCAAG TCCGC CATGC CCGA AGGCT ACATC CAGGA GCGCA CCATC TTCTT CAAGG ACGAC GGCAC C											: 900
	CCGCT ACCCG GACCA CATGA AGCAG CACGA CTTCT TCAAG TCCGC CATGC CCGA AGGCT ACATC CAGGA GCGCA CCATC TTCTT CAAGG ACGAC GGCAC C											: 900
		*	920	*	940	*	960	*	980	*	1000	
	TACAA GACCC GCGCC GAGGT GAAAT TCGAG GCGCA CACCC TGGTG AACCG CATC GAGCT GAAGG GCATC GACTT CAAGG AGGAC GGCAG CATCC TGGGG C											: 1000
	TACAA GACCC GCGCC GAGGT GAAAT TCGAG GCGCA CACCC TGGTG AACCG CATC GAGCT GAAGG GCATC GACTT CAAGG AGGAC GGCAG CATCC TGGGG C											: 1000
		*	1020	*	1040	*	1060	*	1080	*	1100	
	ACAAG CTGGA GTACA ACTAC AACAG CCACA AGGTC TATAT CACCG CCGAC AAGC AGAAG AACCG CATCA AGGTG AACTT CAAGA CCGGC CACAA CATCGA											: 1100
	ACAAG CTGGA GTACA ACTAC AACAG CCACA AGGTC TATAT CACCG CCGAC AAGC AGAAG AACCG CATCA AGGTG AACTT CAAGA CCGGC CACAA CATCGA											: 1100
		*	1120	*	1140	*	1160	*	1180	*	1200	
	GGACG GCAGC GTGCA GTTTC CCGAC CACTA CCAAG AGAAG ACCCG CATCG CCGA CCGCG CCGTG CTGCT CCGCG ACAAC CACCA CCGTA CCAAC CAGTCC											: 1200
	GGACG GCAGC GTGCA GTTTC CCGAC CACTA CCAAG AGAAG ACCCG CATCG CCGA CCGCG CCGTG CTGCT CCGCG ACAAC CACCA CCGTA CCAAC CAGTCC											: 1200
		*	1220	*	1240	*	1260	*	1280	*	1300	
	GCGCT GAGCA AAGAC CCGAA CGAGA AGCGG GATCA CATGG TCGTG CTGGA GTTC GTGAC CCGCG CCGGG ATGAC TCTCG GCATG GACGA GCTGT ACAAG T											: 1300
	GCGCT GAGCA AAGAC CCGAA CGAGA AGCGG GATCA CATGG TCGTG CTGGA GTTC GTGAC CCGCG CCGGG ATGAC TCTCG GCATG GACGA GCTGT ACAAG T											: 1300
		*	1320	*	1340	*						
	AGCGG CCGCG CCATA GATAA AATAA AAGAT TTTAT TTAGT CTCCA GAAAA AGGG GA											: 1356
	AGCGG CCGCG CCATA GATAA AATAA AAGAT TTTAT TTAGT CTCCA GAAAA AGGG GG											: 1356

Vergleich der miNons-Expressionskassette mit der Ursprungssequenz:

	20	40	60	80	100	
Runde 6	ACGAA GACGG CCTAT TTCCCATCAT TCCTT CATAT TTCCA TATAC GATAC AAGG CTGTT AGACA GATAA TTAGA ATTAATTTTCA CTCTA AACAC AAAGAT					: 1.00
pAZI-miNons	ACGAA GACGG CCTAT TTCCCATCAT TCCTT CATAT TTCCA TATAC GATAC AAGG CTGTT AGACA GATAA TTAGA ATTAATTTTCA CTCTA AACAC AAAGAT					: 1.00
	120	140	160	180	200	
	ATTAG TACAA AATAC GTGAC GTAGA AAGTA ATAAT TTCTT GGGTAGTTTG CAGT TTTAA AATTA TGT TT TAAAA TGGAC TATCA TATGCTTACC GTAAC T					: 2.00
	ATTAG TACAA AATAC GTGAC GTAGA AAGTA ATAAT TTCTT GGGTAGTTTG CAGT TTTAA AATTA TGT TT TAAAA TGGAC TATCA TATGCTTACC GTAAC T					: 2.00
	220	240	260	280	300	
	TGAAA GTATT TCGAT TTCTT GGCCTT TATAT ATCTT GTGGA AAGGACGAAA CACC GTGCT CGCTT CGGCA GCACA TATAC TAGTC GACTA GGGAT AACAGG					: 3.00
	TGAAA GTATT TCGAT TTCTT GGCCTT TATAT ATCTT GTGGA AAGGACGAAA CACC GTGCT CGCTT CGGCA GCACA TATAC TAGTC GACTA GGGAT AACAGG					: 3.00
	320	340	360	380	400	
	GTAAT TGT TT GAATG AGGCTTCAGT ACTTT ACAGAA TCGT TGGCT GCACA TCTT GGAAA CACIT TGTGGGATTA CTTC T CAGG TTAAC CCAAC AGAAGG					: 4.00
	GTAAT TGT TT GAATG AGGCTTCAGT ACTTT ACAGAA TCGT TGGCT GCACA TCTT GGAAA CACIT TGTGGGATTA CTTC T CAGG TTAAC CCAAC AGAAGG					: 4.00
	420	440	460	480	500	
	CTCGA GAAGG TATAT TGCTG TTGAC AGTGA GCGAT CTCGC TTGGG CGAGA GTAA GTAGT GAAGC CACAG ATGTA CTTAC TCTCG CCCAA GCGAG AGTGCC					: 5.00
	CTCGA GAAGG TATAT TGCTG TTGAC AGTGA GCGAT CTCGC TTGGG CGAGA GTAA GTAGT GAAGC CACAG ATGTA CTTAC TCTCG CCCAA GCGAG AGTGCC					: 5.00
	520	540	560	580	600	
	TACTG CCTCG GAATT CTAAA GTAGC CCGTT GAATT CAAGG GGCTA CTTTA GGAG CAATT ATCTT GTTTA CTAAA ACTGA ATACC TTGCT ATCTC TTTGAT					: 6.00
	TACTG CCTCG GAATT CTAAA GTAGC CCGTT GAATT CAAGG GGCTA CTTTA GGAG CAATT ATCTT GTTTA CTAAA ACTGA ATACC TTGCT ATCTC TTTGAT					: 6.00
	620	640	660			
	ACATT TTTTAC AAAGCT GAAT TAAAA TGGTA TAAAT TAAAT CACTT TTTTC AATT GGAAG ACTAA TGC GT TTAAC					: 6.75
	ACATT TTTTAC AAAGCT GAAT TAAAA TGGTA TAAAT TAAAT CACTT TTTTC AATT GGAAG ACTAA TGC GT TTAAC					: 6.75

