

**Konstruktion und Charakterisierung
neuer onkolytischer
Herpes Simplex-Viren Typ 1**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer**

**Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von

Nadine Müther

Diplom-Biologin

geboren am 21.06.1977 in Steinheim

2008

Referent: Prof. Dr. Martin Messerle

Koreferent: Prof. Dr. Marcus Pröpsting

Tag der Promotion: 07.03.2008

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Konstruktion und Charakterisierung neuer onkolytischer Herpes Simplex-Viren Typ 1 „

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung

herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

(Unterschrift)

Name: Nadine Müther

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	6
Abstract	7
1 Einleitung	8
1.1 Onkolytische Viren	8
1.2 Gliome	12
1.3 Herpes-Simplex-Virus Typ 1	14
1.4 Ziel der Arbeit	22
2 Material	24
2.1 Allgemeine Laborgeräte	24
2.2 Chemikalien	25
2.3 weitere Verbrauchsmaterialien	26
2.4 Puffer und Lösungen	27
2.5 Zellkulturmedien	28
2.6 Molekulargewichtsmarker	28
2.7 Antikörper	28
2.8 Enzyme	29
2.9 Plasmide	29
2.10 Eukaryotische Zellen	30
2.11 Viren	30
2.12 Bakterien	30
2.13 Kits	31
3 Methoden	32
3.1 Zellkultur	32
3.2 Virologische Techniken	33
3.3 Molekularbiologische Techniken	36
3.4 Klonierung rekombinanter DNA	40
3.5 Transformation von Bakterien	40
3.6 BAC- Mutagenese	41

3.7	Biochemische Techniken.....	46
4	Ergebnisse	49
4.1	Klonierung eines HSV-1 BAC-Klons mit Wildtyp-Virus-Eigenschaften	49
4.2	Markierung des pHSV-1(17 ⁺)Lox Genoms mit einem Luciferase-Gen.....	55
4.3	Deletion der verschiedenen Apoptose-Inhibitor-Gene.....	63
4.4	Wachstumsanalysen der neuen onkolytischen HSV-1-Vektoren	69
4.5	Untersuchungen zur Induktion der Apoptose	73
5	Diskussion.....	87
5.1	Klonierung von HSV-1 Stamm 17 ⁺ -Rekombinanten mit Wildtyp-Eigenschaften 87	
5.2	Markierung des pHSV-1(17 ⁺)Lox Genoms mit einem Luciferase-Gen.....	89
5.3	Herstellung der Apoptose-Inhibitor-Gen Deletionsmutanten	92
5.4	Untersuchungen zur Apoptose-Induktion.....	97
5.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	101
6	Danksagung	102
7	Literaturverzeichnis.....	103
8	Anhang	116
8.1	Primer	116
8.2	Southern Blot Sonden	117
8.3	Virus-Mutanten	117

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AS	<i>amino acid(s)</i> , Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> , artifizielles Bakterienchromosom
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indoyl-3-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CPE	Cytopathischer Effekt
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> , und andere
ET-Mutagenese	abgeleitet von <i>RecE</i> und <i>RecT</i> -Mutagenese
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	<i>Fluorescein-Isothiocyant</i>
h	<i>hour</i> , Stunde
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ-1
HDAP	<i>HSV-1-dependent apoptosis</i> , HSV-1 abhängige Apoptose
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
min	Minute
MOI (PFU/Zelle)	<i>multiplicity of infection</i> ; Anzahl der infektiösen Partikel pro Zelle
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p.i.	<i>post infection</i> , nach der Infektion
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasenkettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque formende Einheiten
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat -Polyacrylamidgelelektrophorese
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
Tk	Thymidinkinase
UL	<i>unique long region</i>
US	<i>unique short region</i>
wt	Wildtyp
µl	Mikroliter
GBM	Glioblastoma multiforme
OV	onkolytische Viren

Zusammenfassung

Maligne Gliome und speziell das *Glioblastoma multiforme* gehören zu den häufigsten und aggressivsten humanen Gehirntumoren mit äußerst schlechter Prognose. Derzeit existiert keine Therapie, die die Lebenserwartung der Patienten signifikant verlängert. Die Virotherapie ist ein neuer, viel versprechender Therapieansatz. Herpes Simplex-Viren weisen dabei ein besonders großes Potential für die Behandlung von malignen Gliomen auf, da sie als neurotrope Viren, Zellen die sich aus dem Zentralen Nervensystem ableiten, infizieren und zerstören können. Da viele Tumorzellen Veränderungen in den Apoptose-Signalwegen aufweisen und Herpesviren ihrerseits eine Vielzahl von anti-apoptotischen Genen entwickelt haben, wurden in dieser Arbeit Herpes Simplex-Viren mit Deletionen in den Apoptose-Inhibitor-Genen hergestellt, um dadurch eine Spezifität für Tumorzellen mit Veränderungen in den Apoptose-Signalweg zu erzielen. Die Klonierung des Genoms des HSV-1 Stamms 17⁺ als künstliches bakterielles Chromosom (BAC) in *E. coli* ermöglichte die Mutagenese mit den Methoden der Bakteriengenetik und dadurch die schnelle, effiziente Herstellung neuer onkolytischer Viren (OV). In dieser Arbeit wurde mittels homologer Rekombination das bei der initialen BAC-Insertion zerstörte Thymidinkinase-Gen erfolgreich rekonstituiert. Zusätzlich wurde die BAC-Vektor-Sequenz mit Erkennungsstellen (loxP-Stellen) für die Cre-Rekombinase flankiert, sowie das Cre-Rekombinase-Gen in den BAC-Vektor inseriert. Nach Transfektion des resultierenden BAC pHSV-1(17⁺)Lox in permissive Zellen schnitt die inserierte Cre-Rekombinase die BAC-Vektor-Sequenz aus dem Genom aus und ein Virus mit nahezu Wildtyp-Eigenschaften entstand. Um später die Ausbreitung und Effektivität der neuen onkolytischen Herpes Simplex-Viren im Mausmodell durch Biolumineszenz-Messungen verfolgen zu können, wurde ein *firefly*-Luciferase Gen zwischen die viralen Gene UL55 und UL56 inseriert. Ausgehend von diesem Luciferase-BAC pHSV-1(17⁺)Lox-luc erfolgte die Herstellung der neuen OV durch Deletion der HSV-1 Apoptose-Inhibitor-Genen US1, US3 und US5. Um die Spezifität der neuen OV zu bestimmen, wurde das Wachstumsverhalten der resultierenden Deletionsmutanten in Gliom- und primären Zellen untersucht und mit den Eigenschaften existierender OV (Δ ICP34.5) verglichen. Dabei konnte für die US1- und US3-Deletionsmutante eine Spezifität vergleichbar mit der des Δ ICP34.5 Virus festgestellt werden, sowie in U87MG-Gliomzellen eine gesteigerte Replikationseffizienz des Δ US3-Virus gegenüber dem Δ ICP34.5 Virus. Die Deletion des US5-Gens führte zu keiner Selektivität für Gliomzellen. Zusätzlich wurde die Fähigkeit der Deletionsmutanten untersucht die Apoptose-Induktion zu verhindern. Nur für die US3-Deletionsmutante konnte ein Verlust der anti-apoptotischen Funktion festgestellt werden.

Schlagwörter: Herpes Simplex-Virus Typ 1, onkolytische Viren, Apoptose

Abstract

Malignant gliomas, especially glioblastoma multiforme, are aggressive brain tumors that give a poor prognosis for survival. None of the conventional anticancer therapies have been successful in significantly prolonging the lifespan of these patients. A promising strategy may be treatment with oncolytic Viruses (OV). Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), as a neurotropic virus that infects and replicates in nervous system derived cells, has a great potential as an anti-cancer agent for nervous system derived tumors. As most tumor cells display impaired apoptosis pathways and HSV-1 has evolved several strategies to block apoptosis, I focussed my efforts on the development of anti-apoptotic gene deleted HSV-1 to achieve tumor specificity. Anti-apoptotic gene deleted viruses should therefore selectively replicate in cells with alterations in these pathways.

For this novel approach to generate oncolytic viruses, in preliminary work from Nagel et al. (2007) the HSV-1 strain 17 + genome was cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC) in *E. coli* in order to manipulate the genome by using the bacterial recombination machinery. In this work I reconstituted the thymidine kinase gene, which was disrupted due to the initial BAC insertion using homologous recombination. Additionally, I flanked the BAC vector sequence with recognition sites for the Cre-recombinase (loxP-sites) and inserted the Cre-recombinase gene into the vector sequence. After transfection into permissive cells the BAC vector sequence was removed by self excision through Cre-mediated recombination to reconstitute an oncolytic virus that grows as similarly as possible to the wt virus. In order to track viral growth in a mouse tumor model by bioluminescence imaging the *firefly* luciferase gene was inserted between the viral genes UL55 and UL56. Starting from this luciferase-containing BAC clone the anti-apoptotic genes US1, US3 and US5 of HSV-1 were deleted to construct the novel oncolytic viruses. To assess the anti-tumor efficacy and specificity of the new oncolytic viruses I measured the growth curves of these different deletion mutants on primary HFF cells and on glioma cells and compared them with those of existing oncolytic viruses (Δ ICP34.5). For the US1- and US3-deletion mutant I could determine specific replication comparable to the Δ ICP34.5-mutant. The Δ US3-virus also showed an enhanced anti-tumor efficacy in U87MG cells in comparison to the Δ ICP34.5-virus. The anti-apoptotic gene deleted viruses were also checked in apoptosis induction assays, to see whether they are still able to inhibit apoptosis. Only for the US3-deletion mutant was there a loss of the inhibitory function.

Keywords: herpes simplex virus type 1, oncolytic virus, apoptosis

1 Einleitung

1.1 Onkolytische Viren

Die erste wissenschaftliche Veröffentlichung, in der Viren und Tumorremission in direkten Zusammenhang gebracht wurden, datiert bereits aus dem Jahre 1904 (Dock, 1904). In dieser ersten Publikation wurde von einer Patientin mit Zervixkarzinom berichtet, die von einem Hund gebissen worden war. Nachdem ihr attenuierte Tollwutviren injiziert worden waren, wurde ein Rückgang des Tumors beobachtet. Die „Virotherapie“ wurde in den nächsten Jahrzehnten weiterverfolgt und immer wieder wurden Studien veröffentlicht, in denen die Infektion mit Adenoviren, Masern oder Mumps zur Remission verschiedener Tumore führte (Smith *et al.*, 1956, Pasquinucci, 1971, Taqi, 1981, Asada, 1974). Allerdings fehlten die molekularen Grundlagen und die technischen Möglichkeiten, um die Zusammenhänge zu entschlüsseln. Nach diesen initialen Versuchen, begann sich die Forschung in den 90er Jahren erneut mit der alten Hypothese der onkolytischen Viren zu beschäftigen. Mit der Verfügbarkeit neuer Technologien zur gentechnischen Modifikation vieler Virusspezies, sowie neuen Erkenntnissen der molekularen Mechanismen der viralen Pathogenese, als auch auf dem Gebiet der Tumor-Molekularbiologie, wurden enorme Anstrengungen unternommen, um der alten Idee der viralen Tumorthherapie zu neuen Anwendungen zu verhelfen. Der Begriff der „onkolytischen Viren“ (OV) wurde aber erst früh im 21. Jahrhundert geprägt (Kirn *et al.*, 2001).

1.1.1 Wirkungsmechanismus onkolytischer Viren

Onkolytische Viren basieren auf dem Prinzip der selektiven Zerstörung infizierter Tumorzellen und der sekundären Ausbreitung in malignem Gewebe durch virale Replikation, ohne kollateralen Schaden in normalen Zellen zu verursachen. Die Tumorzellen werden zu *in situ* Fabriken, die den „Wirkstoff“ in tausendfacher Kopie selbst herstellen, wodurch es zu einer massiven Amplifikation der initialen Dosis im Tumor kommt. Somit hat man einen sich selbsterhaltenden und selbstverstärkenden Wirkstoff zur Verfügung, der erst nach der vollständigen Zerstörung des Tumors, in Ermangelung von Wirtszellen, aus dem Wirtsorganismus verschwindet (Abb. 1). Zusätzlich kann bei den Patienten eine Immunreaktion gegen die während der Zellyse freigesetzten Tumor-Antigene induziert werden, die zur Eliminierung von gestreuten Tumorzellen beiträgt.

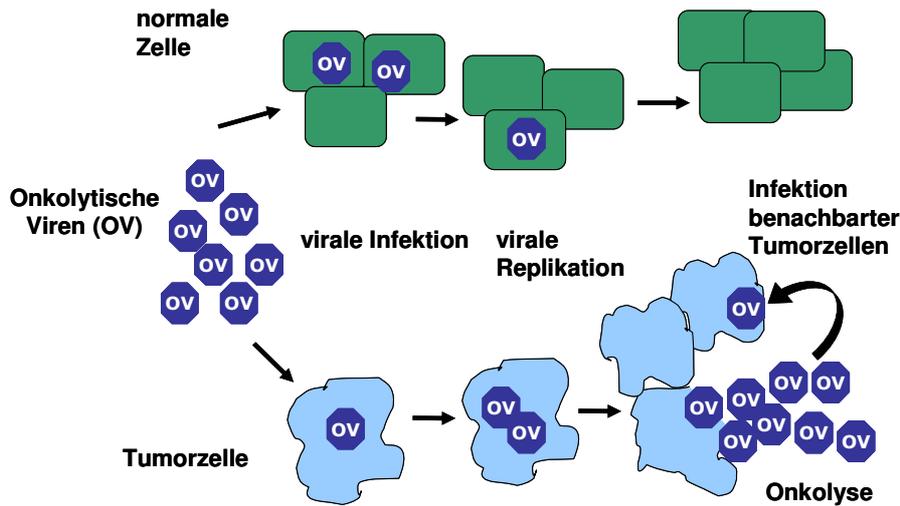


Abb. 1: Prinzip der Tumor-selektiven Replikation onkolytischer Viren in Tumorzellen

Die Spezifität der Viren ist dabei der entscheidende Faktor. Man unterscheidet derzeit zwei Arten solcher onkolytischer Viren. Zum einen existieren Viren, die natürliche tumorspezifische Replikationseigenschaften aufweisen, wie z.B. einige Stämme der Reoviren und des Vesiculostomatitis-Virus. Zum anderen können Viren genetisch manipuliert werden, um eine tumorspezifische Propagation zu erreichen. Zu diesen genetisch modifizierten Viren gehören vor allem das Herpes Simplex Virus-Typ 1 (HSV-1), aber auch Adenoviren und das Newcastle Disease Virus. Die in jüngsten klinischen Studien genutzten, genetisch manipulierten onkolytische Viren, Adenovirus ONYX-015 und CV706 (Chiocca et al., 2004), sowie HSV-1 G207 (Markert et al., 2000) und 1716 (Harrow et al., 2004), zeigen ermutigende Ergebnisse hinsichtlich der Toxizität und Spezifität. Die beobachtete Sicherheit der HSV-1-Vektoren nach intracranialer Applikation bei Mäusen ist angesichts der Neuropathogenität des Wildtyp-HSV-1 bemerkenswert (Markert et al., 2000, Rampling et al., 2000). Im Mausmodell konnte eine Wirksamkeit der HSV-Vektoren gegen eine Reihe von Tumoren, z.B. Melanome, Prostata-Karzinome, Hepatome und Gliome nachgewiesen werden (Varghese & Rabkin, 2002). Die Effektivität dieser onkolytischen Viren in den klinischen Studien ist derzeit jedoch aufgrund ihrer erheblichen Attenuierung begrenzt (Kirn, 2001).

Anfänglich wurden onkolytische Viren basierend auf nicht replikationsfähigen Viren hergestellt, die dem Transfer von Transgenen dienten und deren Genprodukte die Tumorerstörung auslösen sollten. Diese Vektoren zeichneten sich durch eine hohe Sicherheit aus, da essentielle Gene für die Virusreplikation deletiert wurden, wodurch das Risiko einer generalisierten Infektion ausgeschlossen wurde. Als Transgen wurde z.B. das HSV-1 Thymidinkinase-Gen in retro- oder adenovirale Vektoren inseriert. Nach Gabe des Wirkstoffes Ganciclovir phosphoryliert die virale Thymidinkinase spezifisch Ganciclovir und

es entsteht ein Monophosphat, das anschließend von zellulären Kinasen zu Ganciclovir 5'-Triphosphat phosphoryliert wird. In dieser Form wird es als synthetisches Nukleotid-Analogon in die DNA inkorporiert und bewirkt den Abbruch der DNA-Synthese, wodurch letztendlich die Tumorzellen zerstört werden. Diese Strategie erwies sich allerdings als wenig effizient (Klatzman *et al.*, 1998, Rainov, 2000), da die Gentransferraten zu niedrig waren, um große, solide Tumore zu behandeln.

Die Entwicklung replikationsfähiger Viren überwand diese Einschränkung, allerdings setzt die Anwendung replikationsfähiger onkolytischer Viren die spezifische Replikation in den Tumorzellen voraus. Es existieren mehrere Möglichkeiten die Replikation der onkolytischen Viren auf die Tumorzellen zu beschränken.

Die Tumorselektivität kann sowohl durch selektive Infektion, als auch durch selektive Replikation der Viren in den Tumorzellen erreicht werden. Der Ansatz der Tumor-selektiven Infektion wurde bisher nur mit adenoviral-abgeleiteten onkolytischen Viren (Hemminki *et al.*, 2001) erfolgreich angewandt und beruht auf der Interaktion von viralen Oberflächenproteinen und zellulären Rezeptoren über die die Infektion der Zelle stattfindet. Die viralen Oberflächenproteine wurden dazu gezielt so verändert, dass nur noch Krebszell-spezifische Rezeptoren erkannt werden und dadurch die Infektion auf die Tumorzellen beschränkt bleibt.

Für eine selektive Replikation der onkolytischen Viren in Tumorzellen stellen die veränderten Signaltransduktionswege der Tumorzellen einen Angriffspunkt dar (Abb. 2). Viren beeinflussen eine Reihe von Signaltransduktionswegen, die auch in Tumorzellen verändert sind, z.B. die p53- und Rb (Retinoblastom)-Tumorsuppressor-Signalwege. Mutationen des p53 in Tumorzellen verhindern u.a. die Apoptose-Induktion in diesen Zellen. Viren ihrerseits haben verschiedenste Mechanismen entwickelt, um die Apoptose-Induktion zu verhindern. Die Tumorspezifität des Adenovirus ONYX-015 beruht auf der Deletion des Apoptose-Inhibitor-Gens E1B55kD, wodurch diese Viren selektiv in Apoptose-resistenten Tumorzellen replizieren können (Lang *et al.*, 2003; Ries *et al.*, 2000). Allerdings führt die Deletion des E1B55kD-Gens der Adenoviren zu einer starken Attenuierung der Viren verglichen mit dem Wildtyp-Virus, da E1B55kD auch am Transport und der Translation der viralen mRNA beteiligt ist (Leppard & Schenk, 1989; Kirn, 2001).

Der Einsatz Tumor-spezifischer Promotoren ist eine viel versprechende Alternative zur Deletion viraler Gene. Da das virale Genom hoch optimiert ist und virale Gene meist mehrere Funktionen haben, führt die Deletion viraler Gene oft zu einer erheblichen Attenuierung der Viren. Idealerweise sollte der verwendete Promotor ausschließlich in Tumorzellen aktiv sein. Neuere onkolytische Viren beruhen daher auf dem Prinzip, die Expression essentieller viraler Gene unter die Kontrolle tumorspezifischer Promotoren zu stellen (Chung *et al.*, 1999; Kambara *et al.*, 2005).

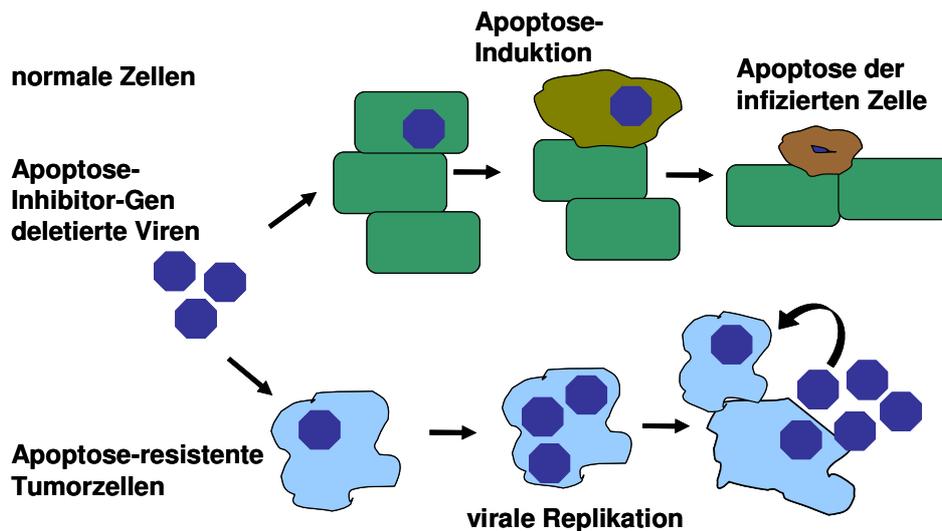


Abb. 2: Tumor-selektive Replikation durch Deletion der Apoptose-Inhibitor-Gene.

Obwohl Herpesviren mit einer Vielzahl von Stoffwechselwegen interferieren, werden derzeit nur wenige Prinzipien genutzt, um eine tumorspezifische Replikation dieser Viren zu erreichen. Dabei bieten sich speziell Herpesviren aus mehreren Gründen ausgesprochen gut für den Einsatz in der Tumorthherapie an und dabei besonders für die Behandlung maligner Gliome. Zum einen existieren gut verträgliche Virusstatika (Acyclovir, Ganciclovir) gegen HSV-1, um gegebenenfalls eine unerwünschte Replikation der Viren zu unterbinden. Andererseits replizieren die neurotrophen Herpes-Simplex-Viren in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, darunter auch Zellen, die sich aus dem Zentralen Nervensystem ableiten, wie maligne Gliomzellen. Während des produktiven Replikationszyklus werden die infizierten Zellen durch das Virus lysiert und somit zerstört. Die Lyse der Zellen wird durch entscheidende biochemische Veränderungen und strukturelle Zerstörungen in der Zelle verursacht und stellt vermutlich einen nekrotischen Prozess dar (Aubert & Blaho, 2001). Die derzeit in klinischen Studien befindlichen onkolytischen Herpes-Vektoren G207 und HSV1716 beruhen auf der Deletion des Neurovirulenz-Gens γ 34.5. Das von diesem Gen kodierte Protein ICP34.5 inhibiert die Wirkung der zellulären Proteinkinase R (PKR) und verhindert dadurch die Abschaltung der Proteinsynthese (Chiocca, 2002). Normalerweise würde es, in einer durch die Virusinfektion induzierten Stressreaktion, zu der Phosphorylierung der α -Untereinheit des Translations-Initiations-Faktors-2 durch die Proteinkinase R kommen. In vielen Tumorzellen ist der PKR-abhängige Signalweg durch einen weitgehend ungeklärten Mechanismus aufgrund der Überexpression des Onkogens Ras gestört und daher können die Δ ICP34.5 Mutanten in diesen Tumorzellen replizieren, aber nicht in normalen Zellen (Farassati *et al.*, 2001; Harrow *et al.*, 2004 a). Ein weiteres Selektionsprinzip wurde bei der Deletion des UL39 Gens im onkolytischen Herpesvirus

rRp450 genutzt. Das HSV-1 UL39 Gen kodiert für die virale Ribonukleotid-Reduktase (ICP6), wodurch die virale Replikation in post-mitotischen Zellen ermöglicht wird, da die Ribonukleotid-Reduktase an der Bereitstellung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten für die DNA-Synthese beteiligt ist. Die Deletion des UL39-Gens beruht auf der Überlegung, dass die virale Ribonukleotid-Reduktase in Tumorzellen, die einen Defekt im p16/Rb-Signalweg aufweisen, nicht benötigt wird, da in diesen Zellen eine ausreichende Menge an Desoxyribonukleotiden vorhanden ist. Allerdings erwies sich auch dies als schwaches Selektionsprinzip (Advani *et al.*, 2002).

Eine Steigerung der Effizienz der onkolytischen Viren kann durch die Kombination mit verschiedenen anderen Therapieverfahren, wie Chemotherapie oder Bestrahlung erreicht werden. Die Mechanismen dieser Effekte sind weitgehend ungeklärt, da bisher nur durch klinische Studien die Wirksamkeit der Therapien getestet wurde. So wirken HSV-1 G207 und Radiotherapie bei der Anwendung bei Kopf- und Halstumoren synergistisch, bei Prostatakarzinomen hingegen konnte keine Verbesserung der Therapie beobachtet werden (Kin *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2001). Die Kombination der onkolytischen Herpesviren mit Chemo- oder Strahlentherapie konnte in den meisten Fällen die Effektivität erhöhen, vor allem bei der Behandlung von malignen Gehirntumoren.

1.2 Gliome

Die Inzidenzrate maligner Gliome liegt in den USA bei 5-10 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Somit sind sie die häufigsten humanen Gehirntumore (Legler *et al.*, 1999). Diese Tumore leiten sich von Gliazellen und deren Vorläufern im zentralen Nervensystems (ZNS) ab. Gliome werden anhand eines von der *World Health Organization* (WHO) empfohlenen Klassifikations-Systems nach der Histologie und der Prognose in die Malignitätsgrade I bis IV eingeteilt (Kleihues *et al.*, 1993). Die Grad IV Gliome, auch *Glioblastoma multiforme* (GBM) genannt, sind dabei die aggressivsten und gleichzeitig auch die häufigsten Gliome (~50%). *Glioblastoma multiforme* können *de novo* (primäres GBM) entstehen oder sich aus niedriggradigen Gliomen entwickeln (sekundäres GBM). Die mittlere Überlebensrate nach der initialen Diagnose eines *Glioblastoma multiforme* liegt trotz konventioneller Therapie bei nur etwa 12 Monaten (Gil-Salu *et al.*, 2004; Rainov, 2000). Fortschritte in der Chirurgie, Bestrahlungstherapie und auch Chemotherapie konnten diese Prognose in den letzten 50 Jahren nicht entscheidend verbessern (Rich & Bigner, 2002). Eine Ursache für die Resistenz gegenüber den verschiedenen Behandlungsmethoden beruht auf dem komplexen Charakter des Tumors selbst. Eine Bestrahlung der Tumore ist wenig effektiv, da das normale umgebende Gehirngewebe nur niedrige Strahlungsdosen toleriert. Die chirurgischen Möglichkeiten sind durch das diffuse, infiltrierende Wachstum der

Glioblastoma multiforme stark eingeschränkt, außerdem zeigt sich entweder eine generelle oder eine allmählich entstehende Chemoresistenz aufgrund inaktiver Apoptosesignalwege in den Gliomen. Die verschiedenen Veränderungen der Signaltransduktionswege, der Zell-Zyklus- und Apoptoseregulation, die üblicherweise in Gliomen gefunden werden, korrelieren mit dem Malignitätsgrad. Grad 1-2 Gliome sind durch die Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF2) und deren Rezeptoren charakterisiert. *Glioblastoma multiforme* weisen Mutationen in den Tumor-Suppressor-Genen p53 und p16 auf. Die Progression vom niedriggradigen Astrozytom hin zum *Glioblastoma multiforme* ist in 65% der Fälle mit einer Mutation des p53-Gens assoziiert, wohingegen nur bei 10% der Patienten mit einem primären *Glioblastoma multiforme* dieser Defekt nachweisbar ist (Shapiro, 2002). Tumore mit defektem oder inaktivem p53 besitzen die Fähigkeit, die Apoptose zu umgehen. Deletionen oder Veränderungen im Chromosom 10 sind die häufigsten genetischen Veränderungen beim Glioblastom. Entscheidend für die Progression des Tumors ist die daraus resultierende Inaktivierung eines der zahlreichen Tumor-Suppressor-Gene, die auf diesem Chromosom kodiert sind. So findet sich in 30% der Glioblastome eine Mutation des Phospholipid-Phosphatase (PTEN) Tumor-Suppressor-Gens (Fujisawa *et al.*, 1999).

Zurzeit existiert für Glioblastome keine kurative Therapie und die konventionellen Therapien, allein oder die Kombination von Chirurgie und Chemotherapie, können einzig zu einer Verlängerung der Lebenserwartung von 3-9 Monaten führen (Pulkkanen & Yla-Herttuala, 2005). Der Mangel an erfolgreichen Therapieoptionen und die Toxizität der konventionellen Therapien verdeutlichen den dringenden Bedarf an alternativen molekular-basierten Behandlungsverfahren mit geringer Toxizität, verbesserter Wirksamkeit und hoher Spezifität. Einen neuen viel versprechenden Therapieansatz zur Behandlung dieser Tumore stellt die Virotherapie dar, da Gliome sich durch die Lokalisation im Gehirn und das Fehlen von Metastasen außerhalb des Gehirns auszeichnen. Nur in Einzelfällen konnten Metastasen eines Glioblastoms in anderen Gehirnregionen oder im Rückenmark beobachtet werden (Medhkour & Chan, 2005; Mourad *et al.*, 2005).

Maligne Gliome sind daher besonders attraktive Ziele für die Anwendung von neurotrophen onkolytischen Herpesviren.

1.3 Herpes-Simplex-Virus Typ 1

Das Herpes Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) gehört zu der Familie der *Herpesviridae*, welche mehr als 130 Spezies umfasst (Cleator & Klapper, 2004). Die meisten Herpesviren wurden in Säugetieren entdeckt, aber auch in vielen anderen Wirbeltierarten bis hin zu Fröschen und Fischen gibt es Herpesviren. Die Partikelmorphologie aller Vertreter der *Herpesviridae* ist praktisch identisch, während die ausgelösten Symptome stark variieren können. Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist die Fähigkeit, nach der Erstinfektion eine lebenslange latente Infektion im Wirt zu etablieren. Unterteilt werden die Vertreter der *Herpesviridae* in die Unterfamilien *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesviren*.

Die *Alphaherpesviren*, zu denen die Herpes Simplex-Viren gehören, weisen ein breites Wirtsspektrum auf. Sie vermehren sich *in vitro* effizient mit kurzen Replikationszyklen und breiten sich daher schnell in der Zellkultur aus, wodurch es zu einem fulminanten zytopathischen Effekt (CPE) kommt (Cleator & Klapper, 2004; Roizman & Knipe, 2001). Die Vertreter dieser Unterfamilie rufen beim Menschen bläschenartigen Ausschlag im Bereich der Haut und Schleimhaut hervor. Anhand der antigenen Eigenschaften werden die *Alphaherpesviren* in zwei Sero-Typen, HSV-1 und HSV-2, eingeteilt (Schneweis, 1962). Die Seroprävalenz von HSV-1 liegt in Deutschland bei etwa 85% (Hellenbrand *et al.*, 2005). Die primäre Infektion erfolgt meist schon im Kindesalter durch Schmierinfektion.

Ein typisches Herpesviruspartikel besteht aus vier strukturellen Komponenten: dem doppelsträngigen DNA-Genom, dem ikosaedrischen Kapsid, dem Tegument und der Virusmembran. Das erste vollständig sequenzierte und publizierte Genom war das des HSV1 Stammes 17⁺ (GenBank X14112; McGeoch *et al.* 1985; McGeoch *et al.* 1986; McGeoch *et al.* 1988; Perry & McGeoch 1988). Das doppelsträngige, lineare Genom hat eine Größe von 152.261 bp und kodiert für mehr als 80 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF). Das Genom ist unterteilt in ein langes Segment (*unique long*, UL-Region) und ein kurzes Segment (*unique short*, US-Region), welche durch invertierte Einheiten wiederholter Sequenzen flankiert sind. Diese werden je nach ihrer Lage im Zentrum oder an den Genomenden als interner Repeat (IR, *internal repeat*) oder terminaler Repeat (TR, *terminal repeat*) bezeichnet. Die invertierten Sequenzwiederholungen der UL-Region werden mit *ab* und *b'a'* bezeichnet, die der US-Region mit *a'c'* und *ac* (Wadsworth *et al.*, 1975). Die Anzahl der *a*-Sequenzwiederholungen an der UL-US- Verbindungsstelle und an dem Ende der UL-Region ist variabel. Die Struktur der *a*-Sequenz ist sehr stark konserviert, besteht jedoch aus einer variablen Anzahl von Wiederholungselementen (Wagner *et al.*, 1978; Roizman, 1979). Während der Replikation können durch intramolekulare Rekombination der identischen, invertierten Wiederholungen vier isomere Genomformen entstehen, in denen die UL- und US-Regionen unterschiedlich zueinander orientiert sind

(Abb. 3). Diese vier Isoformen können aus Virionen isoliert werden (Roizman & Knipe, 2001). Das HSV-1 Genom besitzt zwei verschiedene Replikationsursprünge (Origins), oriL (Gray & Kaerner, 1984) und oriS (Stow, 1982). Der oriL ist in der Mitte der L-Region lokalisiert, der oriS ist auf dem HSV-1 Genom zweimal vorhanden, da dieser in den invertierten Sequenzwiederholungen, die die US-Region flankieren, lokalisiert ist.

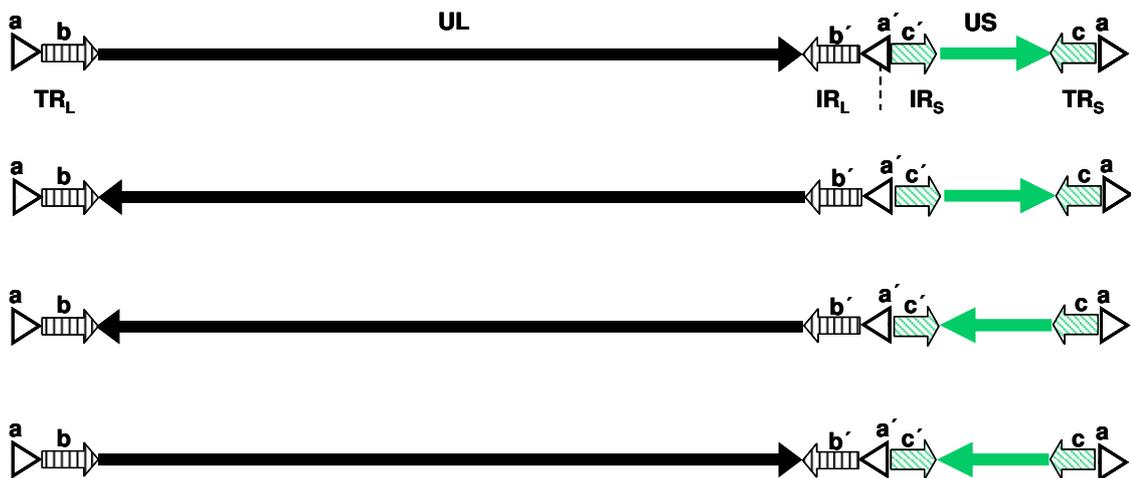


Abb. 3: Genomorganisation von HSV-1.

Das HSV-1 Genom ist unterteilt in ein langes (UL-Region) und ein kurzes Segment (US-Region), welche durch terminale und interne Repeats (TR und IR) flankiert sind. Die a-Sequenzen sind an den Enden sowie zwischen der UL- und US-Region lokalisiert. Während der Replikation entstehen vier Isoformen des HSV-1 Genomes mit unterschiedlich zueinander orientierten UL- und US-Regionen, flankiert von den terminalen und internen Repeats (TR und IR).

Die viralen Gene werden anhand der Phase ihrer Expression während des Infektionszyklus in die kinetischen Klassen α (*immediate early*), β (*early*), γ_1 (*late*) und γ_2 (*true late*) eingeteilt. Die Genbezeichnung ergibt sich aus der Position im Genom, z.B. UL39 oder US5. Die viralen Proteine werden entweder nach ihrer Funktion, z.B. vhs – "*virus host shut off protein*", absteigend nach ihrem Molekulargewicht, z.B. VP1-3, VP5, oder nach ihrer Genbezeichnung, z.B. US3, benannt. Eine weitere Einteilung unterscheidet zusätzlich die in infizierten Zellen gebildeten Proteine (*infected cell protein*, z.B. ICP34.5).

Die Infektion mit Herpes Simplex-Viren beginnt mit der Adsorption (Attachment) der viralen Glycoproteine gC und gB an Heparansulfat-Glycosaminoglycan der Zelloberfläche (Spear, 2004; Spear *et al.*, 2000; Spear & Longnecker, 2003). Dieser reversiblen Bindung folgt die Interaktion des Glycoproteins gD an einen der Korezeptoren. Der erste identifizierte Korezeptor war der HVEM (*herpesvirus entry mediator*, HveA), ein Vertreter der TNF-Rezeptorfamilie (Montgomery *et al.*, 1996). Mittlerweile sind eine Reihe von weiteren

Korezeptoren identifiziert, darunter Nectin-1 (HveC, *herpes virus entry receptor C*), Nectin-2 (HveB, *herpes virus entry receptor B*) 3-O-Sulfat modifizierte Heparan-Sulfate (Spear, 2004; Warner *et al.*, 1998). Im Zusammenspiel mit gB und einem Heterokomplex aus den Glycoproteinen gH und gL fusioniert die Virushülle mit der Plasmamembran, und das Kapsid mit Teilen des Teguments gelangt in das Zytosol (Spear, 2004; Sodeik *et al.*, 1997). Einige Zelltypen werden auch durch Endocytose der Viruspartikel infiziert (Nicola *et al.* 2004; Gianni *et al.* 2004). Im Zytoplasma werden die Kapside zu den Kernporen transportiert, durch die das virale Genom und einige Proteine in das Nukleoplasma entlassen werden (Sodeik *et al.*, 1997). Im Zellkern zirkularisiert das lineare Virus-Genom und liegt dann als Episom im Kernplasma vor.

Durch die episomale Struktur eröffnet sich die Möglichkeit, das Virus-Genom als *bacterial artificial chromosome* (BAC) zu klonieren und somit der Mutagenese durch die Methoden der Bakteriengenetik zugänglich zu machen. Zuvor war eine gezielte Mutagenese von Herpesvirusgenomen nur mit Hilfe der ineffektiven homologen Rekombination in eukaryotischen Zellen möglich (Spaete *et al.*, 1987). BACs sind vom F (Fertilitäts)-Faktor von *E. coli* abgeleitete Plasmidvektoren, die auf ein Minimum ihrer genetischen Information reduziert sind, ohne dass sie die Eigenschaft der autonomen Replikation verloren haben (Kim *et al.*, 1992; Shizuya *et al.*, 1992). Durch die strikte Kontrolle des F-Faktor Replikons liegt das BAC in *E. coli* Zellen stabil in niedriger Kopienzahl vor (O'Connor *et al.* 1989). Messerle *et al.* (1997) klonierten erstmals das Genom des murinen Cytomegalovirus als BAC und konnten mit der Klonierung dieses β -Herpesvirusgenoms zeigen, dass das Verfahren generell für Herpesviren anwendbar ist. Das Verfahren wurde in den letzten Jahren für eine Vielzahl von Herpesviren übernommen (Adler *et al.*, 2003). Zur Herstellung eines BACs wurden die für die Replikation notwendigen bakteriellen Gene *oriS* und *repE*, welche die unidirektionale Replikation vermitteln, und *parA* und *parB*, welche die Kopienzahl des BACs auf eine oder zwei Kopien pro Bakterien-Zelle beschränken, mit Virus-DNA in Säugerzellen kotransfiziert (Messerle *et al.*, 1997). Durch klassische homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen integrierte der BAC-Vektor in das virale Genom. Anschließend wurden zirkuläre Replikationsintermediate der rekombinierten Virus-DNA aus den infizierten Zellen isoliert und in *E. coli* transformiert, wodurch die BAC-klonierten Virusgenome für die Bakteriengenetik zugänglich wurden. Nagel *et al.* (2007) klonierten das Genom des vollständig sequenzierten HSV-1 Stamm 17⁺ als BAC in *E. coli*. Bei der Herstellung des HSV1(17⁺)-BACs wurden die bakteriellen Gene in das Gen für die Thymidinkinase (UL23) integriert, welches in Zellkultur nicht essentiell ist. Mit Hilfe der bakteriellen Rekombination ist eine einfache, schnelle und gezielte Manipulation des Virusgenoms in *E. coli* möglich (siehe Methoden, 3.6) und nach Transfektion der BAC-DNA in permissive eukaryotische Zellen können wieder Viren rekonstituiert werden.

1.3.1 Herpes simplex Virus-Infektion und Apoptose

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein hoch regulierter Prozess, der sowohl während der Differenzierung von Geweben statt findet, als auch einen effektiven Verteidigungsmechanismus gegen Virusinfektionen darstellt (Abb. 4). Die Apoptose ist dabei einer der Hauptmechanismen der Zelle, um die Vermehrung und Ausbreitung von Viren zu verhindern. Apoptose führt zur irreversiblen Veränderung der Zellphysiologie und schließlich zum Zelltod. Morphologisch ist die Apoptose charakterisiert durch Zellschrumpfen, Ein- und Ausstülpung der Plasmamembran, Kondensation des Chromatins und Schrumpfen und Fragmentierung des Zellkerns unter Erhalt der Organellen (Wyllie *et al.*, 1980). Biochemisch kann die Apoptose durch die Fragmentierung der DNA, die Spaltung der Procaspasen oder Caspase-Substrate nachgewiesen werden.

Die Prozesse der Apoptose können durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli ausgelöst werden. Abhängig vom Signal erfolgt die Induktion der Apoptose über extrinsische oder intrinsische Signalwege (Green, 1998; Nagata, 1997; Sun *et al.*, 1999; Abb. 4).

