

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Adenoviren

2.1.1. Taxonomie

Die Familie der Adenoviridae ist in die Genera Aviadenoviridae (Adenoviren [Ad] der Vögel) und Mastadenoviridae (Adenoviren der Säugetiere) eingeteilt, die wiederum in zahlreiche Subgenera unterteilt sind und neben den humanen Ad auch bovine, porcine, ovine, canine, equine, caprine, murine und Affen-Ad enthalten. Die humanen Ad sind in 6 Subgruppen (A bis F) unterteilt, denen 49 Serotypen (Horwitz 1996) nach ihrer genetischen Variabilität, dem onkogenen Potential, dem G- und C-Gehalt ihrer DNA und der Resistenz gegen neutralisierende Antikörper zugeteilt werden (Wadell *et al.* 1980; Wadell *et al.* 1987). Des weiteren erfolgt eine Subklassifikation der Subgruppen aufgrund des Hämagglutinationsmusters (z.B. BI und BIII, DI bis DIII) (Hierholzer 1973; Mei and Wadell 1996; Eiz and Pring-Akerblom 1997).

Ad, die nach ihrer Erstisolierung 1954 aus adenoidem Gewebe benannt wurden, sind das kausale Agens verschiedener akuter, in der Regel mild verlaufender Erkrankungen bei Mensch und Tier. Nutztiere (v.a. Kalb, Lamm, Fohlen) zeigen respiratorisch-enterale Symptome, während es bei Hunden nach einer Infektion mit dem caninen Ad 1 zu einer akuten septikämischen Erkrankung mit bevorzugter Manifestation in Gefäßen, Leber und dem Zentralnervensystem kommt (Hepatitis contagiosa canis).

Die humanen Ad können in 2 phänotypische Gruppen eingeteilt werden (Bailey and Mautner 1994), wobei Vertreter der Subgruppen A und F der gastrointestinalen Gruppe zugeordnet werden (z. B. Infektionen der Darmkrypten durch Ad 12 (A), Gastroenteritis durch Ad 40 und 41 (F) (Wadell *et al.* 1987), während Vertreter der Subgruppen B (z.B. Ad 3), C (z.B. Ad 2 und 5) und E (z.B. Ad 4) der respiratorischen Gruppe angehören und v. a. eine Infektion der oberen Luftwege bewirken, von der hauptsächlich Kleinkinder betroffen sind. Ad der Subgruppe C wurden jedoch auch im Myokard von Kindern und Erwachsenen mit Myokarditis bzw. dilatativer Kardiomyopathie (DCM) nachgewiesen (Martin *et al.* 1994; Pauschinger *et al.* 1999). Ad der Subgruppe D (z.B. Ad 8, 9, 19, 37) können eine epidemische Konjunktivitis verursachen (Curtis *et al.* 1998; Viswalingam 1993).

Ad stellen außerdem bei anormalen Schwangerschaften (fetale Wachstumsrestriktion, Oligohydramnion, nichtimmuner fetaler Hydrops) die am häufigsten isolierten viralen Pathogene in der Amnionflüssigkeit dar (Van, I *et al.* 1998; Wenstrom *et al.* 1998).

2.1.2. Morphologie

2.1.2.1. Allgemeine Morphologie

Bei Ad handelt es sich um unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 70 bis 90 nm (Nemerow and Stewart 1999), die ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 36 kb besitzen, dessen Molekulargewicht 150×10^6 Da beträgt (Stewart *et al.* 1991). Sie verfügen über eine kubische Kapsidsymmetrie in Form eines Ikosaeders, der aus 20 gleichseitigen Dreiecksflächen besteht und dessen 12 Ecken von den Spitzen jeweils 5 benachbarter Flächen gebildet werden. Die 5 an den Ecken befindlichen Proteinuntereinheiten vereinigen sich zu 12 Kapsomeren, die als Pentamere oder Pentone bezeichnet werden und die Basis für antennenartige Fibern darstellen. Der Rest des Virions wird von 240 Hexameren gebildet, die als Trimere vorliegen und deren hervorstehende Schlaufen die Hauptepitope für neutralisierende Antikörper (Ak) darstellen (Shenk T. 1996). Ad enthalten 11 Strukturproteine, von denen 7 das Kapsid bilden und die übrigen 4 (Protein V, VII, μ und terminales Protein) gemeinsam mit der DNA als Core bezeichnet werden (Stewart *et al.* 1991) (Abb. 2.1.).

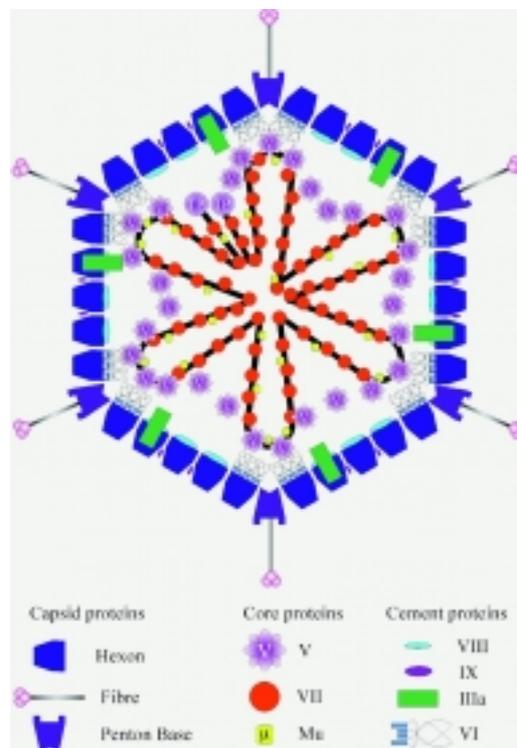


Abb. 2.1.
Morphologie eines Adenovirus (Russell 2000)

2.1.2.2. Genom

Das etwa 36 kb große Genom der Ad enthält überlappende transkriptionale Einheiten auf beiden DNA-Strängen, die über 50 Polypeptide kodieren (Shenk T. 1996). Die Gene sind in 5 funktionellen Gruppen angeordnet, von denen 4 (E1 bis E4) zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion aktiviert werden, während die Gruppe der spät exprimierten Gene (L) für die Synthese der viralen Strukturproteine (Kapsidbildung) verantwortlich ist (Shenk T. 1996)

Die E1-Gene werden sehr schnell transkribiert und fördern die Expression zellulärer Gene für die DNA-Replikation und die Transkription der anderen frühen Virusgene. E1B-Genprodukte blockieren den Apoptoseweg und gewährleisten damit den zeitlichen Rahmen für eine produktive Virusinfektion, während die E2-Genprodukte direkt in die DNA-Replikation involviert sind (z.B. Polymerase) (Russell 2000) Das E3-Gen ist für die eigentliche Virusvermehrung abkömmlich, spielt jedoch eine wesentliche Rolle bei der Immunüberwachung *in vivo* (Wold and Gooding 1991). So kodiert es Proteine mit immunsuppressiven Funktionen, behindert die MHC-Klasse-I-vermittelte Antigen-Präsentation an der Zelloberfläche, wodurch die Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten gehemmt wird und hemmt die Apoptose infizierter Zellen. Das E4-Gen ist ebenso wie E1 und E2 unerlässlich für die virale Genomreplikation, da die kodierten Proteine die selektive Expression von viralen Genen auf Kosten der zellulären Gene fördern (Hackett N.R. and Crystal R.G. 2000).

2.1.2.3. Penton

Das Ad-Penton besteht aus einem 320 kDa Pentonbasisprotein und einem 182 kDa Fiberprotein (Stewart *et al.* 1991; Stewart *et al.* 1993). Während die Interaktion des Fiberproteins mit dem zellulären Rezeptor für die Anlagerung (Attachment) an die Zielzelle verantwortlich ist, bewirkt die Interaktion des Pentonbasisproteins, speziell des RGD-Musters mit zellulären Integrinen die Virusinternalisierung (Wickham *et al.* 1993). Das Pentonbasisprotein besteht aus 5 identischen Polypeptiduntereinheiten, von denen jede eine Protrusion in Form einer oberflächlichen Schlaufe besitzt, die über die Proteintertiärstruktur hinausragt und eine Arginin-Glycin-Asparagin (RGD)-Sequenz enthält (Roelvink *et al.* 1998). Eine Ausnahme stellt der Serotyp F dar, der kein RGD-Muster besitzt (Roelvink *et al.* 1998). Die Protrusionen sind aufgrund der Anzahl der Aminosäure (AS)-Reste, die das RGD-Muster flankieren, bei den einzelnen Ad-Serotypen unterschiedlich lang. So besitzen sie bei Ad 2 und

Ad 5 80 AS-Reste (Neumann *et al.* 1988) und sind ebenso wie bei Ad 3 hoch beweglich (Schoehn *et al.* 1996; Chiu *et al.* 1999), während sie bei Ad 12 mit 20 AS-Resten (Sprenkel *et al.* 1994) kürzer und wahrscheinlich auch weniger flexibel sind (Chiu *et al.* 1999). Die spezielle räumliche Anordnung der 5 RGD-Protrusionen ist verantwortlich für das Integrinclustering (Chiu *et al.* 1999).