7.2 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

7.2.1 Basen und Aminosäuren

A Adenin

T Thymin

G Guanin

U Uracil

C Cytosin

7.2.2 Anglizismen

Annealing

Anlagerung zweier einzelsträngiger DNA-Moleküle zu einem Doppelstrang

Antisense

Angabe der Richtung des Oligonukleotids (entgegen der Leserichtung)

Assay

Protokoll oder Versuchsaufbau

Blot

Methode des Transfers von z.B. Proteinen auf eine Membran

Blunt ends	gerade Enden nach einem Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA
Cap	Kappe die die Stabilität der RNA drastisch erhöht
Cluster	eine Gruppe
Coulter Counter	Zellzähler
Enhancer	Transkriptionsverstärker
Envelope engeneering	künstliche Veränderung des Hüllproteins
Firefly	Glühwürmchen
Forward	in Leserichtung
Guide strand	Leitstrang
Hairpin	Haarnadel-Struktur
Imager	Gerät zur bildlichen Darstellung
Imaging	bildlich darstellen
Insert	Einfügung
Loop	Schleife
Low melting moint	geringer Schmelzpunkt
Marker	Größenstandard
Mock	Transfektion ohne DNA-Zugabe
Monitoring	Überwachung der Virusreplikation mittels fluoreszierender Proteine
Nonsilencing	nicht Stilllegung von z.B. Genexpression
Passenger strand	Gegenstrang zum „guide strand“
P-bodies	Strukturen, welche im mRNA-Abbau eine Rolle spielen (processing bodies)
Primer	Starter-Oligonukleotide in der PCR
Prodrug	Vorstufe eines pharmazeutischen Wirkstoffes
Reverse	in entgegengesetzter Leserichtung

Self-targeting	gegen sich selbst gerichteten Zielen
Semi-dry Blotting	Methode des halbtrockenen Transferierens von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen
Sense	Angabe der Richtung des Oligonukleotids (mit der Leserichtung)
Silencing	Stilllegung von z.B. Genexpression
Singel-chain	Einzelstrang
Small molecule inhibitor	kleinmolekularer Inhibitor
Sticky ends	„Klebrige“ oder überhängende Enden nach dem Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA
Strippen	Entfernen von bereits gebundenen Antikörpern von einer Nitrozellulosemembran
Tag	An ein Protein angefügtes Antikörperepitop zur einfachen Detektion
Targeting	Lenkung des viralen Tropismus auf bestimmte Zielzellen

7.2.3 Sonstige Abkürzungen

-	Negativkontrolle
+	Positivkontrolle
°C	Grad Celsius
5FC	5-Fluorozytosin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADA	Adenosin-Deaminase-Defizienz
Ago2	Argonaut Protein 2
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (acquired immunodeficiency syndrome)

Akt	Proteinkinase B
aMLV	amphotropes murines Leukämievirus
APC	Anaphase-promotender Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
as	antisense
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5-triphosphat
AZT	3'-Azido-3'-Desoxythymidin, ein RT-Hemmer
b	Base
Bcr-Abl	onkogenes Fusionsprotein
bp	Basenpaare
BRCA2	Protein mit Schlüsselrolle in der DNA-Reparatur (Breast Cancer 2)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	carboxyterminal
c	Zenti-
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CA	Kapsid
ca.	circa
CD	Zytosin-Deaminase
CD4	Oberflächenantigen (cluster of differentiation 4)
Cdc25	Zellzyklusregulierende phosphatase (cell division cycle 25)
Cdk1	Cyclin-abhängige Kinase 1 (cyclin dependent kinase 1)
DGCR8	RNA bindendes Protein (<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>)
cDNA	komplementäre (complementary) DNA

CMV	Cytomegalovirus
Cox2	Cyclooxygenase-2
CXCI12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 – ein Chemokinrezeptoren
d	Desoxy-
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
d.h.	das heißt
DAPI	4'6-Diamino-2-Phenylindol
Dcr2	Dicer-2
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e.V.	eingetragener Verein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFP	enhanced green fluorescence
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
EGFRvIII	verkürzte EGFR Mutante
EGTA	Ethylenglycol-bis-[Aminoethylether]-Tetraacetat
Env	Hüllglykoprotein bestehend aus den Untereinheiten TM und SU (envelope protein)

<i>env</i>	retrovirales Strukturgen, welches für das Hüllprotein (envelope protein) kodiert
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alias, lateinisch: und andere
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellerkennung (fluorescent activated cell sorting)
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FKS	fötales Kälberserum
FSC	forward scatter
fwd	in Leserichtung (forward)
g	Gramm oder Gravitationskonstante ($9,81 \text{ m/s}^2$)
Gag	gruppenspezifisches Antigen (group specific antigen)
<i>gag</i>	retrovirales Strukturgen, welches für die gruppenspezifischen Proteine (group specific antigens) des Viruskapsids und des Viruskerns kodiert
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
gp	Glykoprotein
h	Stunde oder human
HEK	humane embryonale Nieren-Zellen (Human Embryonic Kidney)
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	horse raddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSV-TK	Herpes-Simpex-Virus-Thymidinkinase
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratumoral
i.v.	intravenous
iE	infektiöse Einheit