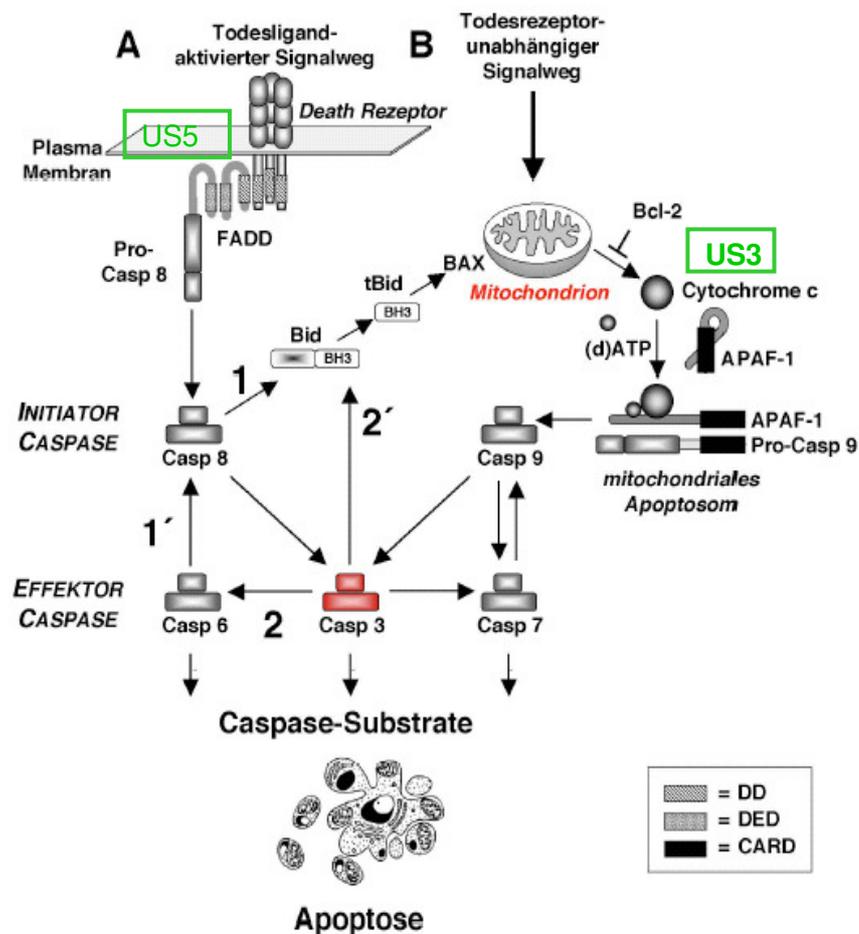


Abb. 4: Signalwege der Apoptose-Induktion.

(A) Extrinsischer durch Todesliganden-aktivierter Signalweg (B) Intrinsischer Todesrezeptor-unabhängiger Signalweg. HSV-1 Apoptose-Inhibitoren und deren Interaktion mit den Signalwegen (grüne Kästchen). Quelle: edoc.hu-berlin.de/.../HTML/chapter2.html

Das extrinsische Signal (Todesliganden-aktivierter Signalweg, Abb. 4 A) wird über die Bildung eines *Death-inducing signal complex* (DISC) ins Zytoplasma vermittelt (Kischkel *et al.*, 1995). Durch Bindung eines Liganden (z.B. CD95L) an den Todesrezeptor (CD95) wird ein membranständiger Signalkomplex gebildet, der aus CD95L, CD95 Rezeptor, dem Adapterprotein FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne) und der Initiator-Caspase Procaspase-8 besteht, wodurch die Procaspase-8 durch autokatalytische Spaltung aktiviert wird. Die aktivierte Caspase-8 wiederum spaltet und aktiviert die Effektor-Caspase-3, welche zelluläre Proteine spaltet, wie das DNA-Reparaturenzym Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) oder den *DNase inhibitor DNA fragmentation factor 45* (DFF45). Die Spaltung von Caspase-Substraten führt zu morphologischen und biochemischen Veränderungen der apoptotischen Zelle. Die Caspase-3 ist nicht nur der Hauptmediator dieser Spaltungen, sie aktiviert ihrerseits auch andere Effektor-Caspasen, wie Caspase-6 und -7. Dadurch kommt es in einer signalverstärkenden Rückkopplung zur Aktivierung der Caspase-8.

Der intrinsische Signalweg (Todesrezeptor-unabhängiger Signalweg, Abb. 4 B) wird durch intrazelluläre Ereignisse wie Virusinfektionen oder DNA-Schädigung nach z.B. UV-Bestrahlung, oxidativem Stress oder durch bestimmten extrazellulären Signalen ausgelöst (Green & Evan, 2002). Toxische Substanzen wie z.B. Chemotherapeutika wirken direkt auf die Mitochondrien und induzieren dadurch die Todesrezeptor-unabhängige Apoptose (Ferrari *et al.*, 1998). Durch noch nicht genau bekannte Mechanismen kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytoplasma (Luo *et al.*, 1998 Green, 1998). Die Bindung von Cytochrom c und ATP bzw. dATP an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) verursacht eine Konformationsänderung von Apaf-1, wodurch die CARD (*caspase recruitment domain*)-Domäne exponiert (Hu *et al.*, 1999; Saleh *et al.*, 1999) und die Bindung der Pro-Caspase-9 an die CARD-Domäne möglich wird. Dieser Komplex wird auch als mitochondriales Apoptosom bezeichnet. Durch die Bildung dieses Komplexes erfolgt die autokatalytische Aktivierung der Caspase-9 (Green, 1998; Sun *et al.*, 1999). Diese wiederum spaltet und aktiviert die Effektor-Caspase-3 und -7 (Nicholson, 1999) und so laufen der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose-Induktion an diesem Punkt zusammen. Analog zum extrinsischen Signalweg erfolgt eine Signalverstärkung durch die Caspase-7 vermittelte Aktivierung der Caspase-9. Vernetzt sind beide Signalwege durch die Caspase-8 vermittelte Aktivierung der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade über die Aktivierung der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie wie Bax oder Bid. Der Verlust der Bax-Expression ist in den meisten Tumoren mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapie verbunden. Im Gegensatz dazu kontrollieren und hemmen andere Mitglieder dieser Genfamilie, z.B. Bcl-2, Bcl-xL oder Bad die Apoptose-Induktion.

Herpesviren haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt die Induktion der Apoptose in infizierten Zellen zu blockieren, um die virale Replikation zu gewährleisten. Die Infektion mit Herpes Simplex Virus induziert zunächst Apoptose in infizierten Zellen, später werden aber virale Proteine synthetisiert, die das Fortschreiten der Apoptose in den infizierten Zellen verhindern. Durch Blockierung der Proteinsynthese konnte gezeigt werden, dass die Apoptose durch eine HSV-1-Infektion innerhalb eines Zeitfensters von drei Stunden nach der Infektion (*post infection*, p.i.) induziert wird, unabhängig von der *de novo* Proteinsynthese viraler oder zellulärer Proteine (Koyama & Adachi, 1997). Der genaue Mechanismus der Induktion der Apoptose ist aber weitgehend unklar. Aubert *et al.* (1999) konnten zeigen, dass 3-6 Stunden p.i. anti-apoptotische Proteine synthetisiert werden, welche das Fortschreiten der Apoptose verhindern. Dieses Zeitfenster, in dem die Apoptose-Inhibitor-Proteine produziert werden, wurde als „*prevention window*“ bezeichnet (Abb. 5). Diese biphasische Modulation der Apoptose durch HSV-1 wird durch eine empfindliche Balance zwischen den pro- und anti-apoptotischen Faktoren gesteuert.

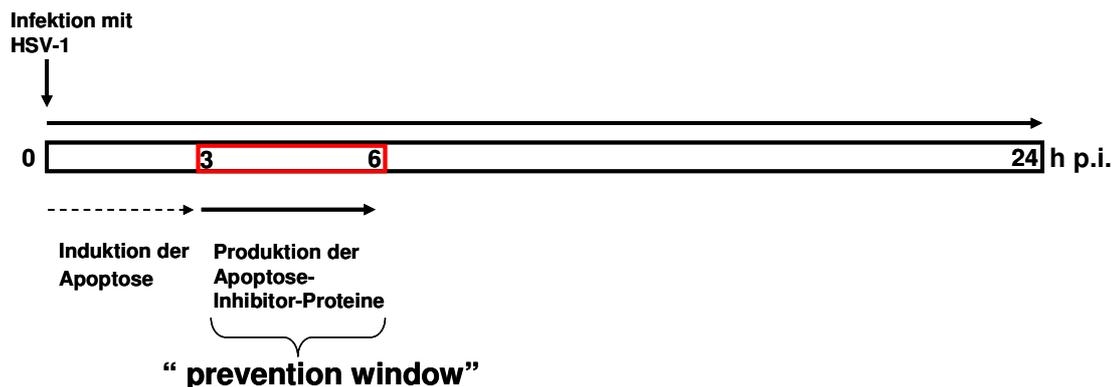


Abb. 5: HSV-1 und Apoptose.

Interaktion der HSV-1-Infektion mit der Apoptose-Induktion und Produktion der Apoptose-Inhibitor-Proteine

Die von HSV-1 kodierte anti-apoptotischen Proteine können infizierte Zellen sowohl vor der exogen als auch endogen induzierten Apoptose schützen. Infizierte Zellen sind fähig, die durch externe Stimuli, wie osmotischen Schock, Serumentzug, Sorbitolbehandlung oder auch FAS-Liganden induzierte Apoptose (Goodkin *et al.*, 2003, Aubert *et al.*, 1999; Galvan *et al.*, 1999; Galvan *et al.*, 2000; Jerome *et al.*, 1998), sowie die durch die Infektion selbst induzierte Apoptose zu blockieren (Aubert *et al.*, 1999; Leopardi *et al.*, 1997). Studien haben gezeigt, dass die Fähigkeit von HSV-1, die induzierte Apoptose zu blockieren, Zelltypabhängig ist (Galvan & Roizman, 1998). Derzeit sind sieben virale Gene bekannt, denen anti-apoptotische Aktivität zugeschrieben werden konnte: ICP4, ICP27, US1, US3, US5, gD sowie LAT.

Die Infektion von Zellen mit Deletionsmutanten der viralen Gene ICP4 oder ICP27 führte zur

Induktion der Apoptose in verschiedenen Zellen. ICP4-Deletionsmutanten waren unfähig, die HSV-bedingte Apoptose (*HSV-1 dependent apoptosis*, HDAP) in Vero-Zellen zu unterbinden (Leopardie & Roizman, 1996), und die ICP27-Deletionsmutanten konnten die Apoptose in HEp-2 Zellen (Larynx-Karzinomzelllinie) nicht mehr verhindern (Aubert *et al.*, 1999). Beobachtet wurde eine Aktivierung der Caspase-3, Freisetzung von Cytochrom c, die Caspase-3 abhängige Prozessierung von PARP und DFF (Aubert *et al.*, 1999) sowie eine Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien in den Zellkern infizierter Zellen (Zhou & Roizman, 2000). Allerdings blockieren die essentiellen *immediate-early* Proteine ICP4 und ICP27 die Apoptose nicht direkt, sondern sind als Regulatorproteine für die Expression weiterer Apoptose-Inhibitor-Gene verantwortlich.

Eines dieser Apoptose-Inhibitor-Gene ist US3. Der US3-Locus kodiert eine nicht-essentielle, multifunktionelle Serin-Threonin-Proteinkinase (Roizman & Knipe, 2001). Neben der Blockierung der Apoptose vermittelt die US3-Proteinkinase die posttranslationelle Modifikation des vom ORF UL34 kodierten viralen Phosphoproteins, und ermöglicht damit die Translokation von Viruspartikeln vom Zellkern ins Cytoplasma (Reynolds *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2004). Neuste Veröffentlichungen zeigen, dass die Proteinkinase in zwei Varianten vorkommt, einer längeren US3-Proteinkinase und einer verkürzten Form, der US3.5-Proteinkinase, wobei die US3.5-Kinase keine Apoptose inhibierende Aktivität aufweist (Poon *et al.*, 2006; Poon & Roizman, 2005). Die anti-apoptotische Funktion der US3-Proteinkinase konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Die Infektion von Vero- und HEp-2-Zellen mit US3-Deletionsmutanten führte zu einer vermehrten DNA-Fragmentierung, verglichen mit Wildtyp-Virus infizierten Zellen (Leopardi *et al.*, 1997). Die Expression von rekombinantem US3 mit einem Baculovirus-Vektor zeigte, dass US3 fähig ist, die Aktivierung der Caspase-3 und -9 und die Freisetzung des Cytochrom c zu verhindern (Munger *et al.*, 2001). Dies führte zu der Annahme, dass die US3-vermittelte Inhibierung der Apoptose in der prämitochondrialen Phase der Apoptose-Induktion stattfindet. In dem Mitochondrien-abhängigen Signalweg der Apoptose-Induktion vermitteln zelluläre Kinasen wie PKA, Akt oder Rsk Überlebenssignale über das pro-apoptotische Bad Protein (Yang *et al.*, 1995). Durch Phosphorylierung wird Bad inaktiviert und dadurch die Bildung von Heterodimeren mit zellulären anti-apoptotischen Proteinen verhindert (Zha *et al.*, 1996). Dadurch können diese anti-apoptotischen Proteine die Apoptose-Induktion blockieren. Die Fähigkeit von US3 die Apoptose zu verhindern, beruht wahrscheinlich auf der spezifischen Phosphorylierung dieser zellulären Substrate, wobei das genaue Zielprotein der Phosphorylierung noch unbekannt ist. Benetti & Roizman (2004) zeigten, dass die PKA durch US3-vermittelte Phosphorylierung aktiviert wird und diese dann eventuell gemeinsam pro-apoptotische Proteine durch Phosphorylierung inaktivieren. In infizierten Zellen, die hohe Mengen von US3 exprimieren, wird Bad schnell phosphoryliert

(Cartier *et al.*, 2003). Offensichtlich ist also die US3-Proteinkinase eine der wichtigsten Komponenten der viralen Apoptose-Intervention *in vivo* und *in vitro*.

Das US1- oder ICP22-Protein ist eines von zwei Proteinen, die vom *immediate-early* Gen $\alpha 22$ kodiert werden. Bei dem US1.5 handelt es sich um eine verkürzte Form des US1 (Carter & Roizman, 1996; Poon *et al.*, 2000). Die ersten Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion des US1 brachte eine Studie von Aubert & Blaho (1999), in der gezeigt wurde, dass das US1-Genprodukt während der Virus-induzierten Apoptose degradiert wird. Der Mechanismus ist aber weitgehend unklar. Interessanterweise replizierten ICP22-Deletionsmutanten in Vero- und in HEp-2 Zellen mit vergleichbarer Kinetik wie das Wildtyp-Virus, während ihre Replikationsfähigkeit in primären Zellen stark eingeschränkt ist (Sears *et al.*, 1985). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass transformierte Zelllinien wie Vero-Zellen ebenso wie Tumorzellen die Fähigkeit zur Apoptose eingebüßt haben und dadurch gegen die virale Apoptose-Induktion resistent sind (Aubert & Blaho, 1999; Galvan & Roizman, 1998).

Das US5-Gen kodiert für das kleine Glycoprotein J (gJ), welches auf der Oberfläche infizierter Zellen nachgewiesen werden konnte (Ghiasi *et al.*, 1998). Zurzeit ist außer der anti-apoptotischen Funktion keine weitere Funktion für das Glycoprotein J beschrieben. Die US5-Deletionsmutante RAS116 war unfähig, die FAS-induzierte Apoptose zu verhindern (Jerome *et al.*, 1999). Da gJ in der Zellmembran lokalisiert ist, vermuteten Jerome *et al.* (2001), dass Glycoprotein J mit der Apoptose-Induktion über den extrinsischen Signalweg interferiert. Der genaue Mechanismus ist allerdings ebenfalls weitgehend unklar. Andere HSV-1 Genprodukte, für die eine Apoptose-inhibierende Funktion diskutiert wird, sind das Glycoprotein D (gD, Zhou & Roizman, 2002) sowie das *latency-associated transkript* (LAT; Perng *et al.*, 2000). Die Expression von LAT inhibiert die, durch die Überexpression von Bax, Caspase-8 oder -9 induzierte Apoptose (Ahmed *et al.*, 2002; Inman *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2004). Die anti-apoptotische Wirkung von LAT wurde lange kontrovers diskutiert, da sie eher bei der Reaktivierung bzw. Etablierung der Latenz von Bedeutung zu sein (Perng *et al.*, 2000).

Die Inhibierung der Apoptose während der HSV-1 Infektion ist wahrscheinlich abhängig von der Kooperation der verschiedenen viralen Apoptose-Inhibitoren. Wenn einzelne Apoptose-Inhibitoren nicht effizient exprimiert werden, verschiebt sich das Gleichgewicht der biphasischen Modulation der Apoptose auf die Seite der Apoptose-Induktion. Folglich würde die Deletion von einzelnen Apoptose-Inhibitor-Genen vermutlich zur Induktion der Apoptose in sensitiven primären Zellen führen, während die Replikation der Deletionsmutanten in apoptose-resistenten Tumorzellen ungehindert fortschreiten könnte.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Entwicklung neuer, effektiver Therapieverfahren zur Behandlung maligner Gliome stellt eine enorme Herausforderung an die Forschung dar. Aufgrund der schlechten Prognosen, sowie dem weitgehenden Versagen der existierenden Therapieverfahren ist die Entwicklung neuer molekular-basierter Behandlungsverfahren geradezu eine zwingende Notwendigkeit. Die Virotherapie mit onkolytischen Herpesviren ist ein viel versprechender Ansatz, allerdings zeigen die derzeit existierenden HSV-1-Vektoren noch eine zu geringe Effektivität. Aufgrund neuer Einblicke in die molekulare Funktion viraler Proteine bei der Interaktion von HSV-1 mit infizierten Zellen, sowie genauerer Kenntnisse über Glioblastomzellen, sollten in dieser Arbeit neue onkolytische Herpes Simplex-Viren konstruiert werden.

Dafür war in Vorarbeiten das Genom des Herpes Simplex Virus-Typ 1 Stamms 17⁺ als BAC in *E. coli* kloniert und somit für die Mutagenese mit den Methoden der Bakteriengenetik zugänglich gemacht worden. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst das bei der BAC-Insertion zerstörte Thymidinkinase-Gen rekonstituiert, sowie die BAC-Vektor-Sequenz dahingehend verändert werden, dass diese nach Transfektion des BAC-klonierten Genoms in permissive Zellen ausgeschnitten wird und dadurch ein Virus mit Wildtyp-Eigenschaften entsteht. Basierend auf diesem HSV-1(17⁺)-BAC-Klon mit nahezu Wildtyp-Virus-identischem Genom sollte dann die Entwicklung neuer onkolytischer Herpesviren stattfinden. Um die Ausbreitung und Effektivität der neuen onkolytischen HSV-1-Vektoren im *in vivo* Mausmodell durch Biolumineszenz-Messungen bestimmen zu können, sollte zusätzlich ein *firefly*-Luciferase-Gen in das Genom inseriert werden.

Herpesviren haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um die Apoptose zu blockieren. Tumorzellen zeigen ihrerseits vielfältige Blockierungen der Apoptose-Signalwege, während diese in normalen Zellen intakt sind. Aufbauend auf diesen Überlegungen sollten in dieser Arbeit durch die Deletion der HSV-1 Apoptose-Inhibitor-Gene Herpesvirus-Vektoren gewonnen werden, die selektiv in Tumorzellen mit Veränderungen in den Apoptose-Signalwegen replizieren und diese dadurch zerstören können. In normalen Zellen sollte die Zerstörung der Apoptose-Inhibitor-Gene zu einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber der durch das Virus selbst induzierten Apoptose führen. In infizierten Tumorzellen sollte es dagegen durch die Mutationen der Apoptose-Signalwege zu keiner Apoptose-Induktion kommen und die virale Replikation könnte in diesen Apoptose-resistenten Tumorzellen weiter voranschreiten und so schlussendlich zur Lyse der Tumorzellen führen. Ziel war es dabei, möglichst gering attenuierte, gliomspezifische, onkolytische Herpesviren zu konstruieren, die in der Lage sind, zu hohen Titern zu replizieren und die sich in der gesamten heterogenen Tumormasse ausbreiten können.

Die Deletion der verschiedenen viralen Apoptose-Inhibitor-Gene sollte durch homologe

Rekombination in *E. coli* erfolgen, wodurch sich die neuen rekombinanten HSV-Vektoren selektiv in apoptose-resistenten Gliomzellen vermehren sollten und diese durch die lytische Infektion zerstört würden, ohne gravierenden Schaden in normalen Zellen anzurichten. Die Wachstumseigenschaften der neuen onkolytischen Apoptose-Inhibitor-Gen deletierten Herpesviren sollten zunächst im Zellkultursystem in Gliom- und primären Zellen getestet werden, bevor das therapeutische Potential und das Sicherheitsprofil *in vivo* in einem murinen Gliommodell durch Biolumineszenz-Messungen bestimmt würden. Zusätzlich sollen die Apoptose-Inhibitor-Gen deletierten Viren auf ihre Fähigkeit die Apoptose zu inhibieren untersucht werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Laborgeräte

Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Geldokumentationssystem	Alpha Innotech Corp., San Leandro, GB
Inkubator für Bakterien	Kendro, Rodenbach
Inkubatoren für Säugerzelllinien, Hera Cell	Kendro, Rodenbach
Kühlzentrifuge 5417 und 5415R	Eppendorf, Hamburg
LAS-3000 Imager	FujiFilm, Düsseldorf
Luminometer DIGENE DCR-1	MGM, Hamden, USA
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikrowellenofen 800	Severin, Sundern
Mini-PROTEAN 3 Electrophorese Einheit	Bio-Rad, Hercules, USA
Neubauer-Zählkammer	Omnilab, Gehrden
Photometer Bio	Eppendorf, Hamburg
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, USA
Rotoren: JA-10	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
JA-20	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
JA-20.1	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
SW40	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Type 19	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Sterilwerkbank Heraeus Herasafe	Kendro, Rodenbach
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
TL 100 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Trans-Blot® SD-Semi-Dry Transfer Einheit	Bio-Rad, Hercules, USA
Wippschüttler	Biometra, Göttingen

Kleingeräte, Plastikwaren und Einwegmaterialien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht), Omnilab (Gehrden), Roth (Karlsruhe), Greiner (Frickenhäuser), Neolab (Heidelberg) und Brand (Wertheim).

2.2 Chemikalien

40% Acrylamid/ Bisacrylamid 19:1	Qbiogen, Irvine, USA
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
APS (Ammoniumperoxosulfat)	Merck, Darmstadt
BCIP (5-Bromo-4-chloro-indolyl-3-phosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Qbiogen, Irvine, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Baker, Deventer, Holland
Ethanol	Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
L-Arabinose	Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Glutamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Baker, Deventer, Holland
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Baker, Deventer, Holland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
NBT (<i>Nitroblue</i> Tetrazolium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure, 37%	Riedel-de-Haën, Seelze
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
TEMED (N, N, N', N' –Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tris (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween20	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.3 weitere Verbrauchsmaterialien

Agar	BD, Pharmingen, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovines Serum Albumin)	NEB, Beverly, USA
Hefeextrakt	BD, Pharmingen, USA
Korsolex	Bode Chemie, Hamburg
Ligase Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, San Diego, USA

Material

Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Trypton	BD, Pharmingen, USA
Zeozin	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.4 Puffer und Lösungen

Benzonase-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 µg/ml BSA
100 x Denhardt's	1% (w/v) Ficoll 400, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon K30, 1% (w/v) BSA
10 x DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerin, 0,37 mM Bromphenolblau, 10 mM EDTA
High Stringency Puffer	0,5 x SDS, 0,1% (w/v) SDS
LB-Agar	1,6% (w/v) Agar, in LB-Medium
LB-Medium	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,8% NaCl
Low Stringency Puffer	2 x SCC, 01% (w/v) SDS
Minipräp.-Lösung 1	50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 8,0
Minipräp.-Lösung 2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Minipräp.-Lösung 3	3 M K-Acetat pH 5,5
MNT-Puffer	20 mM MES, 100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,2
PBS	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8,5 mM Na ₂ HPO ₂ 2H ₂ O, 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T für Western Blot	1 x PBS, 0,1% (v/v) Tween
Prähybridisierungslösung	5 x SCC, 5 x Denhardt's Lsg., 1%(w/v) SDS, 50%(v/v) Formamid
Protein-Probenpuffer für SDS-PAGE	100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau
5 x SDS-Laufpuffer	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 17 mM SDS
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat
Stripping buffer	1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (w/v) SDS

Material

50 x TAE-Puffer	2 M Tris, 0,25 M Na-Acetat, 50 mM EDTA, pH 7,8
10 x TBE-Puffer:	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA
TBST-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100
TE-Puffer	10mM Tris, 1 mM EDTA
TSM-Puffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5
Waschpuffer Southern Blot	0,15 M Maleinsäure, 0,1 M NaCl, pH 7,5; 0,3% (v/v) Tween 20

2.5 Zellkulturmedien

BHK-21/Vero/HEp-2 Zell-Medium	<i>Minimum Essential Eagle Medium</i> (MEM, Cytogen), 7,5% (v/v) fötales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	15% (v/v) FCS, 10% DMSO in MEM Medium oder 20% (v/v) FCS, 10% DMSO in DMEM Medium
Gliomzellen Medium	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (DMEM, Sigma- Aldrich), 10% (v/v) FCS, Penicillin/Streptomycin
Opti-MEM	(Invitrogen, Carlsbad, USA)
RPMI/BSA	0,1% (w/v) BSA, RPMI 1640 Medium (Cytogen)

2.6 Molekulargewichtsmarker

1 kb-DNA Leiter (12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,6 kB, 506 bp)	Invitrogene, Carlsbad, USA
Rainbow Marker (250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15, 10 kDA)	Amersham, Buckinghamshire, England

2.7 Antikörper

2.7.1 primäre Antikörper

polyklonaler Kaninchen-anti-PARP-Antikörper	Cell Signaling, Trask Lane, USA
polyklonaler Ziege-anti-HSV-1-Tk-Antikörper	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
monoklonaler Maus-anti-CD95-Antikörper	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

anti-DIG-AP-Antikörper	Roche, Mannheim, Deutschland
anti- β -Actin-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.7.2 sekundäre Antikörper

Kaninchen-anti-Maus HRP-Antikörper	Dako, Hamburg
Kaninchen-anti-Ziege HRP-Antikörper	Dako, Hamburg
Maus-anti-Kaninchen HRP-Antikörper	Dako, Hamburg

2.8 Enzyme

2.8.1 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (Frankfurt/Main) bezogen.

2.8.2 weitere Enzyme

Benzonase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ligase	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.9 Plasmide

pCP20 (Cherepanov & Wackernagel, 1995; exprimiert konstitutiv Flp-Rekombinase, kodiert Ampicillinresistenz (Amp^{R}), temperatursensitiver Replikationsursprung ori R101, repliziert bei 30°C)

pGP704-Kan (Loewendorf *et al.*, 2004; kodiert für eine Kanamycinresistenz (Kan^{R}) vom Transposon TN903, die von zwei minimalen Flp-Rekombinase-Erkennungssequenzen (FRT-Stellen) flankiert ist)

pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000; kodiert Red α , β , γ unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotors P_{BAD} , Ampicillinresistenz (Amp^{R}), temperatursensitiver Replikationsursprung ori R101, repliziert bei 30°C)

pRpsLneo (Gene Bridges, Dresden; kodiert für das rpsL Gen und eine Kanamycinresistenz (Kan^{R}))

pOri6K-F5 (Borst *et al.*, 2005; kodiert Kanamycinresistenz (Kan^{R}), die von zwei mutierten FRT-Stellen flankiert ist, Ampicillinresistenz (Amp^{R}))

pC3lucM157-Kan (Klenovsek *et al.*, 2007; kodiert *firefly* Luciferase-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors und Kanamycinresistenz (Kan^R), die von zwei FRT-Stellen flankiert ist, Ampicillinresistenz (Amp^R))

pIC1.3-Tet (Kodiert Cre-Rekombinase, virale Thymidinkinase, FRT-Stellen flankiertes Tetracyclinresistenz (Tet^R)-Gen, sowie eine 655 bp Homologie zur BAC-Vektor-Sequenz)

2.10 Eukaryotische Zellen

BHK-21 Zellen: adhärenente, unpolarisierte Nierenepithelzellen aus dem Goldhamster (ATCC-Nr.: CCL-10)

Vero-Zellen: adhärenente, unpolarisierte Nierenepithelzellen aus der grünen Meerkatze (ATCC-Nr.: CCL-81)

U251, U87MG, A172 und U118: humane Gliomzelllinien, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ariane Söling, Universitätsklinik Göttingen

Hep-2 Zellen: Epithelzellen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Diagnostik des virologischen Institutes der Medizinischen Hochschule, Hannover

2.11 Viren

HSV-1 Stamm 17⁺ (Brown *et al.*, 1973) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Beate Sodeik, Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule, Hannover. Dieser HSV-1 Stamm 17⁺ ist komplett sequenziert (Wildtyp, GenBank X14112; Brown *et al.*, 1973; McGeoch *et al.*, 1985; McGeoch *et al.*, 1986; McGeoch *et al.*, 1988; Perry & McGeoch, 1988)

Virus-Mutanten, die im Verlauf dieser Arbeit hergestellt wurden, sind in den Ergebnissen beschrieben.

2.12 Bakterien

***Escherichia coli*, DH10B** (Grant *et al.*, 1990) Genotyp: F⁻ Φ 80d/lacZ Δ M15 mcrA Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Δ lacX74 *deoR* *recA* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Sm^R) *nupG* λ ⁻.

***Escherichia coli*, DY380** (Lee *et al.*, 2001) Genotyp: F⁻ Φ 80d/lacZ Δ M15 mcrA Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Δ lacX74 *deoR* *recA* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Sm^R)

nupG [λ cI857 (*cro-bioA*) \leftrightarrow tet]. *E. coli* DY380 Bakterien wurden aus den DH10B Bakterien abgeleitet. DY380 Bakterien beinhalten im Bakteriengenom einen replikationsdefekten λ Prophagen. Die Rekombinationsgene *red* α , β , γ werden unter der Kontrolle des λ PL-Promotor exprimiert. Dieser Promotor wiederum ist durch den temperatursensitiven Repressor cI857 bei 32°C reprimiert bzw. nicht reprimiert bei 42°C.

2.13 Kits

<i>NucleoBond</i> PC100	Macherey Nagel, Düren
UltraClean™15 DNA <i>Purification</i> Kit	MOBIO, Solana Beach, USA
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim
PCR <i>Purification</i> Kit	Qiagen, Hilden
ANNEXIN V/FITC/7-AAD Kit	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die BHK-21, HEp-2 und Vero Zellen wurden in *Minimum Essential Eagle Medium* (MEM) kultiviert. Supplementiert wurde das Medium für die Vero-Zellen mit 7,5% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, 1 h bei 56°C inaktiviert), bei den übrigen Zelllinien mit 10% FCS. Zur Kultivierung der Gliom- und MRC-7 Zellen sowie der 293T Zellen wurde *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM) mit 10% FCS verwendet. Allen Medien wurde zusätzlich Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 100 U/ml bzw. 100 mg/ml zugesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Flaschen oder Zellkulturschalen bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit einem CO₂-Anteil von 5%. Zur Erhaltung wurden die konfluenten Zellkulturen zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gespült und die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt. Sämtliche Zellkulturen wurden regelmäßig mit Hilfe eines Mykoplasmen Detektions Kit auf Mykoplasmen getestet.

3.1.2 Dauerkultur eukaryotischer Zellen

Für die Langzeit-Lagerung wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm Schale mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Medium resuspendiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt und 4 min mit 750 x g bei RT abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 2,5 ml Medium ohne weitere Zusätze aufgenommen und je 800 µl der Zellsuspension wurden in Einfrierröhrchen überführt. Zu den 800 µl Zellsuspension wurde die gleiche Menge Einfriermedium zugetropft und durch Invertieren vorsichtig gemischt. Die Einfrierröhrchen wurden zunächst für 1-3 Tage bei -80°C zwischengelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Aussaat der Zellen wurden diese zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Zu der Zellsuspension wurden langsam 5 ml Medium zugegeben und anschließend 4 min bei 750 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue 10 cm Zellkulturschale ausgesät.

3.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion von Plasmid- oder BAC-DNA wurden zu 80% konfluente Vero-Zellkulturen genutzt. Die Zellen einer 10 cm Schale wurden einmal mit PBS gespült, mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Medium aufgenommen. Abschließend wurden die Zellen bei RT mit 750 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 800 µl Opti-MEM resuspendiert. Etwa 1 µg Plasmid- bzw. 2-3 µg BAC-DNA (BAC-Midipräparation, siehe 3.3.5) und 800 µl Zellsuspension wurden in einer 4 mm-Elektroporationsküvette gemischt und bei 250 V und 1500 µF elektroporiert. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in mit Medium vorbereitete 10 cm Schalen transferiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Bei der Rekonstitution von Viren aus BAC-DNA wurden die Zellen bis zum Auftreten von Plaques, hervorgerufen durch das replizierende Virus, kultiviert. Bei vollständigem cytopathischen Effekt (CPE) wurden die Zellen mit dem Überstand (Passage 1, P1) in ein 15 ml Röhrchen überführt und zunächst bei -80°C gelagert. Das intrazelluläre Virus wurde durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad freigesetzt. Diese Virussuspension wurde für die Infektion neuer Zellen genutzt.

3.2 Virologische Techniken

3.2.1 Herstellung von Virusstocks

Die Präparation der Virusstocks erfolgte weitgehend entsprechend veröffentlichten Protokollen (Döhner et al., 2006, Döhner et al., 2002, Sodeik et al., 1997). Zur Herstellung von Virusstocks wurden subkonfluente BHK-21 Zellen (1-2 x 10⁷ Zellen/175 cm Kulturflasche) mit Virussuspension der Passage 2 infiziert. Vor der Inokulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,01 in 5 ml RPMI/BSA 1 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurden zum Inokulum 25 ml Medium zugegeben und die Zellen bis zum vollständigen CPE inkubiert (2-3 Tage). Die Zellen wurden dann durch Klopfen vom Boden entfernt und zusammen mit dem Medium in JA-10 Zentrifugenbecher überführt und zunächst bei 450 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml MNT-Puffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Der Überstand wurde in einen Beckman Type 19 Zentrifugenbecher überführt und 1,5 h bei 4°C mit 13.500 x g zentrifugiert. Das Viruspellet wurde anschließend vorsichtig mit 2 ml MNT-Puffer resuspendiert, in ein zuvor mit RPMI/BSA Medium ausgespültes Reagenzglas überführt und 14-18 h im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde die Virussuspension erneut vorsichtig resuspendiert und dann

entweder aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert oder durch eine Dichtegradienten Ultrazentrifugation weiter gereinigt.

3.2.2 Nycodenz-Dichtegradienten Ultrazentrifugation

Die weitere Aufarbeitung des Virusstocks erfolgte über einen linearen Nycodenz-Gradienten in MNT-Puffer. Dazu wurden SW28 Ultra-Zentrifugenröhrchen exakt auf halber Höhe markiert und dann mit 10% Nycodenz-Lösung bis zur Markierung gefüllt. Mit Hilfe einer Spritze mit langer Kanüle wurde dann vorsichtig 40% Nycodenz-Lösung unterschichtet, bis die Interphase die Markierung erreichte. Anschließend wurde der Nycodenz-Gradient (10-40% (w/v)) mit Hilfe des Gradientenmaster hergestellt. Die zuvor nochmals im Ultraschall-Wassereisbad homogenisierte Virussuspension wurde auf den Nycodenz-Gradienten überschichtet. Anschließend wurden die SW28 Ultra-Zentrifugenröhrchen für 110 min bei 4°C mit 53.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Virusbande, welche sich etwa in der Mitte des Gradienten befand, geerntet, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Plaque-Titration

Die Titration der Virusstocks erfolgte entsprechend dem veröffentlichten Protokoll von Döhner et al., 2002. Vero-Zellen wurden in 6-Loch Platten mit $3-5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Am folgenden Tag wurden die subkonfluenten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Inokulum infiziert. Der zu bestimmende Virusstock wurde dazu in einer 10-fach Verdünnungsreihe mit RPMI/BSA Medium verdünnt. Die Inokulation erfolgte in Triplikaten für 1 h bei RT auf dem Wippschüttler. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 2 ml Kulturmedium und 20 µg/ml gereinigtem, humanem IgG überschichtet und für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Das humane IgG beinhaltet HSV-1 spezifische Antikörper in ausreichenden Mengen, um die in das Kulturmedium freigesetzten Virionen zu neutralisieren. Somit verbreitet sich die Infektion ausschließlich von Zelle zu Zelle. Die resultierenden Plaques gehen auf jeweils eine infizierte Zelle zurück. 3 Tage nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, gefärbt und anschließend die Plaques gezählt. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen dann durch Zugabe von 1 ml Methanol pro Vertiefung für 10 min bei RT fixiert. Das Methanol wurde anschließend entfernt und die Zellen mittels 200 µl GIEMSA Lösung/Loch 15 min gefärbt. Anschließend wurden die Plaques gezählt und der Virustiter kalkuliert (Mittelwert Plaqueanzahl x Verdünnungsfaktor x 2). Der Titer der Viruspräparation wurde dabei in *plaque forming units* (PFU) pro ml Virusstock angegeben.

3.2.4 Wachstumskinetik

Die viralen Wachstumseigenschaften wurden auf verschiedenen Zelllinien bestimmt. Dazu wurden subkonfluente Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit einer MOI von 1, 5 oder 10, 1 h bei RT auf dem Wippschüttler infiziert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann Kulturmedium zu den Zellen gegeben. In 3 h Intervallen wurden bis zu 54 h nach Infektion (*post infection*, p.i.) 250 µl Überstand entnommen und durch neues Kulturmedium ersetzt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Bestimmung der Virustiter gelagert.

3.2.5 Isolierung viraler DNA

Subkonfluente Vero-Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach etwa 2-3 Tagen, bei vollständigem CPE, wurde das Medium mit den Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1.800 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in SW40 Ultra-Zentrifugenröhrchen überführt und 1 h bei 4°C mit 90.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das pelletierte Virus mit abgeschnittener Pipettenspitze vorsichtig in 500 µl Benzonase Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die zelluläre DNA abzubauen, wurden 100 U Benzonase zu dem resuspendierten Pellet zugegeben, mehrfach vorsichtig invertiert und 1 h bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung der Benzonase wurden 20 µl 500 µM EDTA-Lösung (pH 8,0) zugegeben und durch mehrfaches Invertieren gut gemischt. Anschließend wurden zunächst 500 µl 1%ige SDS-Lösung hinzugefügt und gemischt. Dann wurden 40 µl Proteinase K Stammlösung (20 mg/ml) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 2 h bei 56°C inkubiert und anschließend einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion unterzogen. Die wässrige, DNA enthaltende Phase wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Reaktionsgefäß überführt und daraus die DNA gefällt. Dazu wurden 2 µl Glykogen (35 mg/ml) zugegeben, kurz gemischt und dann 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,2 zugegeben, invertiert und zuletzt 1 Vol. Isopropanol zugegeben, invertiert und 30 min bei 4°C mit 32.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, zum DNA-Pellet 800 µl Ethanol (70%) gegeben und erneut 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer bei 4°C gelöst.

3.2.6 Plaquereduktionstest

Für den Nachweis der Suszeptibilität von HSV-1 gegenüber Virostatika wie Acyclovir (ACV) wurde der Plaquereduktionstest genutzt. Dazu wurden subkonfluente Vero-Zellen mit den verschiedenen HSV-1 Mutanten mit einer MOI von 0,001 infiziert. Der Test wurde als

Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation bei RT auf dem Wippschüttler wurde das Inokulum entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen dann mit Kulturmedium und 20 µg/ml humanem IgG überschichtet. Zusätzlich wurden dem Medium verschiedene Verdünnungen einer Acyclovir-Stammlösung zugesetzt: 2,5 µg/ml, 0,25 µg/ml oder 0,025 µg/ml. Viruswachstumskontrollen wurden ohne Virostatikum in Medium inkubiert. Nach dreitägiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte die Fixierung der Zellen (siehe 3.2.3). Die Plaqueanzahl pro Vertiefung wurde bestimmt und prozentual in Bezug auf infizierte, aber unbehandelte Zellen dargestellt. Dadurch konnte die 50%ige inhibitorische Dosis (ID₅₀), d.h. die Virostatikakonzentration bei der das Viruswachstum um 50% reduziert ist, ermittelt werden.

3.3 Molekularbiologische Techniken

3.3.1 Kultivierung von Bakterien

Die *E. coli* Stämme wurden, sofern nicht anders angegeben, auf LB-Agar oder in LB-Medium unter Schütteln bei 37°C für 14-18 h kultiviert. Gegebenenfalls wurden geeignete Antibiotika zugesetzt.

3.3.2 Dauerkultur von Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 500 µl einer Bakterien-Übernachtskultur mit 500 µl 50% Glycerin durch Invertieren gemischt und sofort bei -80°C eingefroren. Neue Kulturen konnten dann aus der Dauerkultur durch die Entnahme von gefrorenem Zellmaterial angesetzt werden.

3.3.3 Präparation von Plasmid-DNA („Mini-Präp.“)

Die Präparation von Plasmid-DNA (*high-copy* Plasmid) aus Bakterien erfolgte aus 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur. Dazu wurden die Bakterien 3 min bei 4°C mit 5.000 x g pelletiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 200 µl Lösung II wurde die Suspension durch mehrfaches Invertieren gemischt und dann für maximal 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung III (4°C) zum Fällen der Proteine zugegeben, gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 5 min bei 4°C und 32.000 x g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 400 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und anschließend für 15 min bei 4°C und 32.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet

mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, luftgetrocknet, in 50 µl TE-Puffer mit RNase (Endkonzentration 20 µg/ml) aufgenommen und 30 min bei 37°C gelöst.

3.3.4 Präparation von BAC-DNA („BAC-Mini-Präp.“)

Die Isolierung von BAC-DNA (*low-copy*-Plasmide) aus Bakterien erfolgte aus einer 10 ml Übernachtkultur. Die Bakterien wurden zunächst mit 7.000 x g bei 4°C für 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Die Suspension wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 300 µl Lösung II zugegeben, invertiert und für maximal 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µl Lösung III (4°C) zugegeben, erneut durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden für 5 min bei 4°C und 32.000 x g pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 800 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und anschließend 20 min mit 32.000 x g bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 800 µl Ethanol (70%) gewaschen, luftgetrocknet, 100 µl TE-Puffer mit RNase (Endkonzentration 20 µg/ml) zugegeben und 30 min bei 37°C gelöst.