Das Ad-Fiberprotein stellt ein Oligomer aus 3 identischen Polypeptiduntereinheiten von 30 bis 65 kDa dar (Ruigrok *et al.* 1990), wobei jedes Monomer aus den Domänen Endstück – Schaft - Kopfstück zusammengesetzt ist (Stevenson *et al.* 1995). Das N-terminale Endstück verbindet die Fiber mit dem Pentonbasisprotein (Philipson *et al.* 1968) und besteht bei Ad 2 und 5 aus 46 AS (Chroboczek *et al.* 1995; Hong *et al.* 1997). Der sich anschließende Schaft besteht aus einer serotypenabhängigen Anzahl sich wiederholender Muster (β -repeats) aus 15 AS (van Raaij *et al.* 1999). So besitzen Ad der Subgruppe A und C mit 23 bzw. 22 Wiederholungen verhältnismäßig lange Fibern, Ad der Subgruppe E mit 12 Wiederholungen mittlere Fibern und Ad der Subgruppe B und D verfügen mit 6 bzw. 8 Wiederholungen über eher kurze Fibern (Chroboczek *et al.* 1995). Ad der Subgruppe F besitzen sowohl mittlere (12 Wiederholungen) als auch lange Fibern (22 Wiederholungen) (Chroboczek *et al.* 1995). Das carboxyterminale Ende der Fiber wird von einer knaufartigen globulären Domäne (Knob) gebildet (Philipson *et al.* 1968) und gewährleistet die Spezifität der Zellrezeptorerkennung (Henry *et al.* 1994; Louis *et al.* 1994; Fender *et al.* 1995; Stevenson *et al.* 1995; Krasnykh *et al.* 1996; Roelvink *et al.* 1996).

Vor allem der Fiberkopf der Ad 2 und 5 ist aufgrund der Verwendung dieser Serotypen als adenovirale Vektoren Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen (Xia *et al.* 1994; Roelvink *et al.* 1999; Santis *et al.* 1999; van Raaij *et al.* 1999). Es handelt sich um ein lösliches trimeres Protein in Form eines 3-flügeligen Propellers, der zentral eine oberflächliche Depression aufweist. Die einzelnen Monomere bestehen aus einer 8-strängigen antiparallelen β -Sandwich-Struktur (Henry *et al.* 1994; Xia *et al.* 1994), von denen die β -Stränge C, B, A, und J das V-Blatt bilden, das in Richtung Virion zeigt, während die β -Stränge G, H, I und D das R- Blatt bilden und in Richtung Rezeptor weisen (Xia *et al.* 1994). Während durch Deletionsanalysen im R-Blatt des Ad5-Knob Bindungsmuster für den spezifischen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) festgestellt wurden und außerdem vermutet wurde, daß die β -Stränge E und F oder eine benachbarte Region in die Rezeptorerkennung einbezogen sind (Santis *et al.* 1999), halten andere Untersucher Teile der seitlich hervortretenden AB-Schleife des V-Blattes, den β -Strang B und die DE-Schleife für die wesentlichen Elemente des CAR-Bindungsortes (Roelvink *et al.* 1999). Dies beruht auf

einem Vergleich der AS-Sequenzen des Fiber-Knobs verschiedener Ad-Serotypen, die alle den CAR nutzen und sich zwar zu 29 bis 66 % von der Ad 5-Sequenz unterscheiden, jedoch in einigen wenigen AS in ähnlichen Positionen (AB-Schleife, B-Strang) übereinstimmen. Einzelne Mutationen in der AB-Schleife, der DG-Schleife und dem β -Strang F führten zu einer stark reduzierten Bindungsaffinität zwischen isoliertem Ad5-Fiberknob und CAR (Kirby *et al.* 2000). Auch für andere Untersucher spielt die AB-Schleife eine essentielle Rolle in der Interaktion mit dem zellulären Rezeptorprotein CAR (Bewley *et al.* 1999) bzw. wird der seitliche Bereich zwischen zwei Monomeren, der von der AB-Schleife des einen Monomers und der DG-Schleife des benachbarten Monomers gebildet wird als Rezeptorbindungsort favorisiert (van Raaij *et al.* 1999). Die sich daraus ergebende Schlußfolgerung, daß das Kopf-Trimer 3 Rezeptormoleküle (CAR) binden kann (Roelvink *et al.* 1999; van Raaij *et al.* 1999; Tomko *et al.* 2000) wird auch durch andere Untersucher unterstützt, die nach Untersuchungen des Molekulargewichtes von isoliertem Ad 12-Knob und der Immunglobulin (Ig) V-Domäne von CAR mehr als ein gebundenes Rezeptormolekül vermuten (Freimuth *et al.* 1999) bzw. feststellten, daß auch einzelne Ad 5-Knob-Monomere Rezeptor binden können, jedoch mit geringerer Affinität (Santis *et al.* 1999).

2.1.3. Anlagerung und Aufnahme in die Zielzelle

Die Voraussetzung für eine Infektion ist der rezeptorvermittelte Kontakt zwischen Virus und Zielzelle (Attachment). Dies erfolgt bei der Mehrzahl der Ad durch die Bildung eines hochaffinitiven Komplexes zwischen dem Ad-Fiberknob und dem spezifischen Rezeptor der Wirtszelle (Wickham *et al.* 1993; Mayr and Freimuth 1997), dem CAR (Bergelson *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997). Eine Ausnahme stellen die Serotypen 3 (Defer *et al.* 1990; Di Guilmi *et al.* 1995; Stevenson *et al.* 1995; Roelvink *et al.* 1998), 7 (Roelvink *et al.* 1998) und 35 (Bergelson *et al.* 1997; Shayakhmetov *et al.* 2000) der Subgruppe B sowie die Serotypen 8 und 37 der Subgruppe D (Huang *et al.* 1999; Arnberg *et al.* 2000) dar, die einen anderen Rezeptor nutzen.

Die effiziente Virusaufnahme in die Zelle erfordert in einem separaten (unabhängig von der Fiber-Zell-Erkennung), aber kooperativen Schritt eine Interaktion der RGD-Protrusion des Pentonbasisproteins mit zellulären α_v -Integrinen, insbesondere $\alpha_v\beta_5$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen (Wadell *et al.* 1980; Stewart *et al.* 1993; Wickham *et al.* 1993; Bai *et al.* 1994; Mathias *et al.* 1994; Wickham *et al.* 1994; Stevenson *et al.* 1995). Es ist bisher unbekannt, ob die Integrinbindung gleichzeitig mit der CAR-Bindung oder im Anschluß daran erfolgt

(Nemerow 2000). Nach einem Modell für Ad 5 (relativ langer Fiberschaft), dessen Gültigkeit noch nicht erwiesen ist, kommt es erst zu einer CAR-Bindung, in deren Ergebnis die Fiber durch eine Konformationsänderung umknickt und so einen engen Kontakt des Virions mit der Zelloberfläche ermöglicht, wodurch eine Interaktion des Pentonbasisproteins mit α_v -Integrinen erleichtert wird (Nemerow 2000). Die integrinvermittelte Internalisierung erfolgt bei 37°C innerhalb von 5 min (Greber *et al.* 1993; Wickham *et al.* 1993), wobei die Viruspartikel gemeinsam mit den assoziierten Integrinen in clathrinausgekleidete Vesikel (clathrin coated pits) aufgenommen werden (Varga *et al.* 1991; Greber *et al.* 1993; Wickham *et al.* 1993), während die Fiberproteine an der Oberfläche verbleiben (Nemerow 2000). Dynamin (Zytosol-GTPase) reguliert die clathrinvermittelte Endozytose (Damke *et al.* 1994), wobei zahlreiche Signalmoleküle (Phosphatidylinosit-3-OH-Kinase, CDC42, Rho A, GTPase Rac1, Docking-Molekül p130 CAS), die zum Teil durch die Interaktion Pentonbasisprotein-Integrin aktiviert werden, die Ad-Endozytose durch eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Aktinpolymerisation) fördern (Li *et al.* 1998a; Li *et al.* 1998b; Li *et al.* 2000). Nach der Aufnahme in die clathrin coated pits kommt es zu einer Dissoziation des Clathrinmantels (Helenius *et al.* 1980) und durch die Tätigkeit von Protonenpumpen in der Endosomenmembran zu einem Abfall des pH-Wertes (pH 6,2) im Endosom, der eine Konformationsänderung und einen partiellen Abbau des Kapsids zur Folge hat (Svensson 1985). Ad-Partikel besitzen die Fähigkeit, die endosomale Membran vor der Fusion mit lysosomalen Vakuolen und der Degeneration durch lysosomale Enzyme zu zerstören (Greber *et al.* 1993). Diese spezifische Eigenschaft wird durch ein TVD-Muster im zytoplasmatischen Ende der β_5 -Integrinuntereinheit reguliert (Wang *et al.* 2000) und erfordert die Interaktion der $\alpha_v\beta_5$ -Integrine mit anderen Zellfaktoren und dem Pentonbasisprotein (Wickham *et al.* 1994; Cotten and Weber 1995). Nach dem Entweichen aus dem Endosom erfolgt der Transit der freien Viruspartikel zum Zellkern. Dabei sind die Ad-Kapside mit den Mikrotubuli assoziiert und nutzen die Mikrotubuli-Motoren um in den Kernporenkomplex zu gelangen (Saphire *et al.* 2000). Im Kernplasma erfolgt die Replikation.