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPA	Immuno-Peroxidase-Assay
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRDye	Infrarot konjugierter Zweit-Antikörper (Infrared Dye Optical Agents)
IRES	interne Ribosomenbindestelle (internal ribosomal entry site)
JAK	Janus Kinase
Kb	Kilobasenpaare
KCM	Kaliumchlorid-Kalziumchlorid-Magnesiumchlorid-Transfektionspuffer
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Lauri Bertani
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor (leukemia inhibitory factor)
log	Logarithmus
Lsg.	Lösung
LTR	Endsequenzen des retroviralen Genoms (Long Terminal Repeat)
m	Meter
M	Molar
MA	Matrix
mA	Milliampere
MAP-Kinase	Mitogen-aktiviertes Protein
mCAT-1	zellulärer Rezeptor des ecotropen MLV
MCS	Klonierungsstelle im Vektor, charakterisiert durch das Vorhandensein einzigartiger Restriktionsschnittstellen (Multiple Cloning Site)

mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
MLV	Murines Leukämievirus
mM	Millimol
MMP	Matrix Metalloprotease
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Nano-
N	N-terminal
NC	Nukleokapsid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health
NK	natürliche Killerzellen (natural killer cells)
Nons	nonsilencing
NP40	Nonidet-P 40
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p	Piko-
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PAZ	Piwi, Argonaute und Zwillie Protein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PE	Phycoerthrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut oder Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
Piwi	Untergruppe der Argonautenproteine (P-element induced wimpy testis)
PLK1	Polo-ähnliche-Kinase 1 (Polo-like-kinase 1)
pmol	picomol
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
POL	Polymerase-Protein
<i>pol</i>	retrovirales Gen, welches für die viralen Proteine mit enzymatischer Aktivität kodiert (polymerase)
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
Pre-miRNA	Vorläufer micro RNA (precursor micro RNA)
Pri-miRNA	primäre micro RNA (primary micro RNA)
PRO	Protease
PTGS	posttranskriptionelles Gen-silencing
Puro	Puromycin
R2D2	doppelsträngigeRNA Bindungsprotein
rev	gegen die Leserichtung (reverse)
RISC	RNA-induzierter Stilllegungs-Komplex (RNA induced silencing complex)
RLC	RISC-beladender Komplex (RISC loading komplex)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
rPIT-2	zellulärer Rezeptor des amphotropen MLV
RPMI	Kulturmedium aus dem „Roswell Park Memorial Institute“
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	reverse Transkriptase oder Raumtemperatur

s. Kap.	siehe Kapitel
s.c.	subcutan
SCID	severe combined immunodeficiency; schwere, kombinierte Immundefizienz
SCID-X1	eine Variante von SCID mit mutiertem Interleukin-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
sec	Sekunde(n)
SH2	Src-Homologie-Domäne 2
shRNA	kurze Haarnadel-Struktur RNA (short hairpin RNA)
siRNA	small interfering RNA
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SOB	Nährmedium für Bakterien (Super Optimal Broth-Medium)
SOC	SOB-Medium mit zusätzlicher Glukose
SOCS	Unterdrücker der Zytokin-Signalwege (Suppressors of Cytokine Signaling)
ss	einzelsträngig (single stranded)
SSC	side scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
STAT3C	konstitutiv aktive Mutante des STAT3
SU	Oberflächenhüllprotein (surface protein)
SV40	simianes Virus 40
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TAE	Trisacetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TBS	Tris-gepufferte Salzmischung (Tris-buffered Saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
TFB	Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien (transformation buffer)
T _m	Schmelztemperatur

TM	Transmembranprotein des Hüllproteins Env
TRBP	trans-activation response RNA-binding protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
u.a.	unter anderem
U3/U5	Regionen in der LTR
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Volumen (volume)
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
VPR	virales Protein R
v-Src	Onkogene Kinase des Rous-Sarkom-Virus
VSV-G	Vesticular Stomatitis Virus Glycoprotein G
w	Gewicht (weight)
WB	Western-Blot-Analyse
wt	Wildtyp
XPR1	zellulärer Rezeptor der polytropen und xenotropen MLVs
z.B.	zum Beispiel
α -x	anti (gegen), Antikörper gegen x
μ	Mikro-
Ψ	Verpackungssignal der viralen genomischen RNA Psi

7.3 Lebenslauf

7.4 Danksagung

8. Literaturverzeichnis

1. Aaronson,D.S., Horvath,C.M., 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 1653-1655.
2. Aghi,M., Hochberg,F., Breakefield,X.O., 2000. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy. *J. Gene Med.* 2, 148-164.
3. Ahr,A., Karn,T., Solbach,C., Seiter,T., Strebhardt,K., Holtrich,U., Kaufmann,M., 2002. Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 359, 131-132.
4. Alexandru,G., Uhlmann,F., Mechtler,K., Poupart,M.A., Nasmyth,K., 2001. Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* 105, 459-472.
5. Anderson,W.F., 1998. Human gene therapy. *Nature* 392, 25-30.
6. Aravind,L., Koonin,E.V., 2001. A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol.* 341, 3-28.
7. Archambault,V., Glover,D.M., 2009. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 265-275.
8. Barr,F.A., Sillje,H.H., Nigg,E.A., 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 429-440.
9. Bartel,D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
10. Battini,J.L., Rasko,J.E., Miller,A.D., 1999. A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1385-1390.
11. Berberich-Siebelt,F., Klein-Hessling,S., Hepping,N., Santner-Nanan,B., Lindemann,D., Schimpl,A., Berberich,I., Serfling,E., 2000. C/EBPbeta enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN-gamma induction in T cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 2576-2585.
12. Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., Hannon,G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
13. Blaese,R.M., Culver,K.W., Miller,A.D., Carter,C.S., Fleisher,T., Clerici,M., Shearer,G., Chang,L., Chiang,Y., Tolstoshev,P., Greenblatt,J.J., Rosenberg,S.A., Klein,H., Berger,M., Mullen,C.A., Ramsey,W.J., Muul,L., Morgan,R.A., Anderson,W.F., 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
14. Boden,D., Pusch,O., Silbermann,R., Lee,F., Tucker,L., Ramratnam,B., 2004. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* 32, 1154-1158.

