

Aus dem Institut für Virologie (Standort Mitte)
des Fachbereichs Veterinärmedizin und
der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie des
Universitätsklinikums *Benjamin Franklin*
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur mRNA-Expression des Coxsackie-
Adenovirus-Rezeptors (CAR) der Ratte während
der Organogenese und in Rattenkardiomyozytenkulturen
sowie zur Bedeutung der CAR-Expression für den
adenoviralen Gentransfer in
Rattenkardiomyozytenkulturen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kerstin Hinze
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2001

Journal-Nr.: 2580

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. D. Ebner
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. W. Poller
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. H. Ludwig

Tag der Promotion:	28. Juni 2002
--------------------	---------------

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1. Adenoviren	2
2.1.1. Taxonomie	2
2.1.2. Morphologie	3
2.1.2.1. Allgemeine Morphologie	3
2.1.2.2. Genom	4
2.1.2.3. Penton	4
2.1.3. Anlagerung und Aufnahme in die Zielzelle	6
2.2. Adenovirusrezeptoren	8
2.2.1. Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR)	8
2.2.1.1. Morphologie	8
2.2.1.2. Gewebe- und zellspezifische CAR-Expression	11
2.2.1.3. Entwicklungsspezifische CAR-Expression	13
2.2.1.4. Zelluläre Bedeutung von CAR	14
2.2.1.5. Bedeutung von CAR für den adenoviralen Gentransfer	16
2.2.2. Integrine	16
2.3. Vektorsysteme	18
2.3.1. Nichtvirale und virale Vektorsysteme	18
2.3.2. Adenovirale Vektoren	19
2.4. Adenoviraler Gentransfer	20
2.4.1. Adenovektorgenerationen	20
2.4.2. Probleme des gerichteten Gentransfers <i>in vivo</i>	22
2.4.3. Fetaler Gentransfer	24
2.5. Quantitative kompetitive PCR	24

3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1. Untersuchungsmaterial	28
3.1.1. Versuchstiere	28
3.1.2. Zellkulturen	28
3.2. RNA- und DNA-Präparation	29
3.2.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe mit <i>RNA clean</i>	29
3.2.2. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen mit <i>RNA clean</i>	30
3.2.3. Präparation von Gesamt-RNA aus Gewebe mittels <i>RNeasy Mini Kit</i>	30
3.2.4. DNase I- Behandlung der präparierten RNA	31
3.2.4.1. Kombination von RNA-Präparation mittels <i>RNeasy Mini Kit</i> und DNase I-Behandlung	31
3.2.4.2. DNase I-Behandlung mit anschließender RNA-Aufreinigung mittels <i>RNeasy Mini Kit</i>	31
3.2.4.3. DNase I-Behandlung ohne anschließende RNA-Aufreinigung	32
3.2.5. Präparation von genomischer DNA und Adenovektor-DNA aus transduzierten Zellen	32
3.2.6. Präparation von Adenovektor-DNA aus Adenovektor-Präparationen	32
3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese	33
3.2.8. RNA- und DNA- Quantifizierung	33
3.3. Konstruktion der verkürzten RNA-Längenstandards	34
3.3.1. Mutagenese- und Overlap-PCR	34
3.3.2. Ligation und Transformation	35
3.3.3. Plasmidpräparation	35
3.3.4. RNA-Transkription	36
3.4. Analyse von Nukleinsäuren	37
3.4.1. Agarosegelelektrophorese	37
3.4.2. Restriktionsfragmentanalyse	38

3.4.3. DNA-Sequenzierung	38
3.5. Quantitative kompetitive RT-PCR	39
3.5.1. Reverse Transkription	39
3.5.2. PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase	39
3.5.3. Quantitative Analyse der PCR-Produkte	40
3.6. DNA- und RNA-Hybridisierungstechniken	41
3.6.1. Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden mittels „PCR-like“-Markierung	41
3.6.2. Nukleinsäuretransfertechniken	43
3.6.2.1. Northern-Blot	43
3.6.2.2. Dot-Blot	44
3.6.2.3. Southern-Blot	44
3.6.3. Hybridisierung	45
3.6.4. Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte	46
3.7. Adenovirale Transduktion von Zellen	47
3.7.1. Adenovirale Vektoren	47
3.7.2. Transduktion	48
3.7.3. Transgenexpressionsnachweis	48
3.7.3.1. Nachweis der CAR-Expression mittels FACS-Analyse	48
3.7.3.2. Nachweis der GFP-Expression	49
3.7.3.3. Nachweis der Luciferase-Expression	49
4. ERGEBNISSE	
4.1. Evaluierung der kompetitiven RT-PCR	50
4.1.1. Nachweis von rCAR1- und rCAR2-mRNA in verschiedenen Organen	50
4.1.2. Sequenzierung der RNA-Längenstandards	50
4.1.3. Vergleich der Konzentrationen des rCAR1- und rCAR2-Längenstandards	52
4.1.4. Austestung der in der reversen Transkription einzusetzenden Mengen an rCAR1-, rCAR2- und GAPDH-Längenstandard für jedes Organ	52
4.1.5. Ermittlung der optimalen Zykluszahl für die kompetitive RT-PCR	55
4.1.6. Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	56