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass der Zellzyklus einen Einfluß auf die Ad-Infektion besitzt. Basierend auf Beobachtungen, dass die Ad-Infektion in klonalen Zellpopulationen von Zelle zu Zelle variiert, konnte gezeigt werden, dass Zellen, die sich in der M-Phase befinden, vermehrt Rezeptor an der Zelloberfläche exprimieren (1,5 mal mehr CAR und 2,3 mal mehr α_v -Integrin), entsprechend mehr Kapsid binden und eine höhere Transgenexpression aufweisen (Seidman *et al.* 2001).

2.2. Adenovirusrezeptoren

2.2.1. Coxsackie-und Adenovirus-Rezeptor

2.2.1.1. Morphologie

Nachdem bereits vor über 20 Jahren festgestellt wurde, daß Ad 2 mit dem strukturell und genetisch verschiedenen Coxsackievirus B3 um einen gemeinsamen Zelloberflächenbindungsort konkurriert (Lonberg-Holm *et al.* 1976), wurde 1997 demonstriert, daß ein 46 kDa-Zelloberflächenprotein einen Rezeptor für Coxsackie-und Adenoviren darstellt (Bergelson *et al.* 1997; Carson *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997). Dieser CAR ist ein etwa 365 AS großes Transmembranprotein mit zwei aminoterminalen immunglobulinähnlichen extrazellulären Domänen [Domäne 1 ist mit IgV verwandt, Domäne 2 ist mit IgC2 verwandt (Williams and Barclay 1988)], einer 22 AS großen membranüberspannenden helikalen Domäne und einer mit 107 AS relativ großen und hochkonservierten carboxyterminalen intrazellulären Domäne (Bergelson *et al.* 1997). Neben der Erstisolierung des Rezeptors beim Menschen (hCAR) und der Maus (mCAR) (Bergelson *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997), konnte auch bei der Ratte (rCAR), beim Schwein (pCAR), beim Hund (dCAR) (Fechner *et al.* 1999), beim Rind (Thoelen *et al.* 2001b) sowie beim Zebrafisch (van Raaij *et al.* 2000) ein eigener Rezeptor isoliert werden (Abb. 2.2.). Untersuchungen mit der Methode von Kyte & Doolittle (Kyte and Doolittle 1982) und Chou & Fasman (Chou and Fasman 1974) zeigten ähnliche hydrophile und hydrophobe Domänen bei hCAR, rCAR, pCAR und dCAR (Fechner *et al.* 1999). Des weiteren konnten, anfänglich bei der Maus (Bergelson *et al.* 1998), später auch bei Mensch und Ratte (Fechner *et al.* 1999), zwei CAR-Isoformen (CAR1/CAR2) isoliert werden, die sich nur im C-terminalen Ende unterscheiden, wobei CAR2 (mCAR2) gegenüber CAR1 (mCAR1) um 13 AS kürzer ist und 13 AS ausgetauscht sind (insgesamt 26 AS verändert), eine Änderung, die nicht essentiell für die Ad-Rezeptorfunktion ist (Bergelson *et al.* 1998) (Abb. 2.2.).

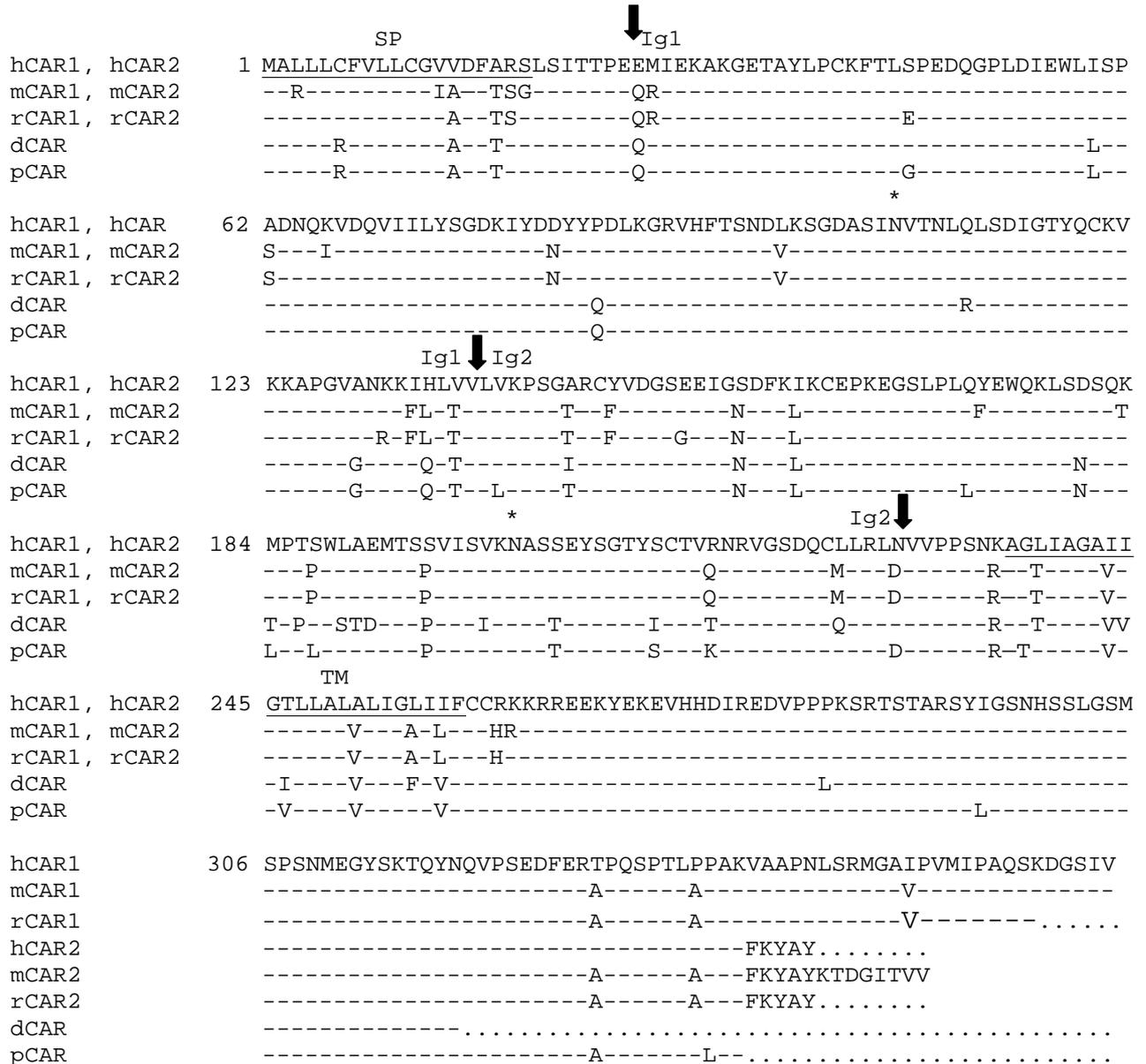


Abb. 2.2.

Aminosäuresequenz des hCAR1, hCAR2, mCAR1, mCAR2, rCAR1, rCAR2, pCAR, dCAR entsprechend der bei Tomko *et al.* (1997) und Fechner *et al.* (1999) publizierten Daten. Zum hCAR identische Aminosäuren sind durch Striche (-) gekennzeichnet, Punkte (.) kennzeichnen unbekannte Sequenzen. Die Position des potentiellen Signalpeptids (SP) und der Transmembrandomäne (TM) sind unterstrichen, die Positionen der extrazellulären Ig-Domänen Ig1 und Ig2 gekennzeichnet. Potentielle N-Glykolysierungsorte sind durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

Das hCAR kodierende Gen konnte auf dem humanen Chromosom 21 (21q11.2) lokalisiert werden (Bergelson *et al.* 1997; Mayr and Freimuth 1997; Tomko *et al.* 1997). Daneben scheinen zahlreiche Pseudogene auf den Chromosomen 15, 18 und 21 zu existieren, die jedoch aufgrund von Insertionen, Deletionen oder einfachen Basenfehlpaarungen kein

funktionales Protein kodieren (Bowles *et al.* 1999). Das hCAR-Gen besteht aus 7 Exons und umfasst 52647 bp (Bowles *et al.* 1999) (Abb. 2.3.).