15. Bolognesi,D.P., Montelaro,R.C., Frank,H., Schafer,W., 1978. Assembly of type C oncornaviruses: a model. *Science* 199, 183-186.
16. Boveri,T., 2008. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J. Cell Sci.* 121 Suppl 1, 1-84.
17. Bowerman,B., Brown,P.O., Bishop,J.M., Varmus,H.E., 1989. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev.* 3, 469-478.
18. Bromberg,J.F., Wrzeszczynska,M.H., Devgan,G., Zhao,Y., Pestell,R.G., Albanese,C., Darnell,J.E., Jr., 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.
19. Brummelkamp,T.R., Bernards,R., Agami,R., 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
20. Cai,X., Hagedorn,C.H., Cullen,B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10, 1957-1966.
21. Carmell,M.A., Hannon,G.J., 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 214-218.
22. Castanotto,D., Rossi,J.J., 2009. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457, 426-433.
23. Catlett-Falcone,R., Landowski,T.H., Oshiro,M.M., Turkson,J., Levitzki,A., Savino,R., Ciliberto,G., Moscinski,L., Fernandez-Luna,J.L., Nunez,G., Dalton,W.S., Jove,R., 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*. 10, 105-115.
24. Chang,F., Re,F., Sebastian,S., Sazer,S., Luban,J., 2004. HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. *Mol. Biol. Cell* 15, 1793-1801.
25. Chang,L.J., Chen,C.H., Urlacher,V., Lee,T.Z., 2000. Differential apoptosis effects of primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* 7, 322-333.
26. Chendrimada,T.P., Gregory,R.I., Kumaraswamy,E., Norman,J., Cooch,N., Nishikura,K., Shiekhattar,R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
27. Chiarle,R., Simmons,W.J., Cai,H., Dhall,G., Zamo,A., Raz,R., Karras,J.G., Levy,D.E., Inghirami,G., 2005. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat. Med.* 11, 623-629.
28. Chiu,Y.L., Rana,T.M., 2002. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 10, 549-561.
29. Chung,K.H., Hart,C.C., Al-Bassam,S., Avery,A., Taylor,J., Patel,P.D., Vojtek,A.B., Turner,D.L., 2006. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res.* 34, e53.

30. Chung,Y.S., Breidt,F., Dubnau,D., 1998. Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 29, 905-913.
31. Coffin,J.M., Hughes,S.H., Varmus,H.E., 1997 *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Press.
32. Cogswell,J.P., Brown,C.E., Bisi,J.E., Neill,S.D., 2000. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ.* 11, 615-623.
33. Connor,R.I., Chen,B.K., Choe,S., Landau,N.R., 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206, 935-944.
34. Coppo,P., Dusanter-Fourt,I., Millot,G., Nogueira,M.M., Dugray,A., Bonnet,M.L., Mitjavila-Garcia,M.T., Le,P.D., Guilhot,F., Vainchenker,W., Sainteny,F., Turhan,A.G., 2003. Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells. *Oncogene* 22, 4102-4110.
35. Cosset,F.L., Morling,F.J., Takeuchi,Y., Weiss,R.A., Collins,M.K., Russell,S.J., 1995. Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain. *J. Virol.* 69, 6314-6322.
36. Cullen,B.R., 2004. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* 16, 861-865.
37. Culver,K.W., Ram,Z., Wallbridge,S., Ishii,H., Oldfield,E.H., Blaese,R.M., 1992. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256, 1550-1552.
38. Curiel,D.T., Rancourt,C., 1997. Conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 27, 67-81.
39. Dalba,C., Klatzmann,D., Logg,C.R., Kasahara,N., 2005. Beyond oncolytic virotherapy: replication-competent retrovirus vectors for selective and stable transduction of tumors. *Curr. Gene Ther.* 5, 655-667.
40. Darnell,J.E., 2005. Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat. Med.* 11, 595-596.
41. de Bono,J.S., Rowinsky,E.K., 2002. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol. Med.* 8, S19-S26.
42. de Fougerolles A., Vornlocher,H.P., Maraganore,J., Lieberman,J., 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 443-453.
43. Dechow,T.N., Pedranzini,L., Leitch,A., Leslie,K., Gerald,W.L., Linkov,I., Bromberg,J.F., 2004. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10602-10607.

44. Dock,G., 1904. The influence of complicating diseases upon leukaemia. *J. Med. Sci.* 127, 563-592.
45. Doyle,A., Morris,C.B., Armitage,W.J., 1988. Cryopreservation of animal cells. *Adv. Biotechnol. Processes* 7, 1-17.
46. DuBois,R.N., Abramson,S.B., Crofford,L., Gupta,R.A., Simon,L.S., van de Putte,L.B., Lipsky,P.E., 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12, 1063-1073.
47. Duerner,L.J., Schwantes,A., Schneider,I.C., Cichutek,K., Buchholz,C.J., 2008. Cell entry targeting restricts biodistribution of replication-competent retroviruses to tumour tissue. *Gene Ther.* 15, 1500-1510.
48. Echeverri,C.J., Beachy,P.A., Baum,B., Boutros,M., Buchholz,F., Chanda,S.K., Downward,J., Ellenberg,J., Fraser,A.G., Hacohen,N., Hahn,W.C., Jackson,A.L., Kiger,A., Linsley,P.S., Lum,L., Ma,Y., Mathey-Prevot,B., Root,D.E., Sabatini,D.M., Taipale,J., Perrimon,N., Bernards,R., 2006. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods* 3, 777-779.
49. Echeverri,C.J., Perrimon,N., 2006. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* 7, 373-384.
50. Eckerdt,F. Funktionelle Charakterisierung von Interaktionspartnern der Polo-like Kinase 1 (Plk1) . Thesis/Dissertation 2003. Universität Frankfurt .
51. Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., Tuschl,T., 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
52. Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., Tuschl,T., 2001b. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
53. Felzien,L.K., Woffendin,C., Hottiger,M.O., Subbramanian,R.A., Cohen,E.A., Nabel,G.J., 1998. HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5281-5286.
54. Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., Mello,C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
55. Fouchier,R.A., Meyer,B.E., Simon,J.H., Fischer,U., Malim,M.H., 1997. HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J.* 16, 4531-4539.
56. Frecha,C., Szecsi,J., Cosset,F.L., Verhoeven,E., 2008. Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 8, 449-460.