3.3.5 Midi-Präparation von Plasmid- und BAC-DNA

Die Midi-Präparation von Plasmid-DNA und BAC-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des *NucleoBond* PC100 Kits aus einer 100 ml Übernachtkultur entsprechend den Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.3.7). Die isolierte BAC-DNA wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst.

3.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die gezielte Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Ein typischer 50 µl PCR Ansatz enthielt folgende Komponenten:

- 25 µl HotStarTaq Mix
- 2-5 ng Template DNA
- 10 pmol Vorwärts-Primer
- 10 pmol Rückwärts-Primer

Ein typisches PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

- 95°C 15 min (Denaturierung des Templates)

10 Zyklen:	94 °C	30 sec (Denaturierung)
	68 °C	30 sec (Primer-Annealing)
	72 °C	110 sec (DNA-Synthese)
25 Zyklen:	94 °C	45 sec (Denaturierung)
	65 °C	45 sec (Primer-Annealing)
	72 °C	110 sec (DNA-Synthese)
1 Zyklus	72 °C	10 min (Nach-Synthese)

Die Synthesezeiten richteten sich nach der Größe des erwarteten Produkts. Die Annealingtemperaturen wurden nach der Länge und dem G/C-Anteil der Primer bestimmt.

3.3.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde spektroskopisch mittels eines Photometers in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der DNA wurde über das Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260 nm/280 nm bestimmt. Ein Wert > 1,8 entspricht einer DNA Lösung mit hoher Reinheit. Eine OD von 1 entspricht 50 µg/ml dsDNA.

3.3.8 Restriktionsanalyse von DNA

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden wurde ein Ansatz von 1-5 µl (1 µg) Plasmid-DNA, 3 µl 10x Restriktionspuffer und 1-5 U Restriktionsenzym auf 30 µl mit dH₂O aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1% TAE-Agarosegel bei 100-150 V für 1-3 h. Als Größenstandard diente eine 1 kb-Leiter (Invitrogen). Zur Färbung der DNA wurden die Agarosegele in eine Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gelegt und mit Hilfe des Geldokumentationssystems (Alpha Innotech Corporation) ausgewertet.

Für die Restriktionsanalyse von BAC- und Virus-DNA wurden 5 µl 10 x Restriktionspuffer vorgelegt, 45 µl (~2 µg) DNA mit abgeschnittener Pipettenspitze dazugegeben und 20 U Restriktionsenzym dazupipettiert. Dieser Restriktionsansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert und in einem 0,5% TBE-Agarosegel 12-16 h bei 80 V aufgetrennt. In die TBE-Agarosegele wurde das Ethidiumbromid (10 µg/ml) direkt zugegeben. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Geldokumentationssystems (Alpha Innotech Corporation).

3.3.9 Sequenzierung der DNA

Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma MWG Biotech AG durchgeführt. Dazu wurden pro Sequenzierung 1 µg Plasmid-DNA und 10 pmol/µl Primer an MWG versandt. Für die Sequenzierung von BAC-DNA wurden 2 µg an die Firma Sequiserve GmbH mit den entsprechenden Primern versandt.

3.3.10 Southern Blot Analyse

Die DNA-Hybridisierungs sonden für den Southern-Blot wurden mittels des PCR *DIG Probe Synthesis* Kit (Roche) nach Herstellerangaben in einer PCR Reaktion mit Digoxigenin (DIG)-gekoppelten Desoxynukleotiden markiert. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran sowie die Detektion der hybridisierten Sonden wurde ebenfalls nach den Vorgaben im *DIG Application Manual for Filter Hybridization* (2003; Roche) ausgeführt.

Die Virus-DNA wurde mittels des Restriktionsenzym HindIII gespalten (siehe 3.3.8) und gelelektrophoretisch in einem 0,5% TBE-Agarosegel für 14 h bei 80 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung der DNA wurde das Gel 30 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl geschwenkt und anschließend durch eine 30 minütige Behandlung mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert, gefolgt von einer 30 minütigen Neutralisierung in 0,5 M Tris- HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl. Anschließend erfolgte für 14 h der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran mittels Kapillartransfer mit 20 x SSC Puffer. Nach dem Transfer wurde die DNA zunächst 30 Minuten im Wasserbad bei 42°C in der Prähybridisierungslösung prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit 5 µl der denaturierten DIG-markierten DNA-Sonden in 10 ml Prähybridisierungslösung für 6 h bei 42°C. Die Membran wurde danach zunächst zweimal mit *Low Stringency* Puffer und anschließend zweimal mit auf 65°C vorgewärmtem *High Stringency* Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran getrocknet und bei 4 °C gelagert. Die Hybride der Ziel-DNA mit den DIG-markierten Sonden wurden durch Anti-DIG-Antikörper detektiert. Dazu wurde die Membran für 2 min in Waschpuffer gewaschen und dann 30 min in 1 x Blocking Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten mit 10 ml des anti-DIG- Antikörpers (1:3000 verdünnt in 1 x Blocking Puffer) inkubiert, gefolgt von zwei Waschschr itten mit 1 x Waschpuffer. Die alkalische Phosphatase wurde dann durch die Farbreaktion mit Nitroblau Tetrazolium Salz (NTB) und 5´Bromo-4-Chlor-Indolyl-3- Phosphat (BCIP) detektiert. Dazu wurde die Membran mit TSM Puffer equilibriert und dann mit 165 ng/ml BCIP, 305 ng/ml NBT in TSM im Dunklen gefärbt. Die Farbreaktion wurde zuletzt durch Waschen mit H₂O gestoppt und dokumentiert.

3.4 Klonierung rekombinanter DNA

3.4.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem UltraClean™15 DNA *Purification* Kit (MOBIO Laboratories, „Glasmilch-Kit“) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die gesuchte Bande wurde dazu mit einem Skalpell zügig, unter UV-Licht, aus dem Gel ausgeschnitten und dann mit Hilfe des Kits aufgereinigt.

3.4.2 Dephosphorylierung

Bei der Spaltung eines Vektors durch eine Restriktionsnuklease entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Um diese Religation des Vektors weitgehend zu verhindern wurden die 5'-Enden der linearen DNA dephosphoryliert. Dazu wurde 1 U CIP (*calf intestine phosphatase*) nach der Spaltung des Vektors zu dem Reaktionsansatz gegeben und dieser 1 h bei 56°C inkubiert. Um das Enzym wieder aus dem Ansatz zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz entweder mit dem PCR *Purification* Kit gereinigt oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe der Glasmilch (3.4.1) aus dem Agarosegel aufgereinigt.

3.4.3 Ligation

Für die Insertion eines DNA-Fragments (Insert) in einen Vektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Für den Ligationsansatz (30 µl) wurde dreimal mehr Insert- als Vektor-DNA eingesetzt und mit 0,5 U Ligase und 3 µl 10 x Ligasepuffer 1 h bei Raumtemperatur oder 16 h bei 16°C inkubiert.

3.5 Transformation von Bakterien

3.5.1 Präparation elektrokompeter DH10B Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden 2,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur in 400 ml LB Medium überimpft und weitere 3-4 h bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien 15 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 7.000 x g bei 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst mit 5 ml kaltem, autoklaviertem Wasser resuspendiert und dann mit 400 ml kaltem Wasser aufgefüllt und erneut mit 7.000 x g bei 4°C für 10 min pelletiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Nach der erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml kaltem 10% Glycerin resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen

überführt und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Pellet in einem Pelletvolumen 10% Glycerin aufgenommen. Diese Bakterien-suspension wurde zu 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.5.2 Präparation rekombinations- und elektrokompetenter DY380 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden 2,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur in 100 ml LB Medium überimpft und bei 32°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die im bakteriellen Genom integrierten Rekombinationsgene durch eine 15 minütige Schüttelinkubation bei 42°C im Wasserbad aktiviert. Nach der Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension für 15 min direkt auf Eis gestellt. Die weitere Präparation elektrokompetenter Bakterien erfolgte entsprechend dem Protokoll 3.5.1.

3.5.3 Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Ein 50 µl Aliquot der elektrokompetenten Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA (2-5 ng) wurde zu den Bakterien pipettiert, gemischt und in eine vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte umgehend bei 2500 V und 25 µF. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 500 µl LB aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zur Selektion auf den LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und je nach Plasmid bei 30°C, 32°C, 37°C oder 43°C für 14-18 h inkubiert.

3.6 BAC- Mutagenese

3.6.1 Red/ET-Mutagenese

Die Manipulation von BACs erfolgte unter Nutzung der Rekombinationsenzyme red α , β , γ des Bakteriophagen λ durch homologe Rekombination (Zhang *et al.*, 1998). Diese so genannte ET-Mutagenese, ursprünglich benannt nach den Rekombinasefunktionen RecE und RecT, ist eine effektive Methode zur Herstellung von Mutanten. So können unabhängig von Restriktionsschnittstellen und der Größe der DNA, Insertionen, Deletionen oder auch Substitutionen ins Genom eingeführt werden. Der genaue Mechanismus der Rekombination ist allerdings weitgehend ungeklärt, bislang existieren nur Modellvorstellungen (Muyrers *et al.*, 2000). Red α ist eine 5'-3'-Exonuklease, die die Nukleotide abspaltet und so 3'-Einzelstrangregionen freilegt. Diese großen 3'-Einzelstrangüberhänge werden von dem red

β Einzelstrangbindeprotein gebunden und können dann mit der komplementären Einzelstrang-DNA, die in der DNA-Replikationsgabel exponiert ist, verbunden werden. Red γ verhindert die Degradation der linearen DNA durch bakterielle Nukleasen wie RecBCD (Abb. 6).

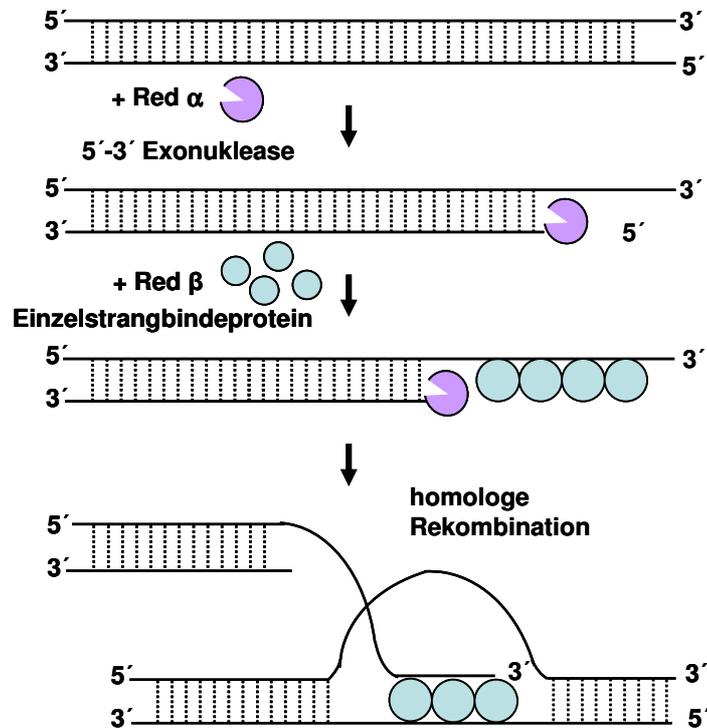


Abb. 6: ET-Mutagenese. Die ET-Mutagenese beruht auf der Anwendung der λ -Phagenproteine Red α , β , und γ . Red α ist eine 5'-3' Exonuklease die 3'-Einzelstrangregionen freilegt, die dann von dem Red β Proteinbindeprotein gebunden werden. Die Interaktion von Red α und β katalysiert die homologe Rekombination.

Die homologe Rekombination eines linearen DNA-Fragments, das für einen Selektionsmarker kodiert und durch homologe Sequenzen zur Zielsequenz im BAC Genom flankiert ist, benötigt die Rekombinationsproteine des Bakteriophagen λ (Abb. 7). Diese können entweder über das Plasmid pKD46 (Datsenko & Wanner, 2000) kodiert oder direkt im Genom der DY380 Bakterien als Prophage integriert (Lee *et al.*, 2001), vorliegen. Das pKD46 Plasmid besitzt einen temperatursensitiven Replikationsursprung (oriR101) und exprimiert die Rekombinationsproteine Red α , β , γ unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotors P_{BAD} . Die Rekombinationsproteine der DY380 Bakterien werden durch Hitzeschock bei 42°C induziert. Die homologen Sequenzen die zur Rekombination benötigt werden, sind sehr kurz (25-50 bp). Diese, zur Zielregion des HSV-1 BAC Genoms homologen Sequenzen (H1 und H2, Abb. 7 A), wurden an das 5'-Ende von Primern

angehängt. Die 3'-Bereiche der Primer wiesen eine Homologie zum als Template für die PCR genutzten Plasmid auf (Abb. 7 B). Das Plasmid pGP704-Kan (Abb. 7 B1) kodiert für ein Kanamycin-Resistenzgen, das durch zwei Flp-Rekombinase Erkennungsstellen (*Flp recombinase recognition target sites*, FRT) flankiert ist. Das Plasmid pIC1-Tet (Abb. 7 B2) kodiert ein mit Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase (loxP-Stellen)-flankiertes Tetracyclin-Resistenzgen. In der PCR-Reaktion wurde jeweils ein lineares DNA-Fragment (Abb. 7 C) hergestellt, das zur Rekombination in *E. coli* Bakterien genutzt wurde, die den HSV-1 BAC tragen und die Rekombinationsenzyme Red α , β , γ exprimieren (Abb. 7 D). Die Rekombinationsenzyme ermöglichten die Rekombination über die zum HSV-1 Genom homologen Bereiche H1 und H2, wodurch die Zielsequenz durch die Insertion des Resistenzgens ersetzt wurde. Folglich tragen diese rekombinanten Bakterien die neu eingebrachte Antibiotikumresistenz und können darüber selektiert werden (Abb. 7 E). Um das zwischen den FRT-Stellen liegende Kanamycin-Resistenzgen zu entfernen, wurde das Plasmid pCP20, welches die FLP-Rekombinase kodiert, in die Bakterien elektroporiert. Die Expression der FLP-Rekombinase (Cherepanov & Wackernagel, 1995) führte zur Rekombination zwischen den FRT-Stellen, wodurch das Kanamycin-Resistenzgen, unter Verbleib einer FRT-Stelle im Genom entfernt wurde (Abb. 7 F1). Für die Deletion des loxP-Stellen flankierten Tetracyclin-Resistenzgens wurde das Plasmid pMCre, in die Bakterien elektroporiert. Das Plasmid pMCre kodiert für die Cre-Rekombinase, wodurch das Tetracyclin-Resistenzgen unter Verbleib einer loxP-Stelle aus dem Genom ausgeschnitten wurde (Abb. 7 F2).

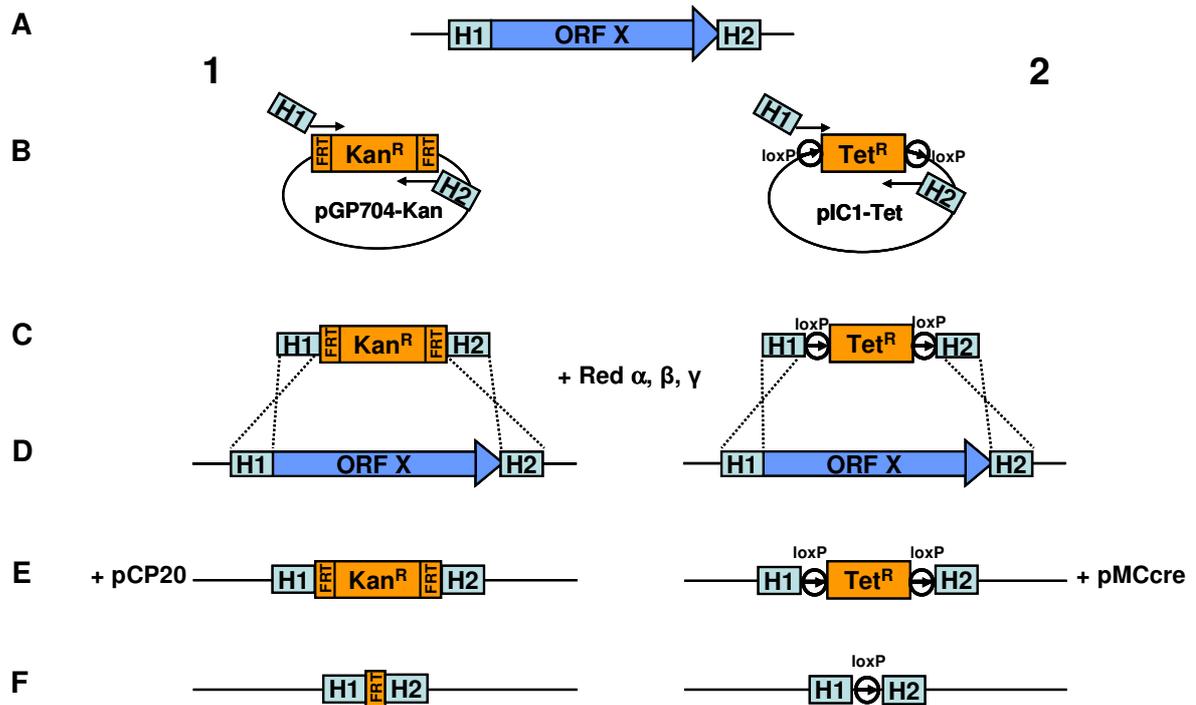


Abb. 7: Schema der Insertion eines Selektionsmarkers zur Deletion eines ORF X. Diese zur Zielregion homologen Sequenzen (H1 und H2, A) wurden an das 5'-Ende von Primern angehängt, die 3'-Bereiche der Primer wiesen eine Homologie zum Template Plasmid auf (B). Das in der PCR hergestellte lineare DNA-Fragment (C) wurde in *E. coli* Bakterien elektroporiert, die den HSV-1 BAC trugen und die Rekombinationsenzyme Red α , β , γ exprimieren (D). In diesen Bakterien fand die homologe Rekombination über die Bereiche H1 und H2 statt, wodurch die Zielsequenz durch Insertion des Resistenzgens ersetzt wurde. Positive rekombinante Bakterien wurden über die neu eingebrachte Antibiotikaresistenz selektiert (E). Expression der Flp-Rekombinase (kodierte durch Plasmid pCP20) oder Cre-Rekombinase (kodierte durch Plasmid pMCcre) führte zur Deletion der Selektionsmarker unter Verbleib einer FRT- oder loxP-Stelle im Genom.

3.6.2 Herstellung der Deletionsmutanten durch Insertion des FRT-flankierten Kanamycin-Resistenzgens

Mit Hilfe der beschriebenen ET-Mutagenese wurden die Apoptose-Inhibitor-Gen Deletionsmutanten sowie die Prototyp G207 Mutante hergestellt. Im Anhang wurden die zur Herstellung der Mutanten verwendeten Primer (8.1) aufgelistet und die deletierten Sequenzen (8.3) angegeben. Elektrokompente DH10B *E. coli* Bakterien, die den pHSV-1(17⁺)Lox-luc BAC tragen, wurden mit dem pKD46 Plasmid (temperatursensitiver Replikationsursprung, kodiert Red α , β , γ , Amp^R) transformiert (siehe 3.5.3). Nach der Elektroporation wurden die Bakterien 1 h bei 30°C inkubiert und anschließend auf LB-Agarplatten mit 17 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol und 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausplattiert und für 18 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine positive Kolonie in 5 ml LB-Medium Vorkultur

überimpft und erneut für 18 h bei 30 °C inkubiert. 2 ml dieser Vorkultur wurden in 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika überimpft und 3 h bei 30 °C inkubiert. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Rekombinationsenzyme Red α , β , γ durch die Zugabe von L-Arabinose in einer finalen Konzentration von 0,1% (w/v) induziert. Nach der Zugabe der L-Arabinose wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 bei 30 °C weiter inkubiert. Anschließend erfolgte erneut die Präparation elektrokompeter Bakterien (siehe 3.5.1). In diese Bakterien wurde das PCR-Fragment (FRT-flankiertes Kanamycin-Resistenzgen mit beidseitig homologen Regionen zur Ziel-DNA) elektroporiert (siehe 3.5.3). Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin ausplattiert und für 14 h bei 43 °C inkubiert, welches den Verlust von dem Plasmid pKD46 zur Folge hatte. Von positiven Klonen der Selektionsplatte wurde BAC-DNA isoliert und mittels Restriktionsspaltung auf erfolgreiche Rekombination überprüft.

3.6.3 Deletion des FRT-flankierten Kanamycin-Resistenzgenes

Bakterien, in die das FRT-flankierte Kanamycin-Resistenzgen erfolgreich rekombiniert wurde, wurden in LB-Medium mit Chloramphenicol und Kanamycin bei 37 °C für 18 h kultiviert. Anschließend folgte die Präparation elektrokompeter Bakterien (siehe 3.5.1). Unter Verwendung des Plasmids pCP20 (temperatursensitiver Replikationsursprung, kodiert Flp-Rekombinase, Amp^R) konnte das in die BAC-DNA inserierte FRT-flankierte Kanamycin-Resistenzgen wieder entfernt werden. Die Flp-Rekombinase rekombinierte die FRT-Stellen und entfernte so die Sequenz zwischen den FRT-Stellen, wodurch die Kanamycin-Resistenz, unter Verbleib einer FRT-Stelle, aus dem Genom ausgeschnitten wurde. 2-5 ng dieses Plasmids wurden in die kompetenten Bakterien elektroporiert, 1 h bei 30 °C inkubiert, anschließend auf Chloramphenicol- und Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und für 18 h bei 30 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden 5-10 Kolonien auf chloramphenicolhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und erneut für 14 h bei 43 °C inkubiert, um das temperatursensitive pCP20 Plasmid zu entfernen. Positive Klone wurden anschließend auf Chloramphenicol-haltige LB-Agarplatten und parallel auf Chloramphenicol- und Kanamycin-haltige LB-Agarplatten übertragen, um auf den Verlust der Resistenz zu testen. Die DNA der positiven Klone wurde isoliert und mittels Restriktionsspaltung auf die Deletion der Kanamycin-Resistenz-Kassette überprüft.

3.6.4 Primerdesign

Die Primer für das zu transformierende PCR-Fragment setzten sich aus zwei Bereichen zusammen, einer Homologie am 5'-Ende, deren Sequenz der Ziel-DNA entsprach und einer

Homologie am 3'-Ende, die für die Bindung an den Selektionsmarker notwendig war. Die optimale Länge der Homologie zur Ziel-DNA betrug zwischen 30-60 bp, die der 3'-Region zwischen 18 und 30 bp. Damit ergab sich eine Länge von ca. 70 bp für die Primer.

3.7 Biochemische Techniken

3.7.1 Zellyse eukaryotischer Zellen

Zur Zellyse wurde zunächst das Medium von den Zellen (5×10^5) entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l TBST-Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellspatel vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 10 min auf Eis inkubiert und kurz gemischt. Die Zelltrümmer wurden mit $32.000 \times g$ bei 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt.

3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Zellysate wurde mittels Bradford Reagenz bestimmt. 5 μ l des Zellysates wurden mit 500 μ l Bradford Reagenz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben im Photometer gemessen und über eine Eichkurve der Proteingehalt bestimmt.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese wurde genutzt, um Proteine entsprechend ihrer molaren Masse aufzutrennen. SDS-Gele bestehen aus einem oberen Sammel- und einem unterem Trenngel. Für die Auftrennung wurden 8%ige Trenngele aus folgenden Komponenten hergestellt:

2,65 ml H₂O
1 ml 40% Bis-Acrylamid
1,25 ml 1,5 M Tris pH 8,8
50 μ l 10% SDS
50 μ l 10% APS
3 μ l TEMED

Nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und ein 5 %iges Sammelgel folgendermaßen hergestellt:

733 μl H₂O
133 μl 40% Bis-Acrylamid
126 μl 1,5 M Tris pH 8,8
10 μl 10% SDS
10 μl 10% APS
1 μl TEMED

Das Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Je 20 μl Zelllysate wurden mit 20 μl 2 x Proteinladepuffer gemischt, 5 min bei 99°C inkubiert, kurz zentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Als Größenvergleich wurde jeweils der Rainbow-Marker mitgeführt. Nach dem Beladen der Gele wurden die Proteine im Sammelgel bei 50 V aufgetrennt. Im Trenngel erfolgte die Auftrennung bei 120 V, bis der Farbmarker den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.7.4 Proteintransfer und Immunoblot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels des Trans-Blot® *SD-Semi-Dry Blotters*. Ein Filterpapier und eine Nitrocellulose-Membran in der Größe des Trenngels wurden in Roti-Blot Puffer A getränkt, ein Filterpapier in Roti-Blot Puffer B. Auf der Blotapparatur wurde der Blot wie folgt zusammengebaut: zunächst das Anoden-Filterpapier, dann die Nitrocellulose-Membran, das Trenngel und abschließend das Kathoden-Filterpapier. Die Proteine wurden für 30 min bei 17 V auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT mit 5% Milch/PBS-T blockiert. Zur Antikörpermarkierung wurde die Membran zunächst für 14-18 h bei 4°C mit der primären Antikörperverdünnung (α -PARP 1:1000, α -Actin 1:2000, α -Tk 1:500) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und 45 min mit der sekundären Antikörperverdünnung (α -Maus HRP 1:1000, α -Kaninchen HRP 1:1000, α -Ziege HRP 1:1000) inkubiert. Zuletzt wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und mit ECL-Färbesubstrat nach Herstellerangaben inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe des LAS-3000 *Imager*.

3.7.5 Luciferase-Assay

Subkonfluente Vero-Zellen einer 12 Loch-Platte wurden mit einer MOI von 0,1 bzw. 10 mit dem HSV-1(17⁺)lox-luc Virus infiziert. Dazu wurde das Medium entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 μl Inokulum zu den Zellen gegeben und dann 1 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach der Inokulation wurde jeweils 1 ml Kultur-Medium pro Vertiefung zu den Zellen gegeben und die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die

Bestimmung der Luciferase-Expression erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 2, 4, 6, und 8 h) nach Infektion. Dazu wurde das Medium abgesaugt, 250 µl 1 x Lysepuffer (*passive lysis buffer*, PLB) auf die Zellen gegeben und bei RT für 15 min inkubiert. Das Zelllysate wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min mit 32.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C bis zur Messung der Luciferase-Aktivität gelagert. Für die Messung wurden 20 µl Zelllysate in ein Röhrchen überführt und 100 µl Luciferase Reagenz zugegeben. Die Bestimmung der Aktivität der Luciferase im Luminometer DIGENE DRG-1 erfolgte unmittelbar nach Zugabe des Luciferase Reagenz. Die resultierende Lichtemission wurde dabei mit dem Luminometer quantifiziert. Die Messung der relativen Lichtausbeute (*relative light units*, RLU) erfolgt über den gesamten Empfindlichkeitsbereich des Luminometers (390-520 nm) für einen Zeitraum von 10 s.

3.7.6 Apoptosebestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Bestimmung der Apoptoserate mit Hilfe der Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD (ANNEXIN V-FITC/7-AAD Kit, Beckman Coulter) wurden 5×10^5 Jurkat-Zellen pro 2 ml Medium in 6-Loch Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die subkonfluenten Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und anschließend 20 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit dem anti-CD95-Antikörper oder Etoposid 20 h p.i. für 4 h. Anschließend wurden die Zellen entsprechend dem Herstellerprotokoll gefärbt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen anschließend in 100 µl 1 x Bindungspuffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Färbung erfolgte mit 10 µl Annexin V-FITC und 20 µl 7-AAD. Nach der Zugabe der Farbstoffe wurden die Proben 15 min auf Eis dunkel inkubiert und danach mit 400 µl eiskaltem 1 x Bindungspuffer aufgefüllt. Die Messung der Apoptoserate erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers der Firma Beckman Coulter CYTOMICS FC 500.

4 Ergebnisse

Das Genom des HSV-1 Stamm 17⁺ war in Vorarbeit von Claus H. Nagel als künstliches bakterielles Chromosom (*bacterial artificial chromosom*, BAC) in *E. coli* kloniert und somit für die Mutagenese mit den Methoden der Bakteriengenetik zugänglich gemacht worden (Nagel *et al.*, 2007). Die Insertion der BAC-Vektor-Sequenzen erfolgte dabei in den Thymidinkinase (Tk)-Locus (UL23), wodurch dieser in zwei Fragmente geteilt wurde. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der ET-Mutagenese HSV-1 Stamm 17⁺ Reporterviren mit nahezu Wildtyp-Virus Eigenschaften konstruiert. Dazu wurde das zerstörte Thymidinkinase-Gen rekonstituiert und die bakteriellen Vektor-Sequenzen mit Erkennungsstellen (loxP-Stellen) für die Cre-Rekombinase flankiert, sowie das Cre-Rekombinase-Gen in den Vektor inseriert. Nach Transfektion dieses veränderten HSV-1 BAC-Genoms in permissive Zellen wurden die BAC-Vektor-Sequenzen, einschließlich des in den Vektor inserierten Cre-Rekombinase-Gens, aus dem Genom ausgeschnitten. Durch diese Deletion entstand ein Virus mit einem dem Wildtyp-Virus entsprechenden Genom. Um die Ausbreitung und Effektivität der onkolytischen Herpes Simplex-Viren *in vivo* im Mausmodell verfolgen zu können, wurde ein *firefly*-Luciferase Gen zwischen die viralen Gene UL55 und UL56 inseriert. Ausgehend von diesem Luciferase-BAC-Klon wurden onkolytische Herpes Simplex-Viren hergestellt, bei denen verschiedene Apoptose-Inhibitor-Gene deletiert wurden. Diese onkolytischen Viren wurden auf ihr Wachstumsverhalten in Gliom- und primären Zellen untersucht, sowie auf ihre Fähigkeit die Apoptose zu inhibieren.

4.1 Klonierung eines HSV-1 BAC-Klons mit Wildtyp-Virus-Eigenschaften

Für die Konstruktion von onkolytischen Herpesviren ist es wünschenswert, von einem vollständigen Genom auszugehen, da bei anderen Herpesviren beobachtet wurde, dass auch die Deletion von *in vitro* nicht essentiellen Genen zu einer Attenuierung der Virusrekombinanten *in vivo* führen kann (Wagner *et al.*, 1999). Das Thymidinkinase-Gen ist für die Replikation *in vitro* nicht essentiell, jedoch für die Replikation *in vivo*. Es vermittelt Sensitivität gegenüber antiviralen Wirkstoffen wie Acyclovir (ACV) und ist somit essentiell für die Behandlung von Infektionen. Aus Sicherheitserwägungen ist daher die Wiederherstellung der Thymidinkinase unerlässlich für den Einsatz der onkolytischen Herpesviren in der Tumorthherapie. Ebenso kann die Insertion der „BAC-Gene“ in Herpesviren zu deren Attenuierung führen, wie es für MCMV und PRV gezeigt wurde (Wagner *et al.*, 1999; Smith & Enquist, 2000). Daher wurde sowohl das Thymidinkinase-Gen rekonstituiert, als auch die BAC-Vektor-Sequenzen mit loxP-Stellen flankiert, so dass diese

nach der Transfektion in eukaryotische Zellen durch das in den Vektor inserierte Cre-Rekombinase-Gen ausgeschnitten werden können (Smith & Enquist, 2000).

Diese Wiederherstellung eines vollständigen HSV-1 Stamm 17⁺-Genoms erfolgte in mehreren Schritten durch Red-vermittelte homologe Rekombination in *E. coli* (Abb. 8). Im initialen Mutagenese-Schritt wurde in den HSV-1(17⁺)blue BAC-Klon ein mit loxP-Stellen flankiertes Tetracyclin-Resistenz-Gen (Tet^R, Abb. 8 A) inseriert. Dadurch wurde zum einen das vor der BAC-Vektor-Sequenz gelegene Thymidinkinase-Fragment entfernt, zum anderen wurde dadurch eine loxP-Stelle vor der BAC-Vektorsequenz eingefügt. Dieser rekombinante pHSV-1(17⁺)Tet-Klon (Abb. 8 B) wurde freundlicherweise von Mandy Glaß zur Verfügung gestellt. Die DNA des pHSV-1(17⁺)Tet-Klons wurde isoliert und in DY380 Bakterien, welche die Gene für die Rekombinationsenzyme im Genom beinhalten, elektroporiert. Im nächsten Mutagenese-Schritt wurde eine rpsLneo-Resistenz-Kassette in die DY380 Bakterien mit dem pHSV-1(17⁺)Tet elektroporiert. Durch die Insertion der rpsLneo-Resistenz-Kassette wurde das *lacZ*-Gen sowie die hinter der BAC-Sequenz gelegene loxP-Stelle ersetzt. Für weitere Mutagenese-Schritte wurde aus diesem pHSV-1(17⁺)Tet-rpsLneo (Abb. 8 C) die zuvor eingefügte Tet-Resistenz wieder entfernt. Durch die Expression der Cre-Rekombinase (kodiert durch das Plasmid pMCre) erfolgte die Rekombination der loxP-Stellen, wodurch die dazwischen liegende Tet-Resistenz unter Verbleib einer loxP-Stelle aus dem Genom ausgeschnitten wurde. Der resultierende pHSV-1(17⁺)rpsLneo (Abb. 8 D) beinhaltete nach der Cre-spezifischen Rekombination eine vor der BAC-Vektor-Sequenz lokalisierte loxP-Stelle. Im nächsten Mutagenese-Schritt wurde in DH10B Bakterien mit dem pHSV-1(17⁺)rpsL-neo ein 6840 bp lineares Fragment, bestehend aus einem Cre-Rekombinase-Gen, einer mit FRT-Stellen flankierte Tetracyclin-Resistenz, dem Thymidinkinase-Gen sowie einer 655 bp Homologie zur BAC-Sequenz elektroporiert. Die Rekombination erfolgte über die Homologien zur BAC-Vektor-Sequenz und dem noch im Genom verbliebenen Thymidinkinase-Fragment in den pHSV-1(17⁺)rpsL-neo. In dem resultierenden pHSV-1(17⁺)Tet-Tk (Abb. 8 E) war die BAC-Vektorsequenz mit loxP-Stellen flankiert und ein vollständiges Thymidinkinase-Gen an die ursprüngliche Stelle im Genom neu eingeführt. Das zusätzliche, mit FRT-Stellen flankierte, Tet-Resistenz-Gen wurde im nächsten Schritt mittels der Flp-Rekombinase (kodiert durch das Plasmid pCP20) wieder entfernt. Der resultierende pHSV-1(17⁺)lox (Abb. 8 F) repräsentiert den vollständigen HSV-1(17⁺) BAC-Klon und diente als Basis für die Herstellung von Luciferase-exprimierenden onkolytischen Viren.

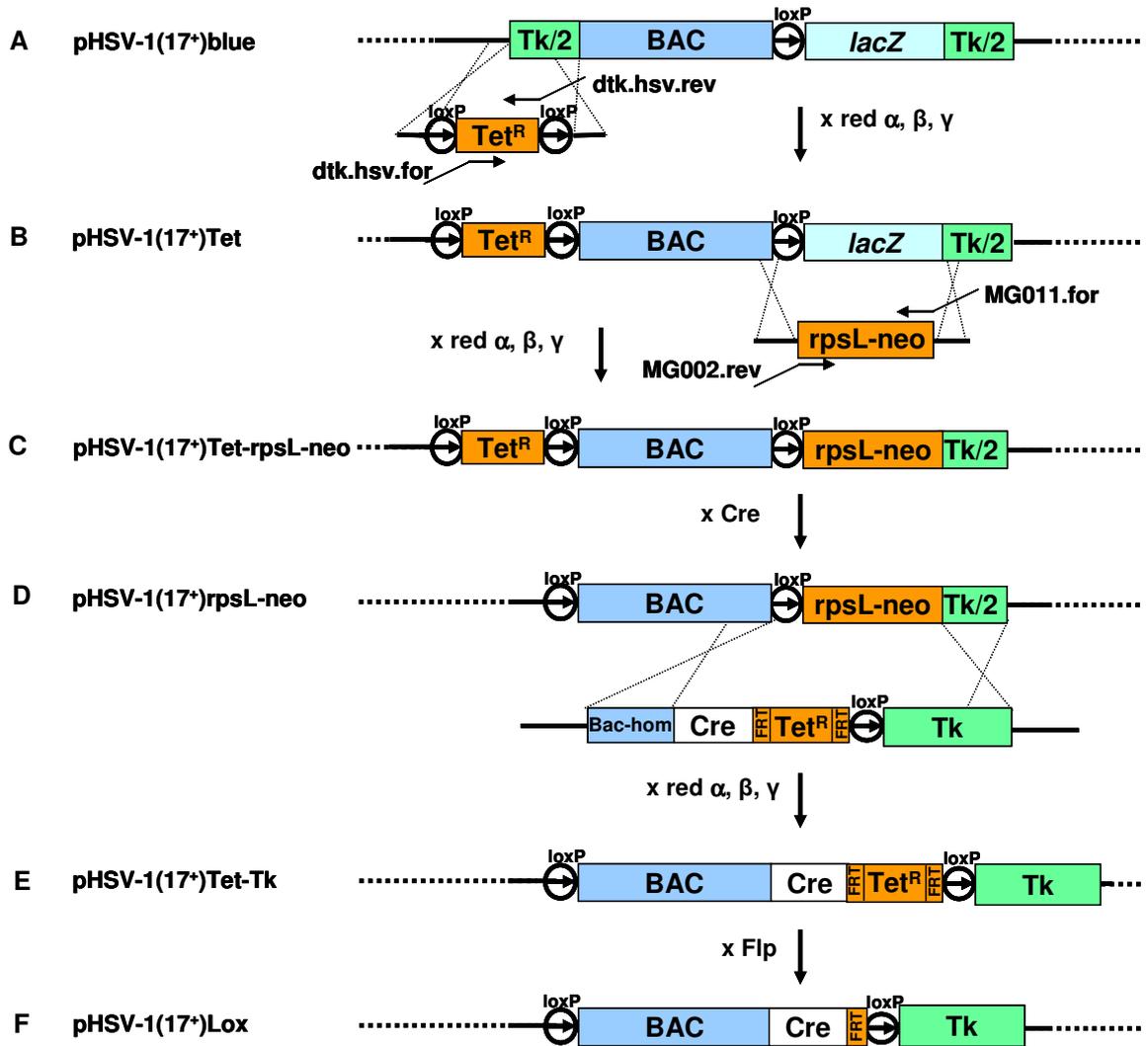


Abb. 8: Flankierung der bakteriellen Vektorsequenzen mit Erkennungsstellen (*loxP*-Stellen) für die Cre-Rekombinase und schrittweise Reinsrierung des Thymidinkinase-Gens mittels Red-vermittelter Rekombination in *E. coli*.

Die Wiederherstellung eines vollständigen HSV-1 Stamm17⁺-Genoms, ausgehend vom pHSV-1(17⁺)blue BAC (A), erfolgte sukzessiv entsprechend den dargestellten Schritten durch Red-vermittelte homologe Rekombination in *E. coli*.

Die einzelnen Elemente sind folgendermaßen markiert: BAC (blau), BAC-Vektor-Sequenzen; Cre (weiß), Cre-Rekombinase-Gen; *lacZ* (hell blau), *E.coli lacZ*-Gen; *loxP* (⊕), Erkennungsstelle für Cre-Rekombinase; *rpsL-neo* (orange), *rpsL*-Neo-Resistenz-Kassette; *Tet^R* (orange), Tetracyclin-Resistenz-Gen; *Tk/2* (grün), Fragment des Thymidinkinase-Gens; *Tk* (grün), komplettes Thymidinkinase-Gen; *FRT* (orange), Erkennungsstelle für Flp-Rekombinase; Flp, Flp-Rekombinase kodiert durch das Plasmid pCP20;

4.1.1 Charakterisierung der Genomstruktur der rekombinanten BAC-Klone

Die BAC-Klone wurde nach jedem Mutagenese-Schritt durch Restriktionsanalyse auf die erwarteten Veränderung durch die Rekombination überprüft und dadurch unerwünschte Rekombinationsereignisse, z.B. zwischen Sequenzwiederholungen im Virusgenom, ausgeschlossen. Dazu wurde die DNA der jeweiligen BAC-Klone isoliert und mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten (Abb. 9, Abb. 10) und die Restriktionsmuster mit den vorhergesagten Fragmenten verglichen. Bei der Restriktionsspaltung mit BglIII verschwand durch die Insertion der Tet-Resistenz-Kassette das 7,8 kb BglIII Fragment im BAC pHSV-1(17⁺)Tet (Abb. 9, B) im Vergleich zum parentalen BAC pHSV-1(17⁺)blue (Abb. 9, A) und ein neues 5,1 kb Fragment entstand. Die Spaltung mit MfeI führte zu zwei neuen Fragmenten (3,6 und 4,5 kb, Abb. 10, B), durch eine neu mit der Tet^R-Kassette eingebrachte MfeI-Schnittstelle. Die ursprüngliche 5,5 kb Bande des pHSV-1(17⁺)blue (Abb. 10, A) verschwand im BAC pHSV-1(17⁺)Tet (Abb. 10, B). Die Deletion des *lacZ*-Gens durch die Insertion der *rpsL*-neo-Kassette verkleinerte ein 6,5 kb BglIII-Fragment des pHSV-1(17⁺)Tet (Abb. 9, B) auf 3,6 kb im pHSV-1(17⁺)Tet-*rpsL*-neo (Abb. 9, C). Die MfeI-Spaltung des pHSV-1(17⁺)Tet-*rpsL*-neo zeigte den Verlust des 8,0 kb Fragments (Abb. 10, C) im Vergleich zum pHSV-1(17⁺)Tet. Die im *lacZ*-Gen lokalisierte MfeI-Schnittstelle wurde durch die Insertion der *rpsL*-neo-Resistenz-Kassette deletiert, wodurch im pHSV-1(17⁺)Tet-*rpsL*-neo ein 49,9 kb Fragment entstand. Die anschließende Deletion des zuvor eingefügten, von loxP-Stellen flankierten Tet-Resistenz-Gens durch die Cre-Rekombinase, führte durch den Verlust der internen BglIII-Schnittstelle zu der Vergrößerung des 5,1 kb BglIII-Fragments des pHSV-1(17⁺)Tet-*rpsL*-neo (Abb. 9, C) auf 7,7 kb im pHSV-1(17⁺)*rpsL*-neo (Abb. 9, D). Im MfeI-Restriktionsmuster zeigte sich eine neue 5,4 kb Bande durch die Deletion des Tet-Resistenz-Gens (Abb. 10, D). Die Rekombination des linearen DNA-Fragments, das für die Cre-Rekombinase, die FRT-flankierte Tet-Resistenz und die vollständige Thymidinkinase kodiert, resultierte in zwei neuen Banden in der BglIII-Spaltung (2,9 und 4,9 kb, Abb. 9, E), das MfeI-Restriktionsmuster zeigte eine neue Bande bei 6,6 kb (Abb. 10, E), verglichen mit dem pHSV-1(17⁺)*rpsL*-neo (Abb. 10, D). Die Entfernung der zur Selektion eingeführten FRT-flankierten Tet^R-Kassette aus dem pHSV-1(17⁺)Tet-Tk durch die Flp-Rekombinase, zeigte sich im BglIII-Restriktionsmuster durch das Auftreten einer neuen 2,4 kb Bande (Abb. 9, F), im MfeI-Restriktionsmuster verschwand die 6,6 kb Bande (Abb. 10, F), bezogen auf den parentalen pHSV-1(17⁺)Tet-Tk (Abb. 10, E). Durch die zwei unabhängigen Restriktionsanalysen konnte somit der Erfolg der einzelnen Mutagenese-Schritte bestätigt werden. Jedoch fehlten im MfeI-Restriktionsmuster aller Mutanten vier, nach der veröffentlichten Sequenz des HSV-1(17⁺)-Genoms berechneten Fragmente (15,0; 6,8; 5,6 und 5,3 kb). Eine Restriktionsanalyse mit BamHI und MfeI (Daten nicht gezeigt) ergab, dass zwei MfeI-Schnittstellen, die im internen *Repeat* bzw. terminalen

Repeat lokalisiert sein sollten, bereits im parentalen BAC HSV-1(17⁺)blue nicht vorhanden sind und deshalb diese Fragmente fehlten.