Thoelen *et al.* (2001a) konnten für hCAR die Existenz von 3 exonüberspringenden Splicevarianten zusätzlich zum originalen, 7 Exons umfassenden mRNA-Transkript zeigen, denen die Exons 5 und 6 (β -Variante) bzw. 3 bis 6 (γ und δ -Variante) fehlen und die über unterschiedliche Stop-Kodons im Exon 7 verfügen.

Nach Cohen *et al.* (2001) könnten auch die CAR-Isoformen hCAR1 und hCAR2 auf einem alternativen Splicing der prä-mRNA beruhen. Andersson *et al.* (2000) konnten dagegen zeigen, dass die Isoformen auf die Existenz eines alternativen Exons 27 kb *downstream* von Exon 7 zurückzuführen sind.

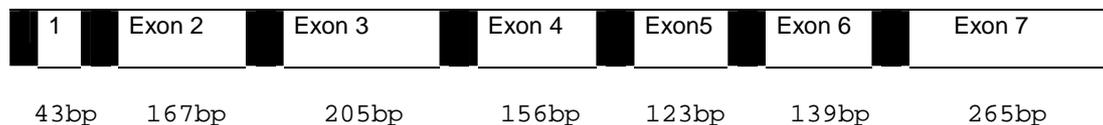


Abb. 2.3.

Genstruktur des humanen CAR (Bowles *et al.* 1999); *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Accession Nummer (AF200465)

CAR kann in die Immunglobulin-Superfamilie eingeordnet werden (Tomko *et al.* 2000) und weist die höchste Übereinstimmung mit dem CTX-Protein (zuerst identifiziert als cortical thymocyte marker bei *Xenopus laevi* (Chretien *et al.* 1998) und dem humanen A33-Antigen (Expression in Kolonkarzinomzellen) auf (Heath *et al.* 1997; Honda *et al.* 2000). Andere Mitglieder dieser Familie, wie NCAM (neural cell adhesion molecule), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), PDGFR (platelet derived growth factor receptor) und MHC (major histocompatibility complex)-Klasse I und II sind an zahlreichen Funktionen wie Zelladhäsion und Antigenpräsentation beteiligt und dienen als Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Orr *et al.* 1979; Kaufman *et al.* 1984; Yarden *et al.* 1986; Cunningham *et al.* 1987) oder als Virusrezeptor [ICAM-1 für Rhinoviren (Staunton *et al.* 1989), PVR für Polioviren (Mendelsohn *et al.* 1989), CD 4 für HIV I (Maddon *et al.* 1986)].

Die $\alpha 2$ -Domäne der schweren Kette des humanen MHC-Klasse I-Moleküls soll ebenfalls als Rezeptor für Ad 5 fungieren (Hong *et al.* 1997), was von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden konnte (Hemmi *et al.* 1998; Davison *et al.* 1999; McDonald *et al.* 1999). MHC-Klasse I-Moleküle sind jedoch sehr polymorph und es ist noch nicht klar, ob eventuell eine Untereinheit eine Funktion im Ad-Attachment besitzt (Bergelson 1999).

In mehreren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sowohl die zytoplasmatische als auch die transmembrane CAR-Domäne nicht notwendig für die Virusbindung bzw. den Viruseintritt sind und allein die extrazelluläre Domäne als Docking-Protein fungiert (Bergelson *et al.* 1998; Leon *et al.* 1998; Nalbantoglu *et al.* 1999; Wang and Bergelson 1999). Speziell die mit dem IgV verwandte D1-Domäne besitzt die Ad-Bindungsaktivität und ist auch allein ausreichend für die Bindung der Ad-Fiberknobdomäne (Freimuth *et al.* 1999). Dies wird durch die hohe AS-Sequenzhomologie in diesem Bereich bei verschiedenen Spezies (Ratte, Schwein, Hund) unterstützt (Fechner *et al.* 1999).

2.2.1.2. Gewebe- und zellspezifische CAR-Expression

Der CAR dient neben den oben erwähnten humanen Ad-Serotypen und dem aviären Ad CELO (Tan *et al.* 2001) auch den humanen Coxsackievirus B Serotypen 1-6 (Martino *et al.* 2000) und dem porcinen Coxsackievirus B5 als dem Erreger der vesikulären Schweinekrankheit als Rezeptor (Martino *et al.* 1998). Coxsackie-B-Viren (CVB) aus der Gattung Enterovirus der Picornaviridae unterscheiden sich als unbehüllte Einzelstrang-RNA-Viren ohne Fiberstrukturen strukturell stark von den Ad. Ihre Bindung an die Zielzelle erfolgt durch das Einschleiben des Rezeptors in eine canyonartige Vertiefung der Virusoberfläche (Muckelbauer *et al.* 1995). Neben CAR kann DAF (decay acceleration factor, CD 55), eine regulatorische Komponente des Komplementweges, einigen Serotypen sowie dem Virus der vesikulären Schweinekrankheit als Korezeptor dienen (Bergelson *et al.* 1995; Martino *et al.* 1998).

CVB können beim Menschen verschiedene Organe wie Gehirn, Darm, Herz, Pankreas und Lunge infizieren (Melnick J.L. 1996), neugeborene Mäuse sind besonders empfänglich für Enzephalitis durch CVB 3 (Grodums E.L. and Dempster G. 1959; Grodums E.L. and Dempster G. 1961), während adulte Mäuse Läsionen in der Leber und im Herzen aufweisen (Melnick J.L. 1996). Bei Schweinen kommt es nach einer Infektion mit dem Virus der vesikulären Schweinekrankheit zur Aphtenbildung im Maul- und Klauenbereich (Nardelli *et al.* 1968).

Die Verteilung der CAR-Expression korreliert mit dem breiten Tropismus von CVB, wohingegen Ad einen viel begrenzteren Tropismus aufweisen (v.a. oberer Respirationstrakt, Magen-Darm-Trakt). So konnte beim erwachsenen Menschen die höchste CAR-mRNA-Expression im Herzen, im Pankreas und im Gehirn (Tomko *et al.* 1997; Bergelson *et al.* 1998; Fechner *et al.* 1999) sowie im Dünndarm und Hoden/ Prostata (Tomko *et al.* 1997) ermittelt

werden und eine mittlere bis geringe Expression in der Leber, der Lunge und der Niere (Bergelson *et al.* 1998; Fechner *et al.* 1999). Adulte Mäuse wiesen die höchste CAR-mRNA-Expression in der Leber und relativ hohe Expressionswerte in Herz, Lunge und Niere (Tomko *et al.* 1997; Bergelson *et al.* 1998; Fechner *et al.* 1999) sowie im Gehirn auf (Tomko *et al.* 1997; Fechner *et al.* 1999). Adulte Ratten zeigten ein ähnliches Expressionsmuster wie adulte Mäuse (Fechner *et al.* 1999). Sowohl beim Menschen als auch bei adulten Ratten und Mäusen konnte keine oder nur eine äußerst geringe CAR-mRNA-Expression in der Skelettmuskulatur und der Milz gefunden werden (Bergelson *et al.* 1998).

Immunhistochemische Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die CAR-Expression auf bestimmte Zelltypen innerhalb eines Organs begrenzt zu sein scheint. So zeigten adulte Ratten eine Rezeptorexpression in den ependymalen Zellen des Ventrikelsystems, im Epithel des Respirationstraktes (außer Lungenalveolen), in epithelialen Zellen von Niere, Leber und Darm und vereinzelt auch in Herz und Pankreas (Tomko *et al.* 2000). Auch bei Mäuseembryonen konnte neben einer hohen CAR-Expression im zentralen und peripheren Nervensystem vor allem in epithelialen Zellen verschiedener Organe eine CAR-Expression nachgewiesen werden, so z.B. in Basalzellen der Haut und im Epithel von Darm, Mundhöhle und Nase (Tomko *et al.* 2000). Die beim Menschen gefundene hohe CAR-mRNA-Expression im Pankreas beschränkt sich auf azinöse Zellen, während in Inselzellen keine CAR-Expression nachgewiesen werden konnte (Mena *et al.* 2000).

Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass sich die subzelluläre Verteilung von CAR am differenzierten Atemwegsepithel und polarisierten MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells) auf die basolaterale Seite beschränkt und apikal kein CAR vorhanden ist (Pickles *et al.* 1998; Freimuth *et al.* 1999; Walters *et al.* 1999; Pickles *et al.* 2000). Nach der Transfektion dieser Zellen mit CAR-Mutanten, denen die transmembrane und zytoplasmatische CAR-Domäne fehlte, konnte dagegen eine vorwiegend apikale Lokalisation erreicht werden (Pickles *et al.* 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Information für die basolaterale Expression v.a. in den AS 345 bis 349 (LSRMG) enthalten ist, wobei zusätzliche Informationen auch zwischen den AS 318 und 345 sowie 261 und 315 vorhanden sein müssen (Cohen *et al.* 2001). Daneben wurde CAR subzellulär in Zellausläufern (Neuriten) von Nervenzellen (Honda *et al.* 2000) sowie in Herzmuskelzellen an Zell-Zell-Kontaktstellen des Sarkolemmes bzw. im Bereich der Disci intercalares nachgewiesen (Noutsias *et al.* 2001).