57. Garcia,R., Yu,C.L., Hudnall,A., Catlett,R., Nelson,K.L., Smithgall,T., Fujita,D.J., Ethier,S.P., Jove,R., 1997. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 8, 1267-1276.
58. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V., Robert Koch-Institut, 2010 *Krebs in Deutschland*; ISBN 978-3-89606-207-9.
59. Golan,A., Yudkovsky,Y., Hershko,A., 2002. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.* 277, 15552-15557.
60. Grandis,J.R., Drenning,S.D., Chakraborty,A., Zhou,M.Y., Zeng,Q., Pitt,A.S., Tweardy,D.J., 1998. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth *In vitro*. *J. Clin. Invest* 102, 1385-1392.
61. Haase,A.D., Jaskiewicz,L., Zhang,H., Laine,S., Sack,R., Gatignol,A., Filipowicz,W., 2005. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6, 961-967.
62. Hacein-Bey-Abina,S., von,K.C., Schmidt,M., McCormack,M.P., Wulffraat,N., Leboulch,P., Lim,A., Osborne,C.S., Pawliuk,R., Morillon,E., Sorensen,R., Forster,A., Fraser,P., Cohen,J.I., de Saint,B.G., Alexander,I., Wintergerst,U., Frebourg,T., Aurias,A., Stoppa-Lyonnet,D., Romana,S., Radford-Weiss,I., Gross,F., Valensi,F., Delabesse,E., Macintyre,E., Sigaux,F., Soulier,J., Leiva,L.E., Wissler,M., Prinz,C., Rabbitts,T.H., Le,D.F., Fischer,A., Cavazzana-Calvo,M., 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
63. Hamanaka,R., Maloid,S., Smith,M.R., O'Connell,C.D., Longo,D.L., Ferris,D.K., 1994. Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila polo* serine-threonine kinase. *Cell Growth Differ.* 5, 249-257.
64. Hanahan,D., Weinberg,R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
65. Heinrich,P.C., Behrmann,I., Muller-Newen,G., Schaper,F., Graeve,L., 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334 (Pt 2), 297-314.
66. Hilbrandt,M. Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 bei Myokarditis. Thesis/Dissertation 2009. Charité Berlin.
67. Hilfiker-Kleiner,D., Hilfiker,A., Drexler,H., 2005. Many good reasons to have STAT3 in the heart. *Pharmacol. Ther.* 107, 131-137.
68. Hiraoka,K., Kimura,T., Logg,C.R., Kasahara,N., 2006. Tumor-selective gene expression in a hepatic metastasis model after locoregional delivery of a replication-competent retrovirus vector. *Clin. Cancer Res.* 12, 7108-7116.

69. Hiraoka,K., Kimura,T., Logg,C.R., Tai,C.K., Haga,K., Lawson,G.W., Kasahara,N., 2007. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model. *Cancer Res.* 67, 5345-5353.
70. Holtrich,U., Wolf,G., Brauninger,A., Karn,T., Bohme,B., Rubsamen-Waigmann,H., Strebhardt,K., 1994. Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1736-1740.
71. <http://www.mirbase.org/>. Online Source 2011.
72. Hunter,E., Swanstrom,R., 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 157, 187-253.
73. Hynes,N.E., 2000. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2, 154-157.
74. Ilyas,M., Straub,J., Tomlinson,I.P., Bodmer,W.F., 1999. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur. J. Cancer* 35, 1986-2002.
75. Jaenisch,R., Jahner,D., Nobis,P., Simon,I., Lohler,J., Harbers,K., Grotkopp,D., 1981. Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice. *Cell* 24, 519-529.
76. Karaïskou,A., Jessus,C., Brassac,T., Ozon,R., 1999. Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 21), 3747-3756.
77. Kasahara,N., Dozy,A.M., Kan,Y.W., 1994. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266, 1373-1376.
78. Kavanaugh,M.P., Miller,D.G., Zhang,W., Law,W., Kozak,S.L., Kabat,D., Miller,A.D., 1994. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7071-7075.
79. Khvorova,A., Reynolds,A., Jayasena,S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
80. Kinzler,K.W., Vogelstein,B., 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761, 763.
81. Kisseleva,T., Bhattacharya,S., Braunstein,J., Schindler,C.W., 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1-24.
82. Klasens,B.I., Huthoff,H.T., Das,A.T., Jeeninga,R.E., Berkhout,B., 1999. The effect of template RNA structure on elongation by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 355-370.