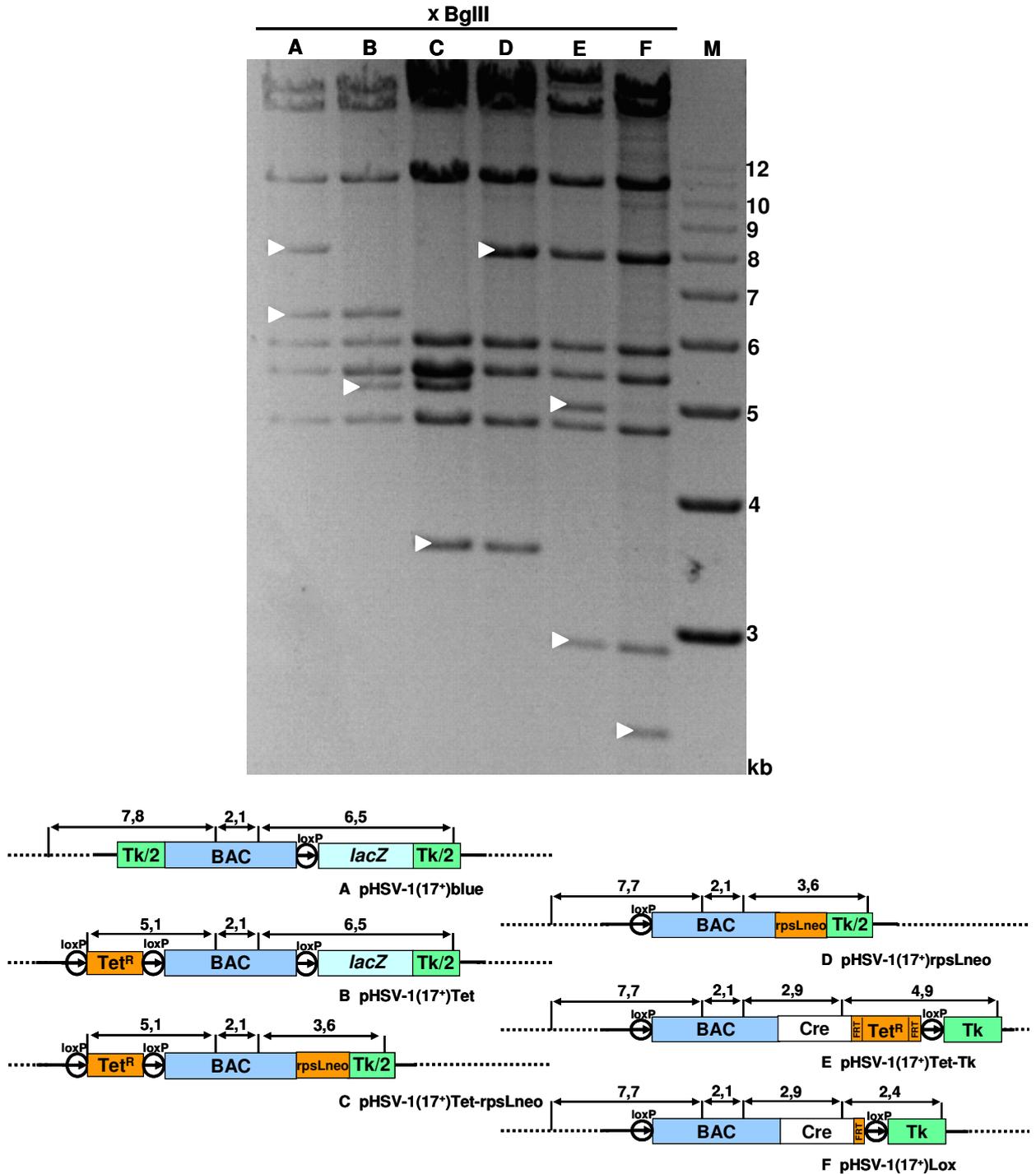


Abb. 9: Restriktionsanalyse isolierter BAC-DNA mit BgIII.

BAC-DNA von pHSV-1(17⁺)blue (A), pHSV-1(17⁺)Tet (B), pHSV-1(17⁺)Tet-rpsL-neo (C), pHSV-1(17⁺)rpsL-neo (D), pHSV-1(17⁺)lox-Tet (E) sowie pHSV-1(17⁺)lox (F) wurde isoliert, mit der Restriktionsendonuklease BgIII gespalten und im 0,5%igen TBE-Agarosegel für 14 h aufgetrennt. Die veränderten Restriktionsmuster resultierten aus den Deletionen oder Insertionen in den unterschiedlichen BAC-Klonen und wurden durch weiße Dreiecke gekennzeichnet. Die erwartete Größe der Fragmente in kb ist im Schema angegeben.

4.2 Markierung des pHSV-1(17⁺)Lox Genoms mit einem Luciferase-Gen

Um die Ausbreitung und Effektivität der onkolytischen Viren *in vivo* durch nicht invasive Biolumineszenz-Messungen (*bioluminescence imaging*, BLI) im Mausmodell verfolgen zu können, wurde in den BAC pHSV-1(17⁺)Lox das Gen für die *firefly*-Luciferase eingebaut. Die Biolumineszenz-Messung beruht auf der biochemischen Reaktion des Enzyms Luciferase (Luc) mit dem Substrat D-Luciferin. In Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und Sauerstoff wird das Substrat D-Luciferin durch Oxydation in einen angeregten Zustand versetzt. Zur Emission von Licht kommt es beim Übergang des Oxyluciferins in den Grundzustand, wobei die Wellenlänge des biolumineszenten Lichts zwischen 400-700 nm liegt (McElroy & DeLuca, 1985). Bei der Verwendung der Biolumineszenz als nichtinvasives bildgebendes Verfahren nutzt man den Umstand, dass die Menge der emittierten Photonen proportional zur Expressionsrate des Reporterproteins Luciferase sind (Contag *et al.*, 1997; Contag *et al.*, 1998; Benaron *et al.*, 1997).

Für die Insertion des Luciferase-Gens wurde der intergenische Bereich zwischen den viralen Genen UL55 und UL56 gewählt, da diese offenen Leserahmen eine *tail-to-tail* Anordnung aufweisen. Dadurch war eine Beeinflussung der Expression beider Gene durch die Insertion wenig wahrscheinlich. Als Promoter wurde der starke Cytomegalovirus *Major Immediate-Early*-Promoter verwendet, um eine hohe Luciferase-Expression und somit eine hohe Nachweis-Empfindlichkeit für die onkolytischen Viren zu erreichen.

4.2.1 Insertion des *firefly*-Luciferase-Gens

Die Insertion des *firefly*-Luciferase-Gens erfolgte zusammen mit einem FRT-Stellen flankierten Kanamycin-Resistenzgen in einer Red-vermittelten Rekombination in *E. coli* (Abb. 11). Die zur homologen Rekombination genutzten Sequenzen lagen zwischen den offenen Leserahmen UL55 und UL56 (nt 126660-126769) des pHSV-1(17⁺)Lox. Mittels PCR wurde ein lineares PCR-Produkt bestehend aus dem Luciferase-Gen mit dem HCMV-MIEP-Promotor, einem FRT-flankierten Kanamycin-Resistenzgen und den flankierenden homologen Sequenzen amplifiziert und in DH10B Bakterien, die den HSV-1(17⁺)Lox BAC trugen, elektroporiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination wurde der Kanamycin-Selektionsmarker mit der Flp-Rekombinase, unter Verbleib einer FRT-Stelle im Genom, wieder ausgeschnitten. Die erfolgreiche Insertion der Luciferase-Kanamycin-Resistenz-Kassette und die anschließende Deletion des Selektionsmarkers wurden durch Restriktionsanalysen der BAC-DNA überprüft. Dieses BAC-klonierte HSV-1 Genom mit dem *firefly*-Luciferase-Gen diente als Ausgangskonstrukt für die Herstellung der onkolytischen

HSV-Vektoren, wodurch alle abgeleiteten HSV-Vektoren durch Biolumineszenz-Messungen *in vivo* zu verfolgen sind.

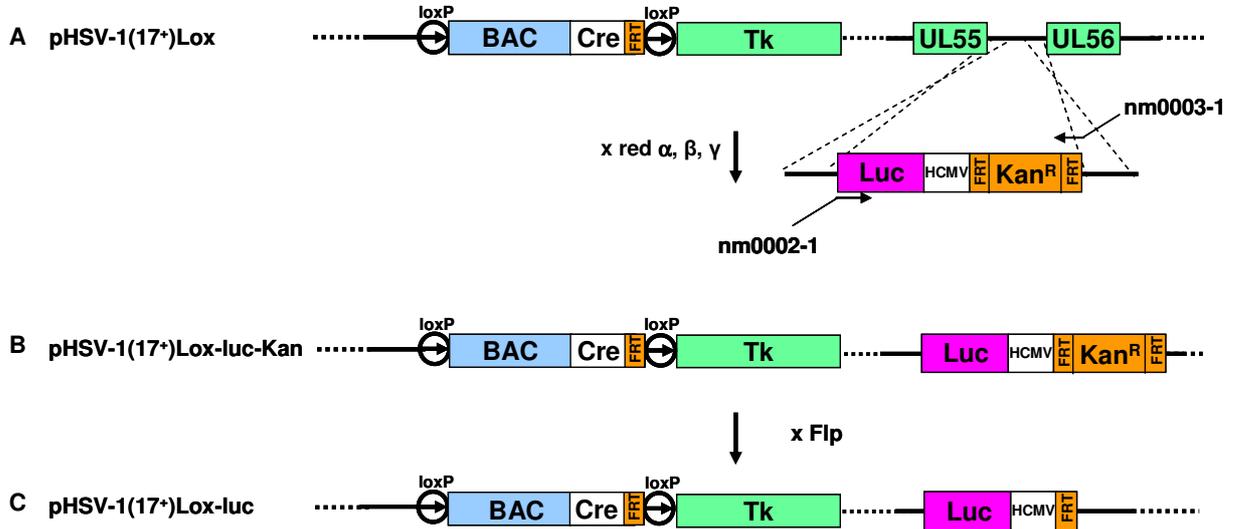


Abb. 11: Insertion des *firefly*-Luciferase-Gens.

(A) Ein PCR-Produkt bestehend aus Luciferase-Gen, HCMV-MIEP-Promotor, FRT-flankiertem Kanamycin-Resistenzgen und den flankierenden homologen Sequenzen wurde in kompetente DH10B Bakterien mit dem pHSV-1(17⁺)Lox elektroporiert. Positive Rekombinanten (pHSV-1(17⁺)Lox-luc-kan, (B) wurden über die Kanamycin-Resistenz selektioniert, welche anschließend durch Flp-Rekombinase-Expression, unter Verbleib einer FRT-Stellen, aus dem Genom wieder ausgeschnitten wurde (pHSV-1(17⁺)Lox, C).

4.2.2 Charakterisierung der Genomstruktur der BAC-Luciferase-Rekombinanten

Zur Charakterisierung der Luciferase-Klone wurde BAC-DNA isoliert, diese mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (EcoRV, MfeI, HpaI) gespalten und in einem 0,5% TBE-Agarosegel aufgetrennt (Abb. 12). Die Insertion der Luciferase-Kan^R-Kassette in den pHSV-1(17⁺)lox führte zu Veränderungen des Restriktionsmusters, die durch weiße Dreiecke in der Abb. 12 markiert wurden. In der EcoRV Spaltung verschob sich die 7,9 kb Bande des pHSV-1(17⁺)lox (A1) auf 11,6 kb (B1) in pHSV-1(17⁺)lox-luc-Kan, wobei die 7,8 kb Bande verschwand. Nach der Deletion der Kanamycin-Resistenz aus dem pHSV-1(17⁺)lox-luc-Kan verkleinerte sich die 11,6 kb Bande auf 10,6 kb (C1). Durch die Insertion der Luciferase-Kan^R-Kassette wurden zwei neue MfeI-Schnittstellen eingeführt, wodurch das 9,5 kb Fragment (A2) des pHSV-1(17⁺)lox in drei kleinere Fragmente gespalten wurde (4,1 kb, 456 bp und 8,6 kb, B2). Nach der Deletion der Kan^R-Kassette verkürzte sich das 8,6 kb

Fragment auf 7,6 kb (C2). Die Restriktionsendonuklease HpaI schnitt außerhalb des inserierten DNA-Fragments, weshalb eine 4,9 kb Bande in pHSV-1(17⁺)lox-luc-Kan (B3) entstand, die sich nach Deletion der Kanamycin-Resistenz-Kassette um etwa 1 kb auf 3,9 kb in pHSV-1(17⁺)lox-luc (C3) verkürzte. Die erwarteten Fragmente zeigten sich in jeder der drei unabhängigen Restriktionsanalysen, wodurch die erfolgreiche Insertion des Luciferase-Gens nachgewiesen wurde.

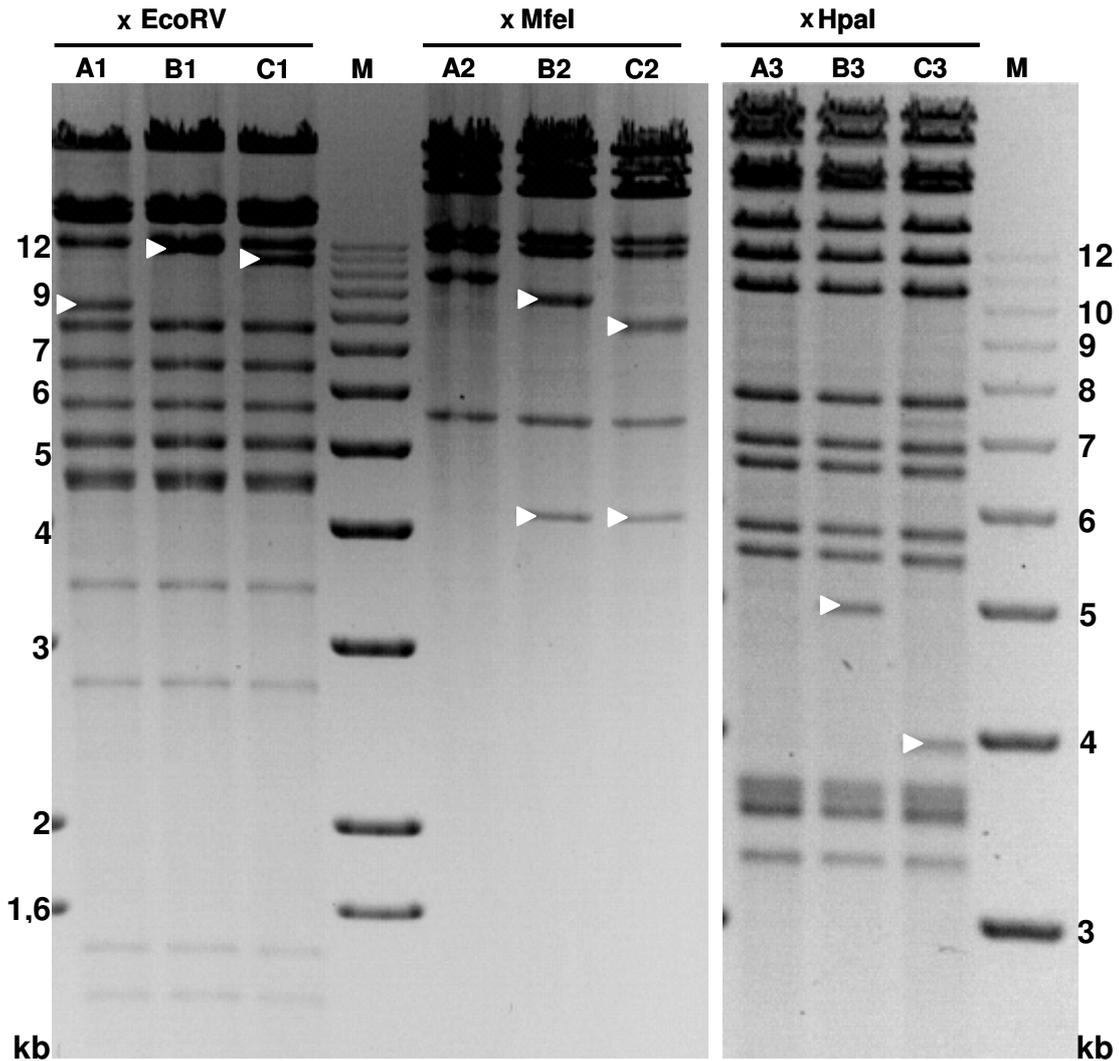


Abb. 12: Restriktionsanalyse der Luciferase-BAC Mutanten.

Die DNA der BAC-Mutanten pHSV-1(17⁺)Lox (A), pHSV-1(17⁺)Lox-luc-Kan (B) und p pHSV-1(17⁺)Lox-luc (C) wurde isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV, MfeI und HpaI gespalten und in einem 0,5% TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die erwarteten Veränderungen durch die Insertion des Luciferase-Gens und der anschließen Entfernung der Kanamycin^R-Kassette in den rekombinanten Genomen wurden durch weiße Dreiecke markiert.

4.2.3 Rekonstitution und Analyse der Luciferase-exprimierenden Viren

Im Allgemeinen kann die Mutagenese von Herpesviren, abhängig von der Größe der genomischen Deletion oder Insertion, zu deren Attenuierung führen (Miller *et al.*, 2003; McMenamin *et al.*, 1998). Um das Wachstumsverhalten des von dem BAC pHSV-1(17⁺)Lox-luc abgeleiteten Virus zu analysieren, wurde zunächst Virus rekonstituiert. Dazu wurde der pHSV-1(17⁺)Lox-luc in permissive Vero-Zellen transfiziert. Innerhalb von 1-2 Tagen entwickelten sich erste Plaques und spätestens nach weiteren 3 Tagen zeigten alle Zellen vollständigen cytopathischen Effekt. Das resultierende Virus HSV-1(17⁺)Lox-luc wurde bis zur Herstellung eines Virusstocks auf BHK-21 Zellen zweimal passagiert. Anschließend wurde das Virus über einen Nycodenz-Gradienten gereinigt und der Titer bestimmt. Nach der Transfektion des BAC pHSV-1(17⁺)lox-luc in permissive Vero-Zellen kam es zur Expression des, in den BAC-Vektor integrierten Cre-Rekombinase-Gens (Abb. 13, A). Der kodierende Bereich des Cre-Rekombinase-Gens ist durch ein Intron unterbrochen, weshalb in *E. coli* keine vorzeitige Expression erfolgte und der BAC-Vektor stabil blieb. Erst nach Transfektion in eukaryotische Zellen kommt es zur Expression der Cre-Rekombinase. Die Cre-vermittelte Rekombination der loxP-Stellen führte dann zur Eliminierung der durch loxP-Stellen flankierten BAC-Vektor-Sequenzen. Mit der Elimination des BAC-Vektors wurde auch das Cre-Gen selbst ausgeschnitten. Das resultierende Virus HSV-1(17⁺)Lox-luc beinhaltete, verglichen mit dem Wildtyp HSV-1(17⁺) Virus, einzig eine im Genom verbliebene loxP-Stelle und das zusätzliche Luciferase-Gen. Restriktionsanalysen der pHSV-1(17⁺)Lox-luc BAC-DNA und HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus-DNA mit EcoRI (Abb. 13, B) zeigten, dass die BAC-Vektorsequenz vollständig und effizient aus dem Genom ausgeschnitten wurde. Die BAC-Vektor spezifischen Fragmente (0,766; 1,9 und 6,9 kb) des pHSV-1(17⁺)Lox-luc verschwanden im HSV-1(17⁺)Lox-luc und ein neues 2,4 kb Fragment entstand. Da die Virus-DNA in den Virionen im Gegensatz zur zirkulären BAC-DNA linear ist, führte die Spaltung der Virus-DNA zusätzlich zu zwei terminalen Fragmenten von 12,6 und 5,6 kb (markiert durch ein t).

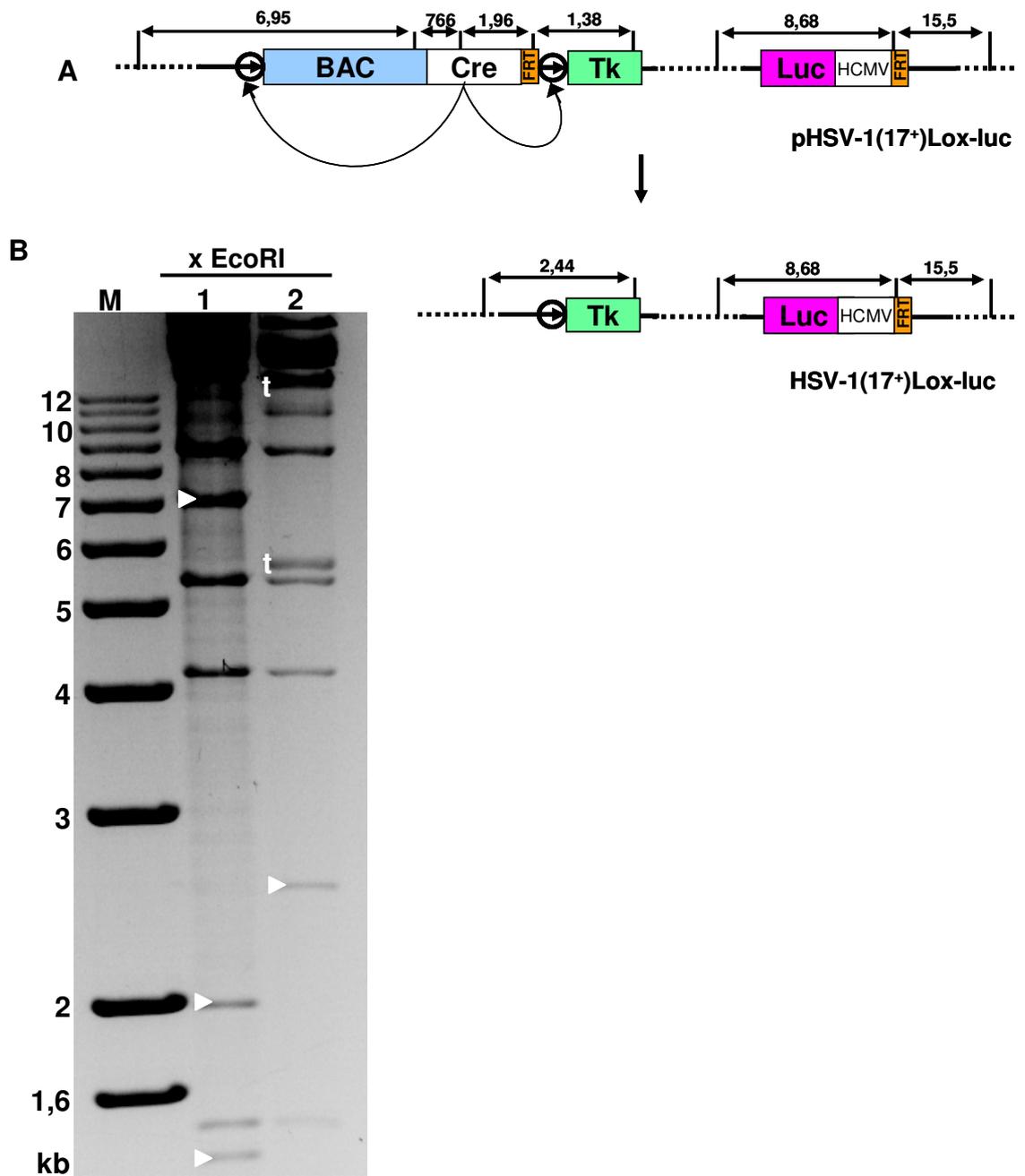


Abb. 13: Cre-vermittelte Exzision der BAC-Vektor-Sequenz nach Transfektion.

(A) Schematische Darstellung der Cre-Rekombinase vermittelten Exzision der BAC-Vektor-Sequenz aus dem pHSV-1(17⁺)Lox-luc nach Transfektion in permissive Vero-Zellen. Die EcoRI Restriktionsfragmente und deren erwartete Größe wurden in kb angegeben. (B) Restriktionsanalyse der pHSV-1(17⁺)Lox-luc BAC-DNA (1) und HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus-DNA (2) mit EcoRI. Die Veränderungen der Fragmente durch die Exzision des BAC-Vektors wurden durch weiße Dreiecke markiert. Die terminalen Fragmente der linearen Virus-DNA wurden durch zwei t markiert.

Um das Wachstumsverhalten des HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus mit dem des Wildtyp-Virus HSV-1(17⁺) zu vergleichen, wurde von beiden Viren eine Wachstumskinetik aufgenommen (Abb. 14). Dazu wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 0,05 oder 5 des jeweiligen Virus infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben vom Überstand entnommen und der Titer durch Plaque-Titration bestimmt. Die Wachstumskinetik des HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus war vergleichbar mit der des Wildtyp-Virus HSV-1(17⁺), sowohl bei einer MOI von 5 als auch bei einer MOI von 0,05. Die Insertion des Luciferase-Gens führte somit nicht zu Attenuierung des HSV-1(17⁺)Lox-luc in Vero-Zellen.

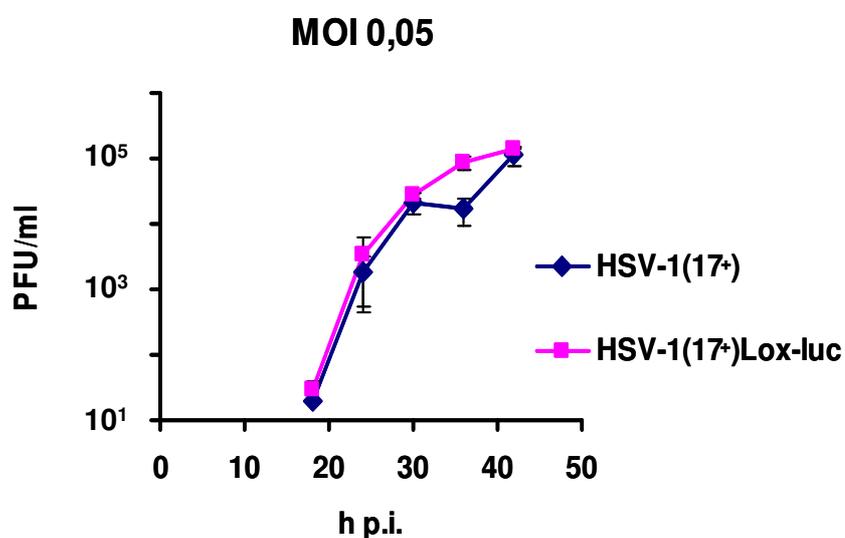
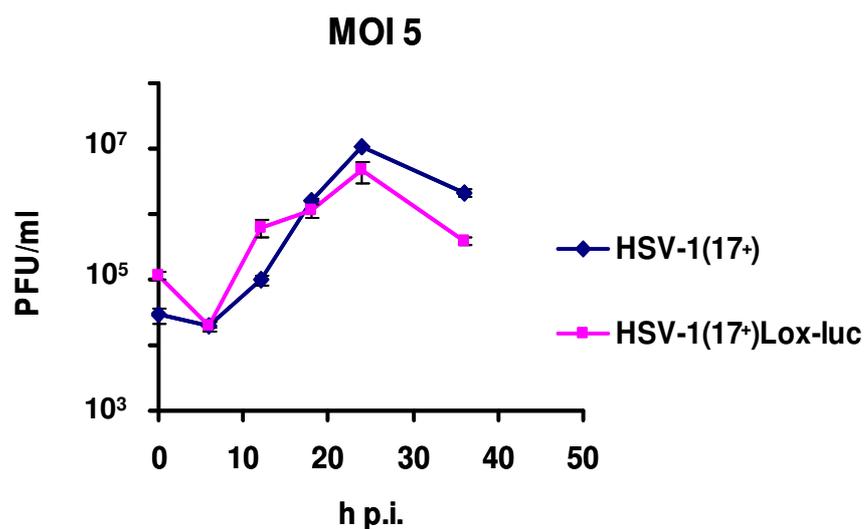
A**B**

Abb. 14: Wachstumskurven von HSV-1(17⁺) und HSV-1(17⁺)lox-luc.

Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 0,05 (A) oder 5 (B) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.) wurden Proben vom Überstand entnommen und die Titer durch Plaque-Titration in Dreifachbestimmung bestimmt.

4.2.4 Suszeptibilität gegenüber Acyclovir

Zur Behandlung von HSV-Infektionen stehen eine Reihe von Präparaten zur Verfügung, die spezifisch die Virusreplikation hemmen. Das Nukleosidanalogen Acyclovir (ACV) wird als spezifisches Substrat von der viralen Thymidinkinase (Tk) erkannt und in ein Monophosphat umgewandelt, das anschließend von zellulären Kinasen zum Acyclovir-Triphosphat phosphoryliert wird. In dieser Form konkurrieren die Acyclovir-Triphosphat mit Desoxyguanosin-Triphosphate als Substrat für die virale DNA-Polymerase. Sie werden als synthetisches Nukleosid-Analogon in die wachsende DNA-Kette eingebaut und bewirken den Abbruch der DNA-Synthese durch Kettenabbruch. Nur ein geringer Anteil der Acyclovir-Triphosphat wird in die zelluläre DNA eingebaut, da diese ein wesentlich besseres Substrat für die virale Polymerase als für die zelluläre Polymerase darstellt.

Durch die Wiederherstellung des Thymidinkinase-Gens im BAC-Klon pHSV-1(17⁺)Lox-luc sollte das resultierende Virus HSV-1(17⁺)Lox-Luc wieder sensitiv gegenüber der Behandlung mit Acyclovir sein. Der phänotypische Nachweis der Suszeptibilität gegenüber Acyclovir erfolgte über einen Plaquereduktionstest (Abb. 15), wie er von Herrmann zum ersten Mal beschrieben wurde (Herrmann, 1961). Safrin et al. legten für den Plaquereduktionstest einen IC₅₀-Schwellenwert von 2 µg/ml ACV, da die IC₅₀-Werte der meisten Isolate von Patienten, die auf ACV nicht Ansprachen, darüber lagen (Safrin et al., 1994). Die ID₅₀ (50%ige inhibitorische Dosis) gibt diejenige Virostatikakonzentration, bei der sich die Zahl der Plaques um 50% reduziert. Dazu wurden subkonfluente Vero-Zellen mit den Thymidinkinase-positiven Viren HSV-1(17⁺)Lox-luc und Wildtyp HSV-1(17⁺) sowie mit dem Thymidinkinase-negativen Virus HSV-1(17⁺)blue infiziert. Die Behandlung der infizierten Vero-Zellen mit unterschiedlich hohen Virostatikakonzentrationen von 0,025 bis 2,5 µg/ml erfolgte ab 1 h p.i. Sowohl bei Zellen, die mit dem Wildtyp HSV-1 Stamm 17⁺ infiziert wurden, als auch bei HSV-1(17⁺)Lox-luc infizierten Zellen führte die Behandlung mit Acyclovir zu einer stark reduzierten Plaqueanzahl im Vergleich zu unbehandelten infizierten Zellen. Bereits eine Konzentration von 0,25 µg/ml Acyclovir verminderte die Plaqueanzahl des HSV-1(17⁺)Lox-luc im Vergleich zu unbehandelten infizierten Zellen um 80%, bei wt-infizierten Zellen reduzierte sich die Plaqueanzahl um 60%. Nach einer Behandlung mit 2,5 µg/ml Acyclovir sind bei den Thymidinkinase-positiven Viren HSV-1(17⁺)Lox-luc sowie dem Wildtyp HSV-1(17⁺) praktisch keine Plaques mehr nachweisbar. Die IC₅₀-Werte des Wildtyp-Virus sowie des HSV-1(17⁺)Lox-luc liegen deutlich unter 2 µg/ml Acyclovir. Im Vergleich dazu zeigte sich bei HSV-1(17⁺)blue infizierten Zellen bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml nur etwa eine 10%ige Reduktion der Plaquezahl. Auch die Behandlung mit 2,5 µg/ml Acyclovir führte bei HSV-1(17⁺)blue infizierten Zellen nur zu einer Verminderung der Plaqueanzahl auf etwa 60%. Die Suszeptibilität des HSV-1(17⁺)blue Virus lag deutlich über

dem Schwellenwert. Die Empfindlichkeit gegenüber Acyclovir vom HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus war vergleichbar mit der des Acyclovir-sensitiven wt-HSV-1(17⁺) Virus und im Vergleich zum parentalen HSV-1(17⁺)blue wiederhergestellt. Die Rekonstitution einer funktionellen Thymidinkinase im HSV-1(17⁺)Lox-luc war somit erfolgreich. Das HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus war sensitiv gegenüber der Behandlung mit Acyclovir.

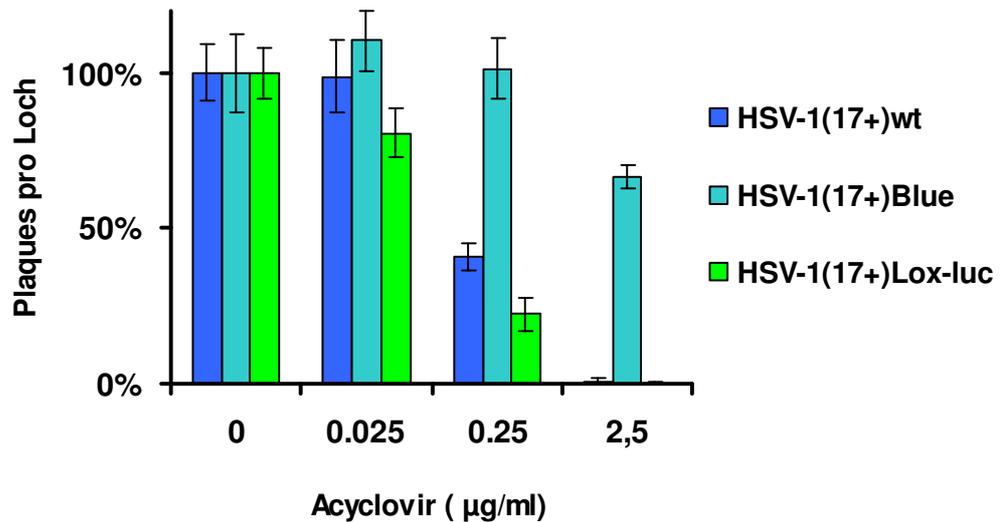


Abb. 15: Suszeptibilität von HSV-1(17⁺)Lox-Luc gegen Acyclovir.

Subkonfluente Vero-Zellen wurden mit HSV-1(17⁺)wt (Tk+), HSV-1(17⁺)blue (Tk-) bzw. HSV-1(17⁺)Lox-luc (Tk+) infiziert. Die Behandlung mit unterschiedlichen Virostatikumkonzentrationen (von 0,025 bis 2,5 µg/ml) erfolgte 1 h nach Inokulation. Nach dreitägiger Inkubationszeit wurde die Anzahl der Plaques pro Vertiefung für die unterschiedlich behandelten Proben bestimmt und prozentual in Bezug zu infizierten, aber unbehandelten Zellen dargestellt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

4.2.5 Messung der Luciferase-Expression von HSV-1(17⁺)Lox-luc

Eine möglichst hohe Luciferase-Expression ist notwendig, um die Ausbreitung und Effektivität der onkolytischen Viren im *in vivo* Mausmodell durch Biolumineszenz-Messungen beurteilen zu können. Für die Bestimmung der Luciferase-Expression (Abb. 16) wurden subkonfluente Vero-Zellen mit dem HSV-1(17⁺)lox-luc Virus mit einer MOI von 1 oder 10 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Zelllysate hergestellt und die Expression der Luciferase gemessen. Bereits nach 4 h war eine entsprechend der eingesetzten Virusmenge unterschiedlich starke Luciferase-Expression detektierbar, welche im Verlauf der Infektion weiter anstieg. Ein funktionelles Luciferase-Gen wurde somit erfolgreich in den HSV-1(17⁺) BAC eingebracht und führte nicht zu einer Beeinträchtigung der viralen Wachstumseigenschaften.

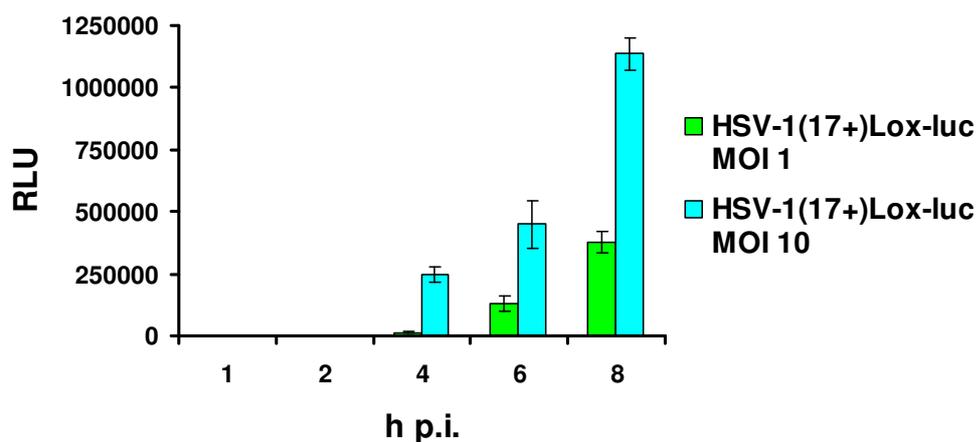


Abb. 16: Messung der Luciferase-Aktivität des HSV-1(17⁺)Lox-luc.

Für die Luciferase-Aktivitätsbestimmung wurden Vero-Zellen mit dem Luciferase-exprimierenden Virus HSV-1(17⁺)lox-luc infiziert (MOI 1 bzw. 10). Die Luciferase-Expression in den infizierten Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in Triplikaten bestimmt.

4.3 Deletion der verschiedenen Apoptose-Inhibitor-Gene

Für die Entwicklung effektiver onkolytischer HSV-1-Vektoren wurde ein neuer Ansatz gewählt, um Tumorspezifität zu erreichen. Basierend auf der Überlegung, dass in Tumorzellen die Apoptose-Mechanismen oft inaktiviert sind, wurden HSV-1 Mutanten mit Deletionen der Apoptose-Inhibitor-Gene hergestellt. Derzeit sind sieben virale Gene bekannt, denen Apoptose-inhibierende Aktivität zugeschrieben wird. Für die Herstellung der onkolytischen Apoptose-Inhibitor-Gen deletierten Herpes Simplex-Viren wurden in dieser Arbeit die viralen Gene US3 und US5, welche die Apoptose direkt inhibieren, sowie das US1-Gen, dessen Funktion in der Apoptose-Inhibition noch nicht vollständig geklärt ist, ausgewählt.

Die Deletion der einzelnen Apoptose-Inhibitor-Gene erfolgte durch Red-vermittelte homologe Rekombination in *E. coli* (Abb. 17). Die jeweiligen Apoptose-Inhibitor-Gene wurden durch eine mit mutierten FRT-Stellen (mFRT)-flankierte Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Die zur homologen Rekombination genutzten Sequenzen lagen z.B. am Rand des offenen Leserahmens (ORF) des US1-Gens, wodurch der US1-ORF durch die Insertion des Selektionsmarker vollständig ausgetauscht wurde. Positive Rekombinanten wurden durch die neu eingebrachte Kan^R-Resistenz selektiert. Analog zu der US1-Deletionsmutante wurden auch die US3- und US5-Deletionsmutanten hergestellt.