2.2.1.3. Entwicklungsspezifische CAR-Expression

Neben der tierartlich unterschiedlichen Gewebeverteilung konnte auch eine entwicklungsbedingte unterschiedliche Expression in den verschiedenen Geweben festgestellt werden. So steht die besondere Empfänglichkeit neugeborener Mäuse für Enzephalitis durch CVB3 (s.o.) in Relation zu einer reichlichen Rezeptorexpression im neonatalen Gehirn (Kunin C.M. and Halmagyi N.E. 1961; Kunin C.M. 1962) und die relative Resistenz älterer Mäuse gegen Enzephalitis (Grodums E.L. and Dempster G. 1959; Grodums E.L. and Dempster G. 1961) begründet sich in einer mit dem Alter stark abfallenden Rezeptorexpression (Xu and Crowell 1996). Durch neuere Untersuchungen auf Protein- und mRNA-Ebene wurden diese Ergebnisse konkretisiert. So konnte im Gehirn von Mäuseembryonen eine vom Tag 10,5 p.c. bis zur Geburt hin ansteigende Expression an CAR und CAR-mRNA nachgewiesen werden. Nach der Geburt kam es zu einem Abfall, wobei die Werte 7 Tage nach der Geburt etwa den Werten vom Tag 16,5 p.c. entsprachen. Nach 21 Tagen war nur noch wenig CAR und nach 60 Tagen weder CAR noch CAR-mRNA nachweisbar (Honda *et al.* 2000). Neugeborene Mäuse wiesen die höchste CAR- und CAR-mRNA-Expression im Gehirn auf (v.a. in Kortex, Meningen, Mittelhirn, Hippocampus). Während CAR-mRNA in geringen Mengen auch in Herz, Niere und Leber, nicht jedoch in der Lunge nachgewiesen werden konnte, wurde CAR nur schwach im Herzen und nicht in Lunge, Leber und Niere nachgewiesen (Honda *et al.* 2000).

Schachtner *et al.* (1999) fanden bei Mäuseembryonen (Tag 12 p.c.) v.a. im Gehirn und in der Leber, aber auch im Herzen und im Epithel der Luftwege eine hohe CAR-mRNA-Expression. Auch andere Untersucher fanden bei neugeborenen Mäusen bzw. Mäuseembryonen (Tag 15 p.c.) eine hohe CAR-Expression im Gehirn bzw. im zentralen und peripheren Nervensystem (Hotta *et al.* 1998; Tomko *et al.* 2000), aber auch im Herzen (Hotta *et al.* 1998), die sowohl im Gehirn als auch im Herz so stark abfiel, daß sie bei adulten Mäusen nicht mehr nachweisbar war (Hotta *et al.* 1998).

Immunhistochemische und RT-PCR-Untersuchungen an Rattenherzen zeigten ähnliche Ergebnisse (reichlich CAR bei neugeborenen Tieren, kaum CAR bei adulten) (Ito *et al.* 2000). Nalbantoglu *et al.* (1999) konnten im Herzen von 3 Tage alten Mäusen mittels RT-PCR einen mäßigen CAR-mRNA-Level nachweisen, der sich jedoch bis zum Tag 60 nach der Geburt nicht veränderte. Sie fanden aber in der Skelettmuskulatur von Mäusen, dass ein am Tag 3 p.p. vorhandener niedriger CAR-mRNA-Level bei adulten Tieren bis zur Nachweisgrenze abfiel.

2.2.1.4. Zelluläre Bedeutung von CAR

Über die zelluläre Bedeutung von CAR ist bisher wenig bekannt. CAR wird der Immunglobulinklasse zugeordnet, deren Vertreter an zahlreichen Adhäsionsprozessen beteiligt sind. Im Rahmen einer Kristallisationsstudie konnte gezeigt werden, dass die für die Ad-Bindung verantwortliche extrazelluläre Ig-Domäne D1 als Dimer vorliegt, das dem CD2-D1-CD58-D1-Heterodimer sehr ähnlich ist und eine Dissoziationskonstante besitzt, die typisch für andere Zelladhäsionskomplexe ist (van Raaij *et al.* 2000). Diese Erkenntnisse als auch Ergebnisse, wonach CAR vor allem in der embryonalen Phase (v.a. in Gehirn und Herz) (Hotta *et al.* 1998; Schachtner *et al.* 1999; Ito *et al.* 2000; Tomko *et al.* 2000) und bei unreifen Zellen [basale Zellen im geschichteten oropharyngealen Epithel (Hutchin *et al.* 2000), unreife Skelettmuskelfasern (Nalbantoglu *et al.* 1999; Cho *et al.* 2000)] bzw. sich regenerierenden Zellen [regenerierende Skelettmuskelfasern (Nalbantoglu *et al.* 1999), in Herzmuskelzellen nach experimenteller Autoimmunmyokarditis mit Beginn der akuten Entzündungsphase (Ito *et al.* 2000)] sowie in Herzmuskelzellen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Noutsias *et al.* 2001) erhöht exprimiert wird, lassen eine Beteiligung an Adhäsionsprozessen vermuten. So können Harnblasentumorzellen in Abhängigkeit von ihrer CAR-Expression Zellaggregate bilden, wobei durch eine Blockierung der interzellulären Adhäsion mit dem CAR-spezifischen monoklonalen Ak RmcB demonstriert werden konnte, dass diese Aggregatbildung spezifisch durch das CAR-Protein vermittelt wird (Okegawa *et al.* 2001). Auch Honda *et al.* (2000) konnten mit einem Aggregationsassay zeigen, dass CAR in Zelladhäsionsprozesse involviert ist und im sich entwickelnden Nervensystem von Mäusen als Adhäsionsmolekül im neuronalen Netzwerk fungieren kann. Die immunhistochemisch gefundene subzelluläre Lokalisation von CAR in den Filopodia der Wachtumszapfen (growth cones) und Neuriten von primären Neuronen des Hippocampus unterstützt diese These (Honda *et al.* 2000). Die Bedeutung von Membranproteinen als Erkennungsmolekül bei der Neuritenextension und dem Finden geeigneter Zellen zum Aufbau neuronaler Verbindungen ist bereits seit längerer Zeit bekannt (Hynes and Lander 1992; Goodman and Shatz 1993) und äußert sich in einer transienten Expression von Adhäsionsmolekülen vor allem zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt, wenn die Neuronen hauptsächlich mit Zell-Zell-Interaktionen befaßt sind.

In neonatalen Rattenkardiomyozyten, die mit hCAR transfiziert wurden, konnte CAR ebenso wie in Herzmuskelzellen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie subzellulär an Zell-Zell-Kontaktstellen des Sarkolemmes bzw. im Bereich der Disci intercalares (Glanzstreifen)

sowie in nichtkardialen Zellen, die eine Verbindung zwischen Kardiomyozyten herstellen, nachgewiesen werden (Noutsias *et al.* 2001).

Untersuchungen zur CAR-Expression in der Plazenta des Menschen zeigten, daß CAR im ersten Trimester der Schwangerschaft in Trophoblastzellen der Zotten und in extravillösen Trophoblastzellen exprimiert wird, während es im dritten Trimester nur in den für das Eindringen in die Uteruswand und die maternalen Gefäße und die Kontaktaufnahme mit maternalen Zellen verantwortlichen extravillösen Trophoblastzellen vorhanden ist (Koi *et al.* 2001).

Daneben konnte festgestellt werden, dass die CAR-Expression bei HUVEC-Zellen (humane umbilikale Gefäßendothelzelllinie) mit zunehmender Kulturkonfluenz (Carson *et al.* 1999) bzw. bei neonatalen Rattenkardiomyozytenkulturen nach einem Absinken 24 h nach der Isolation mit dem Auftreten von Zellkontakten (Clustering und Beating der Zellen) nach ca. 72 h ansteigt (Ito *et al.* 2000).

Dahingegen fehlt primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen eine CAR-Expression, die jedoch während der Differenzierung in Erythroid- und Myeloidzellen erlangt wird (Rebel *et al.* 2000).

Verschiedene Untersuchungen zur Beeinflussung der CAR-Expression lassen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen CAR-Expression und Adhäsions- und Regenerationsprozessen vermuten. So kam es bei verschiedenen Gliomazelllinien durch die Transduktion von p53 (Tumorsuppressorgen mit antiproliferativem Effekt) zu einer Abnahme der CAR-Expression und bei der *antisense*-Hemmung von p53 in Zellen mit endogenem p53 zu einer Erhöhung der CAR-Expression (Asaoka *et al.* 2000). Untersuchungen an Prostatakarzinom-Zelllinien konnten ein inverses Verhältnis zwischen der CAR-Expression und dem Wachstum der Karzinomzellen zeigen und lassen vermuten, dass CAR als Tumoringhibitor fungieren könnte (Okegawa *et al.* 2000). Fortführende Untersuchungen an Harnblasentumorzellen bestätigten diese Erkenntnisse, wobei gezeigt werden konnte, dass durch den CAR-vermittelten Zellkontakt eine negative Signalkaskade ausgelöst wird, die zur Modulation von Zellzyklusregulatoren im Kern der Tumorzelle und damit zur Wachstumshemmung führt (Okegawa *et al.* 2001).