83. Knecht,R., Elez,R., Oechler,M., Solbach,C., von,I.C., Strebhardt,K., 1999. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 59, 2794-2797.
84. Knecht,R., Oberhauser,C., Strebhardt,K., 2000. PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int. J. Cancer* 89, 535-536.
85. Kneisel,L., Strebhardt,K., Bernd,A., Wolter,M., Binder,A., Kaufmann,R., 2002. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J. Cutan. Pathol.* 29, 354-358.
86. Kolch,W., Pitt,A., 2010. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 618-629.
87. Kortylewski,M., Kujawski,M., Wang,T., Wei,S., Zhang,S., Pilon-Thomas,S., Niu,G., Kay,H., Mule,J., Kerr,W.G., Jove,R., Pardoll,D., Yu,H., 2005. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.* 11, 1314-1321.
88. Kosaka,N., Iguchi,H., Yoshioka,Y., Takeshita,F., Matsuki,Y., Ochiya,T., 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442-17452.
89. Lal,S., Lauer,U.M., Niethammer,D., Beck,J.F., Schlegel,P.G., 2000. Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunol. Today* 21, 48-54.
90. Lane,H.A., Nigg,E.A., 1996. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* 135, 1701-1713.
91. Le,R.E., Benichou,S., 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology.* 2, 11.
92. Lee,K.S., Grenfell,T.Z., Yarm,F.R., Erikson,R.L., 1998. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9301-9306.
93. Lee,R.C., Feinbaum,R.L., Ambros,V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
94. Lee,Y., Ahn,C., Han,J., Choi,H., Kim,J., Yim,J., Lee,J., Provost,P., Radmark,O., Kim,S., Kim,V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
95. Leung,G.C., Hudson,J.W., Kozarova,A., Davidson,A., Dennis,J.W., Sicheri,F., 2002. The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat. Struct. Biol.* 9, 719-724.
96. Levy,D.E., Darnell,J.E., Jr., 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651-662.

97. Lewis,P.F., Emerman,M., 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 68, 510-516.
98. Li,Z., Dullmann,J., Schiedlmeier,B., Schmidt,M., von,K.C., Meyer,J., Forster,M., Stocking,C., Wahlers,A., Frank,O., Ostertag,W., Kuhlcke,K., Eckert,H.G., Fehse,B., Baum,C., 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.
99. Lingel,A., Simon,B., Izaurralde,E., Sattler,M., 2003. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426, 465-469.
100. Liu,J., Valencia-Sanchez,M.A., Hannon,G.J., Parker,R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719-723.
101. Liu,Q., Paroo,Z., 2010. Biochemical principles of small RNA pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 295-319.
102. Liu,X., Erikson,R.L., 2003. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 5789-5794.
103. Liu,X., Jiang,F., Kalidas,S., Smith,D., Liu,Q., 2006a. Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA*. 12, 1514-1520.
104. Liu,X., Lei,M., Erikson,R.L., 2006b. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol. Cell Biol.* 26, 2093-2108.
105. Liu,Y.P., Vink,M.A., Westerink,J.T., Ramirez de,A.E., Konstantinova,P., Ter,B.O., Berkhout,B., 2010. Titers of lentiviral vectors encoding shRNAs and miRNAs are reduced by different mechanisms that require distinct repair strategies. *RNA*. 16, 1328-1339.
106. Livak,K.J., Schmittgen,T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
107. Logg,C.R., Logg,A., Tai,C.K., Cannon,P.M., Kasahara,N., 2001. Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary. *J. Virol.* 75, 6989-6998.
108. Lynch,T.J., Bell,D.W., Sordella,R., Gurubhagavatula,S., Okimoto,R.A., Brannigan,B.W., Harris,P.L., Haserlat,S.M., Supko,J.G., Haluska,F.G., Louis,D.N., Christiani,D.C., Settleman,J., Haber,D.A., 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129-2139.
109. Makinen,P.I., Koponen,J.K., Karkkainen,A.M., Malm,T.M., Pulkkinen,K.H., Koistinaho,J., Turunen,M.P., Yla-Herttuala,S., 2006. Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J. Gene Med.* 8, 433-441.

110. Markowitz,D., Goff,S., Bank,A., 1988. Construction of a safe and efficient retrovirus packaging cell line. *Adv. Exp. Med. Biol.* 241, 35-40.
111. Matranga,C., Tomari,Y., Shin,C., Bartel,D.P., Zamore,P.D., 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.
112. Matsuda,M., Arai,A., Nakamura,Y., Fujisawa,R., Masuda,M., 2009. Host cell-specific effects of lentiviral accessory proteins on the eukaryotic cell cycle progression. *Microbes. Infect.* 11, 646-653.
113. Matsuda,M., Matsuda,N., Watanabe,A., Fujisawa,R., Yamamoto,K., Masuda,M., 2003. Cell cycle arrest induction by an adenoviral vector expressing HIV-1 Vpr in bovine and feline cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 748-753.
114. McCaffrey,A.P., Meuse,L., Pham,T.T., Conklin,D.S., Hannon,G.J., Kay,M.A., 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-39.
115. Miller,A.D., Rosman,G.J., 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7, 980-6, 989.
116. Miller,D.G., Adam,M.A., Miller,A.D., 1990a. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell Biol.* 10, 4239-4242.
117. Miller,D.G., Adam,M.A., Miller,A.D., 1990b. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell Biol.* 10, 4239-4242.
118. Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., Erlich,H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
119. Nagane,M., Lin,H., Cavenee,W.K., Huang,H.J., 2001. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 162 Suppl, S17-S21.
120. Nettelbeck,D.M., Jerome,V., Muller,R., 2000. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet.* 16, 174-181.
121. Niu,G., Heller,R., Catlett-Falcone,R., Coppola,D., Jaroszeski,M., Dalton,W., Jove,R., Yu,H., 1999. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res.* 59, 5059-5063.
122. Peng,K.W., Morling,F.J., Cosset,F.L., Murphy,G., Russell,S.J., 1997. A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases. *Hum. Gene Ther.* 8, 729-738.
123. Podewski,E.K., Hilfiker-Kleiner,D., Hilfiker,A., Morawietz,H., Lichtenberg,A., Wollert,K.C., Drexler,H., 2003. Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* 107, 798-802.