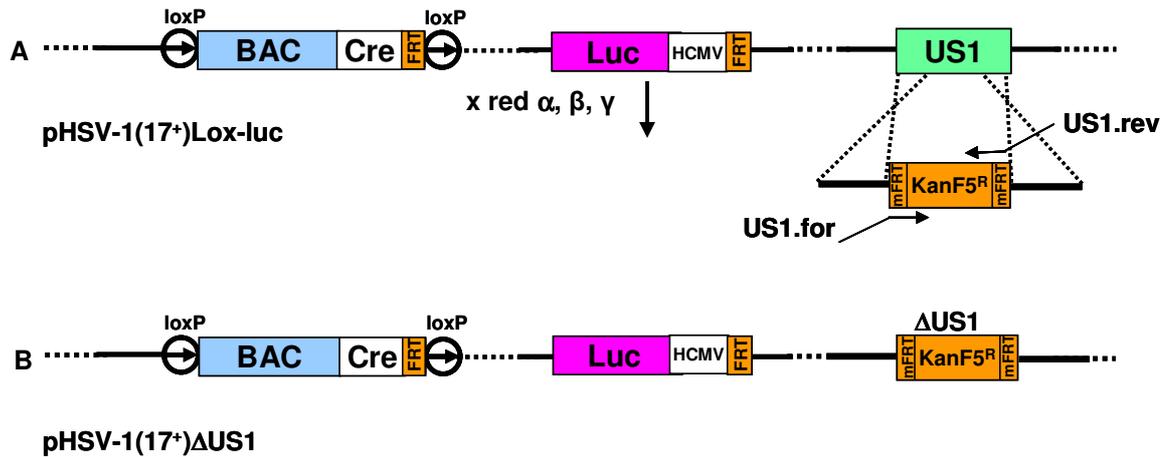


Abb. 17: Deletion des HSV-1 Apoptose-Inhibitor-Gens US1.

(A) Die Deletion des HSV-1 US1-Gens erfolgte durch die Insertion eines mit mutierten FRT-Stellen (mFRT)-flankierten Kanamycin-Resistenzgens. Das lineare 1,1 kb Rekombinationsfragment rekombinierte über die Homologien zur Zielsequenz in den pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A), wodurch das US1-Gen durch die Kan^R-Resistenz ausgetauscht wurde (pHSV-1(17⁺) Δ US1; B).

Um die neuen onkolytischen Viren hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz und der Gliomspezifität beurteilen zu können, sollte ein, zum derzeit in klinischen Studien befindliches onkolytisches HSV-1-Vektor (Prototyp G207), analoges Virus als Kontrolle genutzt werden. Das Prototyp-Virus G207 beruht auf der Deletion beider Kopien des Neurovirulenz-Gens γ 34.5 und einer zusätzlichen Deletion des UL39-Gens. Die beobachtete Sicherheit nach intracranialer Applikation in Mäusen ist bemerkenswert angesichts der Neuropathogenität des Wildtyp-HSV (Varghese & Rabkin, 2002). Diese Sicherheit der G207-Vektoren wurde auch in mehreren Phase I-Studien bestätigt (Market et al., 2000; Rampling et al., 2000), jedoch zeigte sich nur eine begrenzte Effektivität verglichen mit dem Wildtyp-Virus, da das G207-Virus stark attenuiert ist. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass γ 34.5-negative Viren im experimentellen Tumormodellen nicht zu besonders hohen Titern replizieren (Advani *et al.*, 2002), wodurch ihre Effektivität begrenzt wird.

Das analoge Virus HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 wurde auf Basis des klonierten pHSV-1(17⁺)Lox-luc hergestellt. Dazu wurden sukzessiv beide Kopien des γ 34.5-Gens und das UL39-Gen deletiert. Die Herstellung des HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 erfolgte ebenfalls in mehreren Schritten mittels Red-vermittelter homologer Rekombination in *E. coli* (Abb. 18). Zunächst wurde eine mit mutierten FRT-Stellen (mFRT) flankierte Kanamycin-Resistenz-Kassette in eine der Kopien des γ 34.5-Gens des pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A) inseriert. Restriktionsanalysen der resultierenden Klone nach der Rekombination zeigten, dass zunächst die Kopie des γ 34.5-Gens im internen Repeat (IR) durch die Kan^R-Kassette (B) ausgetauscht wurde. Dieser

Selektionsmarker wurde anschließend wieder durch Expression der Flp-Rekombinase entfernt (C). Die Deletion der zweiten Kopie des γ 34.5-Gens im terminalen *Repeat* (TR) erfolgte durch Insertion eines Zeocin^R-Selektionsmarker in den pHSV-1(17⁺)Lox-luc Δ ICP34.5 (C). Das UL39-Gen wurde durch die Insertion einer unflankierten Kan^R-Kassette deletiert. Der resultierende BAC-Klon pHSV-1(17⁺)Lox-luc Δ ICP34.5 (E) beinhaltet somit Deletionen in beiden Kopien des γ 34.5-Gens sowie eine zusätzliche Deletion des UL39-Gens. Das vom pHSV-1(17⁺)Lox-luc Δ ICP34.5 rekonstituierte Virus wurde in den späteren Experimente als Vergleichskontrolle genutzt.

4.3.1 Charakterisierung der Genomstruktur der BAC-Deletionsmutanten

Die DNA der verschiedenen BAC-Deletionsmutanten wurde zunächst durch eine Restriktionsanalyse mit HindIII analysiert (Abb. 19). Die Deletion des US1-Gens führte zu einer Vergrößerung des 4,8 kb Fragments des pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A) auf 5,2 kb in pHSV-1(17⁺) Δ US1 (B). Durch die neu eingebrachte HindIII-Schnittstelle im Kan^R-Gen entstanden bei der Deletion des US3-Gens zwei neue Fragmente (2,1 und 2,4 kb, C), im Vergleich zum pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A). Die Deletion des US5-Gens führte zu einer neuen 1,1 kb Bande sowie zu einem 4,6 kb Fragment (D), verglichen mit dem parentalen BAC. Die Deletion beider Kopien des γ 34.5-Gens und des UL39-Gens im pHSV(17⁺) Δ ICP führte zu Veränderungen von DNA-Fragmenten, die nicht im Schema erfasst sind, wurden aber ebenfalls mit weißen Dreiecken markiert. Der erfolgreiche Austausch des UL39-Gens durch die Kan^R-Kassette zeigte sich durch eine Verkleinerung der 9,4 kb Bande des pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A) auf 6,0 kb im pHSV-1(17⁺) Δ ICP. In den anderen Restriktionsfragmenten wurden wie erwartet keine Unterschiede detektiert.

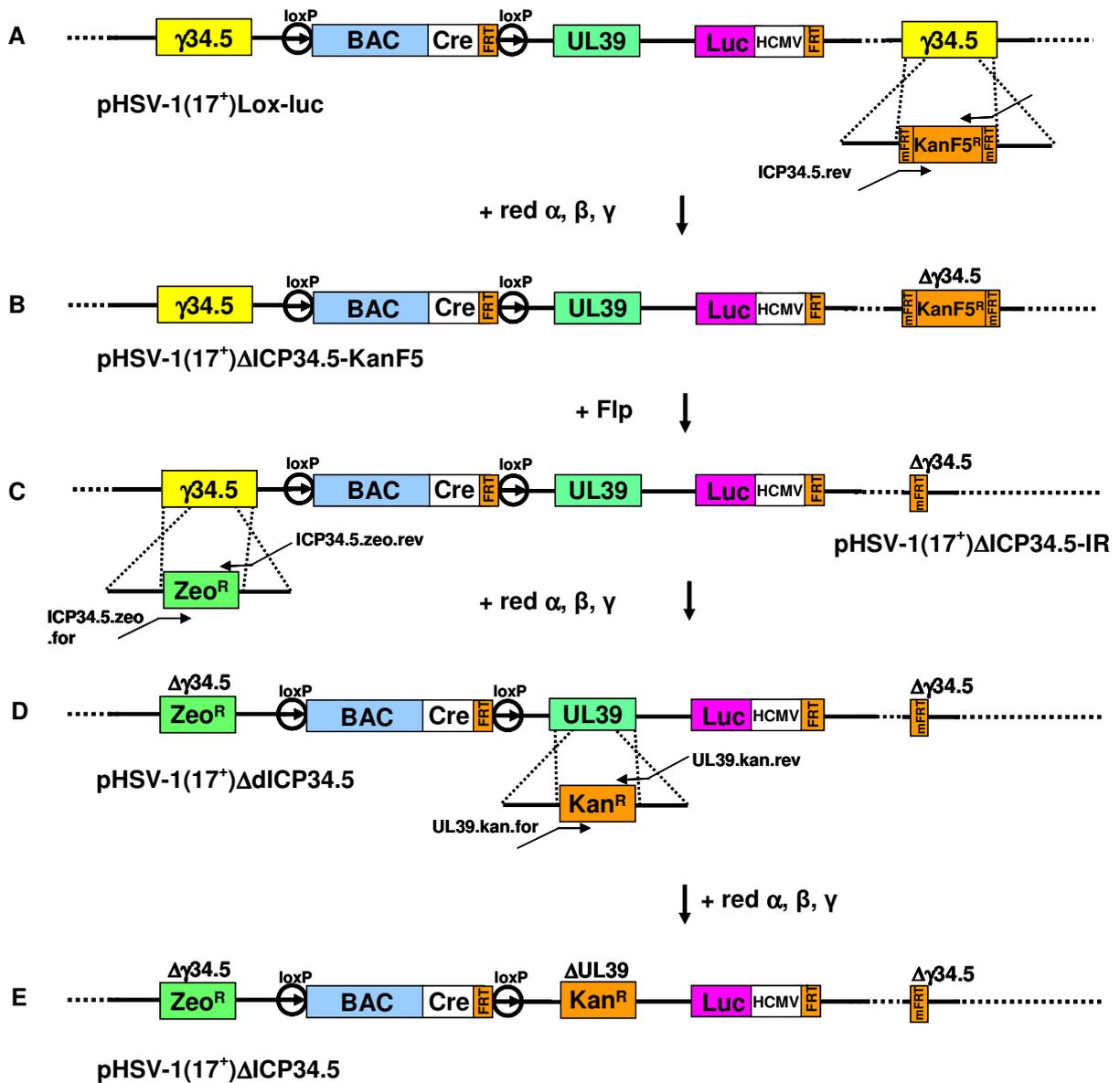


Abb. 18: Herstellung des HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5.

Sukzessive Deletion beider Kopien des Neurovirulenzgens γ 34.5-Gens und des UL39-Gens. (A) Insertion eines mFRT-Stellen flankierten Kanamycin-Resistenz-Gens in den pHSV-1(17⁺)Lox-luc zur Deletion der im internen Repeat (IR) lokalisierten Kopie des γ 34.5-Gens. (B) Die KanF5^R-Kassette wurde durch die Expression der Flp-Rekombinase, unter Verbleib einer FRT-Stelle im Genom, aus dem pHSV-1(17⁺) Δ ICP34.5-KanF5 (B) ausgeschnitten. (C) Deletion der zweiten Kopie des γ 34.5-Gens durch die Insertion einer Zeocin-Resistenz-Kassette in den pHSV-1(17⁺) Δ ICP34.5-IR. (D) Austausch des UL39-Gens durch Insertion eines unflankierten Kanamycin-Resistenzgens in den pHSV-1(17⁺) Δ dICP34.5. (E) Der resultierende pHSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 beinhaltet Deletionen in beiden Kopien des γ 34.5-Gens und des UL39-Gens.

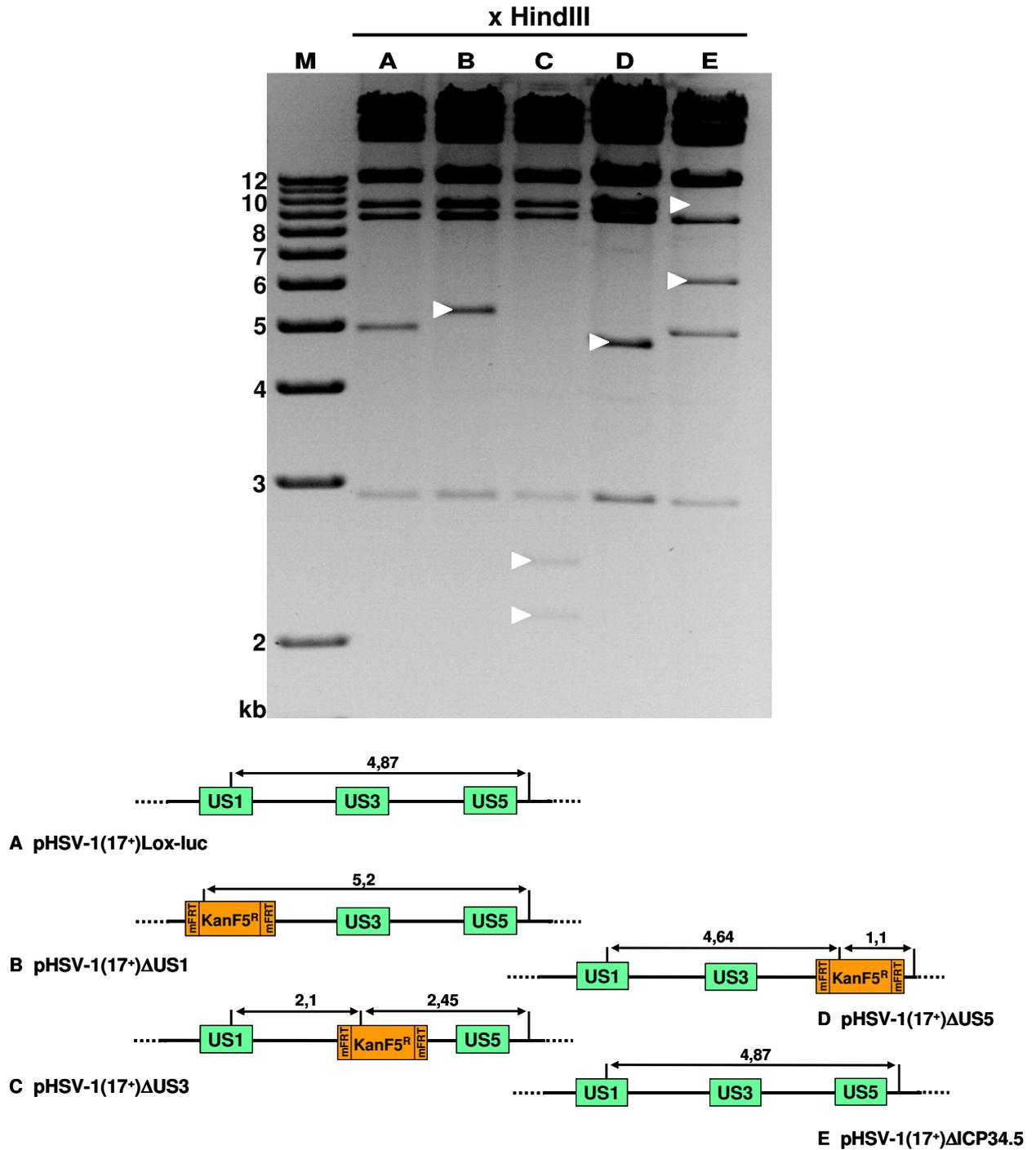


Abb. 19: Charakterisierung der Genomstruktur der Deletionsmutanten durch HindIII Restriktionsanalyse. Die DNA der BACs pHSV-1(17⁺)ΔUS1 (B), pHSV-1(17⁺)ΔUS3 (C), pHSV-1(17⁺)ΔUS5 (D), pHSV-1(17⁺)ΔICP34.5 (E) sowie des parentalen pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A) wurde isoliert, einer Restriktionsspaltung mit HindIII unterzogen und im 0,5% TBE-Agarosegel 14 h aufgetrennt. Veränderungen der DNA-Fragmente in Vergleich zum parentalen pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A) resultieren aus der Insertion des Kanamycin-Resistenzgens und der Deletion der Apoptose-Inhibitor-Gene US1, US3 oder US5. Die erwarteten veränderten Fragmentgrößen in kb sind im Schema angegeben und links durch weiße Dreiecke gekennzeichnet.

Zur Bestätigung der Genomstruktur der Deletionsmutanten wurden die unterschiedlichen Viren rekonstituiert und die Virus-DNA isoliert. Sowohl von der Virus- als auch von der BAC-DNA wurde eine Southern Blot Analyse mit einer spezifischen Sonde durchgeführt (Abb. 20). Die Sonde detektierte eine Region zwischen den viralen Genen US3 und US5. Sowohl für die BAC-DNA als auch für die Virus-DNA wurden die erwarteten Banden detektiert. Es wurden keine Unterschiede zwischen viraler und BAC-DNA festgestellt. Somit konnte durch die Southern Blot Analyse die Genomstruktur der Virus-DNA der unterschiedlichen Deletionsmutanten bestätigt werden.

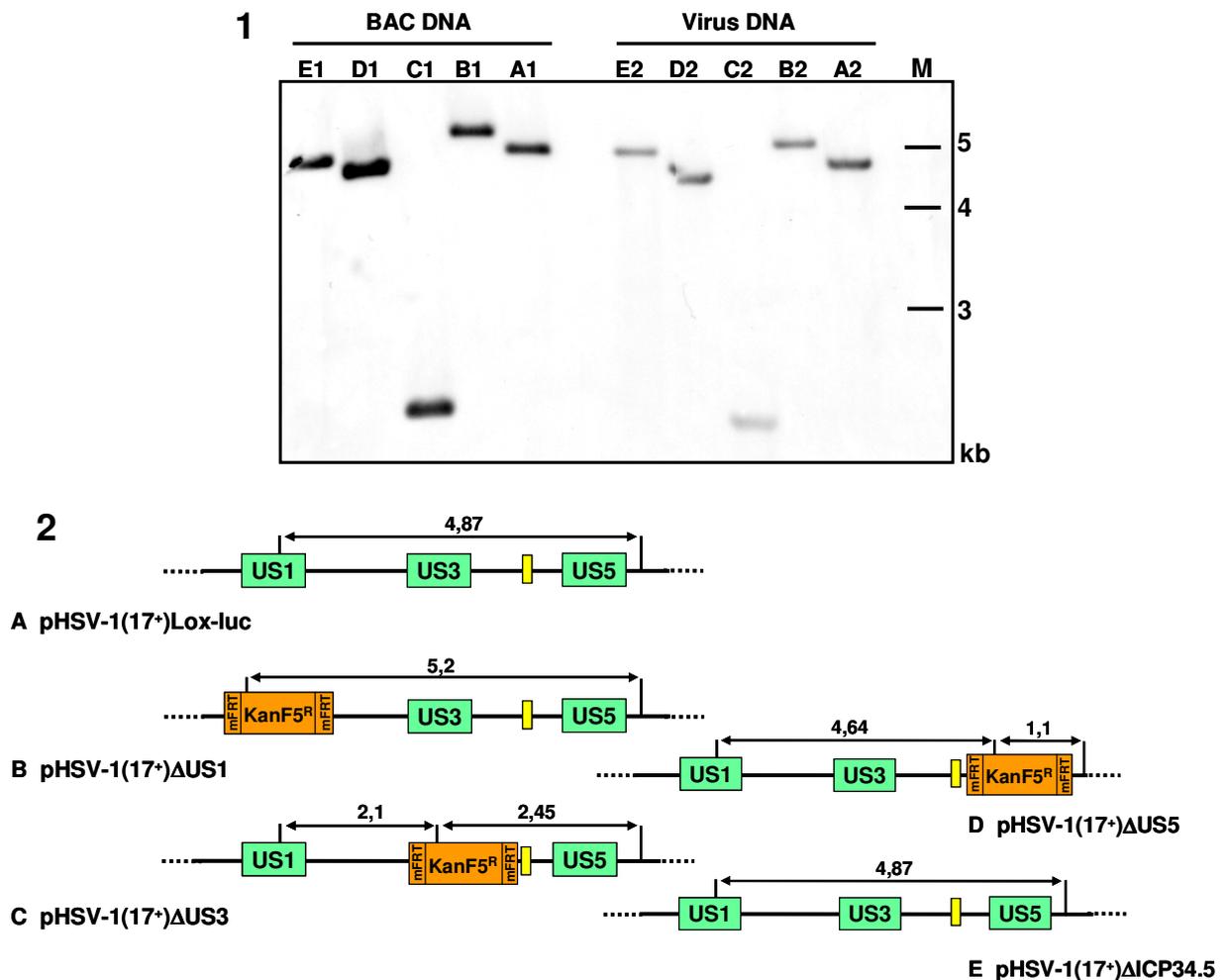


Abb. 20: Southern Blot Analyse der DNA der Detetionsmutanten.

(1) BAC-DNA sowie Virus-DNA von pHSV-1(17⁺)Lox-luc (A), pHSV-1(17⁺)ΔUS1 (B), pHSV-1(17⁺)ΔUS3 (C), pHSV-1(17⁺)ΔUS5 (D) sowie pHSV-1(17⁺)ΔICP (E) wurde isoliert, mit HindIII gespalten, im 0,5% TBE-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Membran wurde mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert, welche spezifisch für eine Region zwischen den viralen Gene US3 und US5 ist (mit gelbem Rechteck markiert). (2) Genom-Aufbau der HSV-1-Deletionsmutanten und die Lokalisierung der DIG-markierten Sonde. Die erwarteten Fragmentgrößen wurden in kb im Schema angegeben.

4.4 Wachstumsanalysen der neuen onkolytischen HSV-1-Vektoren

Idealerweise sollten die neuen onkolytischen HSV-1-Deletionsmutanten in primären Zellen nicht oder nur wenig effizient replizieren, wohingegen sie sich in Gliomzellen effizient vermehren sollten. Die Infektion mit Apoptose-Inhibitor-Gen deletierten Viren sollte in primären Zellen Apoptose auslösen, die nicht mehr unterbunden werden kann. Die weitere Virusreplikation würde dadurch in primären Zellen begrenzt. Im Gegensatz dazu sollte die Infektion in Gliomzellen, die Veränderungen in den Apoptose-Signalwegen aufweisen, nicht zur Apoptose führen und die Vermehrungsrate der Deletionsmutanten sollte deshalb unbeeinflusst sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Vermehrung der verschiedenen HSV-1-Mutanten auf primären HFF-Zellen (Abb. 21) sowie unterschiedlichen Glioblastom-Zelllinien (Abb. 22-Abb. 24) getestet und miteinander verglichen. Die verschiedenen Glioblastom-Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich ihres p53-Status. Die U118- sowie U251-Zellen weisen Mutationen im Tumor-Suppressor-Gen p53 auf und gelten daher als Apoptose-resistent, während die U87MG-Zellen, sowie Wildtyp-p53 exprimieren. U87MG-Zellen wurden für die Bestimmung der Gliomspezifität der derzeit in klinischen Studien benutzten onkolytischen G207-Viren eingesetzt. Zum Vergleich der Wachstumskurven der verschiedenen Mutanten wurden die Zellen mit einer MOI von 5 infiziert. Proben vom Überstand wurden zu dem angegebenen Zeitpunkten entnommen und die Titer durch Plaque-Titration auf Vero-Zellen bestimmt. Als Vergleichskontrollen zur Beurteilung der Replikationseffizienz der Deletionsmutanten wurde zum einen das Wildtyp-Virus HSV-1(17⁺) und zum anderen das HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5-Virus genutzt.

Die Wachstumsanalyse der verschiedenen Deletionsmutanten und des Wildtyp-Virus auf den primären HFF-Zellen zeigte, dass sowohl die Deletionsmutante HSV-1(17⁺) Δ US1 als auch die Δ US3-Deletionsmutante eine verringerte Vermehrungsrate auf primären HFF-Zellen im Vergleich zum Wildtyp-Virus aufweist (Abb. 21). Die Δ US1-Deletionsmutante ist zudem auch im Vergleich zu dem G207 Prototyp-analogen Δ ICP34.5-Virus attenuiert. Die Titer der HSV-1(17⁺) Δ US1-Mutante waren um das Zwanzigfache niedriger als die des Wildtyp-Virus und die Amplifikation der Viren war zudem verzögert. Gegenüber dem Δ ICP34.5-Virus waren die Titer der Δ US1-Mutante um das fünffache reduziert und die Replikation ebenfalls zeitverzögert. Bei der Δ US5-Deletionsmutante konnte keine Veränderung des Wachstumsverhaltens auf den primären Zellen beobachtet werden, dieses Virus replizierte zu vergleichbaren Titern wie das Wildtyp-Virus (Abb. 21). Die Deletion des US5-Gens hatte folglich keinen Einfluss auf die Vermehrungseigenschaften des resultierenden Virus auf HFF-Zellen. Die Wachstumskinetik der Δ US3-Deletionsmutante war vergleichbar mit der des Δ ICP34.5 Prototyp-Virus (Abb. 21). Die Titer beider Virus-Mutanten waren aber verglichen mit dem Wildtyp-Virus um das Fünfzehnfache verringert und beide

Viren somit attenuiert. Die Deletion des US1- bzw. US3-Gens führte somit zu einer weniger effizienten Replikation der Viren in primären HFF-Zellen, vergleichbar mit der Replikation des Prototyp-analogen Δ ICP34.5-Virus. Dieser Trend wurde in drei unabhängigen Experimenten beobachtet.

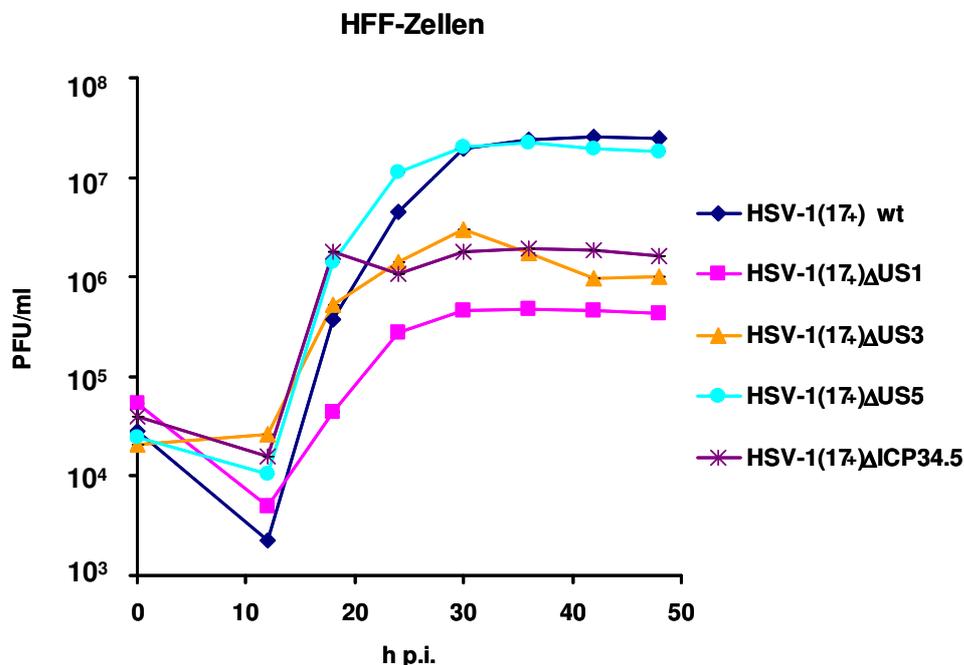


Abb. 21: Wachstumskurven von HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺) Δ US1, HSV-1(17⁺) Δ US3, HSV-1(17⁺) Δ US5, HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 auf HFF Zellen.

Repräsentatives Ergebnis einer von drei Wachstumskinetiken der verschiedenen Virus-Mutanten auf HFF Zellen, die mit einer MOI von 5 infiziert wurden. Proben aus dem Zellkulturüberstand wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und die Titer durch Plaque-Titration auf Vero-Zellen bestimmt. Die Standardabweichungen der Titer von jeweils drei parallelen Kulturen sind aufgrund der geringen Abweichung nicht sichtbar.

In den Gliomzellen U87MG (Abb. 22) zeigten alle Deletionsmutanten ein, dem Wildtyp-Virus entsprechendes Wachstumsverhalten. Auch die auf den HFF-Zellen stark attenuierte Δ US1-Deletionsmutante, sowie die ebenfalls attenuierte Δ US3-Deletionsmutante replizierten auf den U87MG-Gliomzellen dem Wildtyp-Virus vergleichbar. Sowohl die erreichten Titer als auch die Kinetik der Replikation der Deletionsmutanten waren dem Wildtyp-Virus entsprechend. Das Prototyp-Virus Δ ICP34.5 hingegen zeigte um etwa fünffach reduzierte Titer und eine verzögerte Kinetik im Vergleich zu dem Wildtyp-Virus und den Apoptose-Inhibitor-Gen-Deletionsmutanten. Die Deletion der verschiedenen Apoptose-Inhibitor-Gene hatte somit keinen Einfluss auf die Replikation der Mutanten in den U87MG-Gliomzellen.

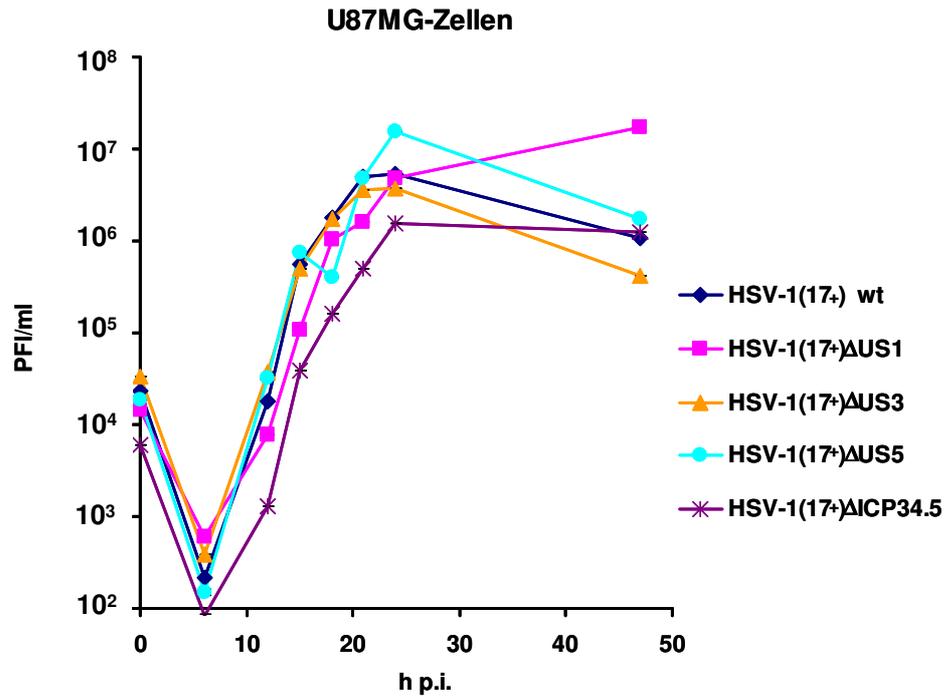


Abb. 22: Wachstumskurven von HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5, HSV-1(17⁺)ΔICP34.5 auf U87MG Gliom-Zellen.

Repräsentatives Ergebnis einer von drei Wachstumskinetiken der verschiedenen Virus-Mutanten auf U87MG-Zellen. Infektion der U87MG-Zellen erfolgte wie unter Abb. 21 beschrieben. Die Standardabweichungen der Titer von jeweils drei parallelen Kulturen sind aber aufgrund der geringen Abweichung nicht sichtbar.

Zusätzlich wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten auf den Apoptose-resistenten Gliomzelllinien U251 und A172 untersucht. Die Wachstumsvergleiche auf U251 Gliomzellen (Abb. 23) zeigten, dass das HSV-1(17⁺)ΔUS5 verglichen mit dem Wildtyp-Virus zu zehnfach höheren Titern und deutlich schneller replizierte. Die Kinetik des Wildtyp-Virus war gegenüber dem ΔUS5-Virus um etwa 8 h verzögert. Die ΔUS3-Deletionsmutante replizierte mit einer verzögerten Kinetik in den U251-Zellen gegenüber dem Wildtyp-Virus und dem ΔUS5-Virus. Die Titer der ΔUS3-Mutante waren deutlich, um das Zehn- bzw. Fünffache reduziert. Außerdem konnte auch eine Reduktion der Titer um das Fünffache der ΔUS3-Deletionmutante gegenüber dem ΔUS1- und ΔICP34.5-Virus gezeigt werden. Das HSV-1(17⁺)ΔUS1 und das ΔICP34.5-Virus replizierten anfangs mit nahezu identischer Kinetik und zu Titern, die anfangs vergleichbar mit denen des Wildtyp-Virus sind, wobei die Titer mit zunehmender Dauer der Infektion (ab ca. 30 h p.i.) abnahmen, während der Titer des Wildtyp-Virus kontinuierlich zunahm.

Die Vermehrungsrate der Deletionsmutanten auf den U118-Gliomzellen (Abb. 24) ergab für die US5-Deletionsmutante ein vergleichbares Bild. Erneut replizierte die ΔUS5-Mutante verglichen mit dem Wildtyp-Virus zu etwa zehnfach erhöhten Titern und mit schnellerer Kinetik. In Gegensatz zu dem Wachstumsverhalten auf U251-Zellen zeigte die ΔUS3-

Mutante und die Δ ICP34.5-Mutante ein vergleichbares Wachstumsverhalten und die Δ US1-Mutante zeigte im Vergleich dazu fünffach geringere Titer und eine leicht um 3 h verzögerte Kinetik, obgleich alle Deletionsmutanten eine beschleunigte Kinetik gegenüber dem Wildtyp-Virus aufwiesen.

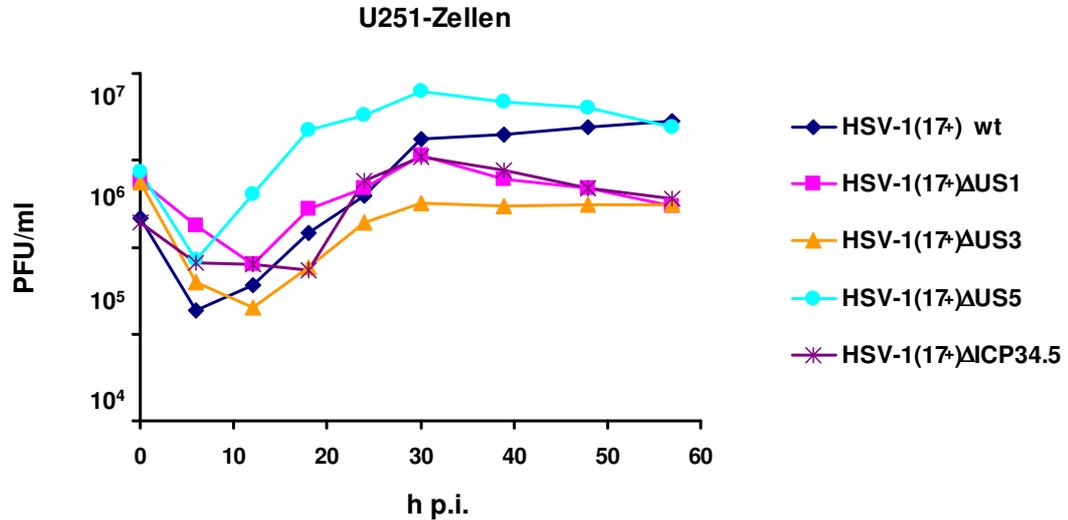


Abb. 23: Wachstumskurven von HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5, HSV-1(17⁺)ΔICP34.5 auf U215 Gliom-Zellen.

Repräsentatives Ergebnis einer von drei Wachstumskinetiken der verschiedenen Virus-Mutanten auf U251-Zellen. Infektion der U251-Zellen erfolgte wie unter Abb. 21 beschrieben. Die Standardabweichungen der Titer von jeweils drei parallelen Kulturen sind aber aufgrund der geringen Abweichung nicht sichtbar.

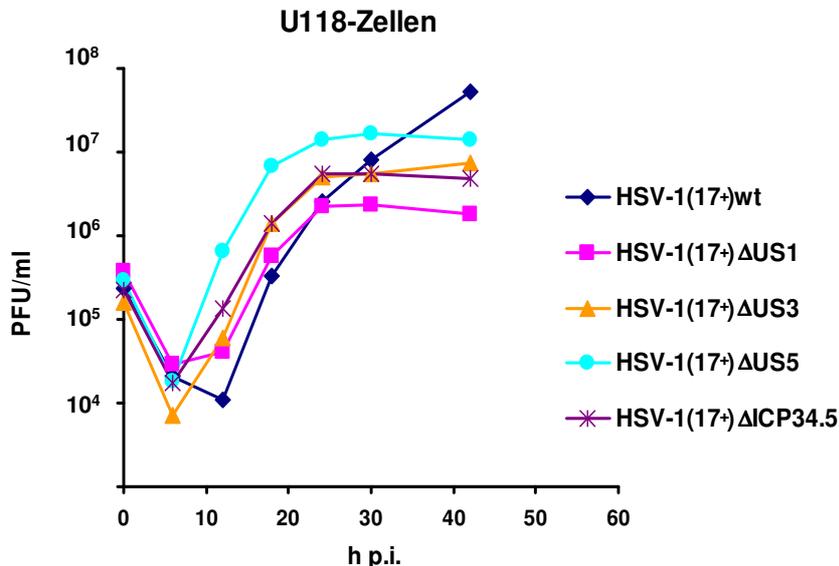


Abb. 24: Wachstumskurven von HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5, HSV-1(17⁺)ΔICP34.5 auf U118 Gliom-Zellen.

Repräsentatives Ergebnis einer von drei Wachstumskinetiken der verschiedenen Virus-Mutanten auf U118-Zellen. Infektion der U118-Zellen erfolgte wie unter Abb. 21 beschrieben. Die Standardabweichungen der Titer von jeweils drei parallelen Kulturen sind aber aufgrund der geringen Abweichung nicht sichtbar.

4.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose

Wie in der Einleitung beschrieben, führt die Infektion mit Wildtyp-HSV-1 innerhalb von drei Stunden nach Infektion zur Induktion der Apoptose, die eingeleiteten Prozesse werden jedoch durch die viralen Apoptose-Inhibitor-Proteine in den infizierten Zellen effektiv blockiert (Koyoma *et al.*, 1997). Diese viralen Inhibitor-Proteine werden 3-6 h nach Infektion synthetisiert und sind fähig, sowohl die HSV-1-bedingte Apoptose (*HSV-1 dependent apoptosis*, HDAP), als auch die durch verschiedene externe Stimuli induzierte Apoptose zu verhindern (Aubert *et al.*, 1999; Galvan & Roizman, 1998). Viele der initialen Untersuchungen der HSV-1-bedingten Apoptose wurden an HEp-2-Zellen durchgeführt (Aubert & Blaho, 2000; Koyoma *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000). Galvan und Roizman (1998) zeigten, dass die Fähigkeit von HSV-1, extern induzierte Apoptose zu blockieren, Zelltyp-abhängig ist. So schützte eine HSV-1-Infektion subkonfluente SK-N-SH-Zellen vor der Apoptose-Induktion durch TNF α oder anti-CD95/FAS-Antikörper, aber nicht HeLa-Zellen. Die biphasische Modulation der Apoptose durch HSV-1 wird durch eine empfindliche Balance zwischen den pro- und anti-apoptotischen Faktoren gesteuert. Zur Klärung, welchen Einfluss die Deletion der einzelnen Apoptose-Inhibitor-Gene US1, US3 bzw. US5 auf die Fähigkeit der Deletionsmutanten hat, die Apoptose in verschiedenen Zelltypen zu blockieren, wurden verschiedene Apoptose-Induktions-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde zum einen die Induktion der Apoptose durch die Infektion mit den Deletionsmutanten analysiert als auch die Fähigkeit der HSV-1-Deletionsmutanten getestet, die intrinsisch- oder extrinsisch-induziert Apoptose zu blockieren.

4.5.1 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion nach Infektion von HEp-2-Zellen mit den HSV-1-Deletionsmutanten

Zur Prüfung, ob die HSV-1-Deletionsmutanten in infizierten Zellen Apoptose induzieren bzw. ob sie die Apoptose inhibieren können, wurden Apoptose-Versuche mit HEp-2-Epithelzellen durchgeführt. Dazu wurden HEp-2 Zellen mit den Deletionsmutanten HSV-1(17⁺) Δ US1, HSV-1(17⁺) Δ US3, HSV-1(17⁺) Δ US5 bzw. HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 sowie dem Wildtyp-Virus infiziert und 24 h nach der Infektion die Apoptose-Induktion anhand morphologischer Veränderungen der Zellen (Abb. 25) und durch Immunoblotting anhand der Caspase-abhängigen Spaltung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) (Abb. 26) in Lysaten infizierter HEp-2 Zellen bestimmt. Die Δ US3-infizierten HEp-2-Zellen zeigten deutliche morphologische Anzeichen für Apoptose, die Zellen schrumpften und bildeten Ausstülpungen der Plasmamembran (sog. *apoptotic bodies*, Abb. 25 D). In den Wildtyp-Virus-infizierten Zellen sowie nach der Infektion mit den Δ US1- und Δ US5-

Deletionsmutanten traten diese Anzeichen der Apoptose nicht auf (Abb. 25 B,C,E.). Die Δ ICP34.5-infizierten Zellen zeigten vereinzelt apoptotische Zellen (Abb. 25 F).

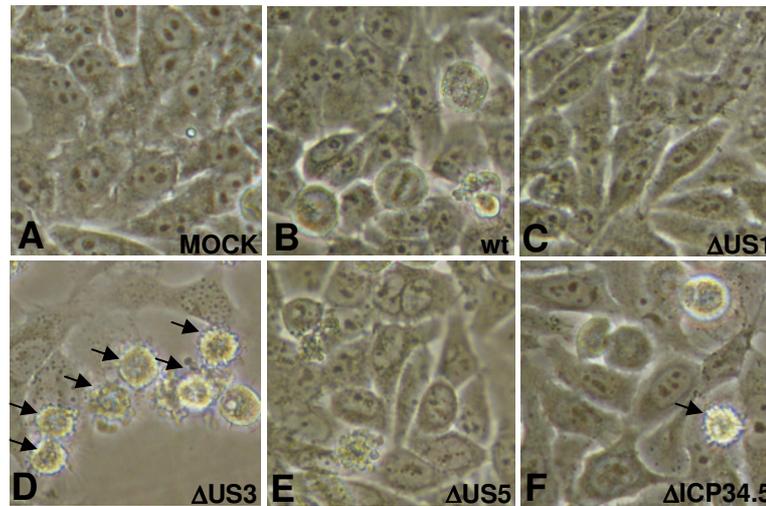


Abb. 25: Morphologische Veränderungen von HEp-2 Zellen nach Infektion mit Wildtyp-HSV-1(17⁺), HSV-1(17⁺) Δ US1, HSV-1(17⁺) Δ US3, HSV-1(17⁺) Δ US5 bzw. HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5.