Eine Induktion von CAR bzw. der CAR-mRNA-Expression konnte in neonatalen Rattenkardiomyozytenkulturen nach der Zugabe von Conavalin A zum Medium bzw. bei experimenteller Autoimmunmyokarditis zeitlich nach der mRNA-Expression von Proentzündungszytokinen (z.B. Interferon γ , TNF- α , Interleukin1 β) beobachtet werden (Ito *et al.* 2000).

2.2.1.5. Bedeutung von CAR für den adenoviralen Gentransfer

Die Expression von CAR ist eine wesentliche Voraussetzung für die Empfänglichkeit einer Zelle für den adenoviralen Gentransfer (Bergelson *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997). So konnten zahlreiche Untersucher an unterschiedlichen Zellen, Zelllinien und Organen eine starke Korrelation zwischen dem Vorhandensein der CAR-Expression und der Adenovektor-Transfereffizienz feststellen [humane Gliomzelllinien (Miller *et al.* 1998; Asaoka *et al.* 2000), humane Melanomzelllinien (Hemmi *et al.* 1998), kolorektale Karzinomzelllinien (Fechner *et al.* 2000), humane Ovar-Tumorzelllinien (You *et al.* 2001), HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) -Zelllinien (Mentel *et al.* 1997; Kasono *et al.* 1999; Li, D. *et al.* 1999; Hutchin *et al.* 2000), humane Harnblasentumorzelllinie (Li, Y. *et al.* 1999), humane Lungenkarzinomzelllinien (Pearson *et al.* 1999), humane Pankreaskarzinomzelllinien (Pearson *et al.* 1999), SUDHL-1-Zelllinie (von anaplastischem Riesenzell-Lymphom abgeleitet) (Turturro *et al.* 2000), Hepatozyten (Hautala *et al.* 1998), Lymphozyten (Leon *et al.* 1998), humane Knochenmarkzellen (hämatopoetische Zellen) (Rebel *et al.* 2000), primäre Fibroblasten (Hidaka *et al.* 1999), humane Alveolarmakrophagen (Kaner *et al.* 1999), differenziertes Atemwegsepithel (Pickles *et al.* 1998; Walters *et al.* 1999; Pickles *et al.* 2000). Dabei erwiesen sich v.a. Zellen und Gewebe nichtepithelialen, mesenchymalen Ursprungs, wie Lymphozyten (Mentel *et al.* 1997; Leon *et al.* 1998), hämatopoetische Zellen, Fibroblasten (Hidaka *et al.* 1999) und reife Skelettmuskelzellen (Cho *et al.* 2000), die wenig oder kein CAR exprimieren als unzugänglich für den adenoviralen Gentransfer. Mittels transgener Mäuse konnte *in vivo* die Bedeutung von CAR für die AdV-Aufnahme in primär für die Ad-Infektion resistenten T- und B-Zellen (Schmidt *et al.* 2000; Wan *et al.* 2000) und in die Skelettmuskulatur (Nalbantoglu *et al.* 2001) nachgewiesen werden.

2.2.2. Integrine

Während CAR die Bindung an die Zelloberfläche vermittelt, erfolgt die Internalisierung der Ad in einem energieabhängigen Prozess durch α_v -Integrine (Wickham *et al.* 1994). Integrine stellen relativ große heterodimere transmembrane Glykoproteine dar, die aus einer nichtkovalent gebundenen α - und β -Untereinheit bestehen (Hynes 1992). Bisher sind 14 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, wobei die α_v -Untereinheit im allgemeinen mit einer β_1 -, β_3 -, β_5 - oder β_8 -Untereinheit assoziiert ist (Hirsch *et al.* 1994). Die Interaktion von Integrinen mit verschiedenen Zellliganden ist die Voraussetzung für wichtige Zellfunktionen wie

Zelladhäsion und -migration, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen sowie für verschiedene Prozesse (Embryogenese, Osteogenese, Wundheilung, neuronale Funktionen, Phagozytose, Tumorinvasion und -metastasierung) (Hynes 1992; Diamond and Springer 1994; Grotewiel *et al.* 1998). Integrine verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett und können in nichtkardialen Zellen als Signalmoleküle und Transducer fungieren. Viele der über 20 Mitglieder der Integrinfamilie erkennen RGD-Sequenzen, die sowohl in extrazellulären Matrixproteinen anderer Zellen (wie z.B. Vitronectin, Fibronectin, Tenacin) sowie in Kollagen, Osteopoetin, Thrombospondin, Fibrinogen, Laminin und von-Willebrandt-Faktor enthalten sind (Hynes 1992; Montgomery *et al.* 1996) als auch in verschiedenen viralen Proteinen vorkommen [VP1-Protein der Coxsackieviren (Roivainen *et al.* 1991; Roivainen *et al.* 1994; Roivainen *et al.* 1996) und des MKS-Virus (Fox *et al.* 1989), Pentonbasisprotein der Ad (Mathias *et al.* 1994), VP7-Protein der Bluetongue und Afrikanische Pferdesterbe auslösenden Reoviren (Basak *et al.* 1996), HIV-TAT-Protein (Barillari *et al.* 1993), Herpes simplex-Glykoprotein H (Galdiero *et al.* 1997)]. Sie spielen damit neben den oben genannten fundamentalen biologischen Prozessen auch eine wichtige Rolle bei zahlreichen viralen Infektionen. Ad, aber auch adenoassoziierte Viren (AAV) und das MKS-Virus nutzen α_v -Integrine zum Zelleintritt (Acharya *et al.* 1989; Jackson *et al.* 1997; Summerford *et al.* 1999). Integrine werden von zahlreichen Geweben exprimiert. Fechner *et al.* (1999) konnten ein ähnliches Verteilungsmuster der α_v -Integrin-mRNA bei Mensch, Ratte und Maus feststellen, wobei die höchste Expression in Gehirn und Niere, eine mittlere Expression in Herz, Lunge, Milz und Leber und eine niedrige Expression in Thymus, Hoden und Skelettmuskulatur gefunden wurde. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass die α_v -Integrin-Expression in der Glia des ZNS und in der Skelettmuskulatur während der Entwicklung dynamisch reguliert ist (Hirsch *et al.* 1994). So konnte am Tag 10,5 p.c. ein hoher α_v -Integrinwert im Neuralrohr und in myotomalen Zellen nachgewiesen werden, der sich mit der fortschreitenden Entwicklung auf die radialen Gliafasern und den apikalen Teil des Myotubus konzentrierte. Am Tag 8 p.p. wurde eine starke Abnahme festgestellt und bei adulten Tieren konnte kein α_v -Integrin mehr nachgewiesen werden. Diese Verteilung ist in Übereinstimmung mit der Rolle, die α_v -Integrin bei der Neuron-Glia-Interaktion während der Organisation der neuronalen Schicht des Cortex und des Cerebellums und bei der myotendinalen Verbindung während der Embryonalentwicklung spielt. Eine niedrige α_v -Integrin-Expression wurde während der Embryonalentwicklung in Herz, Gefäßendothel, Nierentubuli, Bronchien und der glatten Muskulatur des Verdauungstraktes beobachtet. Zusätzlich wurden α_3 - und α_5 -Integrine untersucht, die nicht im ZNS und in der Muskulatur,

dafür aber in glatten Muskelzellen des Darms und anderen mesenchymalen Geweben gefunden wurden (Hirsch *et al.* 1994).

Die Rolle von Integrinen für den adenoviralen Gentransfer wird unterschiedlich beurteilt. So können Integrine in einigen Zellen mit einer hohen CAR-Ausstattung von eher untergeordneter Bedeutung sein, beispielsweise ließen sich Hepatozyten, bei denen kein α_v -Integrin auf der Oberfläche nachweisbar war, gut mit adenoviralen Vektoren infizieren (Hautala *et al.* 1998). Andere Untersucher konnten an verschiedenen humanen Tumorzelllinien [Melanomzelllinien (Hemmi *et al.* 1998), Gliomzelllinien (Miller *et al.* 1998; Asaoka *et al.* 2000), Ovar-Tumorzelllinien (You *et al.* 2001), kolorektale Tumorzelllinien (Fechner *et al.* 2000)] keine Korrelation zwischen der α_v -Integrinausstattung und der Adenovektor-Transfereffizienz feststellen. Andererseits konnte gezeigt werden, daß α_v -Integrine eine verbesserte Adenovektor-Aufnahme bewirken (Wickham *et al.* 1993; Bergelson *et al.* 1997; Tomko *et al.* 1997; Bergelson *et al.* 1998) bzw. eine positive Korrelation zwischen Integrin-Expression und Vektor-Transduktionseffizienz bei verschiedenen humanen Krebszelllinien besteht (Takayama *et al.* 1998; Kasono *et al.* 1999). Auch spielen $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_6\beta_1$ -Integrine und deren Überexpression für den adenoviralen Gentransfer im Ratten-Darmepithel bzw. $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine im Dünndarm von Mäusen eine wichtige Rolle (Hamilton *et al.* 1997; Croyle *et al.* 1998). An hämatopoetischen Zellen kommt es durch $\alpha_m\beta_2$ -Integrine zu einem Attachment und durch $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine zu einer Internalisierung von Ad (Huang *et al.* 1996). Es gibt damit Anhaltspunkte, dass Integrine auch unabhängig von CAR in der Lage sind, Ad zu binden und dass neben α_v -Integrinen auch andere Integrine ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_m\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$) an der Ad-Bindung und -Aufnahme beteiligt sind (Wickham 2000).