124. Pohl,U., Wick,W., Weissenberger,J., Steinbach,J.P., Dichgans,J., Aguzzi,A., Weller,M., 1999. Characterization of Tu-2449, a glioma cell line derived from a spontaneous tumor in GFAP-v-src-transgenic mice: comparison with established murine glioma cell lines. *Int. J. Oncol.* 15, 829-834.
125. Portsmouth,D., Hlavaty,J., Renner,M., 2007. Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* 28, 4-41.
126. Prats,A.C., Roy,C., Wang,P.A., Erard,M., Housset,V., Gabus,C., Paoletti,C., Darlix,J.L., 1990. cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J. Virol.* 64, 774-783.
127. Primrose,S., Twyman,R., 2006 Principles of gene manipulation and genomics, 7. Edition.
128. Rahman,M., 2008. Introduction to Flow Cytometry. <http://www.ab-direct.com/index>.
129. Rainov,N.G., Ren,H., 2003. Gene therapy for human malignant brain tumors. *Cancer J.* 9, 180-188.
130. Ram,Z., Culver,K.W., Oshiro,E.M., Viola,J.J., DeVroom,H.L., Otto,E., Long,Z., Chiang,Y., McGarrity,G.J., Muul,L.M., Katz,D., Blaese,R.M., Oldfield,E.H., 1997. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.* 3, 1354-1361.
131. Ram,Z., Culver,K.W., Walbridge,S., Frank,J.A., Blaese,R.M., Oldfield,E.H., 1993. Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors. *J. Neurosurg.* 79, 400-407.
132. Rana,T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23-36.
133. Rand,T.A., Petersen,S., Du,F., Wang,X., 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621-629.
134. Riese,D.J., Stern,D.F., 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20, 41-48.
135. Roe,T., Reynolds,T.C., Yu,G., Brown,P.O., 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12, 2099-2108.
136. Rogel,M.E., Wu,L.I., Emerman,M., 1995. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* 69, 882-888.
137. Roth,J.A., Cristiano,R.J., 1997. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 21-39.
138. Rotondo,G., Frendewey,D., 1996. Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 24, 2377-2386.

139. Roux,P., Jeanteur,P., Piechaczyk,M., 1989. A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 9079-9083.
140. Robinson,D.A., Dillon,C.P., Kwiatkowski,A.V., Sievers,C., Yang,L., Kopinja,J., Rooney,D.L., Zhang,M., Ihrig,M.M., McManus,M.T., Gertler,F.B., Scott,M.L., Van,P.L., 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* 33, 401-406.
141. Russell,S.J., 1994. Replicating vectors for cancer therapy: a question of strategy. *Semin. Cancer Biol.* 5, 437-443.
142. Saez,E., No,D., West,A., Evans,R.M., 1997. Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 608-616.
143. Sanchez,Y., Bachant,J., Wang,H., Hu,F., Liu,D., Tetzlaff,M., Elledge,S.J., 1999. Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.
144. Sawaya,B.E., Khalili,K., Gordon,J., Taube,R., Amini,S., 2000. Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. *J. Biol. Chem.* 275, 35209-35214.
145. Schaser,T., Wrede,C., Duerner,L., Sliva,K., Cichutek,K., Schnierle,B., Buchholz,C.J., 2011. RNAi-mediated gene silencing in tumour tissue using replication-competent retroviral vectors. *Gene Ther.*
146. Schmidt,M., Reiser,P., Hills,D., Gullick,W.J., Wels,W., 1998. Expression of an oncogenic mutant EGF receptor markedly increases the sensitivity of cells to an EGF-receptor-specific antibody-toxin. *Int. J. Cancer* 75, 878-884.
147. Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Du,T., Xu,Z., Aronin,N., Zamore,P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
148. Shinnick,T.M., Lerner,R.A., Sutcliffe,J.G., 1981. Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* 293, 543-548.
149. Silverman,R.H., Nguyen,C., Weight,C.J., Klein,E.A., 2010. The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Nat. Rev. Urol.* 7, 392-402.
150. Sinkovics,J.G., Horvath,J.C., 2000. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J. Clin. Virol.* 16, 1-15.
151. Sinn,P.L., Sauter,S.L., McCray,P.B., Jr., 2005. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther.* 12, 1089-1098.

152. Sliva,K. Charakterisierung und Optimierung von replikationskompetenten murinen Leukämieviren (MLV) als Gentransfervehikel . Thesis/Dissertation 2006. Universität Frankfurt.
153. Sliva,K., Schnierle,B.S., 2006. Stable integration of a functional shRNA expression cassette into the murine leukemia virus genome. *Virology* 351, 218-225.
154. Sliva,K., Schnierle,B.S., 2010. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virol. J.* 7, 248.
155. Somia,N., Verma,I.M., 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1, 91-99.
156. Somia,N.V., Zoppe,M., Verma,I.M., 1995. Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach to in vivo gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7570-7574.
157. Song,E., Lee,S.K., Wang,J., Ince,N., Ouyang,N., Min,J., Chen,J., Shankar,P., Lieberman,J., 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347-351.
158. Spankuch-Schmitt,B., Wolf,G., Solbach,C., Loibl,S., Knecht,R., Stegmüller,M., von,M.G., Kaufmann,M., Strebhardt,K., 2002. Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 21, 3162-3171.
159. Stass,S.A., Mixson,J., 1997. Oncogenes and tumor suppressor genes: therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* 3, 2687-2695.
160. Statistisches Bundesamt Deutschland. Online Source 2009.
161. Steegmaier,M., Hoffmann,M., Baum,A., Lenart,P., Petronczki,M., Krssak,M., Gurtler,U., Garin-Chesa,P., Lieb,S., Quant,J., Grauert,M., Adolf,G.R., Kraut,N., Peters,J.M., Rettig,W.J., 2007. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr. Biol.* 17, 316-322.
162. Stephanou,A., 2004. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J. Cell Mol. Med.* 8, 519-525.
163. Strebhardt,K., Kneisel,L., Linhart,C., Bernd,A., Kaufmann,R., 2000. Prognostic value of pololike kinase expression in melanomas. *JAMA* 283, 479-480.
164. Suckau,L. RNA Interferenz vermittelte Gentherapie bei Herzinsuffizienz mittels Phospholamban-shRNA exprimierender Adenoviraler - und AAV - Vektoren. Thesis/Dissertation 2008. Freie Universität Berlin.
165. Suo,Z., Johnson,K.A., 1997. RNA secondary structure switching during DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* 36, 14778-14785.