4.1.6.1.	Wiederholung von PCR und Fragmentanalyse	56
4.1.6.2.	Wiederholung der reversen Transkription mit anschließender PCR und Fragmentanalyse	57
4.1.7.	Ermittlung des GAPDH-Korrekturfaktors	58
4.2.	Ermittlung der relativen rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression während der Organogenese	63
4.2.1.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression im Herzen	63
4.2.2.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression im Gehirn	65
4.2.3.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Lunge	66
4.2.4.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Niere	68
4.2.5.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Skelettmuskulatur	69
4.2.6.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der Leber	71
4.2.7.	Vergleichende Untersuchungen zur rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression	72
4.2.7.1.	Verhältnis zwischen rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression	72
4.2.7.2.	Organverteilung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression	73
4.3.	Untersuchung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in Rattenkardiomyozytenkulturen	76
4.3.1.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Zelldichte	76
4.3.2.	rCAR1-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der Zelldichte	78
4.4.	Untersuchungen zur Bedeutung des CAR für den adenoviralen Gentransfer in Rattenkardiomyozytenkulturen	79
4.4.1.	Überprüfung der eingesetzten Adenovektoren	79
4.4.1.1.	Nachweis der korrekten Insertion der Transgene und Überprüfung der Adenovektoren auf RCA-Freiheit	79
4.4.1.2.	Adenovektorvermittelte hCAR-Expression in verschiedenen Zelllinien	81
4.4.2.	Überprüfung der Adenovektor-Transduktionseffizienz in Rattenkardiomyozytenkulturen	82
4.4.3.	Adenovektorvermittelte hCAR-Expression in Rattenkardiomyozytenkulturen	83
4.4.4.	Einfluß der hCAR-Überexpression auf die Adenovektor-Bindung, -Aufnahme und –Transgenexpression	84

5. DISKUSSION

5.1.	Quantifizierung der rCAR-mRNA-Expression mittels kompetitiver RT-PCR	87
5.2.	rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression während der Organentwicklung	89
5.3.	Einfluß von Zelldichte und Kulturdauer auf die rCAR-mRNA-Expression in Rattenkardiomyozytenkulturen	95
5.4.	Bedeutung des CAR für den adenoviralen Gentransfer in Rattenkardiomyozytenkulturen	98

6. ZUSAMMENFASSUNG 101

7. SUMMARY 103

8. LITERATURVERZEICHNIS 105

9. ANHANG 128

9.1.	Tabelle der verwendeten Primerpaare	128
9.2.	Schematische Darstellung zur Konstruktion eines verkürzten RNA-Längenstandards	129
9.3.	Verwendete Geräte	131
9.4.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	132

Danksagung

Selbstständigkeitserklärung

Veröffentlichungen

Lebenslauf

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium der Freien Universität Berlin nach dem Nachwuchsförderungsgesetz unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Ebner und Herrn Prof. Dr. W. Poller für die Überlassung des Themas und die gewährte freundliche Unterstützung. Insbesondere Herrn Prof. Dr. Poller danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas innerhalb seiner Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Benjamin Franklin des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin.

Ganz herzlich danke ich Frau Xiaomin Wang und Herrn Dr. Henry Fechner aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Poller für die enge Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte Hilfe bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. M. Noutsias danke ich für die Durchführung der Laser-Scanning-Mikroskop-Untersuchungen.

Bei Herrn Dr. Vetter vom Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten Rattenkardiomyozytenkulturen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann, für die mir gegenüber erwiesene Geduld, zahlreiche am Computer und mit hilfreichen Diskussionen verbrachte Abende und die beständige Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus danke ich all denen, die mich und diese Arbeit durch ihr freundschaftliches Interesse und mit Rat und Tat unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, November 2001

Veröffentlichungen

Nach freundlicher Genehmigung durch die Promotionskommission des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sind Teile dieser Dissertation vorab in den folgenden Veröffentlichungen erschienen:

Fechner, H., Wang, X., Wang, H., Jansen, A., Pauschinger, M., Scherubl, H., Bergelson, J. M., Schultheiss, H. P., and Poller, W. (2000). Trans-complementation of vector replication versus Coxsackie-adenovirus-receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. *Gene Ther.* **7**, 1954-1968.

Noutsias, M., Fechner, H., de Jonge, H., Wang, X., Dekkers, D., Houtsmuller, A. B., Pauschinger, M., Bergelson, J., Warrach, R., Yacoub, M., Hetzer, R., Lamers, J., Schultheiss, H. P., and Poller, W. (2001). Human Coxsackie-Adenovirus Receptor Is Colocalized With Integrins $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(5)$ on the Cardiomyocyte Sarcolemma and Upregulated in Dilated Cardiomyopathy: Implications for Cardiotropic Viral Infections. *Circulation* **104**, 275-280.

Fechner, H., Noutsias, M., Hinze, K., Wang, X., Escher, F., Dekkers, D., Lamers, J., Vetter, R., Paul, M., Schultheiss, H.-P., Tschoepe, C., and Poller, W. (2001). Regulation of Coxsackie-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and repair - evidence of cell-cell contact dependent regulation. *Circulation* , eingereicht.

Lebenslauf

Name: Kerstin Hinze

Geburtsdatum: 27.02.1968

Geburtsort: Berlin

Anschrift: Gotlindestr. 45
10365 Berlin

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Ausbildung:

1974–1984	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Berlin-Lichtenberg
1984–1986	Facharbeiterausbildung zum Zootechniker für Rinderproduktion im VEG Tierproduktion Berlin
1987–1989	Volkshochschule in Berlin-Lichtenberg Abschluß: Abitur
WS 1989/90– WS 1995/96	Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin und der Freien Universität Berlin Abschluß: Staatsexamen
1996	Erteilung der Approbation als Tierarzt
SS 1999-SS 2001	Promotionsstudium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Berufstätigkeit:

05/86 – 11/86	Zootechniker im VEG Tierproduktion Berlin
12/86 – 08/89	Laborantin am Institut für Pharmakologische Forschung Berlin-Friedrichsfelde
04/96 – 05/97	Tierärztin in der Kleintierpraxis Dr. G. Löwe in Berlin
07/99 – 06/01	NaFöG-Stipendiat der Freien Universität Berlin
seit 11/01	Tierärztin in der Kleintierpraxis M. Hofmann in Berlin