2.3. Vektorsysteme

2.3.1. Nichtvirale und virale Vektorsysteme

Der Gentransfer kann mit Hilfe von viralen und nichtviralen Verfahren erfolgen. Zu den nichtviralen Verfahren gehören physikalische Methoden wie die Elektroporation (Neumann *et al.* 1982), die Mikroinjektion (Capecchi 1980) und die Partikelbombardierung (McCabe *et al.* 1988) sowie chemische Methoden wie die Kalzium-Phosphat-Transfektion (Maitland and McDougall 1977; Wigler *et al.* 1977) und die Transfektion mittels kationischer Liposom-DNA-Komplexe (Felgner *et al.* 1987) oder Polymer-DNA-basierender Systeme bzw. eine

Kombination aus beiden. Daneben gibt es die Möglichkeit des rezeptorvermittelten Gentransfers, bei dem die zu transferierende DNA mit verschiedenen Liganden verbunden wird (Cotten and Wagner 1993; Ledley 1994; Perales *et al.* 1994).

Beim Einsatz viraler Vektoren nutzt man die Fähigkeit von Viren Zellen zu infizieren. Dabei unterscheidet sich ein optimales Vektorvirus vom Wildtypvirus vor allem im Verlust der Replikationsfähigkeit in der Zielzelle und der damit einhergehenden Ungefährlichkeit für weitere Zellen des Wirtes und die Umwelt. Aus diesem Grund werden beim Vektordesign möglichst nur die wichtigsten Elemente des Virusgenoms beibehalten, hauptsächlich Verpackungssequenzen, Sequenzen zur Integration und Stabilisierung des Genoms und die dazu gehörenden Regulationseinheiten (Rüger R 1997). Die Minimierung des Virusgenoms macht die Etablierung von Verpackungs- oder Helferzelllinien erforderlich, die stabil oder transient jene Gene enthalten, die dem Vektor zur Produktion infektiöser Virionen fehlen.

Neben den zur Zeit gebräuchlichsten Vektorviren, den Retroviren und den Adenoviren, werden auch adenoassoziierte Viren (Muzyczka 1992), Vacciniaviren (Pastoret and Brochier 1992) und Herpes-simplex-Viren (Geller and Breakefield 1988) zum Gentransfer eingesetzt. An anderen viralen Vektoren, basierend auf Alphaviren (Hewson 2000; Wahlfors *et al.* 2000), Hepatitis-B-Viren (Chaisomchit *et al.* 1997), minus-Strang-RNA-Viren (Influenza, Ebola) (Palese *et al.* 1996) und Epstein-Barr-Virus (Sclimenti and Calos 1998) wird geforscht.

Zu den Vorteilen retroviraler Gentransfersysteme zählt die durch Integration ins Wirtsgenom erzielte stabile Expression ohne die gleichzeitige Synthese immunogener viraler Proteine (Robbins *et al.* 1998). Allerdings resultiert aus dieser Integrationsfähigkeit die Gefahr der Insertionsmutagenese in funktionelle Einheiten von Tumorsuppressor- oder Onkogenen (Cornetta *et al.* 1990). Andererseits wird ihre Anwendung durch die Beschränkung der Transduktion auf replizierende Zellen limitiert. Zudem können Retroviren nur in relativ niedrigen Titern präpariert werden (Jolly 1994) und haben eine geringe Halbwertszeit im Blutkreislauf, da sie schnell durch das Komplementsystem inaktiviert werden (Bartholomew *et al.* 1978).

2.3.2. Adenovirale Vektoren

Die Verwendung von Ad als Vektoren beruht zum einen auf den zahlreichen Kenntnissen über die Biologie der Ad und der Tatsache, dass Ad ihr Genom sehr effizient in Zielzellen übertragen können, zum anderen sind Ad nicht onkogen für den Menschen und ihr Genom ist leicht zu modifizieren (Ali *et al.* 1994; Brody and Crystal 1994). Ad besitzen den Vorteil,

dass sie zahlreiche Zellen infizieren können, ruhende Zellen eingeschlossen. Ihre hohe Verpackungskapazität (ca. 7,5 kb bei Vektoren der ersten Generation) und die Möglichkeit sie in hohen Titern von 10^{10} bis 10^{12} pfu/ ml herstellen zu können sowie die bereits 5 h nach der Vektoraufnahme einsetzende Genexpression gestatten eine breite praktische Anwendung (Bett *et al.* 1993; Rüger R 1997). Für die Entwicklung adenoviraler Vektoren werden am häufigsten die Serotypen 2 und 5 eingesetzt, deren Genom komplett definiert ist (Horwitz 1996). Die Unfähigkeit zur Replikation wird im allgemeinen durch die Deletion ihrer frühen Gene, der E1-Region erreicht, an deren Stelle die zu transferierende Genkassette eingesetzt wird. Die replikationsdefizienten Viren können in Helferzelllinien, die E1A und E1B stabil exprimieren, propagiert werden [z.B. HEK 293 (Graham *et al.* 1977)].

2.4. Adenoviraler Gentransfer

2.4.1. Adenovektorgenerationen

Bei Adenovektoren (AdV) der ersten Generation werden die E1A- und Teile der E1B-Region entfernt, mitunter (v.a. für *in vitro* Versuche) auch die E3-Region, um zusätzliche Kapazitäten (insgesamt 8 kb) zu gewinnen.

Ein Problem bei der Anwendung dieser Vektoren *in vivo* stellt zum einen die zeitlich limitierte Transgenexpression dar (nach 2 bis 4 Wochen nicht mehr nachweisbar), da es durch die komplexe Verbindung angeborener und erworbener Immunmechanismen des Wirtes zu einer Eliminierung des Vektors kommt. Beispielsweise werden nach intravenöser Vektorapplikation 90 % des AdV innerhalb von 24 h eliminiert (Worgall *et al.* 1997). Weitere immunologische Reaktionen beruhen auf der primären Immunantwort gegen AdV-Proteine kurz nach der Applikation in Form einer akuten-Phase-Antwort, gekennzeichnet durch die Ausschüttung von Entzündungszytokinen, einer gelegentlich auftretenden IgE-unabhängigen Anaphylaxie durch die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen (Engelhardt *et al.* 1994; O'Neal *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999) und der Erkennung und Zerstörung adenoviraler Peptide auf der Oberfläche infizierter Zellen, vermittelt durch zytotoxisch T-Lymphozyten und Killerzellen. So kann es durch die in der Regel notwendigen hohen Vektordosen aufgrund dieser immunologischen Wechselwirkungen zu toxischen Reaktionen kommen (Brenner 1999), was sich z.B. in Endotheldefekten mit Koagulopathie und Leberschädigungen in Form von Hypertrophie und Fibrose äußerte (Dai *et al.* 1995; Kaplan *et al.* 1996). Zum anderen kann der Vektor durch Rekombination zwischen Sequenzen des AdV und homologen Ad-

Sequenzen in der Helferzelllinie die E1-Region erwerben, wodurch es zur Entstehung von replikationskompetenten Ad (RCA) kommt (Lochmuller *et al.* 1994; Hehir *et al.* 1996), die aufgrund der unkontrollierten Amplifikation, Mobilisierung und Verbreitung des Vektors und einer verschärften Immunantwort des Wirtes ein Sicherheitsrisiko in der Anwendung darstellen.

In der Folge wurden Vektoren entwickelt, die neben einer vollständigen E1-Deletion (E1A, E1B, Protein IX) auch Deletionen von E2 und / oder E4 aufweisen und z.T. nicht adenovirale Promotoren besitzen (Lusky *et al.* 1998) sowie entsprechende Helferzelllinien ohne Sequenzüberlappungen wie z.B. die PER C6-Zelllinie (Fallaux *et al.* 1998), wodurch RCA-freie Vektorpräparationen, eine höhere Verpackungskapazität und eine verringerte Toxizität und Immunantwort möglich sind.