HEp-2 Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert. Die Bilder zeigen Ausschnitte von Phasenkontrastaufnahmen 24 h p.i. (100x Vergrößerung). Pfeile markieren apoptotische Zellen.

Diese Ergebnisse bestätigten sich im Immunoblot anhand der Caspase-abhängigen Spaltung der Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) (Abb. 26). PARP ist ein 116 kDa-Protein, das während der Apoptose proteolytisch durch die Caspase-3 in ein 89 kDa- und ein 24 kDa-Fragment gespalten wird (Kaufmann *et al.*, 1993). Das 89 kDa-PARP-Spaltprodukt ist ein etablierter Marker der Apoptose. Die Apoptose wurde in HEp-2-Zelllysaten 24 h nach der Infektion mit den verschiedenen Viren bestimmt. In Zelllysaten von HEp-2-Zellen, die mit HSV-1(17⁺) Δ US3 (Abb. 26, Spur 4) infiziert worden waren, zeigte sich eine deutliche Spaltung der PARP im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (MOCK, Abb. 26, Spur 1). Übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Ergebnissen für die HSV-1 Stamm F US3-Deletionsmutante (R7041) führte die Deletion des US3-Gens im Stamm 17⁺ zum Verlust der inhibitorischen Aktivität des Virus gegenüber der durch die Infektion ausgelösten Apoptose (Leopardie *et al.*, 1997; Cartier *et al.*, 2003). In Zelllysaten von HEp-2 Zellen, die mit der US1- oder US5-Deletionsmutante oder dem Wildtyp-Virus infiziert wurden, konnten hingegen keine gespaltene PARP, verglichen mit nicht infizierten Zellen (MOCK), nachgewiesen werden (Abb. 26, Spuren 1-3 u. 5). In Δ ICP34.5-infizierten Zellen wurde eine geringe Menge gespaltenes PARP detektiert (Abb. 26, Spur 6). Die Deletion der viralen Gene US1 und US5 hatte somit keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Virusmutanten, die durch die Virusinfektion induzierte Apoptose zu blockieren, während die Deletion des US3-

Apoptose-Inhibitor-Gens zu einen Verlust der anti-apoptostischen Aktivität des Virus führt. Der Infektion der Zellen wurde mit einem anti-HSV-1-Thymidinkinase-Antikörper nachgewiesen. In allen infizierten HEp-2-Zellen konnte die virale Thymidinkinase nachgewiesen werden (Abb. 26, Spuren 2-6).

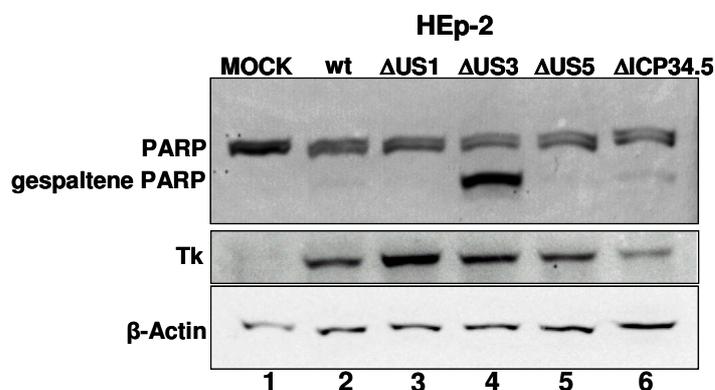


Abb. 26: Apoptose-Induktion (PARP-Spaltung) in HEp-2 Zellen nach Infektion mit HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5, HSV-1(17⁺)ΔICP34.5.

HEp-2 Zellen wurden mit einer MOI von 1 infiziert. 24 h p.i. wurde die Apoptose-Induktion mit Hilfe eines PARP-spezifischen Antikörpers detektiert. Der Nachweis von β-Actin diente der Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Zum Nachweis der Infektion wurde ein Thymidinkinase (Tk)-Antikörper verwendet. Die erwarteten Banden lagen bei 116 kDa (PARP), 89 kDa (gespaltene PARP), 37 kDa (Tk) bzw. 45 kDa (β-Actin).

4.5.2 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion nach Infektion von Jurkat-T-Zellen mit den HSV-1-Deletionsmutanten

Die Apoptose-Untersuchungen wurden wie in 4.5.1 beschrieben, an Jurkat-T-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 mit den verschiedenen Deletionsmutanten infiziert und 24 h nach Infektion wurde die Apoptose detektiert (Abb. 27). Die hohe MOI von 10 wurde genutzt um möglichst alle Zellen zu infizieren, da Jerome *et al.* (1999) zeigten, dass die virale Replikation in Jurkat-Zellen relativ ineffizient ist. Die Bestimmung der Apoptose-Induktion erfolgte dabei durch durchflusszytometrische Messung der Färbung mit Annexin V-FITC und 7-Aminoactinomycin (7-AAD), wodurch die Unterscheidung in vitale, früh- und spätapoptotische Zellen sowie nekrotische Zellen möglich ist. Während der frühen Phase der Apoptose verliert die Plasmamembran ihre Integrität und die Phosphatidylserine werden auf die Außenseite der Plasmamembran transloziert, wo sie dann von Annexin-V-FITC gebunden werden (Vermes *et al.*, 1995). Die Darstellung und Differenzierung von nekrotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des 7-AAD Farbstoffes. Dieser bindet an DNA-Bruchstücke aus dem Zellkern, nachdem die Integrität

der Zellmembran in Folge von Nekrose zerstört worden ist (Schmid *et al.*, 1992). Ist die Färbung Annexin-V und 7-AAD-negativ, so handelt es sich um eine vitale Zelle (Quadrant 3), bei Annexin-V-negativer Färbung und 7-AAD-positiver Färbung ist die Zelle nekrotisch (Quadrant 1). Eine Annexin-positiv-färbung und 7-AAD-negativ-färbung zeigt eine apoptotische Zelle im Frühstadium (Quadrant 4) und eine Annexin- und 7-AAD-positiv-färbung zeigt eine apoptotische Zelle im späten Stadium oder eine nekrotische Zelle (Quadrant 2).

Die durchflusszytometrische Messung der Färbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD ergab bei MOCK-infizierten Zellen einen Anteil von etwa 4% früh-apoptotischen Zellen (Abb. 27 A, 4) und ungefähr 5% spät-apoptotische oder nekrotischen Zellen (Abb. 27 A, 2) der Gesamtpopulation gegenüber 90% vitalen Zellen (Abb. 27 A, 3). Nach der Infektion mit dem Wildtyp-Virus betrug der Anteil von früh-apoptotischen Zellen von der Gesamtpopulation 16% (Abb. 27 B, 4). Die Infektion mit dem Wildtyp-Virus führte somit zu einer messbaren Induktion der Apoptose in Jurkat-T-Zellen, verglichen mit MOCK-infizierten Zellen (Abb. 27 A, B4). In HSV-1(17⁺) Δ US1 (Abb. 27 C), sowie HSV-1(17⁺) Δ US5 (Abb. 27 E) und HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 (Abb. 27 F) infizierten Zellen zeigte sich entsprechend den Wildtyp-Virus infizierte Zellen eine geringfügige Apoptose-Induktion verglichen mit den MOCK-infizierten Zellen (Abb. 27 A). Der Anteil von apoptotischen Zellen nach Infektion mit dem Virus HSV-1(17⁺) Δ US3 betrug hingegen etwa 43% (Abb. 27 D) und war somit deutlich erhöht verglichen mit den MOCK-infizierten Zellen, aber auch erhöht gegenüber den Wildtyp-infizierten Zellen. Auch in den Jurkat-T-Zellen konnte nur nach Infektion mit der Δ US3-Mutante ein deutlicher Anstieg apoptotischer Zellen gemessen werden.

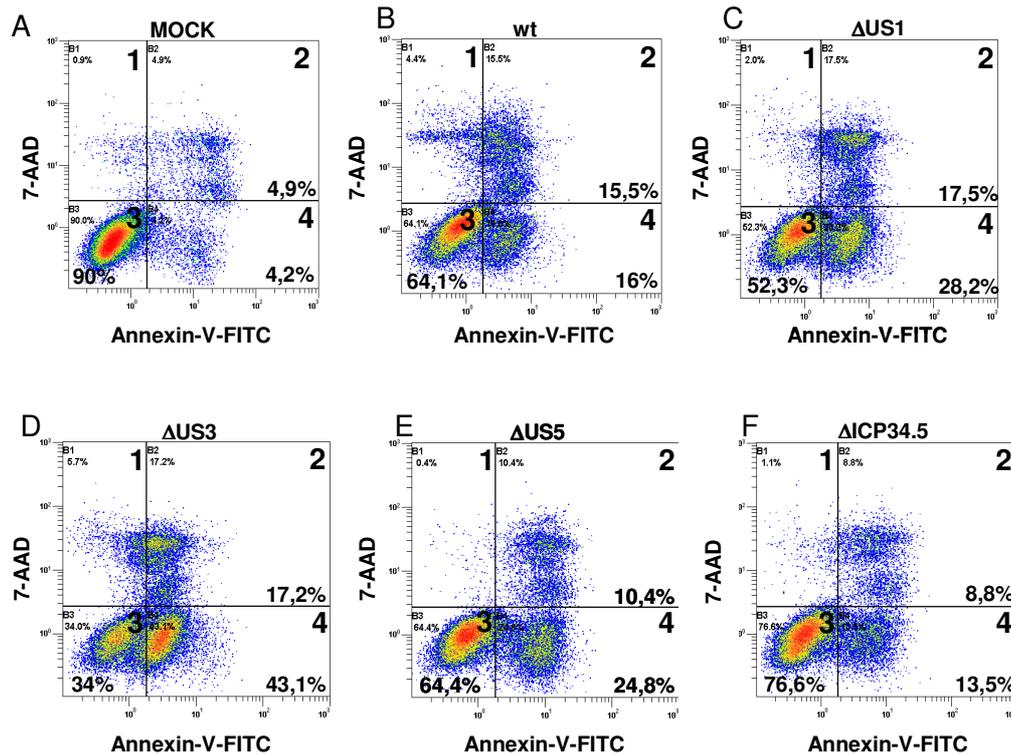


Abb. 27: Apoptose-Induktion in Jurkat-T-Zellen nach Infektion mit HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺) Δ US1, HSV-1(17⁺) Δ US3, HSV-1(17⁺) Δ US5, HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5.

Die Jurkat-T-Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Die Bestimmung der Apoptose-Induktion erfolgte mittels durchflusszytometrische Messung der Färbung der Zelle mit Annexin V-FITC und 7-AAD.

4.5.3 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion in Gliomzellen nach Infektion mit den HSV-1-Deletionsmutanten

Zur Überprüfung der Grund-Hypothese der Arbeit wurde die Apoptose-Induktion nach Infektion auch in den als apoptose-resistent beschriebenen Gliomzellen U251 und A172 untersucht. Die Infektion mit den Deletionsmutanten sollte in diesen Zellen zu keiner Apoptose-Induktion führen, da durch die Veränderungen der Apoptose-Signalwege in den Gliomzellen keine Apoptose induziert werden sollte. Dazu wurden die humanen Gliomzelllinien U251 und A172 mit einer MOI von 5 infiziert und 24 h nach Infektion wurde die Apoptose-Induktion durch morphologische Veränderungen der Zellen (Bilder von U251-Zellen in Abb. 28, Bilder von A172-Zellen nicht gezeigt) und durch Immunoblotting anhand der Caspase-abhängigen Spaltung der PARP in den U251-Zelllysaten (Abb. 29) bzw. A172-Zelllysaten (Abb. 30) bestimmt. Alle infizierten U251-Zellen (Abb. 28 B-F) zeigten 24 h p.i. deutliche Infektionsanzeichen, es konnten aber weder in den Wildtyp-infizierten, noch in den mit den verschiedenen Deletionsmutanten infizierten Zellen morphologische Veränderungen, die auf die Induktion der Apoptose hinweisen, beobachtet werden.

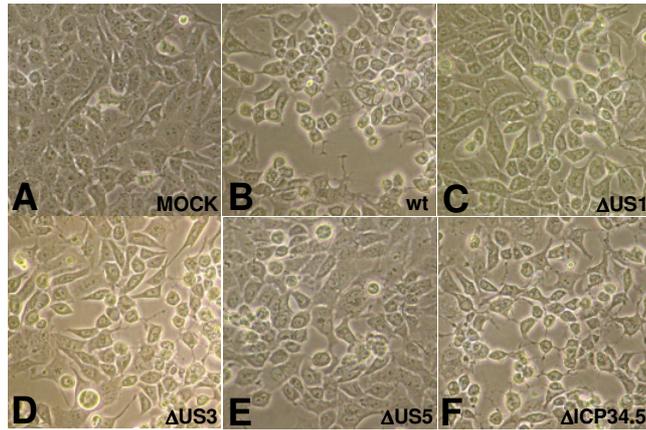


Abb. 28: Morphologische Veränderungen von U251-Zellen nach Infektion mit Wildtyp-HSV-1(17⁺), HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5 bzw. HSV-1(17⁺)ΔICP34.5.

U251-Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert. Die Bilder zeigen Ausschnitte von Phasenkontrastaufnahmen 24 h p.i. (40 x Vergrößerung). Der zytopatische Effekt durch die Virusinfektion war deutlich erkennbar, Zellen blähen sich auf und runden sich ab, Plaques entstanden, es zeigten sich aber keine Ausstülpungen der Plasmamembran (*apoptotic bodies*, siehe Abb. 25).

Entsprechende Ergebnisse zeigte der Immunoblot (Abb. 29). Weder in Wildtyp-Virus-infizierten U251-Zelllysaten, noch in U251-Zelllysaten, die mit einer der Deletionsmutanten infiziert worden waren, konnte eine Spaltung der PARP nachgewiesen werden (Abb. 29 Spur 2-6). Da auch die HSV-1(17⁺)ΔUS3-Infektion zu keiner nachweislichen Induktion der Apoptose führte, nehmen wir an, dass die U251-Zellen resistent gegenüber der HSV-1-bedingten Apoptose-Induktion sind. In allen infizierten U251-Zellen konnte die virale Thymidinkinase und somit die Infektion nachgewiesen werden (Abb. 29 Spuren 2-6).

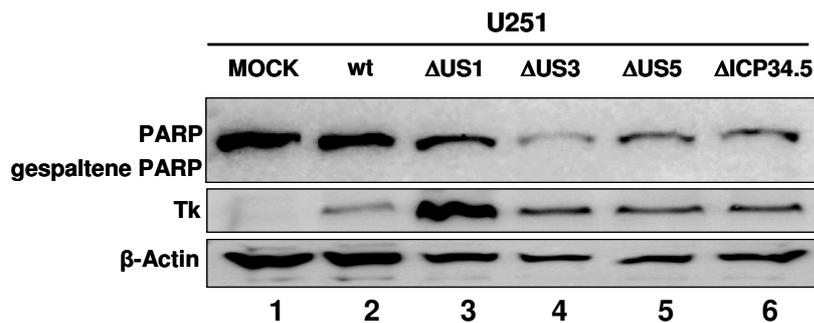


Abb. 29: Apoptose-Induktion (PARP-Spaltung) in U251-Zellen nach Infektion mit HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5, HSV-1(17⁺)ΔICP34.5.

(A) U251 Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert. 24 h p.i. wurde die Apoptose-Induktion mit Hilfe eines PARP-spezifischen Antikörpers detektiert. Der Nachweis von β -Actin diente der Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Zum Nachweis der Infektion wurde ein Thymidinkinase (Tk)-Antikörper verwendet. Die erwarteten Banden lagen bei 116 kDa (PARP), 89 kDa (gespaltene PARP), 37 kDa (Tk) bzw. 45 kDa (β -Actin).

In A172-Zellen hingegen konnte eine Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Bereits in uninfizierten Zellen und auch in den Wildtyp-Virus infizierten Zellen konnte eine geringe Menge der gespaltenen PARP detektiert werden. Die Menge an gespaltenen PARP erhöhte

sich nach Infektion mit HSV-1(17⁺)ΔUS3 (Abb. 30 Spur 4) während die Menge an gespaltenen PARP nach der Infektion mit dem HSV-1(17⁺)ΔUS5 (Abb. 30 Spur 5) und HSV-1(17⁺)ΔUS3 (Abb. 30 Spur 3) vergleichbar zu nicht-infizierten MOCK-Zellen (Abb. 30 Spur 1) war. Die erhöhte Menge gespaltenen PARP in den HSV-1(17⁺)ΔICP34.5 (Abb. 30 Spur 6) infizierten Zellen ist auf die unterschiedlichen eingesetzten Mengen an Protein zurückzuführen. Da in den A172-Gliomzellen nach Infektion mit HSV-1(17⁺)ΔUS3 eine erhöhte Menge gespaltenen PARP nachgewiesen werden konnte und somit nachweislich in den A172-Zellen Apoptose induziert wurde, sind diese Gliomzellen sensitiv gegenüber der Virus-induzierten Apoptose.

Entgegen den Erwartungen, zeigten nur die U251-Gliomzellen eine Resistenz gegenüber der Apoptose-Induktion durch die Infektion mit HSV-1, in den A172-Gliomzellen hingegen führte die Infektion mit der US3-Deletionmutante zu Apoptose-Induktion.

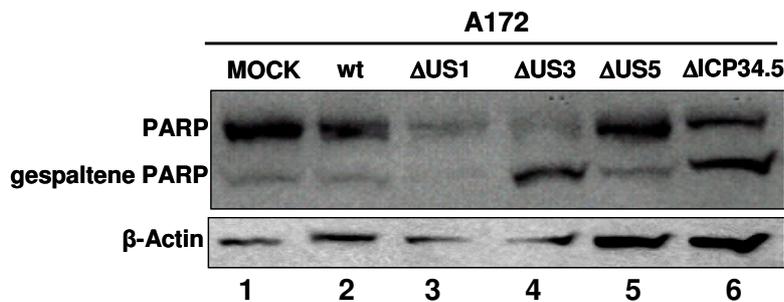


Abb. 30: Apoptose-Induktion (PARP-Spaltung) in A172-Zellen nach Infektion mit HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺)ΔUS1, HSV-1(17⁺)ΔUS3, HSV-1(17⁺)ΔUS5, HSV-1(17⁺)ΔICP34.5.

(A) A172 Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert. 24 h p.i. wurde die Apoptose-Induktion mit Hilfe eines PARP-spezifischen Antikörpers detektiert. Der Nachweis von β-Actin diente der Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Zum Nachweis der Infektion wurde ein Thymidinkinase (Tk)-Antikörper verwendet. Die erwarteten Banden lagen bei 116 kDa (PARP), 89 kDa (gespaltene PARP), 37 kDa (Tk) bzw. 45 kDa (β-Actin).

4.5.4 Apoptose-Inhibition von HSV-Deletionsmutanten nach intrinsischer Apoptose-Induktion

Der HSV-1 Wildtyp ist nicht nur fähig die Apoptose während der Virusinfektion zu blockieren, sondern HSV-1 kann auch extern induzierte Apoptose in infizierten Zellen unterbinden (Aubert *et al.*, 1999; Galvan & Roizman, 1998). Um zu klären, ob die HSV-1-Deletionsmutanten diese Fähigkeit noch besitzen, wurde die Apoptose in HEP-2-Zellen zusätzlich extern induziert. Dazu wurde der Topoisomerase II Inhibitor Etoposid (ETO) genutzt. Etoposid wird in der Tumorthherapie solider Tumore eingesetzt, und induziert

Apoptose durch die Aktivierung der Caspasen über den intrinsischen Signalweg (Perkins *et al.*, 1998). Siitonen *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Etoposid-induzierte Apoptose nicht mit dem Todesrezeptor-abhängigen Signalweg assoziiert ist.

Um die Dauer der Behandlung mit Etoposid zu ermitteln, bis ein Apoptose-Nachweis anhand vom gespaltenen PARP möglich ist, wurden in einem Vorexperiment die HEP-2-Zellen unterschiedlich lange mit Etoposid behandelt (Abb. 32). Bereits 8 h nach der Zugabe von Etoposid (Abb. 32, Spur 4) konnte eine PARP-Spaltung detektiert werden, welche sich mit zunehmender Behandlungsdauer verstärkte. Der deutlichste Nachweis der Apoptose gelang nach einer 12- bis 24-stündigen Behandlung mit Etoposid (Abb. 32, Spur 5 u. 6).

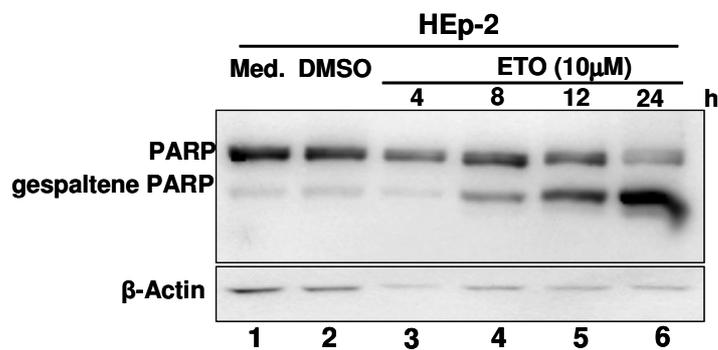


Abb. 31: Externe Apoptose-Induktion mit Etoposid (ETO) in HEp-2-Zellen.

HEp-2-Zellen wurden für 4, 8, 12 oder 24 h mit Etoposid (10 μM) behandelt und anschließend lysiert. Die Apoptose-Induktion wurde mit Hilfe eines PARP-spezifischen Antikörpers detektiert. Der Nachweis von β-Actin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

In den anschließenden Apoptose-Versuchen wurden infizierte HEp-2-Zellen 6 h nach der Infektion mit Etoposid behandelt. Die externe Apoptose-Induktion erfolgte zu diesem Zeitpunkt, da die anti-apoptotischen Gene vom Wildtyp-HSV-1 bereits 6 h nach Infektion synthetisiert sind (Koyama & Adachi, 1997; Aubert *et al.*, 1999). Die Induktion der Apoptose wurde 24 h p.i. und somit nach 18-stündiger Behandlung mit Etoposid untersucht (Abb. 32). Nicht infizierte Zellen (MOCK), die mit Etoposid behandelt worden waren, zeigten erneut deutliche PARP-Spaltung (Abb. 32, vergleiche die Spuren 1 u. 3). Die ΔICP34.5-infizierten Zellen zeigten erneut geringfügig Apoptose-Induktion, allerdings konnten keine erhöhten Mengen von gespaltenen PARP nach der zusätzlichen externen Induktion der Apoptose durch Etoposid detektiert werden (Abb. 32, vergleiche die Spuren 16 u. 18). Wildtyp-Virus sowie ΔUS1- und ΔUS5-infizierte Zellen zeigten hingegen keine Induktion der Apoptose nach Behandlung mit Etoposid. In keinem der Zelllysate konnte gespaltenes PARP detektiert werden (Abb. 32, Spuren 6, 12, 15). Sowohl das Wildtyp-Virus als auch die US1- und US5-Deletionsmutanten konnten offensichtlich die zusätzlich extern induzierte Apoptose

inhibieren. Die Deletion des US1- und US5-Gens hatte somit auch nach extern durch ETO ausgelöster Apoptose-Induktion keinen Verlust der inhibitorische Aktivität zur Folge. Im Gegensatz dazu konnte erneut gespaltene PARP und somit Apoptose-Induktion in den Δ US3-infizierten Zellen nachgewiesen werden, sowohl in den unbehandelten als auch in den mit Etoposid behandelten infizierten Zellen (Abb. 32, Spuren 7-9). Die US3-Deletionsmutante konnte auch die extern durch Etoposid induzierte Apoptose nicht blockieren.

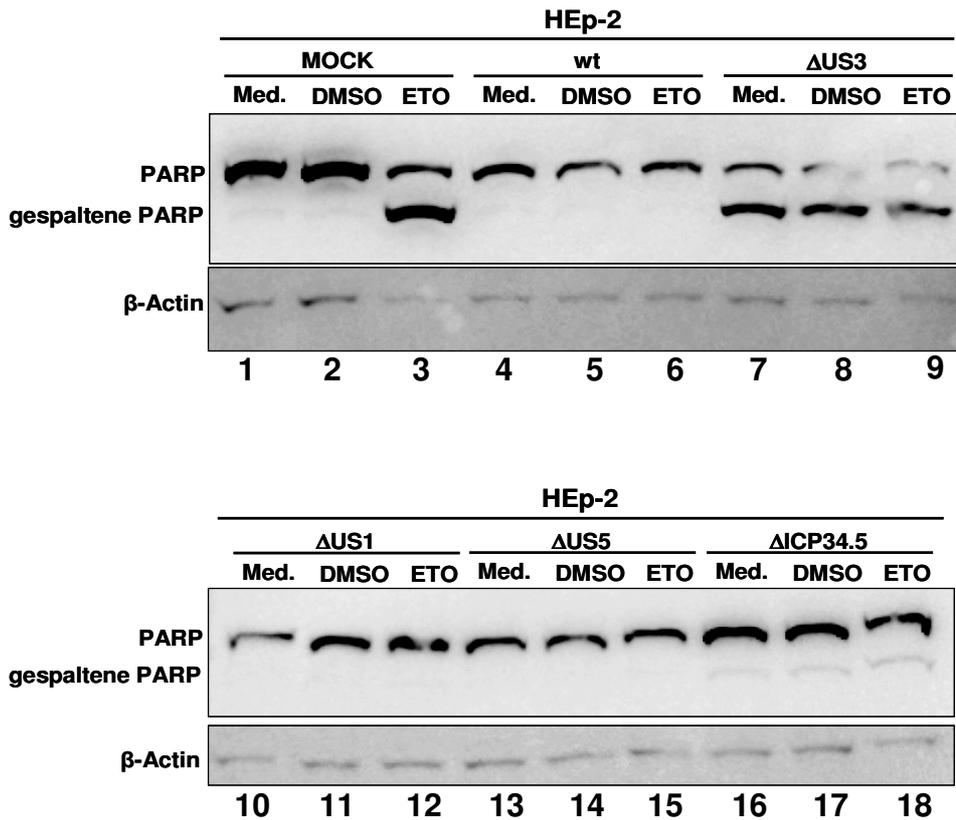


Abb. 32: Externe Apoptose-Induktion mit Etoposid (ETO) in infizierten HEp-2 Zellen.

HSV-1(17⁺) wt, HSV-1(17⁺) Δ US1, HSV-1(17⁺) Δ US3, HSV-1(17⁺) Δ US5, HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 bzw. MOCK- infizierte HEp-2 Zellen wurden 6 h p.i. mit 10 μ M Etoposid behandelt. 24 h p.i. wurde die Apoptose-Induktion mit Hilfe eines PARP-spezifischen Antikörpers detektiert. Der Nachweis von β -Actin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Zur Überprüfung, ob die Apoptose-Induktion der HSV-1(17⁺) Δ US3-Mutante in HEp-2 Zellen einen Einfluss auf die virale Vermehrung hat, und ob die zusätzliche Apoptose-Induktion durch Etoposid diese noch weiter beeinflusst, wurden die Wachstumseigenschaften in HEp-2 Zellen untersucht. Dazu wurden HEp-2 Zellen mit dem HSV-1(17⁺) Wildtyp-Virus und der US3-Deletionsmutante mit einer MOI von 5 infiziert (Abb. 33). Sowohl die HSV-1(17⁺) Δ US3-infizierten als auch die Wildtyp-infizierten HEp-2 Zellen zeigten nach der Zugabe des

externen Apoptose-Stimulus Etoposid bis zu 24 h p.i. keine Veränderungen in der Vermehrungsrate, im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten infizierten Zellen. Mit zunehmender Expositionsdauer konnten sowohl bei Wildtyp- als auch Δ US3-infizierten Zellen eine geringfügig verringerte Vermehrungsrate der mit Etoposid behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Zellen beobachtet werden. Das Wachstumsverhalten der Δ US3-Mutante war allerdings im Vergleich zum Wildtyp-Virus ohnehin stark attenuiert. Die Titer der Δ US3-Mutante waren verglichen mit dem Wildtyp-Virus um das Zwanzigfache reduziert.

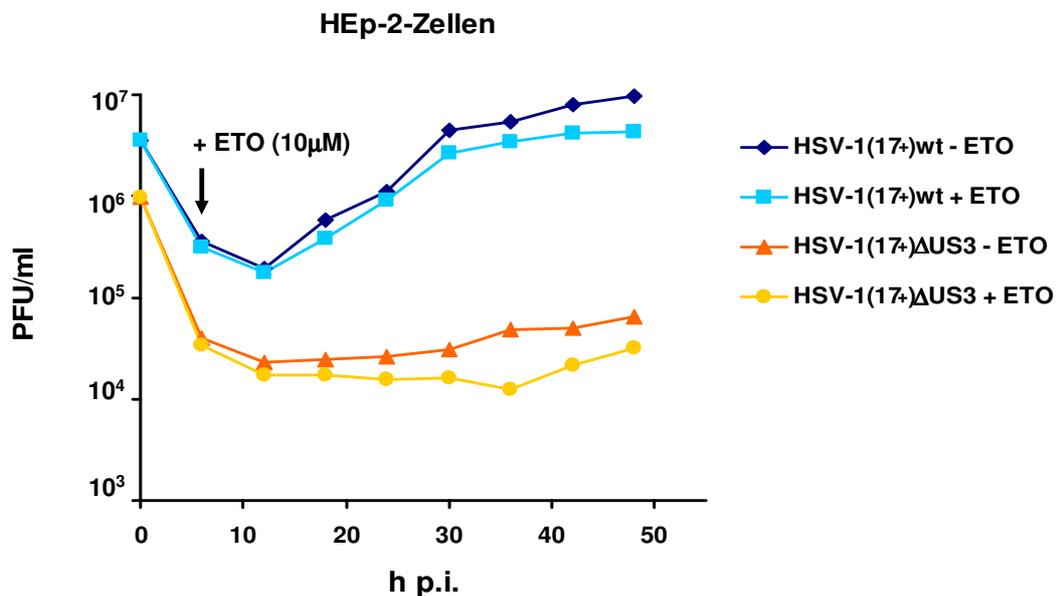


Abb. 33: Wachstumskurven von HSV-1(17⁺)wt und HSV-1(17⁺) Δ US3 auf HEp-2 Zellen unter Einfluss von Etoposid.

HEp-2 Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert. Durch Zugabe von Etoposid (10 μ M) 6 h nach der Infektion wurde Apoptose induziert. Proben aus dem Zellkulturüberstand wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und die Titer durch Plaque-Titration auf Vero-Zellen bestimmt. Die Standardabweichungen der Titer von jeweils drei parallelen Kulturen sind aber aufgrund der geringen Abweichung nicht sichtbar.

Die Gliomzelllinie U251 hatte sich in den zuvor durchgeführten Experimenten als resistent gegenüber der HSV-1-bedingten Apoptose erwiesen. Um zu überprüfen, ob U251-Zellen ebenfalls resistent gegen die extern induzierte Apoptose durch Behandlung mit Etoposid sind, wurden diese unterschiedlich lange mit Etoposid (10 μ M) behandelt (Abb. 34). Auch nach externer Induktion der Apoptose durch Etoposid konnte keine gespaltene PARP und somit keine Induktion der Apoptose gezeigt werden. U251-Zellen sind somit auch gegen die extern durch Etoposid induzierte Apoptose resistent.

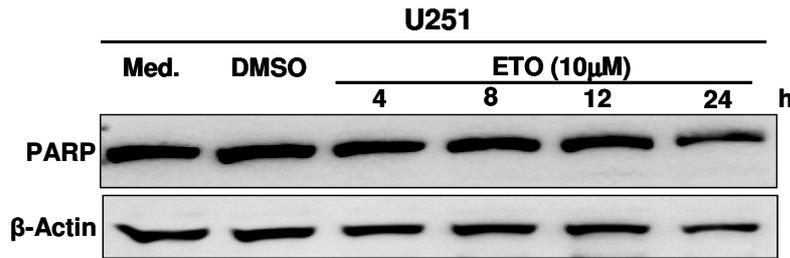


Abb. 34: Externe Apoptose-Induktion mit Etoposid (ETO) in U251-Zellen.

U251 Zellen wurden für 4, 8, 12 oder 24 h mit Etoposid (10 μ M) behandelt und anschließend lysiert. Detektion der Apoptose-Induktion erfolgte durch Immunoblotting. Der Nachweis von β -Actin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

4.5.5 Apoptose-Inhibition durch HSV-1 Deletionsmutanten nach extrinsische Induktion

Zur Induktion der Apoptose über den extrinsischen Signalweg wurde ein monoklonaler anti-CD95-Antikörper verwendet. Unter physiologischen Bedingungen wird der CD95/FAS-Todesrezeptor durch die Bindung eines spezifischen Liganden, dem CD95-Liganden (APO-1L/FasL), aktiviert. Der agonistisch wirkende α -CD95-Antikörper induziert *in vitro* in verschiedenen CD95/Fas-exprimierenden Zelllinien Apoptose (Miyawaki et al. 1992, Yoshino et al. 1994, Yonehara et al. 1994). Jerome *et al.* (1999) konnten zeigen, dass Wildtyp-Virus-infizierte Jurkat-T-Zellen vor der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose-Induktion geschützt sind, während die Deletion des US5-Gens diesen Schutz deutlich reduziert. Die HSV-1(F)-US5-Deletionsmutante RAS116 war unfähig die CD95-induzierte Apoptose in Jurkat-T-Zellen zu verhindern (Jerome *et al.*, 1999; Jerome *et al.*, 2001). Mit den folgenden Experimenten sollte die Fähigkeit der verschiedenen Deletionsmutanten, aber vor allem der US5-Deletionsmutante getestet werden, die durch den extrinsischen Signalweg induzierte Apoptose zu blockieren. Für die extrinsische Induktion der Apoptose wurde die Fas/CD95-exprimierende humane Jurkat-T-Zelllinie verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Deletionsmutanten nach externer Induktion des extrinsischen Todesrezeptor-vermittelten Signalwegs wurden Jurkat-T-Zellen vor der Behandlung mit dem anti-CD95-Antikörper mit einer MOI von 10 infiziert. Die externe Induktion des extrinsischen Signalwegs der Apoptose erfolgte durch die Behandlung mit dem monoklonalen α -CD95-Antikörper für 5 h. Die Apoptose wurde anschließend durch durchflusszytometrische Messung der Färbung mit Annexin V-FITC und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) detektiert. Die Behandlung mit CD95-Antikörper führte in Jurkat-T-Zellen, verglichen zu unbehandelten Zellen zu einer deutlichen Apoptose-Induktion (Abb.

35). Bei unbehandelten Zellen betrug der Anteil apoptotischer Zellen von der Gesamtpopulation etwa 4% (Abb. 35 A4) gegenüber 90% vitaler Zellen (Abb. 35 A3). Durch die Behandlung mit dem α -CD95-Antikörper konnte in den Jurkat-T-Zellen Apoptose induziert werden, der Anteil der frühen apoptotischen Zellen lag bei 54% (Abb. 35 B4), der der spät apoptotischen oder nekrotischen Zellen bei 37% (Abb. 35 B2). Nur etwa 6% der Jurkat-T-Zellen überlebten die Apoptose-Induktion mit dem α -CD95-Antikörper (Abb. 35 B3). Die Infektion mit dem Wildtyp-Virus induzierte in 16% (Abb. 35 C4) der Zellen Apoptose und die Behandlung mit anti-CD95-Antikörper erhöhte den Anteil apoptotischer Zellen auf 36,3% (Abb. 35 D4). Der Anstieg der apoptotischen Zellen ist geringer als in unbehandelten Zellen, zudem wurden 27,4% (Abb. 35 D3) vitale Zellen nach der Behandlung, verglichen mit nur 6,1% (Abb. 35 B3) vitalen Zellen bei nichtinfizierten anti-CD95-Antikörper behandelten Zellen. Die HSV-1(17⁺) Δ US1 (Abb. 35 I u. J) und HSV-1(17⁺) Δ ICP34.5 Mutanten (Abb. 35 K u. L) verhielten sich wie Wildtyp-infizierten Zellen. Entgegen den Erwartungen zeigten auch HSV-1(17⁺) Δ US5-infizierte und mit CD95-Antikörper behandelte Zellen vergleichbare Werte mit dem Wildtyp-Virus (Abb. 35 F). Die Infektion mit HSV-1(17⁺) Δ US5 erzeugte einen Schutz der Jurkat-T-Zellen vor der FAS-vermittelten Apoptose-Induktion da etwa 30% der infizierten und behandelten Zellen (Abb. 35 F3) zeigten keine Anzeichen von Apoptose zeigten. HSV-1(17⁺) Δ US3-infizierte Zellen hingegen waren nicht fähig die durch die Behandlung mit anti-CD95-Antikörper induzierte Apoptose zu unterbinden (Abb. 35 H), nur 11% der Zellen (Abb. 35 H3) der Gesamtpopulation waren nicht apoptotisch oder nekrotische. Eine Auswertung dieser Ergebnisse war allerdings schwer, da die Infektion der Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

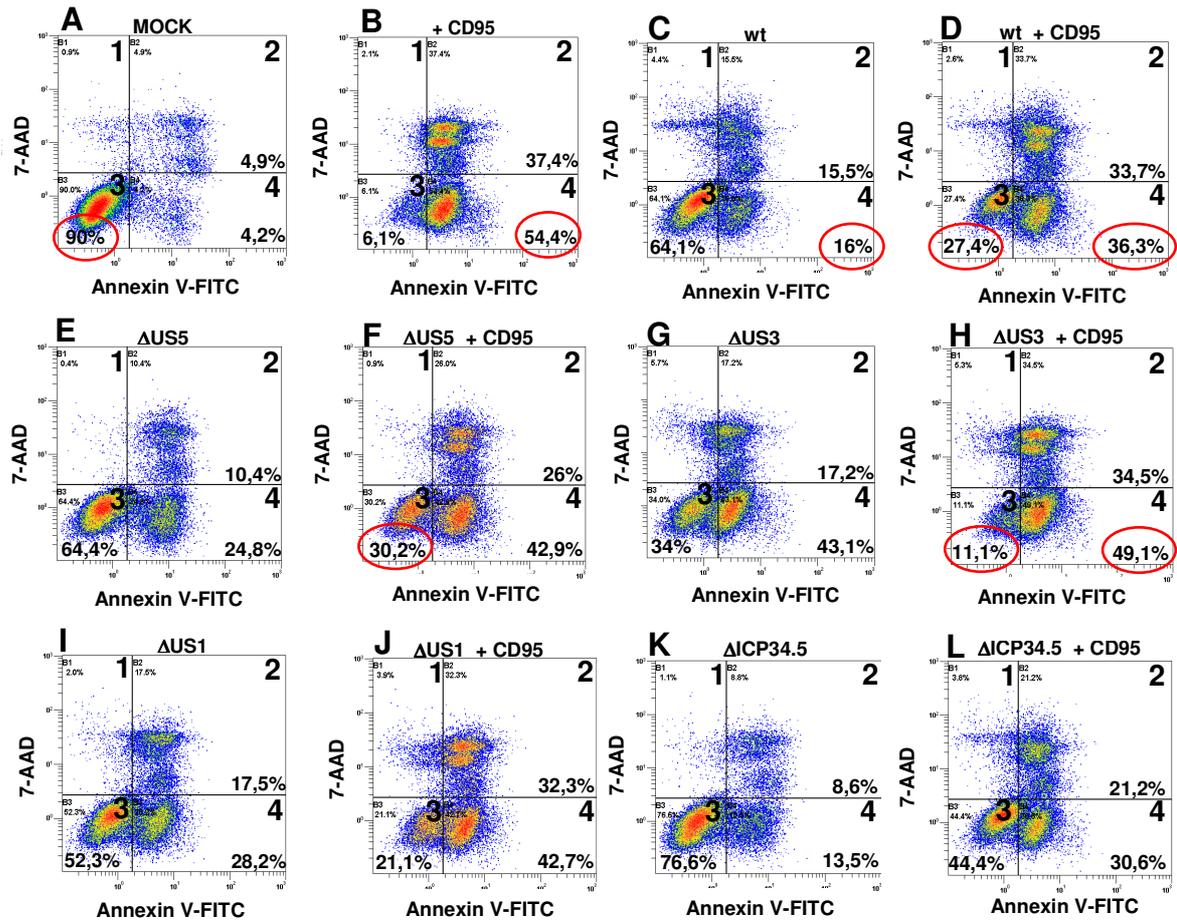


Abb. 35: Apoptose-Inhibition durch HSV-1-Deletionsmutanten nach externe Apoptose-Induktion mit anti-CD95-Antikörper in infizierten Jurkat-T-Zellen.

Die Jurkat-T-Zellen wurden mit einer MOI von 10 der verschiedenen Deletionsmutanten und dem Wildtyp-Virus infiziert. Die Induktion der Apoptose mit dem anti-CD95-Antikörper erfolgte 18 h nach Infektion für 5 h. Die Bestimmung der Apoptose erfolgte per durchflusszytometrische Bestimmung der Färbung mit Annexin V-FITC/7-AAD.

Hep-2 Zellen wurden ebenfalls auf ihre Sensitivität gegenüber der Induktion der FAS-vermittelten Apoptose durch die Behandlung mit einem anti-CD95-Antikörper getestet (Abb. 36), sowie die humane Gliomzelllinie U251 (Abb. 37). Unabhängig von der Konzentration des CD95-Antikörpers konnte keine gespaltene PARP und somit keine Apoptose-Induktion in HEp-2-Zellen nachgewiesen werden.