166. Tahbaz,N., Kolb,F.A., Zhang,H., Jaronczyk,K., Filipowicz,W., Hobman,T.C., 2004. Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* 5, 189-194.
167. Tai,C.K., Kasahara,N., 2008a. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. *Front Biosci.* 13, 3083-3095.
168. Tai,C.K., Kasahara,N., 2008b. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. *Front Biosci.* 13, 3083-3095.
169. Tai,C.K., Wang,W., Lai,Y.H., Logg,C.R., Parker,W.B., Li,Y.F., Hong,J.S., Sorscher,E.J., Chen,T.C., Kasahara,N., 2010. Enhanced efficiency of prodrug activation therapy by tumor-selective replicating retrovirus vectors armed with the *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase gene. *Cancer Gene Ther.* 17, 614-623.
170. Takahashi,T., Sano,B., Nagata,T., Kato,H., Sugiyama,Y., Kunieda,K., Kimura,M., Okano,Y., Saji,S., 2003. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci.* 94, 148-152.
171. Tang,C.K., Gong,X.Q., Moscatello,D.K., Wong,A.J., Lippman,M.E., 2000. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res.* 60, 3081-3087.
172. Temin,H.M., 1990. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 1, 111-123.
173. Temin,H.M., Mizutani,S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211-1213.
174. Temme,A., Rieger,M., Reber,F., Lindemann,D., Weigle,B., Diestelkoetter-Bachert,P., Ehninger,G., Tatsuka,M., Terada,Y., Rieber,E.P., 2003. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Mol. Biol. Cell* 14, 78-92.
175. Thiemen,M. Modifizierung und Anwendung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades. Thesis/Dissertation 2008. Universität Wuppertal.
176. Varmus,H.E., Swanström,R., 1982 Replication of retroviruses. *RNA tumor viruses.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
177. Vile,R.G., Russell,S.J., Lemoine,N.R., 2000. Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther.* 7, 2-8.
178. Wagner,B. Experimentelle Untersuchungen zum retroviralen Gentransfer in primäre Chondrozyten des Kaninchens: Entwicklung konstitutiver und Tetrazyklininduzierbarer Expressionssysteme. Thesis/Dissertation 2004. Technische Universität München.

179. Wang,Y., Juranek,S., Li,H., Sheng,G., Tuschl,T., Patel,D.J., 2008. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 456, 921-926.
180. Weichert,W., Kristiansen,G., Winzer,K.J., Schmidt,M., Gekeler,V., Noske,A., Muller,B.M., Niesporek,S., Dietel,M., Denkert,C., 2005. Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch.* 446, 442-450.
181. Weinberg,R.A., 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146.
182. Weinberg,R.A., 1994. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J. Clin.* 44, 160-170.
183. Williams,C.S., Shattuck-Brandt,R.L., DuBois,R.N., 1999. The role of COX-2 in intestinal cancer. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 8, 1-12.
184. Woetmann,A., Lovato,P., Eriksen,K.W., Krejsgaard,T., Labuda,T., Zhang,Q., Mathiesen,A.M., Geisler,C., Svejgaard,A., Wasik,M.A., Odum,N., 2007. Nonmalignant T cells stimulate growth of T-cell lymphoma cells in the presence of bacterial toxins. *Blood* 109, 3325-3332.
185. Wolf,G., Elez,R., Doermer,A., Holtrich,U., Ackermann,H., Stutte,H.J., Altmannsberger,H.M., Rubsamen-Waigmann,H., Strebhardt,K., 1997. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 14, 543-549.
186. Wu,X., Holschen,J., Kennedy,S.C., Ponder,K.P., 1996. Retroviral vector sequences may interact with some internal promoters and influence expression. *Hum. Gene Ther.* 7, 159-171.
187. Wu,X., Li,Y., Crise,B., Burgess,S.M., 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 300, 1749-1751.
188. Yamamoto,M., Alemany,R., Adachi,Y., Grizzle,W.E., 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.
189. Yan,K.S., Yan,S., Farooq,A., Han,A., Zeng,L., Zhou,M.M., 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468-474.
190. Yarden,Y., Sliwkowski,M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.
191. Yarm,F.R., 2002. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell Biol.* 22, 6209-6221.
192. Yi,R., Qin,Y., Macara,I.G., Cullen,B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011-3016.

-
193. Yu,C.L., Meyer,D.J., Campbell,G.S., Lerner,A.C., Carter-Su,C., Schwartz,J., Jove,R., 1995. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81-83.
 194. Yu,H., Jove,R., 2004. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4, 97-105.
 195. Yu,H., Kortylewski,M., Pardoll,D., 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 41-51.
 196. Yuan,J., Horlin,A., Hock,B., Stutte,H.J., Rubsamen-Waigmann,H., Strebhardt,K., 1997. Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am. J. Pathol.* 150, 1165-1172.
 197. Zavada,J., 1982. The pseudotypic paradox. *J. Gen. Virol.* 63 (Pt 1), 15-24.
 198. Zeng,Y., Wagner,E.J., Cullen,B.R., 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* 9, 1327-1333.
 199. Zernecke,A., Bidzhekov,K., Noels,H., Shagdarsuren,E., Gan,L., Denecke,B., Hristov,M., Koppel,T., Jahantigh,M.N., Lutgens,E., Wang,S., Olson,E.N., Schober,A., Weber,C., 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 2, ra81.
 200. Zhang,Y., Zhang,Y.F., Bryant,J., Charles,A., Boado,R.J., Pardridge,W.M., 2004. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 3667-3677.

Teile dieser Arbeit wurden 2011 unter dem Titel „RNAi-mediated gene silencing in tumour tissue using replication-competent retroviral vectors“ in Gene Therapy veröffentlicht.