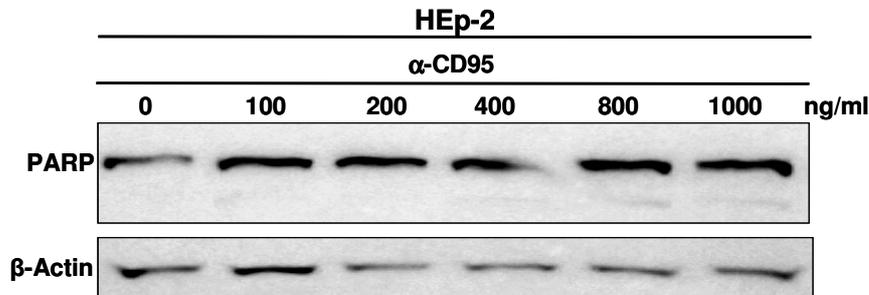


Abb. 36: Externe Apoptose-Induktion durch CD95-Antikörper in HEp-2 Zellen.

HEp-2 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des CD95-Antikörper (0-1000 ng/ml) für 24 h behandelt. Eine eventuelle Induktion der Apoptose wurde über die Spaltung der PARP untersucht.

Auch in den U251-Zellen konnte durch die Behandlung mit dem anti-CD95-Antikörper keine Apoptose induziert werden (Abb. 37). Es konnte kein gespaltenes PARP detektiert werden, unabhängig von der Konzentration des anti-CD95-Antikörpers. U251 und HEp-2 Zellen sind somit resistent gegenüber der extern über den FAS-Rezeptor-vermittelten Signalweg induzierten Apoptose.

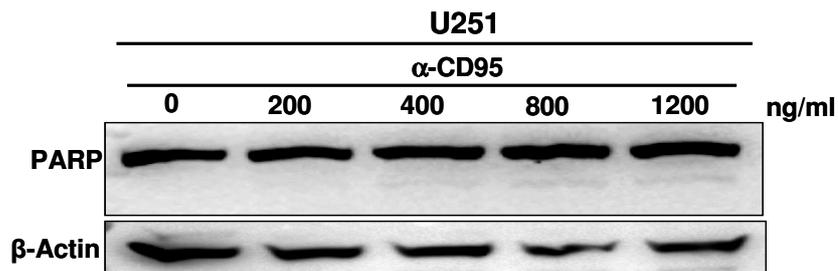


Abb. 37: Externe Apoptose-Induktion durch CD95-Antikörper in U251-Zellen.

U251-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen CD95-Antikörper (200-1200 ng/ml) für 24 h behandelt. Die Induktion der Apoptose wurde über die Spaltung der PARP bestimmt.

5 Diskussion

Die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden für die hochgradig therapieresistenten malignen Gliome stellt eine große Herausforderung an die Forschung dar. Onkolytische Viren, die selektiv Tumorzellen infizieren oder in ihnen replizieren, besitzen ein großes Potential als therapeutisches Agens. Das Herpes Simplex-Virus Typ 1 ist für die Behandlung von Gliomen von besonderem Interesse, da es einen natürlichen Tropismus für neuronale Zellen aufweist, das Genom komplett sequenziert ist und die schnelle lytische Replikation des Virus die Wirtszellen effizient zerstört. Die Klonierung des HSV-1 Stamm 17⁺ als künstliches bakterielles Chromosom (*bacterial artificial chromosom*, BAC) in *E. coli* (Nagel *et al.*, 2007) ermöglichte die gezielte Mutagenese des HSV-1-Genoms mit den Methoden der Bakteriengenetik, wodurch die effiziente Herstellung neuer onkolytischer Herpes Simplex-Viren möglich wurde. Konventionelle Mutageneseverfahren, die auf die Rekombination in eukaryotischen Zellen beruhen, sind im Vergleich dazu wesentlich zeit- und arbeitsaufwendiger.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der homologen Rekombination in *E. coli* neue onkolytische Herpes Simplex-Viren durch die Deletion der Apoptose-Inhibitor-Gene US1, US3 bzw. US5 hergestellt. Diese neuen onkolytischen HSV-1(17⁺)-Rekombinanten wurden auf ihr Wachstumsverhalten in Gliom- und primären Zellen untersucht, sowie deren Fähigkeit bestimmt die Apoptose zu inhibieren.

5.1 Klonierung von HSV-1 Stamm 17⁺-Rekombinanten mit Wildtyp-Eigenschaften

Ein einzigartiger Vorteil des Herpes Simplex-Virus gegenüber anderen Viren wie Adeno- oder Retroviren für den Einsatz als onkolytisches Virus in der Tumorthherapie liegt in der Verfügbarkeit effektiver anti-viraler Medikamente. Für die Entwicklung der neuen onkolytischen Herpes Simplex-Viren war es aus Sicherheitserwägungen unerlässlich, das bei der initialen BAC-Insertion zerstörte Thymidinkinase-Gen des HSV-1(17⁺)blue-BAC zu rekonstituieren, da die virale Thymidinkinase die Sensitivität gegenüber den anti-viralen Medikamenten Acyclovir und Ganciclovir vermittelt. Roizman & Knipe (2001) zeigten, dass die Thymidinkinase zwar nicht essentiell für die Replikation *in vitro*, aber für die Replikation *in vivo* ist und da auch die Deletion von *in vitro* nicht essentiellen viralen Genen zu einer Attenuierung *in vivo* führen kann (Wagner *et al.*, 1999), wurde das Thymidinkinase-Gen in das BAC-Genom reinsertiert. Die derzeit existierenden und in klinischen Studien befindlichen onkolytischen Herpes Simplex-Viren (G207 und HSV1716) zeigen eine signifikante Attenuierung gegenüber dem Wildtyp-Virus, weshalb deren Wirksamkeit stark eingeschränkt

ist (Kirn *et al.*, 2001). Bei der Entwicklung der onkolytischen Herpes Simplex-Viren in dieser Arbeit sollte daher von einem Virus ausgegangen werden, welches weitgehend identische Eigenschaften zum Wildtyp-Virus aufwies, um eine möglichst hohe onkolytische Aktivität zu erreichen.

Ebenso führte die BAC-Insertion in einigen anderen als BAC-klonierten Herpesviren (Messerle *et al.*, 1997; Smith & Enquist, 1999) zu einer Attenuierung der aus den BACs rekonstituierten Viren verglichen zu den entsprechenden Wildtyp-Viren. Nagel *et al.* (2007) fanden für das vom pHSV-1(17⁺)blue-BAC rekonstituierte Virus einen zehnfach niedrigeren Endtiter bezogen auf das Wildtyp HSV-1(17⁺)-Virus. Möglicherweise beeinflusst die BAC-Insertion die Expression benachbarter Gene oder die Effizienz der Verpackung des durch die BAC-Insertion vergrößerten Genoms (Adler *et al.*, 2000; Smith & Enquist, 1999; Yu *et al.*, 2002). Smith und Enquist (2000) berichteten außerdem, dass die BAC-Vektor-Sequenz im Pseudorabies Virus-Genom während der Infektion von Säuger-Zellen instabil ist, wodurch es zur spontanen Deletion der BAC-Vektor-Sequenz und umgebenden viralen Sequenzen kommen kann. Eine Instabilität der BAC-Vektor-Sequenz wurde für das vom BAC pHSV-1(17⁺)blue abgeleitete Virus allerdings nicht beobachtet (C. Nagel, MHH; persönliche Mitteilung). Um einer Attenuierung der Viren durch die zusätzlichen BAC-Gene entgegenzuwirken, wurden die BAC-Vektor-Sequenzen mit Erkennungsstellen (loxP-Stellen) für die Cre-Rekombinase flankiert, sowie das Cre-Rekombinase-Gen in den Vektor inseriert. Da der kodierende Bereich des inserierten Cre-Rekombinase-Gens durch ein Intron unterbrochen ist, erfolgte in *E. coli* keine vorzeitige Expression und der BAC-Vektor blieb in den Bakterien stabil. Erst nach Transfektion in eukaryotische Zellen kam es zur Expression der Cre-Rekombinase. Die Cre-vermittelte Rekombination der loxP-Stellen führte dann zur Eliminierung der durch die loxP-Stellen flankierten BAC-Vektor-Sequenzen. So entstanden nach Transfektion des resultierenden BAC pHSV-1(17⁺)Lox in permissive Zellen Viren mit einem dem Wildtyp-Virus entsprechenden Genom.

5.1.1 Charakterisierung der Genomstruktur der BAC-Klone

Restriktionsanalysen mit verschiedenen Enzymen zeigten, dass die sukzessive Flankierung der BAC-Vektor-Sequenz mit loxP-Stellen durch homologe Rekombination in *E. coli* erfolgreich war. Ebenso konnte das virale Thymidinkinase-Gen erfolgreich mittels homologer Rekombination in *E. coli* im BAC-Genom rekonstituiert werden. Die ET-Mutagenese-Methode zeichnet sich dabei durch ihre Präzision und Schnelligkeit aus. Die, durch die Veränderungen des BAC-Genoms, erwarteten Fragmente konnten nach jedem Mutagenese-Schritt nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich bei der Restriktionsanalyse mit MfeI Unterschiede zwischen der publizierten Sequenz des HSV-1(17⁺) und der Sequenz

der BAC-Klone. Bei der Restriktionsspaltung der BAC-Klone mit MfeI fehlten vier vorhergesagte Fragmente (15,0; 6,8; 5,7 und 5,3 kb). Eine Restriktionsanalyse mit BamHI und MfeI zeigte, dass zwei vorhergesagten MfeI-Schnittstellen, die im internen *Repeat* bzw. terminalen *Repeat* lokalisiert sein sollten, bereits schon in dem parentalen BAC HSV-1(17⁺)blue nicht vorhanden sind (Daten nicht gezeigt). Durch das Fehlen der zwei MfeI-Schnittstellen entstanden stattdessen im MfeI-Restriktionsmuster zwei neue, durch Fusion vergrößerte Fragmente (20,3 und 12,5 kb). Bei der Spaltung der BAC-DNA mit anderen Enzymen konnten keine Veränderungen der Fragmentgrößen in dem Bereich der fehlenden MfeI-Schnittstellen beobachtet werden und so gehen wir davon aus, dass das Fehlen der MfeI-Schnittstellen auf keine größere Deletion im Genom zurückgeht, sondern möglicherweise auf einen Fehler bzw. eine Veränderung in der Sequenz der HSV-1 Stamm 17⁺.

5.2 Markierung des pHSV-1(17⁺)Lox Genoms mit einem Luciferase-Gen

In den letzten Jahren hat das Verfahren der Biolumineszenz deutlich an Bedeutung gewonnen. So wird die biolumineszente Bildgebung im Tiermodell erfolgreich zur Darstellung von Tumorwachstum bzw. -proliferation und Metastasierung sowie zur Untersuchung der Wirksamkeit von Therapieverfahren eingesetzt (Edinger *et al.*, 2002; Gross & Piwnica-Worms, 2005; Rehemtulla *et al.*, 2000, Söling *et al.*, 2004). Die Verwendung der Biolumineszenz als nicht-invasives bildgebendes Verfahren zur Beurteilung der onkolytischen Aktivität der neuen HSV-Vektoren, nutzt den Umstand, dass die Menge der emittierten Photonen proportional zur Expressionsrate des Reporterproteins Luciferase ist (Benaron *et al.*, 1995; Contag *et al.*, 1998; Contag *et al.*, 1997). Die Markierung der neuen onkolytischen Herpes Simplex-Viren mit dem *firefly*-Luciferase-Gen ermöglicht somit die Beurteilung der Virusausbreitung und Vermehrung. Um den Therapieerfolg der, in dieser Arbeit hergestellten onkolytischen Herpes Simplex-Viren in späteren Experimenten im *in vivo* Mausmodell beurteilen zu können, wurden von unserer Kooperations-Arbeitsgruppe A. Söling (Universität Göttingen) Gliomzellen mit einem *renilla*-Luciferase-Reporter gen markiert und ein subkutanes Gliom-Modell in der Maus etabliert (Söling *et al.*, 2004). Die Markierung sowohl der Tumorzellen, als auch der neuen onkolytischen Herpes Simplex-Viren mit unterschiedlichen Luciferase-Reporter genen ermöglicht die parallele Verfolgung der onkolytischen Herpes Simplex-Viren bei gleichzeitiger Bestimmung der Tumorgroße über längere Zeiträume im lebenden Tier. Aufgrund der hohen Sensitivität des Reportersystems können auch kleinste Veränderungen erfasst werden. Szentirmai *et al.* (2006) konnten bei stabil Luciferase-exprimierenden U87MG-Zellen *in vitro* minimal 40 U87MG-Luc Zellen

detektieren, welches die hohe Sensitivität der biolumineszenten Bildgebung widerspiegelt. Ein weiterer Vorteil des Systems liegt darin, dass *in vitro* und *in vivo* praktisch keine Hintergrundaktivität vorhanden ist, da die Luciferase in Säugetierzellen nicht vorkommt. Allerdings kommt es *in vivo* zu einer Absorption und Streuung des emittierten Lichts durch die verschiedenen Gewebeschichten. So ist bekannt, dass z.B. Hämoglobin-Moleküle die blau-grünen Anteile des Luciferase-Spektrums absorbieren (Hastings, 1983). Nach den Arbeiten von Massoud et al. (2002) geht man von einem 10-fachen Signalverlust pro cm Gewebetiefe aus. Aufgrund dessen wurde für die Markierung der Viren die Expression der *firefly*-Luciferase unter die Kontrolle der starken CMV *Major Immediate-Early*-Promotor (MIEP) gesetzt, um eine möglichst hohe Expression der Luciferase zu erreichen. Der CMV-MIEP ist aufgrund seiner sehr starken Expression in verschiedenen Zelltypen, die nur geringsten Schwankungen unterworfen ist, besonders bevorzugt. Eine andere Möglichkeit wäre gewesen, die Expression der Luciferase unter die Kontrolle des ebenfalls starken HSV-Promotors des *immediate early*-Proteins ICP4 zu stellen. Allerdings könnten durch den HSV-Replikationszyklus Schwankungen der Expression der Luciferase auftreten. Daher wurde das *firefly*-Luciferase-Gen zusammen mit dem CMV-MIEP-Promotor und einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in das BAC-Genom des pHSV-1(17⁺)Lox zwischen die viralen Gene UL55 und UL56 inseriert. Diese Region des Genoms wurde ausgewählt, da die Gene eine *tail-to-tail* Orientierung aufweisen. Eine Veränderung des HSV-Genoms an dieser Stelle sollte die Eigenschaften von HSV nicht beeinflussen. Eine Insertion des Luciferase-Gens zwischen den Genen UL3 und UL4 des HSV-Genoms wäre ebenso möglich gewesen. Tanaka et al. (2003) zeigten, dass eine Veränderung des HSV-Genoms an dieser Stelle die Eigenschaften von HSV nicht beeinträchtigt.

Restriktionsanalysen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen bestätigten die erfolgreiche Insertion des Luciferase-Gens zusammen mit den FRT-Stellen flankierten Selektionsmarker in das BAC-Genom des pHSV-1(17⁺)Lox, sowie die anschließende Deletion der Kanamycinresistenz-Kassette. Die durch die Insertion des Luciferase-Gens erwarteten Fragmente konnten in jeder der drei unabhängigen Restriktionsanalysen nachgewiesen werden. Weitere Veränderungen der DNA hingegen waren nicht zu beobachten. Dieses BAC-klonierte HSV-Genom mit dem *firefly*-Luciferase-Gen diente als Basis für die Herstellung der onkolytischen Herpes Simplex-Viren, wodurch die abgeleiteten HSV-Vektoren durch die Biolumineszenz-Messung verfolgbar waren.

5.2.1 Rekonstitution von Virus

Nach der Konstruktion der BAC-Mutanten wurde Virus durch die Transfektion in permissive Zellen rekonstituiert. Erste cytopathische Effekte konnten 2-3 Tage nach der Transfektion

beobachtet werden. Die Zellen rundeten sich ab und Plaques entstanden, allerdings anfänglich nur wenige (5-10 Plaques/10 cm Zellkulturschale). Die Effektivität der Rekonstitution war gering, wahlmöglich durch die Größe der BAC-DNA oder durch Unreinheiten in den DNA-Präparationen. Allerdings hob sich die geringe Effektivität der Transfektion durch die schnelle, effiziente Replikation der rekonstituierten Viren auf.

5.2.2 Analyse der Luciferase-exprimierenden Viren

Bei der Rekonstitution der Luciferase-exprimierenden HSV-Rekombinanten in permissiven Zellen, kommt es zur Expression der in den BAC-Vektor inserierten Cre-Rekombinase. Die Cre-Rekombinase katalysierte homologe Rekombination der loxP-Stellen führte zur erfolgreichen Eliminierung der loxP-Stellen flankierten BAC-Vektor-Sequenz aus dem Virusgenom. Die Eliminierung der BAC-Vektor-Sequenz war aus verschiedenen Gründen wichtig. Zum einen sollte ein eventuell störender Einfluss auf die benachbarten Gene ausgeschlossen werden, zum anderen sollte die normale Größe des HSV-Genoms nicht überschritten werden, um einer Attenuierung der Viren vorzubeugen. Die Restriktionsanalyse mit EcoRI der HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus-DNA und der pHSV-1(17⁺)Lox-luc BAC-DNA zeigten, dass die BAC-Vektor-Sequenz effizient und vollständig aus dem Genom ausgeschnitten wurde. Das Verfahren die Cre-Rekombinase mit dem BAC selbst zu exprimieren, erwies sich somit als effektive Methode die BAC-Vektor-Sequenz aus dem Genom zu entfernen. Zusätzlich zur Exzision der BAC-Vektor-Sequenz konnte keine weiteren unspezifischen Deletionen durch die Restriktionsanalyse festgestellt werden. Das Genom des vom pHSV-1(17⁺)Lox-luc BAC rekonstituierte Virus HSV-1(17⁺)Lox-luc beinhaltet einzig eine im Genom verbleibende loxP-Stelle nach der Exzision der BAC-Vektor-Sequenz sowie das zusätzliche Luciferase-Gen und ist somit um etwa 2,7 kb vergrößert verglichen mit dem Wildtyp-Virus-Genom. Da die Mutagenese von Herpesviren abhängig von der Größe der Deletion oder Insertion zu deren Attenuierung führen kann (Miller *et al.*, 2003; McMenamin *et al.*, 1998) wurden Wachstumsanalysen der rekonstituierten Luciferase-exprimierenden Viren durchgeführt. Die Wachstumskinetiken des Wildtyp-Virus und des HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus zeigten keine Unterschiede, sowohl bei einer MOI von 5 als auch bei einer niedrigen MOI von 0,05. Bei der Verwendung einer niedrigen MOI können normalerweise selbst geringfügige Unterschiede im Wachstumsverhalten der Virusmutanten deutlich herausgestellt werden. Da dies bei den Luciferase-exprimierenden Viren nicht der Fall ist, scheint die Vergrößerung des Genoms durch die Insertion des 2,645 kb großen Luciferase-Gens nicht zu einer Attenuierung des Virus zu führen. Entsprechende Beobachtungen wurden von Warner *et al.* (1998) gemacht, wo eine Vergrößerung des Genoms des HSV-1(KOS)tk12 Virus um etwa 3,5 kb ebenfalls

keine Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mutante hatte. Die Expression der Luciferase scheint somit ebenfalls nicht zur Beeinträchtigung der Expression essentieller viraler Gene zu führen, die sich durch ein verändertes Wachstumsverhalten gezeigt hätte. Luciferase-Expressionsanalysen zeigten, dass das in das Genom inserierte Luciferase-Gen funktionell ist, da die rekonstituierten HSV-1(17⁺)Lox-luc Viren Luciferase in Abhängigkeit der Virusmenge exprimierten. Da die Luciferase in Säuger-Zellen als nicht-toxisch gilt, kann auch durch die Expression der Luciferase durch das Virus auch kein negativer Einfluss auf die Zellen erwartet werden.

Die erfolgreiche Wiederherstellung des Thymidinkinase-Gens im BAC-Genom konnte ebenfalls nach der Rekonstitution von Virus nachgewiesen werden. Die rekonstituierten HSV-1(17⁺)Lox-luc Viren wurden auf ihre Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Acyclovir getestet und zeigten eine deutlich unter dem von Safrin *et al.* (1994) festgelegten Schwellenwert (2 µg/ml Acyclovir) gelegene Suszeptibilität gegenüber Acyclovir. Bei dem parentalen Thymidinkinase-negativen BAC pHSV-1(17⁺)blue hingegen war selbst bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml Acyclovir nur eine Verringerung der Plaqueanzahl auf etwa 60% messbar. Das Luciferase-exprimierenden Virus, das von dem pHSV-1(17⁺)Lox-luc BAC rekonstituiert wurde, zeigte im Vergleich zum dem vom parentalen BAC pHSV-1(17⁺)blue abgeleiteten Thymidinkinase-negativen Virus eine deutliche Empfindlichkeit gegen Acyclovir. Die Empfindlichkeit des HSV-1(17⁺)Lox-luc Virus entsprach der des Wildtyp-Virus. Die Reinsertion des Thymidinkinase-Gens war nicht trivial, da zuvor sehr akkurat die im Genom verbliebenen Reste der, durch die Insertion der BAC-Vektor-Sequenz zerstörten Thymidinkinase, entfernt werden mussten. In HSV-Genom liegen die Gene sehr eng geclustert vor und daher musste bei der Entfernung der Reste auf das eng benachbarte Gen des essentiellen Glycoproteins gH sowie dessen Promotor geachtet werden.

5.3 Herstellung der Apoptose-Inhibitor-Gen Deletionsmutanten

Aufbauend auf der Überlegung, dass Herpes Simplex-Viren die Apoptose-Inhibitoren in Tumorzellen mit veränderten Apoptose-Signalwegen nicht benötigen, wurden in dieser Arbeit durch die Deletion der HSV-1 Apoptose-Inhibitor-Gene neue onkolytische Herpesvirus-Vektoren gewonnen. Für normale Zellen wurde erwartet, dass die Zerstörung der Apoptose-Inhibitor-Gene zu einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber der, durch das Virus selbst induzierten Apoptose führen würde, wodurch die Vermehrung der Viren in primären Zellen begrenzt würde, während die Vermehrung in Apoptose-resistenten Tumorzellen nur minimal beeinflusst sein sollte. Durch die Mutationen der Apoptose-Signalwege in solchen Tumorzellen sollte es nicht zu Apoptose-Induktion kommen und die virale Replikation in diesen Zellen könnte ungehindert voranschreiten und so schlussendlich

zu ihrer Lyse führen.

Die einzelnen HSV-1 Apoptose-Inhibitor-Gene US1, US3 und US5 wurden jeweils durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in das entsprechende Gen des pHSV-1(17⁺)Lox-Luc BAC-Genoms deletiert. Restriktionsanalysen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen bestätigten die Deletion der Apoptose-Inhibitor-Gene im BAC-Genom. Die durch die Insertion des Sektionsmarkers entsprechend erwarteten Fragmente waren vorhanden. Eine Southern Blot Analyse mit einer spezifischen Sonde, die den Bereich zwischen den viralen Genen US3 und US5 detektiert, bestätigten die Deletion der verschiedenen Apoptose-Inhibitor-Gene im Virus-Genom der verschiedenen Deletionsmutanten nach der Rekonstitution der Viren von den BAC-klonierten Deletionsmutanten.

Zur Beurteilung der tumorselektiven Replikation und der Effektivität der Deletionsmutanten wurden die Wachstumseigenschaften der verschiedenen Deletionmutanten sowohl in primären HFF-Zellen als auch in verschiedenen humanen Gliomzellen bestimmt. Zum Vergleich der effektiven aber auch der tumor-spezifischen Replikation dienten das Wildtyp-Virus und ein dem G207-analoges Virus (Δ ICP34.5). Das G207-Virus das derzeit in klinischen Studien als onkolytisches Virus eingesetzt wird, ist aber stark attenuiert. Es war wünschenswert, dass die neu entwickelten onkolytischen Herpesviren gegenüber dem Δ ICP34.5-Virus eine verstärkte anti-tumorale Wirksamkeit ausweisen.

5.3.1 Wachstumsanalysen der G207-analogen ICP34.5-Deletionsmutante

Mineta *et al.* (1995) zeigten für das G207-Virus, dass es sich nur bis zu zehnfach niedrigeren Virustitern verglichen mit dem Wildtyp-Virus vermehren lässt. In dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse mit dem auf Basis des BAC pHSV-1(17⁺)Lox-luc hergestellten G207-analogen Δ ICP34.5-Virus zum Teil bestätigt werden. In U87MG-Zellen wurden etwa fünffach niedrigere Titer und eine verzögerte Kinetik des Δ ICP34.5-Virus verglichen mit dem Wildtyp-Virus nachgewiesen, während in U251-Gliomzellen zu frühen Zeitpunkten der Infektion eine vergleichbar Kinetik zum Wildtyp-Virus gezeigt wurde. Allerdings zeigte sich etwa 30 h p.i. eine Attenuierung des Δ ICP34.5-Virus, die Titer des Δ ICP34.5-Virus stiegen nicht weiter an, während das Wildtyp-Virus im weiteren Verlauf der Infektion zu bis zu zehnfach höheren Titern replizierte. In U118-Gliomzellen konnte für das Δ ICP34.5-Virus entgegen der Erwartung sogar eine beschleunigte Kinetik gegenüber dem Wildtyp-Virus und etwa fünffach erhöhte Titer gezeigt werden. Das Ergebnis der Wachstumskinetik in den U118-Zellen war überraschend, der Trend konnte aber in drei unabhängigen Experimenten wiederholt gezeigt werden. Diese Unterschiede in der Replikation-Effizienz der ICP34.5-Deletionsmutante beruhen zum einen auf den verschiedenen verwendeten Gliomzellen und

deren genetischen Diversität. Leider ist die U118 Gliomzelllinie sowohl histologisch als auch molekular kaum charakterisiert. Die U118-Gliomzellen zeigen keine besonderen morphologischen Auffälligkeiten, zeigen aber die, zu den anderen Gliomzelllinien, mit Abstand geringste Proliferationsrate. Dies deutet darauf hin, dass diesen Zellen von einem niedrig gradigen Gliom abstammen. Möglicherweise führen unterschiedliche Mutationen der Gliomzellen zu einem Wachstumsvorteil der ICP34.5-Deletionsmutante. Ein weiterer Unterschied des Δ ICP34.5-Virus zu dem existierenden G207-Virus ist das zusätzlich ins Genom inserierte Luciferase-Gen. Wie bereits erwähnt führt die Insertion zusätzlicher Gene aber eher zu einer Attenuierung des Virus durch die Vergrößerung des Genoms als zu einer verbesserten Replikation (Wagner *et al.*, 1999). Wachstumsanalysen der Luciferase-exprimierenden HSV-1(17⁺)Lox-luc Viren zeigten kein störender Effekt auf die Replikationsfähigkeit durch die Luciferase-Insertion gegenüber dem Wildtyp-Virus, somit kann eine verstärkte Replikation der ICP34.5-Deletionsmutante durch das zusätzliche Luciferase-Gen ausgeschlossen werden.

5.3.2 Wachstumsanalysen der US3-Deletionsmutante

Die Untersuchungen zur den *in vitro* Wachstumseigenschaften der US3-Deletionmutante zeigten, dass sich das Δ US3-Virus in primären HFF-Zellen zunächst mit einer dem Wildtyp-Virus entsprechenden Wachstums-Kinetik vermehrt, aber bereits 18 h p.i. zeigte sich eine deutliche Attenuierung der Δ US3-Mutante verglichen mit dem Wildtyp-Virus. Die Endtiter der US3-Deletionsmutante waren verglichen zu denen des Wildtyp-Virus um das Fünfzehnfache reduziert. Die verminderte Replikation der US3-Deletionsmutante ist vermutlich auf eine präferenziell in den primären Zellen durch die Virusinfektion induzierten Apoptose zurückzuführen, wodurch die Replikation und die Ausbreitung des Virus limitiert wird. Vergleiche der Wachstumseigenschaften des G207-analogen Δ ICP34.5-Virus und der US3-Deletionsmutante zeigten, dass die Replikation beider Viren in den primären HFF-Zellen vergleichbar erniedrigt ist. Die Replikation des Δ ICP34.5-Virus ist durch die Deletion des UL39-Gen, das für die virale Ribonukleotid-Reduktase (ICP6) codiert, und notwendig für die effiziente DNA-Replikation in sich nicht-teilenden Zellen ist, auf Zellen beschränkt die sich schnell teilen, wie Tumorzellen (Goldstein & Weller, 1998). Der Nachweis einer Apoptose-Induktion durch die Detektion des gespaltenen PARP in den HFF-Zellen konnte nicht erbracht werden, da die Proteinmengen zu gering waren. In zukünftigen Versuchen soll der Apoptose-Induktionsnachweis in primären HFF-Zellen über andere Nachweismethoden gezeigt werden. Denkbar wären Immunfluoreszenzuntersuchungen, oder der Nachweis der Aktivierung der Caspase-9 oder Caspase-6, sowie Detektion der DNA-Fragmentation.

Die Infektion mit dem Δ US3-Virus in HEp-2 führte hingegen zu einer nachweislichen Apoptose-Induktion (siehe Apoptose-Untersuchungen). In der Gliomzelllinie U87MG, die zur Bestimmung der Gliomspezifität des G207-Virus genutzt wurden, konnte eine vergleichbare Replikation der US3-Deletionsmutante mit dem Wildtyp-Virus gezeigt werden, während für das Δ ICP34.5-Virus eine Attenuierung nachgewiesen werden konnte. Diese verbesserte Replikation des Δ US3-Virus in U87MG-Zellen gegenüber dem Δ ICP34.5-Virus korreliert mit einer verbesserten anti-tumoralen Wirksamkeit des neuen onkolytischen Virus verglichen mit dem derzeit genutzten G207-Virus. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Liu *et al.* (2007) konnten übereinstimmenden Ergebnisse für eine US3-Deletionmutante des HSV-1 Stamm F (R7041) gezeigt werden. Lui *et al.* verglichen dabei die Replikation des G207- und des R7041-Virus auf verschiedenen normalen Zellen und konnten ebenfalls zeigen, dass die Replikation des R7041-Virus mit der des G207-Virus vergleichbar, aber gegenüber dem Wildtyp-Virus signifikant reduziert ist. In Vergleichen in verschiedenen Tumorzellen, darunter auch U87MG-Zellen, konnten sie ebenfalls eine verbesserte Replikation der R7041-Mutante gegenüber dem G207-Virus nachweisen. Entgegen den Ergebnissen in den U87MG-Zellen, konnte in dieser Arbeit bei Wachstumsvergleichen in den humanen U118-Gliomzellen keine Verbesserung der Replikation der US3-Deletionmutante gegenüber dem Δ ICP34.5-Virus gezeigt werden, allerdings zeigte sich eine generell beschleunigte Wachstumskinetik der Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Virus zu frühen Zeitpunkten der Infektion in diesen Gliomzellen. Während der Titer der US3-Deletionmutante ab 24 h nach Infektion stagniert, erhöht sich der Titer des Wildtyp-Virus kontinuierlich. Die Stagnation der Virustiter in der Zellkultur rührt daher, dass zu diesem Zeitpunkt bereits alle Zellen infiziert und durch Lyse zerstört waren. In den U251-Gliomzellen hingegen zeigte sich entgegen den Erwartungen sowohl eine Attenuierung des US3-Deletionsmutante verglichen mit dem Δ ICP34.5-Virus, als auch eine Attenuierung gegenüber dem Wildtyp-Virus. Die Titer der US3-Deletionsmutante waren um das Zehnfache verglichen mit dem Wildtyp-Virus reduziert, wodurch eine geringe anti-tumorale Wirksamkeit des Δ US3-Virus wahrscheinlich ist. Die U251-Zellen gelten als Apoptose-resistent, wodurch die Infektion mit der US3-Deletionmutante keine Apoptose induzieren sollte und somit auch keine Reduktion in der Replikationseffizienz zu erwarten was. Möglicherweise führen verschiedene zusätzliche Mutationen der Gliomzellen außerhalb der Veränderungen der Apoptose-Signalwege zu den unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der US3-Deletionsmutante, da mittlerweile neben der anti-apoptischen weitere Funktionen das für HSV-1 US3-Gen beschrieben sind, wie die Blockierung der Histondeacetylierung (Poon *et al.*, 2006), Inhibierung der IFN-Antwort (Piroozmand *et al.*, 2004) oder die Inhibition des mitochondrialen Elektronentransports (Derakhshan *et al.*, 2006).

5.3.3 Wachstumsanalysen der US1-Deletionsmutante

Die Untersuchungen zu den *in vitro* Wachstumseigenschaften der US1-Deletionmutante zeigten, dass das Δ US1-Virus in primären HFF-Zellen verglichen mit dem Wildtyp-Virus deutlich attenuiert ist. Die Titer der US1-Deletionmutante waren um das zwanzigfache reduziert und die Wachstumskinetik gegenüber dem Wildtyp-Virus verzögert. Bei der Herstellung der HSV-1(17⁺) Δ US1-Virus-Stocks in Vero-Zellen zeigte sich hingegen kein verzögertes Wachstumsverhalten gegenüber dem Wildtyp-Virus. Diese Ergebnisse stimmen mit den veröffentlichten Daten von Sears et al. (1998) überein, die für die HSV-1(F)US1 Deletionsmutante eine stark eingeschränkte Replikationsfähigkeit in primären Zellen zeigen konnten, während die Deletionsmutante in Vero- und HEp-2 Zellen mit einer vergleichbaren Kinetik wie das Wildtyp-Virus replizierte. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass die verringerte Replikationsfähigkeit in den primären Zellen auf eine Apoptose-Induktion zurückzuführen ist, während viele transformierte Zelllinie wie die Vero- oder auch BHK-Zellen ebenso wie Tumorzellen die Fähigkeit zur Apoptose eingebüsst haben und dadurch gegen die virale Apoptose-Induktion resistent sind und die Replikation dadurch unbeeinflusst wäre (Aubert & Blaho, 1999; Galvan & Roizman, 1998). Neuste Veröffentlichungen von Nguyen *et al.* (2005) zeigen allerdings, dass Vero-Zellen zwar bis zu 24 h p.i. keine Anzeichen von Apoptose-Induktion aufweisen, danach aber eine Fragmentierung der DNA und somit Apoptose-Induktion detektierbar ist. Da die Wachstumseigenschaften der US1-Deletionmutanten bei Sears *et al.* (1998) in HEp-2-Zellen ebenfalls unverändert zum Wildtyp-Virus waren, obwohl eine Sensitivität der HEp-2-Zellen gegenüber der durch Virusinfektion-ausgelösten Apoptose-Induktion beschrieben ist (Aubert & Blaho, 2003), kann die US1-Deletionsmutante offensichtlich in diesen Zellen keine Apoptose induzieren, wodurch die Replikationsfähigkeit der Mutante begrenzt wäre. Die in dieser Arbeit durchgeführten Apoptose-Induktions-Untersuchungen in HEp-2-Zellen bestätigen diese Vermutung. In Δ US1-infizierten HEp-2-Zellen konnte keine Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Die Deletion des HSV-US1-Gens führte nicht zum Verlust der anti-apoptotischen Aktivität des Virus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem die Wachstumseigenschaften der US1-Deletionsmutante in verschiedenen humanen Gliomzelllinien bestimmt, wobei festgestellt wurde, dass die Replikation in den U87MG, ebenso wie die der US3-Deletionsmutante, mit dem Wildtyp-Virus vergleichbar war. In den U87MG-Gliomzellen konnte somit keine Attenuierung der US1-Deletionmutante festgestellt werden. Bezogen auf das Δ ICP34.5-Virus zeigte sich entsprechend der US3-Deletionsmutante eine verbesserte und beschleunigte Replikation des Δ US1-Virus. Die US1-Deletionsmutante zeigte also auch eine verstärkte U87MG-spezifische Replikation und somit eine Erhöhung der Effizienz des Δ US1-Virus verglichen mit dem Δ ICP34.5-Virus in

den U87MG-Gliomzellen. Bei den Wachstumsvergleichen in den humanen U251-Gliomzellen konnte keine Verbesserung der Replikation der US1-Deletionmutante gegenüber dem Δ ICP34.5-Virus gezeigt werden. Die Replikation in den U118-Gliomzellen zeigte eine geringfügige Reduktion der Titer (fünffach) verglichen mit dem Δ ICP34.5-Virus, allerdings zeigte sich eine generell verbesserte Replikation der Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Virus in diesen U118-Gliomzellen.

5.3.4 Wachstumsanalysen der US5-Deletionsmutante

Die Wachstumsanalyse der US5-Deletionsmutante in primären HFF-Zellen zeigte keine Reduktion der Replikation verglichen mit dem Wildtyp-Virus. Im Gegensatz zu den US1- und US3-Deletionsmutanten konnte für die US5-Deletionsmutante somit keine limitierte Replikation in den primären HFF-Zellen nachgewiesen werden. Die Deletion des US5-Gens führt somit nicht zu der erforderlichen Abschwächung der Replikation in primären Zellen, allerdings replizierte das Δ US5-Virus in den Gliomzellen zu fünfzehnfach erhöhten Titern verglichen mit dem spezifisch in Gliomzellen replizierenden und dadurch in den HFF-Zellen attenuierten Δ ICP34.5-Virus. Diese Ergebnisse stimmen mit Veröffentlichungen überein in denen gezeigt wurde, dass die US5-Deletionsmutanten sich phänotypisch normal in BHK-Zellen verhält (Balan *et al.*, 1994). Da sich durch die Deletion des US5-Gen allein keine ausreichende Selektivität für die Replikation in Gliomzellen bzw. die erforderliche Abschwächung der Replikation in primären Zellen erreichen lässt, kann eventuell durch die Deletion des US5-Gens zusammen mit einem der anderen Apoptose-Inhibitor-Gen eine tumorselektive Replikation erzeugt werden.

5.4 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion

Verschiedenste Veröffentlichungen haben gezeigt, dass HSV-1 fähig ist, mit den Prozessen der Apoptose zu interferieren, um die virale Replikation zu gewährleisten (Aubert *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 1998; Leopardi *et al.*, 1997; Jerome *et al.*, 1998; Galvan & Roizman, 1998). Die Wildtyp-Virus Infektion verhindert sowohl die Infektions-bedingte Apoptose-Induktion (*HSV-1 dependent apoptosis*, HDAP), als auch durch verschiedene externe Stimuli induzierte Apoptose (Aubert *et al.*, 1999; Galvan & Roizman, 1998; Leopardie *et al.* 1997; Jerome *et al.*, 1999). Zur Klärung, welchen Einfluss die Deletion der einzelnen Apoptose-Inhibitor-Gene US1, US3 bzw. US5 auf die Fähigkeit der Deletionsmutanten hat, die Apoptose in verschiedenen Zelltypen zu blockieren, wurde die Apoptose-Induktion untersucht. Dabei wurde sowohl die Induktion der Apoptose durch die Infektion mit den Deletionsmutanten selbst analysiert, als auch die Fähigkeit der HSV-1-Deletionsmutanten

getestet, die über den intrinsische- oder extrinsische-Signalweg induziert Apoptose zu blockieren.

5.4.1 Analyse der Apoptose-inhibibierenden Aktivität nach Infektion von HEp-2-Zellen mit den Deletionsmutanten

Die anti-apoptotische Funktion der HSV-1 US3-Proteinkinase wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Leopardi *et al.*, 1997; Munger *et al.*, 2001; Benetti & Roizman, 2004; Jerome *et al.*, 1999). Derzeit wird die US3-Proteinkinase als eine der wichtigsten Komponenten der viralen Apoptose-Intervention *in vivo* und *in vitro* angesehen. Leopardi *et al.* (1997) wiesen die Apoptose-Induktion nach Infektion mit der US3-Deletionsmutante in Vero- und HEp-2-Zellen anhand einer vermehrten DNA-Fragmentierung, verglichen zu Wildtyp-Virus infizierten Zellen nach. Die Untersuchung der US3-Deletionsmutante in meiner Arbeit zeigte ebenfalls, dass die Infektion mit dem HSV-1(17⁺) Δ US3-Virus, im Gegensatz zur Wildtyp-Virus Infektion, zur Apoptose in HEp-2-Zellen führte. Die Deletion des US3-Gens führte zum Verlust der inhibitorischen Aktivität des Virus. Die Deletion des US1- sowie des US5-Gens hatte keinen Einfluss auf die Apoptose-inhibierende Funktion der Viren. In den Δ US1- bzw. Δ US5-infizierten Zellen konnte keine Apoptose-Induktion durch die Virusinfektion in den HEp-2-Zellen nachgewiesen werden. Die Detektion der Apoptose-Induktion erfolgte in dieser Arbeit sowohl durch die Messung der vermehrten Spaltung der PARP als auch durch morphologische Veränderungen der Zellen. Die Beurteilung der morphologischen Veränderungen und die Detektion der Spaltung der PARP sind weit verbreitet Methoden um Apoptose-Induktion nachzuweisen, allerdings liefern diese Methoden der Apoptose-Detektion keine genauen Einblicke in den Mechanismus und den genauen Ort der Interaktion der anti-apoptotischen Proteine von HSV-1. In zukünftigen Untersuchungen der Eigenschaften der einzelnen Apoptose-Inhibitor-Gen deletierten Mutanten sollten daher die Interaktion genauer überprüft werden, etwa durch die Messung aktivierter Caspase-9 oder der Phosphorylierung von Bcl-2 in Δ US3-infizierten Zellen.

Ein Effekt der Deletion des US5-Gens wurde nicht erwartet, und konnte auch nicht gezeigt werden, da beschrieben wurde, dass das US5-Gen für den Schutz vor extern über den extrinsischen Signalweg vermittelten Apoptose benötigt wird (Jerome *et al.*, 1999).

5.4.2 Analyse der Apoptose-Inhibition durch die Deletionsmutanten nach Induktion des intrinsischen Signalwegs

Da das HSV-1 Wildtyp-Virus nicht nur fähig ist die Apoptose während der Virusinfektion selbst zu blockieren, sondern auch extern induzierte Apoptose unterbinden kann, wurde die

Apoptose nach externer Induktion durch verschiedene Stimuli bestimmt. Cartier *et al.* (2003) zeigten, dass das Wildtyp-Virus die Apoptose-Induktion durch Sorbitol-Behandlung verhindert, während die Δ US3-Mutante die Apoptose-Induktion durch die Sobitol-Behandlung nicht unterbinden kann. Jerome *et al.* (1999) wiesen einen vollständigen Verlust der anti-apoptotische Funktion der US3-Deletionsmutante bei UV-induzierte Apoptose nach. In meiner Arbeit wurde erstmal gezeigt, dass auch die durch Etoposid-induzierte Apoptose in HEp-2-Zellen durch das Wildtyp-Virus unterbunden werden kann, während nach Deletion des US3-Gens diese inhibitorische Funktion verloren geht. Ebenso wie das Wildtyp-Virus sind die US1- und US5-Deletionsmutante fähig die Etoposid-induzierte Apoptose zu verhindern. Die Deletion der HSV-1 Gene US1 und US5 führt auch bei externer Induktion des intrinsischen Apoptose-Signalwegs durch Etoposid-Behandlung nicht zu einem Verlust der inhibitorischen Aktivität. Somit zeigte erneut nur die Deletion des US3-Gens einen Effekt auf die anti-apoptotische Fähigkeit des Virus. Siitonen *et al.* (2000) zeigten, dass die Etoposid-induzierte Apoptose nicht mit dem Todesrezeptor-abhängigen Signalweg assoziiert ist. Perkins *et al.* (1998) konnten nach Etoposid-Behandlung eine Aktivierung der Caspasen über den intrinsischen Signalwegs nachweisen. Somit konnte ein weiterer Beweis für die Interferenz der US3-Proteinkinase mit dem intrinsischen Signalweg der Apoptose erbracht werden.

5.4.3 Analyse der Apoptose-inhibierende Aktivität der Deletionsmutanten in Jurkat-T-Zellen

Die Apoptose-Induktion in den Jurkat-T-Zellen wurde über die Färbung mit Annexin-V-FITC und 7-AAD detektiert. Die Infektion der Jurkat-T-Zellen mit der US3-Deletionsmutante führte zu einer verstärkten Apoptose-Induktion (43,1% apoptotische Zellen) verglichen mit Wildtyp-infizierten Zellen. Etwa 34% Jurkat-T-Zellen zeigten allerdings keine Anzeichen von Apoptose nach der Infektion mit dem Δ US3-Virus. Möglicherweise waren nicht alle Zellen infiziert, trotz einer genutzten MOI von 10. In meiner Arbeit war ein gleichzeitiger Nachweis der Virusinfektion durch das Fehlen geeigneter Marker wie GFP nicht möglich und dadurch ist eine genau Beurteilung der Ergebnisse schwierig, da die gemessenen Effekte nicht direkt auf infizierte Zellen bezogen werden konnten. Allerdings zeigte sich nach Wildtyp-Virus-Infektion ein Schutz vor der durch α -CD95-induzierten über den extrinsischen Signalweg induzierten Apoptose. Das könnte ein Hinweis auf eine erfolgreiche Infektion der Jurkat-T-Zellen sein. In zukünftigen Untersuchungen soll die Virusinfektion durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Zum einen könnte ein zusätzliches GFP-Gen als Marker in das Virus-Genom eingebaut werden. Zum anderen könnte die Infektion durch HSV-1-spezifische Antikörper nach Permeabilisierung der Zellen detektiert werden. Jerome *et al.*

(1999) zeigten, dass die Jurkat-T-Zellen zwar infizierbar sind, aber keine effiziente Replikation in den Jurkat-T-Zellen stattfindet.

Jerome *et al.* (1998) konnten zeigen, dass HSV-1 infizierte Zellen auch gegen die Apoptose-Induktion durch zytotoxische T-Lymphozyten geschützt sind. Die Apoptose-Induktion durch die zytotoxischen T-Lymphozyten wird durch die Interaktion der FAS-Liganden auf den T-Lymphozyten und dem FAS-Rezeptor vermittelt. Daraus schlussfolgernd untersuchten Jerome *et al.* (1999 und 2001) die FAS-vermittelte Apoptose-Induktion nach der Behandlung mit CD95-Antikörpern und konnten zeigen, dass sowohl die Deletion des HSV-1 US5-Gens (RAS116) als auch die Deletion des US3-Gens (R7041) zum Verlust der inhibitorischen Aktivität des Virus gegenüber der FAS/CD95 vermittelten Apoptose-Induktion führt. In meiner Arbeit konnten diese Ergebnisse nur zum Teil bestätigt werden. Die Wildtyp-Virus infizierten Jurkat-T-Zellen zeigten übereinstimmend mit den zuvor veröffentlichten Ergebnissen einen Schutz vor der CD95-vermittelten Apoptose. Die Δ US3-infizierten Zellen hingegen waren wie erwartet nicht geschützt vor der CD95-vermittelten Apoptose. Entgegen den Erwartungen und veröffentlichten Ergebnissen konnte bei der US5-Deletionmutante weiterhin ein Schutz vor der CD95-vermittelten Apoptose gezeigt werden, welcher vergleichbar mit dem des Wildtyp-Virus war. Die Deletion des US5-Gens führte nicht zu dem Verlust der inhibitorischen Aktivität. Möglicherweise kompensiert ein weiteres Apoptose-Inhibitor-Gen die Deletion des US5-Gens, wodurch die inhibierende Aktivität des Virus aufrechterhalten wird.

5.4.4 Analyse der Apoptose-Resistenz der Gliomzelllinien

Die Untersuchung der Deletionsmutanten zur Induktion der Apoptose in dieser Arbeit zeigten, dass auch in den als apoptose-resistent beschriebenen Gliomzellen A172 eine Induktion der Apoptose detektiert werden konnte, während die U251-Gliomzellen absolut resistent gegenüber der Virus-induzierten Apoptose waren. Die Induktion der Apoptose in den A172-Gliomzellen spiegelt erneut die Verschiedenartigkeit der Gliomzellen wieder. Während die U251-Gliomzellen Apoptose-resistent sind, scheinen in den A172-Gliomzellen die Apoptose-Signalwege nicht derart gestört zu sein, dass es zu keiner Induktion der Apoptose durch die Virusinfektion kommen kann, obwohl Mutationen des p53-Tumor-Suppressor-Gens beschrieben sind, die eigentlich zu einer Apoptose-Resistenz führen sollten. Weitere Analysen der U251-Gliomzelllinie ergaben, dass diese Zellen auch eine Resistenz gegenüber einer externen Apoptose-Induktion durch anti-CD95-Antikörper und Etoposid aufzeigen. Aufgrund dessen sind U251-Gliomzellen potentielle Ziele für den Einsatz der neuen onkolytischen Viren, da die Deletion der Apoptose-Inhibitor-Gene in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Replikation der Viren haben sollte.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des HSV-1 US3-Gens ein viel versprechender Ansatz für die Entwicklung neuer, effektiverer onkolytischer Herpes Simplex-Viren darstellt. Durch die Deletion des US3-Gens konnte sowohl eine verstärkte Gliomspezifität erzeugt, als auch die Effektivität der onkolytischen Viren verglichen mit dem G207 analogen Δ ICP34.5-Virus erhöht werden. Die tumorselektive Replikation und Effektivität der US3-Deletionsmutante, sowie ihre Sicherheit soll nun in dem, von der Kooperations-Arbeitsgruppe A. Söling etablierten in vivo Mausmodell mittels der Biolumineszenz-Messung geprüft werden (Söling *et al.*, 2004). Nach der intratumoralen Applikation der onkolytischen Viren in die Mäuse soll die Menge und Lokalisation der Viren und die Entwicklung der Tumormasse nicht-invasiv über längere Zeiträume verfolgt werden. Im Rahmen dieser Biolumineszenz-Messungen wäre auch eine Untersuchung der möglichen Steigerung der Effektivität der onkolytischen Viren in Kombination mit Chemo- bzw. Radiotherapie denkbar (Kim *et al.*, 2005; Tyminski *et al.*, 2001). In vorherigen Studien konnte in den meisten Fällen durch die Kombination von Chemo- und Virotherapie eine erhöhte Effektivität gezeigt werden. Bei der Anwendung des HSV-1 G207 und Radiotherapie bei Hals- und Kopftumoren konnten sogar synergistische Effekte nachgewiesen werden (Jorgensen *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005).

Möglicherweise könnte auch durch die Deletion mehrerer der Apoptose-Inhibitor-Gene eine weitere Verstärkung der Selektivität der onkolytischen Viren erreicht werden. Jerome *et al.* (1999) zeigten, dass das US3- und US5-Gen miteinander bei der Inhibierung der extrinsisch-vermittelten Apoptose-Induktion kooperieren, möglicherweise könnte die Doppeldeletion dieser beiden anti-apoptotischen Gene eine noch erhöhte Selektivität erzeugen. Allerdings könnte es durch die Doppeldeletion auch zu einer unerwünschten Attenuierung der Viren kommen. Eine mögliche Alternative zur Deletion des Gens wäre es, die Expression der einzelnen Apoptose-Inhibitor-Gene unter die Kontrolle tumorspezifischer Promotoren zu stellen. Glaß *et al.* (2007) konnten nachweisen, dass der Nestin-Enhancer eine höhere Aktivität in Gliomzellen besitzt und sich somit als geeignet für die Therapie von malignen Gliomen darstellt. Dieser Ansatz wird in Zukunft weiter untersucht werden.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Prof. Dr. Martin Messerle, für die Überlassung des interessanten Projekts sowie die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Anregungen habe ich stets besonders zu schätzen gewusst.

Ebenso danke ich Jun.-Prof. Dr. Marcus J. Pröpsting für die Übernahme des Korreferates.

Ich danke allen fleißigen Korrekturlesern die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, Corinna Benkartek, Andreas Busche, Mandy Glaß, Pen Kay-Jackson, Corinna Krüger, Kathrin Rode und Sarah Sengstarke. Besonderer Dank gilt dabei Sarah Sengstarke und Corinna Krüger für ihr unermüdliches Korrekturlesen, den vielen hilfreichen Diskussionen und wichtigen Anregungen.

Frau Dr. Ariane Söling danke ich für die Bereitstellung der Gliomzelllinien und des Luciferase-Plasmids.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Messerle“ für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, die stetige Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitatmosphäre. Ebenso möchte ich Claus H. Nagel für die Überlassung des HSV-1(17⁺)blue BAC und den Austausch von Erfahrungen auf dem Gebiet der BAC-Mutagenese danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen des Institutes für Virologie der MHH für das stets angenehme Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, die stets für mich da sind und mich in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert haben. Danke für den Zuspruch und die Aufmunterungen. Ohne Euch wäre ich jetzt nicht da wo ich bin.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Dietmar Plauk für sein Verständnis und die große moralische Unterstützung gerade in der Endphase dieser Arbeit. Danke, dass du immer für mich da bist!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre Geduld, ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Unterstützung bedanken.

7 Literaturverzeichnis

Adler, H., Messerle, M. and Koszinowski, U.H. (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol*, **13**, 111-121.

Advani, S.J., Weichselbaum, R.R. and Roizman, B. (2002). Herpes simplex virus 1 activates cdc2 to recruit topoisomerase II alpha for post-DNA synthesis expression of late genes. *Clin Microbiol Infect*, **8**, 551-563.

Ahmed, M., Lock, M., Miller, C.G. and Fraser, N.W. (2002). Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J Virol*, **76**, 717-729.

Asada, T. (1974). Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer*, **34**, 1907-1928.

Aubert, M. and Blaho, J.A. (1999). The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol*, **73**, 2803-2813.

Aubert, M. and Blaho, J.A. (2001). Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. *Microbes Infect.*, **3**, 859-866.

Aubert, M., O'Toole, J. and Blaho, J.A. (1999). Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **73**, 10359-10370.

Balan, P., Davis-Poynter, N., Bell, S., Atkinson, H., Browne, H. and Minson, T. (1994). An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J Gen Virol*, **75**, 1245-1258.

Benaron, D.A., Contag, P.R. and Contag, C.H. (1997). Imaging brain structure and function, infection and gene expression in the body using light. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **352**, 755-761.

Benetti, L. and Roizman, B. (2004). Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9411-9416.

Borst, E.M. and Messerle, M. (2005). Analysis of human cytomegalovirus oriLyt sequence requirements in the context of the viral genome. *J Virol*, **79**, 3615-26

Brown, S.M., Ritchie, D.A. and Subak-Sharpe, L.H. (1973). Genetic studies with herpes simplex virus type 1. The isolation of temperature-sensitive mutants, their arrangement into complementation groups and recombination analysis leading to a linkage map. *J Gen Virol*, **70**, 329-346.

Carter, K.L. and Roizman, B. (1996). The promoter and transcriptional unit of a novel herpes simplex virus 1 alpha gene are contained in, and encode a protein in frame with, the open reading frame of the alpha 22 gene. *J Virol*, **70**, 172-178.

Cartier, A., Komai, T. and Masucci, M.G. (2003). The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp Cell Res*, **15**, 242-250.

- Cherepanov, P.P. and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinat. *Gene*, **158**, 9-14.
- Chiocca, E.A. (2002). Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, **2**, 938-950.
- Chiocca, E.A., Abbed, K.M., Tatter, S. et al., (2004). A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Molo Ther*, **10**, 958-966.
- Chung, R.Y., Saeki, Y. and Chiocca, E.A. (1999). B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma34.5 gene-mediated virulence toward tumor and cycling cells. *J Virol*, **73**, 7556-7564.
- Cleator, M.C. and Klapper, P.E. (2004). The Herpesviridae. In *Principles and Practice of Clinical Virology, 5th Edition*. John Wiley & Sons.
- Contag, C.H., Spilman, S.D., Contag, P.R., Oshiro, M., Eames, B., Dennery, P., Stevenson, D.K. and Benaron, D.A. (1997). Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol*, **66**, 523-531.
- Contag, P.R., Olomu, I.N., Stevenson, D.K. and Contag, C.H. (1998). Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat Med*, **4**, 245-247.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U A S*, **97**, 6640-6645.
- Derakhshan, M., Willcocks, M.M., Salako, M.A., Kass, G.E. and Carter, M.J. (2006). Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. *J Gen Virol*, **87**, 2155-9.
- Di Christofano, A. and Pandolfi, P.P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, **100**, 387-390
- Dock, G. (1904). Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma. *Am J Med Sci*, **127**, 563.
- Döhner, K., Radtke, K., Schmidt, S. and Sodeik, B. (2006). The eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: Efficient dynein-mediated nuclear targeting in the absence of the small capsid protein VP26. *J Virol*, **80**, 8211-8224.
- Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R. and Sodeik, B. (2002). Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*, **13**, 2795-2809.
- Durand, L.O., Advani, S.J., Poon, A.P. and Roizman, B. (2005). The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J Virol*, **79**, 6757-6762.
- Edinger, M., Cao, Y.A., Hornig, Y.S., Jenkins, D.E., Verneris, M.R., Bachmann, M.H., Negrin, R.S. and Contag, C.H. (2002). Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer*, **38**, 2128-36.
- Farassati, F., Yang, A.D. and Lee, P.W. (2001). Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol*, **3**, 745-750.

- Ferrari, D., Stepczynska, A., Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. (1998). Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med*, **7**, 979-84.
- Fujisawa, H., Kurrer, M., Reis, R.M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. and Ohgaki, H. (1999). Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol*, **155**, 387-394
- Galvan, V. and Roizman, B. (1998). Herpes simplex virus 1 induced and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3931-3936.
- Galvan, V., Brandimarti, R. and Roizman, B. (1999). Herpes simplex virus 1 blocks caspase-3-independent and caspase-dependent pathways to cell death. *J Virol*, **73**, 3219-3226.
- Galvan, V., Brandimarti, R., Munger, J. and Roizman, B. (2000). Bcl-2 blocks a caspase-dependent pathway of apoptosis activated by herpes simplex virus 1 infection in HEP-2 cells. *J Virol*, **74**, 1931-1938.
- Ghiasi, H., Nesburn, A.B., Cai, S. and Wechsler, S.L. (1998). The US5 open reading frame of herpes simplex virus 1 does encode a glycoprotein (gJ). *Intervirology*, **41**, 91.
- Gianni, T., Campadelli-Fiume, G. and Menotti, L. (2004). Entry of herpes simplex virus mediated by chimeric forms of nectin1 retargeted to endosomes or to lipid rafts occurs through acidic endosomes. *J Virol.*, **78**, 12268-12276.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J. and Boivin, G. (2002). Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist*, **5**, 88-114.
- Gil-Salú, J.L., Román, P., Benítez, E., Maestro, E., Pérez-Requena, J. and López-Escobar, M. (2004). Survival analysis following the addition of temozolomide to surgery and radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Neurocirugia*, **15**, 144-150.
- Glaß, M., Söling, A. and Messerle, M. (2007). Tumor-specific activation of cellular regulatory elements is down-regulated upon insertion into Herpes simplex virus genome. *submitted to Journal of Neurovirology*
- Goodkin, M.L., Ting, A.T. and Blaho, J.A. (2003). NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol*, **77**, 7261-7280.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4645-4649.
- Gray, C.P. and Kaerner, H.C. (1984). Sequence of the putative origin of replication in the UL region of herpes simplex virus type 1 ANG DNA. *J. Gen. Virol.*, **65**, 2109-2119.
- Green, D.R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, **94**, 695-698
- Green, D.R. and Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**, 19-30.
- Gross, S. and Piwnica-Worms, D. (2005). Spying on cancer: molecular imaging in vivo with genetically encoded reporters. *Cancer Cell.*, **7**, 5-15.

- Hardwicke, M.A. and Schaffer, P.A. (1997). Differential effects of nerve growth factor and dexamethasone on herpes simplex virus type 1 oriL- and oriS-dependent DNA replication in PC12 cells, *J. Virol.*, **71**, 3580–3587.
- Harrow, S., Papanastassiou, V., Harland, J., et al., (2004). HSV1716 injection into brain adjacent to tumor following surgical resection of high-grade gliomas: safety data and long-term survival. *Gene Ther*, **11**, 1648-1658.
- Harrow, S., Papanastassiou, V., Harland, J., Mabbs, R., Petty, R., Fraser, M., Hadley, D., Patterson, J., Brown, S.M. and Rampling, R. (2004). HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gen Ther*, **11**, 1648-1658.
- Hastings, J.W. (1983). Biological diversity, chemical mechanism and the evolutionary rigins of bioluminescent systems. *J Mol Evol*, **19**, 09-321
- Hellenbrand, W., Thierfelder, W., Müller-Pebody, B., Hamouda, O. and Breuer, T. (2005). Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **24**, 131-135.
- Hemminki, A., Dmitriev, I., Liu, B., Desmond, R.A., Alemany, R. and Curiel, D.T. (2001). Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule. *Cancer Res*, **61**, 6377-6381.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.*, **12**, 770-776.
- Herrmann, E.C. (1961). Plaque inhibition test for detection of inhibitors of DNA viruses. *Proc Soc Exp Biol Med*, **107**, 142-145.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L. und Nunez, G. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis, *Embo J*, **13**, 3586-3595.
- Igarashi, K., Fawl, R., Roller, R.J. and Roizman, B. (1993). Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis, *J. Virol.*, **67**, 2123–2132.
- Inman, M., Perng, G.C., Henderson, G., Ghiasi, H., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L. and Jones, C. (2001). Region of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sufficient for wild-type spontaneous reactivation promotes cell survival in tissue culture. *J Virol.*, **75**, 3636-3646.
- Jerome, K.R., Chen, Z., Lang, R., Torres, M.R., Hofmeister, J., Smith, S., Fox, R., Froelich, C.J. and Corey, L. (2001). HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *J Immunol*, **67**, 3928-3935.
- Jerome, K.R., Fox, R., Chen, Z., Sears, A.E., Lee, H.J. and Corey, L. (1999). Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, US5 and US3. *J Virol*, **73**, 8950.
- Jerome, K.R., Tait, F., Koelle, D.M. and Corey, L. (1998). Herpes simplex virus type 1 renders infected cells resistant to cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol*, **72**, 436-341.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. and Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, **108**, 153-164

- Jorgensen, T.J., Katz, S., Wittmack, E.K., Varghese, S., Todo, T., Rabkin, S.D. and Martuza, R.L. (2001). Ionizing radiation does not alter the antitumor activity of herpes simplex virus vector G207 in subcutaneous tumor models of human and murine prostate cancer. *Neoplasia*, **3**, 451-456.
- Kambara, H., Saeki, Y. and Chiocca, E.A. (2005). Cyclophosphamide allows for in vivo dose reduction of a potent oncolytic virus. *Cancer Res*, **15**, 11255-11258.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. **53**, 3976-3985.
- Kim, S.H., Wong, R.J., Kooby, D.A., Carew, J.F., Adusumilli, P.S., Patel, S.G., Shah, J.P. and Fong, Y. (2005). Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer*, **41**, 313-322.
- Kim, U.J., Shizuya, H., de Jong, P.J., Birren, B. and Simon, M.I. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1083-1085.
- Kirn, D., Martuza, R.L. and Zwiebel, J. (2001). Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat. Med*, **7**, 781-787.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-5588.
- Klatzmann, D., Valery, C.A., Bensimon, G., Marro, B., Boyer, O., Mokhtari, K., Diquet, B., Salzman, J.L. and Philippon, J. (1998). A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther*, **9**, 2591-2604.
- Kleihues, P., Burger, P.C. and Scheithauer, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*, **3**, 255-268.
- Klenovsek, K., Weisel, F., Schneider, A., Appelt, U., Jonjic, S., Messerle, M., Bradel-Tretheway, B., Winkler, T.H. and Mach, M. (2007). Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood*, **1**, 3472-3479.
- Koyama, A.H. and Adachi, A. (1997). Induction of apoptosis by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, **78**, 2909-12.
- Lang, F.F. and Vecil, G.G. (2003). Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol*, **65**, 237-246.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copelan, N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosom engineering system adapted for recombination targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, **73**, 56-65.
- Legler, J.M., Gloeckler, Ries L.A., Smith, M.A., et al.(1999) Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 2050A-51.

- Leopardi, R. and Roizman, B. (1996). The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or by hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9583-9587.
- Leopardi, R., Van Sant, C. and Roizman, B. (1997). The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7891-7896.
- Leppard, K.N. and Shenk, T. (1989). The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J*, **8**, 2329-2336.
- Liu, T.C., Wakimoto, H., Martuza, R.L. and Rabkin, S.D. (2007). Herpes simplex virus Us3(-) mutant as oncolytic strategy and synergizes with phosphatidylinositol 3-kinase-Akt targeting molecular therapeutics. *Clin Cancer Res.*, **13**, 5897-902.
- Loewendorf, A., Kruger, C., Borst, E.M., Wagner, M., Just, U., Messerle, M. (2004). Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells. *J of Virol*, **78**, 13062-71.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
- Markert, J.M., Medlock, M.D., Rabkin, S.D., et al., (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant Gliomas: results of a phase I trial. *Gen Ther*, **7**, 867-874.
- Massoud, T.F. and Gambhir, S.S. (2002). Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, **17**, 545-580.
- McElroy, W.D. and DeLuca, M. (1985). Firefly luminescence. *Chemie- und Bioluminescence*.
- McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E. and Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, **69**, 1531-1574.
- McGeoch, D.J., Dolan, A., Donald, S. and Brauer, D.H. (1986). Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res*, **14**, 1727-1745.
- McGeoch, D.J., Dolan, A., Donald, S. and Rixon, F.J. (1985). Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol*, **181**, 1-13.
- McMenamin, M.M., Byrnes, A.P., Pike, F.G., Charlton, H.M., Coffin, R.S., Latchman, D.S. and Wood, M.J. (1998). Potential and limitation of a gamma 34.5 mutant of herpes simplex 1 as a gene therapy vector in the CNS. *Gen Ther*, **5**, 594-604.
- Medhkour, A. and Chan, M. (2005). Extremely rare glioblastoma multiforme of the conus medullaris with holocord and brain stem metastases, leading to cranial nerve deficit and respiratory failure: a case report and review of the literature. *Surg Neurol*, **63**, 576-582.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. and Koszinowski, U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14758-14763.

- Miller, C., Bhattacharjee, P., Higaki, S., Jacob, R., Danaher, R., Thompson, H. and Hill, J. (2003). Herpesvirus quiescence (QIF) in neural cells VI: Correlation analysis demonstrates usefulness of QIF-PC12 cells to examine HSV-1 latency, reactivation and genes implication in its regulation. *Curr Eye Res*, **26**, 239-248.
- Mineta, T., Rabkin, S.D., Yazaki, T., Hunter, W.D. and Martuza, R.L. (1995). Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med.*, **9**, 8-43.
- Mocarski, E.S. and Roizman, B. (1982). Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA. *Cell*, **31**, 89-97.
- Mocarski, E.S., Post, L.E. and Roizman, B. (1980). Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell*, **22**, 243-255.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J. and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.*, **87**, 427-436.
- Mourad, P.D., Farrell, L., Stamps, L.D., Chicoine, M.R. and Silbergeld, D.L. (2005). Why are systemic glioblastoma metastases rare? Systemic and cerebral growth of mouse glioblastoma. *Surg Neurol*, **63**, 511-509.
- Munger, J., Chee, A.V. and Roizman, B. (2001). The U(S)3 protein kinase blocks apoptosis induced by the d120 mutant of herpes simplex virus 1 at a premitochondrial stage. *J Virol*, **75**, 5491-5497.
- Muyrers, J.P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W. and Stewart, A.F. (2000). Point mutation of bacterial artificial chromosom by ET recombination. *EMBO Rep*, **1**, 239-243.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- Nagel, C.H., Döhner, K., Fathollahy, M., Strive, T., Borst, E.M., Messerle, M. and Sodeik, B. (2007). Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV-1(17⁺)-GFPVP26-gDRFP. *submitted to Journal of Virology*.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ*, **6**, 1028-1042.
- Nicola, A.V. and Straus, S.E. (2004); Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus; *J Virol.*, **78**, 7508 -7517.
- O'Connor, M., Peifer, M. and Bender, W. (1989). Construction of large DNA Segments in *Escherichia coli*. *Science*, **244**, 1307-1312.
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U. and Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: Reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*, **20**, 4922-4931.
- Pasquinucci, G. (1971). Possible effect of measles on leukaemia. *Lancet*, **1**, 136.
- Peng, W., Jin, L., Henderson, G., Perng, G.C., Brick, D.J., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L. and Jones, C. (2004). Mapping herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that protect from apoptosis mediated by a plasmid expressing caspase-8. *J Neurovirol.*, **10**, 260-265.

Perry, L.J. and McGeoch, D.J. (1988). The DNA sequences of the long repeat region and adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, **69**, 2831-2846.

Piroozmand, A., Koyama, A.H., Shimada, Y., Fujita, M., Arakawa, T. and Adachi, A. (2004). Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *Int J Mol Med*, **14**, 641-645.

Polvino-Bodnar, M., Orberg, P.K and Schaffer, P.A (1987). Herpes simplex virus type 1 oriL is not required for virus replication or for the establishment and reactivation of latent infection in mice, *J. Virol.*, **61**, 3528–3535.

Poon, A.P., Gu, H. and Roizman, B. (2006). ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**, 9993-9998.

Poon, A.P. and Roizman, B. (2005). Herpes simplex virus 1 ICP22 regulates the accumulation of a shorter mRNA and of a truncated US3 protein kinase that exhibits altered functions. *J Virol*, **79**, 8470-8479.

Poon, A.P., Benetti, L. and Roizman, B. (2006). U(S)3 and U(S)3.5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *J Virol*, **80**, 3752-3764.

Poon, A.P., Ogle, W.O. and Roizman, B. (2000). Posttranslational processing of infected cell protein 22 mediated by viral protein kinases is sensitive to amino acid substitutions at distant sites and can be cell-type specific. *J Virol*, **74**, 11210-11214.

Pulkkanen, K.J. and Yla-Herttuala, S. (2005). Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther*, **12**, 585-598.

Rainov, N.G. (2000). A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther*, **11**, 2389-2401.

Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. and Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, **275**, 967-969

Rampling, R., Cruickshank, G., Papanastassiou, V., Nicoll, J., Hadley, D., Brennan, D., Petty, R., MacLean, A., Harland, J., McKie, E., Mabbs, R. and Brown, M. (2000). Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gen Ther*, **7**, 859-866.

Rehemtulla, A., Stegman, L.D., Cardozo, S.J., Gupta, S., Hall, D.E., Contag, C.H. and Ross, B.D. (2000). Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*, **6**, 491-495.

Reynolds, A.E., Liang, L. and Baines, J.D. (2004). Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol*, **78**, 5564-5575.

Reynolds, A.E., Ryckman, B.J., Baines, J.D., Zhou, Y., Liang, L. and Roller, R.J. (2001). U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J Virol*, **75**, 8803-8817.

- Reynolds, A.E., Wills, E.G., Roller, R.J., Ryckman, B.J. and Baines, J.D. (2002). Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol*, **89**, 8939-8952.
- Rich, JN and Bigner, DD (2004). Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant gliomas. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 430-446.
- Ries, S.J., Brandts, C.H., Chung, A.S., Biederer, C.H., Hann, B.C., Lipner, E.M., McCormick, F. and Korn, W.M. (2000). Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat Med*, **6**, 1128-1133.
- Roizman, B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*, **16**, 481-494.
- Roizman, B. and Knipe, D.M. (2001). Herpes Simplex Viruses and their Replication. *Fundamental Virology, 4th edition*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2399-2459
- Safrin, S., Elbeik, T., Phan, L., Robinson, D., Rush, J., Elbaggari, A. and Mills, J. (1994) Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**, 1246-1250.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R. und Alnemri, E. S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation, *J Biol Chem*, **274**, 17941-17945.
- Schmid, I., Krall, W., and Uittenbogaard, C. (1992) Death cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser cytometry. *Cytometry*, **13**, 204-208.
- Schneweis, K. E. (1962). Serological studies on the type differentiation of Herpesvirus hominis. *Z Immun exp ther*. **124**, 24-48.
- Sears, A.E., Halliburton, I.W., Meignier, B., Silver, S. and Roizman, B. (1985). Herpes simplex virus 1 mutant deleted in the alpha 22 gene: growth and gene expression in permissive and restrictive cells and establishment of latency in mice. *J Virol*, **55**, 338-346.
- Shapiro, J. R. (2002). Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors, *Am.J.Med.Genet.*, **115**, 194-201.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. and Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 8794-8797.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G.H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell*, **99**, 13-22.
- Siitonen, T., Mäntymaa, P., Säily, M., Savolainen, E. and Koistinen, P. (2000). Etoposide-induced apoptosis is not associated with the fas pathway in acute myeloblastic leukemia cells. *Leuk Res.*, **24**, 281-288.
- Smith, G.A. and Enquist, L.W. (2000). A self-recombination bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4873-4878.

- Smith, R.R., Huebner, R.J., Rowe, W.P., Schatten, W.E. and Thomas, L.B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*, **6**, 1211-1218.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, **136**, 1007-1021.
- Söling, A., Theiss, C., Jungmichel, S., Rainov, N.G. (2004). A dual function fusion protein of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and firefly luciferase for noninvasive in vivo imaging of gene therapy in malignant glioma. *Genet Vaccines Ther.*, **1**, 7.
- Spaete, R.R. and Mocarski, E.S. (1987). Insertion and deletion mutagenesis of the human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7213-7217.
- Spear, P.G. (2004). Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry; *Cellular Biology*, **6**, 401 – 410.
- Spear, P.G. and Longnecker, R. (2003). Minireview: Herpesvirus Entry: an Update; *J Virol*, **77**, 10179 -10185.
- Spear, P.G., Eisenberg, R.J. and Cohen, G.H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology*, **275**, 1-8.
- Stow, N.D. (1982). Localization of an origin of DNA replication within the TRs/IRs repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome, *EMBO J.*, **1**, 863–867.
- Stow, N.D. and McMonagle, E.C. (1983). Characterization of the TRs/IRs origin of DNA replication of herpes simplex virus type 1, *Virology*, **130**, 427–438.
- Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R. and Cohen, G.M. (1999). Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol. Chem*, **274**, 5053-5060.
- Szentirmai, O., Baker, C.H., Lin, N., Szucs, S., Takahashi, M., Kiryu, S., Kung, A.L., Mulligan, R.C. and Carter, B.S. (2006). Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect. *Neurosurgery.*, **58**, 365-72.
- Tanaka, M., Kagawa, H., Yamanashi, Y., Sata, T. and Kawaguchi, Y. (2003). Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol.*, **77**, 1382-1391.
- Taqi, A.M. (1981). Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet*, **1**, 1112.
- Tyminski, E., Leroy, S., Terada, K., Finkelstein, D.M., Hyatt, J.L., Danks, M.K., Potter, P.M., Saeki, Y. and Chiocca, E.A. (2005). Brain tumor oncolysis with replication-conditional herpes simplex virus type 1 expressing the prodrug-activating genes, CYP2B1 and secreted human intestinal carboxylesterase, in combination with cyclophosphamide and irinotecan. *Cancer Res.*, **65**, 6850-6857.
- Varghese, S. and Rabkin, S.D. (2002). Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther.*, **9**, 967-978.

- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, **184**, 39-51.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Wadsworth, S., Jacob, R.J. and Roizman, B. (1975). Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J Virol.*, **15**, 1487-1497.
- Wagner, M., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. and Messerle, M. (1999). Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol*, **73**, 7056-7060.
- Wagner, M.S. & Summers, W.C. (1978). Structure of the joint region and the termini of the DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol.*, **27**, 374-387.
- Warner, M.S., Geraghty, R.J., Martinez, W.M., Montgomery, R.I., Whitbeck, J.C., Xu, R., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. and Spear, P.G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HvE) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology*, **246**, 179-189.
- Weller, S.K., Spadaro, A., Schaffer, J.E., Murray, A.W, Maxam, A.M. and Schaffer, P.A. (1985). Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 930-942.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* **68**, 251-306.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, **80**, 285-291.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, **87**, 619-628.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P. and Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, **20**, 123-128.
- Zhou, G. and Roizman, B. (2000). Wild-type herpes simplex virus 1 blocks programmed cell death and release of cytochrome c but not the translocation of mitochondrial apoptosis-inducing factor to the nuclei of human embryonic lung fibroblasts. *J Virol*, **74**, 9048-9053.
- Zhou, G. and Roizman, B. (2002). Truncated forms of glycoprotein D of herpes simplex virus 1 capable of blocking apoptosis and of low-efficiency entry into cells form a heterodimer dependent on the presence of a cysteine located in the shared transmembrane domains. *J Virol*, **76**, 11469-11475.
- Zhou, G., Galvan, V., Campadelli-Fiume, G. and Roizman, B. (2000). Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *J Virol.*, **74**, 11782-11791.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

- Name: Nadine Müther
- Geburtstag: 21.06.1977
- Geburtsort: Steinheim
- Familienstand: ledig

SCHULAUSSBILDUNG

- 1983-1987 Grundschule Sandebeck
- 1987-1993 Städt. Realschule Steinheim
- 1993-1996 Städt. Gymnasium Steinheim, allgemeine Hochschulreife

AUSBILDUNG

- 08/96-06/98 Berufsbildende Schulen für Naturwissenschaften Ludwigshafen, Abschluss: staatlich geprüfte technische Assistentin für Biologie

STUDIUM

- 10/98-10/00 Grundstudium der Biologie an der Universität Osnabrück
- 10/00- 01/04 Hauptstudium der Biologie an der Universität Bremen, Abschluss: Diplom, Gesamtnote: sehr gut
Thema: Untersuchungen zum Einfluss einer HAV-Infektion auf die Aktivierbarkeit der RNaseL.

PROMOTION

- 05/04-05/05 Doktorandin am ZAMED der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, AG Virus- Zell- Interaktion
- seit 05/05 Fortsetzung der Promotion an der medizinischen Hochschule Hannover im Institut für Virologie, Graduiertenkolleg 745 „ Mukosale Erreger-Wirt-Interaktionen „
Promotionsstudiengang Fachrichtung Biologie der Leibniz Universität Hannover

Poster zum Thema dieser Arbeit auf Fachtagungen

- Müther N., Glaß M., Nagel C.-H., Sodeik B. & Messerle M. (2005)
Construction of a Full-length Herpes Simplex Virus BAC Clone as the base for the development of oncolytic viruses.
Jahrestagung 2005 der Gesellschaft für Virologie, Hannover (Abstract, poster presentation)
- Müther N., Caysa H., Nagel C.-H., Sodeik B., Söling A. & Messerle M. (2006)
Construction of oncolytic viruses based on a Herpes Simplex Virus Type 1 BAC.
Jahrestagung 2006 der Gesellschaft für Virologie, München (Abstract, poster presentation)
- Müther N., Caysa H., Sodeik B., Söling A. & Messerle M. (2006)
Evaluation of the therapeutic effect of oncolytic Herpes Simplex Viruses by bioluminescence imaging.
Workshop: Viral Vectors, Düsseldorf (Abstract, poster presentation)
- Müther N., Glaß M., Nagel C.-H., Sodeik B., Söling A., Messerle M.,
Construction of novel oncolytic Viruses based on a Herpes Simplex Virus Type 1 BAC for the Therapy of malignant Gliomas, Thrid uropean Congress of Virology, Sept 1-5, Nürnberg 2007 (Abstract, poster presentation)

8 Anhang

8.1 Primer

Die Nukleotid (nt)-Angaben beziehen sich auf die Sequenz des HSV-1 Stamm 17⁺. Großbuchstaben: Homologie zur BAC-Sequenz; Kleinbuchstaben: Homologie zum Template

MG002.rev (nt 47563-47601)	5' CTG CTG GTG GCC CTG GGT TCG CGC GAC GATATC GTC TAC gtt cag aag aac tcg tca aga agg 3'
MG011.for	5' GAT GAA TGG CAG AAA TTC GAT GAT AAG CTGTCAAACATG AGA ATT ggc ctg gtg atg atg gcg gga tc 3'
nm0002-1 (nt 116104-116145)	5' GAG CCG TAA CCC AAC CAA ACC AGG CGT GGT GTG AGT TTG TGG cat gcc tgc tat tgt ctt ccc 3'
nm0003-1 (nt 116157-116213)	5' TGT GAG TTA ATA AAT AAA AGT ATC ACG GTC CAT ACT GGC CTG TCG CGT TGT CTC TGA cta caa gga cga cga cga ca 3'
nm55.for	5' GGA CGA TTA AGG TCT CT 3'
nm56.rev	5' GGC CTC CTA GGG TCA ATT CG 3'
US1.for (nt 132644-132673)	5' ATG GCC GAC ATT TCC CCA GGC GCT TTT GCG gaa aag tgc cac ctg cag at 3'
US1.rev (nt 133877-133906)	5' TCA CGG CCG GAG AAA CGT GTC GCT GCA CGG cag gaa cac tta acg gct ga 3'
US3.for (nt 135222-135251)	5' ATG GCC TGT CGT AAG TTT TGT CGC GTT TAC gaa aag tgc cac ctg cag at 3'
US3.rev (nt 136638-136667)	5' TCA TTT CTG TTG AAA CAG CGG CAA ACA AAG cag gaa cac tta acg gct ga 3'
US5.for (nt 137731-137760)	5' ATG TCT CTG CGC GCA GTC TGG CAT CTG GGG gaa aag tgc cac ctg cag at 3'
US5.rev (nt 137978-138007)	5' ATA CGA CAA CTG GGT CCA TGT AGG GAT GGT cag gaa cac tta acg gct ga 3'

ICP34.5.for (nt 125829-125858)	5´ ATG GCC CGC CGC CGC CGC CAT CGC GGC CCC gaa aag tgc cac ctg cag at 3´
ICP34.5.rev (nt 125112-125141)	5´ TTA GAC CGA GTT CGC CGG GCC GGC TCC GCG cag gaa cac tta acg gct ga 3´
UL39-kan.for (nt 86444-86473)	5´ ATG GCC AGC CGC CCA GCC GCA TCC TCT CCC gcc agt gtt aca acc aat ta 3´
UL39-kan.rev (nt 89828-89857)	5´ TCA CAG CGC GCA GCT CAT GCA GAC AAT GTT cga ttt att caa caa agc ca 3´
ICP34.5zeo.for (nt 576-602)	5´ GTC CCA ACC GCA CAG TCC CAG GTC ACC tgt tga caa tta atc atc ggc at 3´
ICP34.5zeo.rev (nt 1230-1259)	5´ TTA GAC CGA GTT CGC CGG GCC GGC TCC GCG tca gtc ctg ctc ctc ggc ca 3´

8.2 Southern Blot Sonden

Die Nukleotid (nt)-Angaben beziehen sich auf die Sequenz des HSV-1 Stamm 17⁺.

sonde 2.for 5´ CCC AGA GAT GCA TAT CAA CT 3´

sonde 2.rev 5´ GGG GAC GGC GAA CAT CTT GA 3´

8.3 Virus-Mutanten

Die Nukleotid (nt)-Angaben beziehen sich auf die Sequenz des HSV-1 Stamm 17⁺.

Name	Veränderung	genutzte Primer
HSV-1(17 ⁺)Lox-luc	Insertion des <i>firefly</i> - Luciferase- Gens zwischen nt 116146-116156	nm0002-1; nm0003-1
HSV-1(17 ⁺)ΔUS1	Deletion des US1 ORF von nt 132674-133876	US1.for; US1.rev

Anhang

HSV-1(17 ⁺)ΔUS3	Deletion des US3 ORF von nt 135252-136637	US3.for; US3.rev
HSV-1(17 ⁺)ΔUS5	Deletion des US5 ORF von nt 137761-137977	US5.for; US1.rev
HSV-1(17 ⁺)ΔICP34.5	Deletionen beider Kopien des λ34.5 ORFs von nt 125859-125111 und nt 603-1231 sowie Deletion des UL39 ORF von nt 86474-89827	ICP34.5.for; ICP34.5.rev ICP34.5zeo.for; ICP34.5zeo.rev UL39-Kan.for; UL39-Kan.rev