Einen weiteren Fortschritt stellt die Entwicklung helferabhängiger Vektorsysteme dar (Morsy and Caskey 1999). Dabei besitzt ein AdV (Helfer) alle für die Replikation erforderlichen Gene, mit Ausnahme der E1-Region. Der zweite AdV enthält nur die viralen ITR's (inverted terminal repeats), die therapeutische Gensequenz (28 bis 32 kb) und das Verpackungssignal. Die Vektorvermehrung erfolgt in speziellen Zelllinien (z.B. Cre-HEK293-Zellen), in denen keine Verpackung des Helfervirus erfolgt, da im Helfervirusgenom beiderseits des Verpackungssignals befindliche Lox-Restriktionsorte, welche durch das Enzym Cre-Rekombinase (stabil exprimiert in Cre-HEK293-Zellen) geschnitten werden, zur Deletion des Verpackungssignals führen (Morsy *et al.* 1998; Morral *et al.* 1999). Die Präparation dieser Vektoren ist zur Zeit noch sehr laborintensiv und es ist schwer therapeutische Titer zu erreichen, außerdem kommt es bei allen heutigen Methoden der Vektorpräparation zu einer Kontamination mit dem Helfervirus. Dennoch scheinen diese Vektoren eine beträchtlich verringerte Toxizität zu besitzen, konnten im Tierversuch therapeutische Mengen an verschiedenen Proteinen induzieren und wiesen eine Expressiondauer von mehr als einem Jahr auf (Morral *et al.* 1999; Parks *et al.* 1999; Balague *et al.* 2000).

Andere Untersuchungen zur Verbesserung der Effizienz des adenoviralen Gentransfers beschäftigen sich mit der Möglichkeit, alternative Serotypen (Mack *et al.* 1997) oder nicht humane Ad [z.B. ovine Ad (Loser *et al.* 2000)] zu nutzen, um eine verringerte Wirksamkeit des Vektors durch immunologische Prozesse zu vermeiden.

Auf eine Veränderung des Zelltropismus und einer Verringerung der Immunogenität und Toxizität zielt der Einsatz gerichteter Vektoren (Wickham 2000). Dies kann mit verschiedenen Methoden erfolgen, zum einen mittels Fibermodifikation, z.B. durch den Einbau integrinbindender RGD-Sequenzen (Wickham *et al.* 1996b; Wickham *et al.* 1997;

Dmitriev *et al.* 1998; Hidaka *et al.* 1999; Kasono *et al.* 1999; Vanderkwaak *et al.* 1999) oder Heparinsulfat-bindender Oligolysine in den Fiberknob (Wickham *et al.* 1996a), zum anderen durch die Bildung von Fiberchimären (Stevenson *et al.* 1997) sowie mit Hilfe von bispezifischen Fusionsproteinen, die den Rezeptorort des Vektors blockieren und einen Liganden in Form eines Antikörpers, eines hochaffinitiven Peptides oder eines Tumormarkers zur Bindung an gewebespezifische Rezeptoren besitzen z.B. EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) (Miller *et al.* 1998; Dmitriev *et al.* 2000), FAS (Leon *et al.* 1998), CD3, E-Selectin, α_v -Integrin, FGF-Rezeptor (Wickham 2000).

Auch die Verwendung zelltypspezifischer Promotoren (Kaneko *et al.* 1995; Rothmann *et al.* 1996; DeMatteo *et al.* 1997; Larochelle *et al.* 1997; Eizema *et al.* 2000) kann eine selektive Genexpression bewirken.

2.4.2. Probleme des gerichteten Gentransfers *in vivo*

In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Gentransfer mittels Adenovektoren sowohl in verschiedenen Zelltypen *in vitro* (Merrick *et al.* 1996; Benhamou *et al.* 1998; Pickles *et al.* 1998; Tsubota *et al.* 1998; Yukawa *et al.* 1998; Hidaka *et al.* 1999) als auch *in vivo* in verschiedenen Organen und bei unterschiedlichen Spezies (Roessler *et al.* 1993; Raphael *et al.* 1996; Torres *et al.* 1996; Chauvet *et al.* 1998; Howell *et al.* 1998; Mondain *et al.* 1998; Shears *et al.* 1998) möglich ist. Die Effizienz des Gentransfers *in vivo* ist dabei von zahlreichen Parametern abhängig, von denen unter anderem das Vektordesign, das Immunsystem des Wirtes und die alters- und organspezifische Rezeptorverteilung aber auch die Applikationsroute von Bedeutung sind. Vor allem anatomische Barrieren sowie die subzelluläre Rezeptorexpression können im Hinblick auf die Applikationsroute eine wichtige Rolle spielen. Beispielsweise scheint die Beschränkung der CAR-Expression auf die basolaterale Oberfläche des gut differenzierten Atemwegsepithels (Pickles *et al.* 1998) ein Grund für die geringe Effizienz des adenoviralen Gentransfers im Rahmen der Genterapie der zystischen Fibrose (Zabner *et al.* 1993; Crystal *et al.* 1994; Hay *et al.* 1995; Knowles *et al.* 1995; Zabner *et al.* 1996) zu sein (Freimuth *et al.* 1999). Auch in anderen genterapeutisch relevanten Geweben wie dem Myokard und der glatten Muskulatur der Gefäßwände konnte eine niedrige Gentransfereffizienz *in vivo* beobachtet werden, die in Diskrepanz zu *in vitro* Untersuchungen steht (Rekhter *et al.* 1998a; Eizema *et al.* 2000; Noutsias *et al.* 2001). Beobachtungen über das Fehlen von CAR in der Gefäßwand neonataler Ratten (Ito *et al.* 2000), die nur subendotheliale Expression von CAR in myokardialen Gefäßen von Patienten

mit DCM (Noutsias *et al.* 2001) und das Vorhandensein einer anatomischen Barriere aus geschlossenem Endothel, Basallamina und engmaschiger subendothelialer Matrix (Smollich *et al.* 1985) zwischen Gefäßlumen und Zielzelle könnten als Erklärung für diese Diskrepanz dienen (Rekhter *et al.* 1998a; Fechner *et al.* 1999).

Auch andere Untersucher konnten die Unfähigkeit von AdV-Partikeln Endothelbarrieren zu durchbrechen feststellen (Cho *et al.* 2000). Ihnen gelang es durch Modulation der Starling-Kräfte den transendothelialen Flux des AdV mittels Konvektion zu erleichtern und nach der intraarteriellen Applikation in die Hintergliedmaße eine Transgenexpression in der Muskulatur zu erreichen (Cho *et al.* 2000).

Des Weiteren konnte im Tierversuch keine Übereinstimmung zwischen der Rezeptorverteilung (CAR, α_v -Integrine) und dem Transgenexpressionsmuster nach systemischer Vektorapplikation gefunden werden (Fechner *et al.* 1999; Schachtner *et al.* 1999). So führte die intravenöse Applikation vor allem zu einer Vektoraufnahme in die Leberzelle [bis 100 % Extraktionseffizienz (Zinn *et al.* 1998)] und damit zu einer überwiegenden Transgenexpression in der Leber (Kass-Eisler *et al.* 1994; Fechner *et al.* 1999). Die intraarterielle Applikation zeigt ein ähnliches Ergebnis. Bei der intrakardialen Applikation in den linken Vorhof bzw. die Herzmuskulatur konnte in der Lunge und im Herzen eine niedrige Transgenexpression festgestellt werden, wobei die Leber weiterhin einen Anteil von über 90 % hatte (Kass-Eisler *et al.* 1994; Fechner *et al.* 1999). Nur nach mikrochirurgischer Injektion des Vektors proximal der Aortaklappen bei temporärem Verschluss der Aorta und des Truncus pulmonalis (Hajjar-Technik) war es möglich, bei Nagern eine hohe Transgenexpression im Herzen zu erreichen (Hajjar *et al.* 1998; Fechner *et al.* 1999).

Eine weitere Möglichkeit, eine effiziente Transgenexpression in verschiedenen Organen zu erreichen, stellt die Applikation des Vektors direkt in bzw. in die Nähe des Zielgewebes dar (Fechner *et al.* 1999). Die direkte Injektion ist jedoch mit einer auf die Umgebung des Stichkanals beschränkten Transgenexpression verbunden und führt zu einer Zerstörung /Verletzung des Gewebes im Bereich des Applikationsortes, die ein wichtiger Faktor für das Ansteigen der Transferrate in diesem Gebiet sein kann (Kass-Eisler *et al.* 1994; Rothmann *et al.* 1996; Rekhter *et al.* 1998b; Shears *et al.* 1998)

Daneben kann durch den oben erwähnten Einsatz gerichteter Vektoren und gewebespezifischer Promotoren ein gezielter Gentransfer erfolgen (siehe 2.3.2.)

2.4.3. Fetaler Gentransfer

Auch Untersuchungen zum fetalen Gentransfer konnten keine Übereinstimmung zwischen Rezeptorverteilung und Transgenexpression zeigen. So führte die intratracheale AdV-Applikation oder die AdV-Applikation in die Amnionflüssigkeit bei Embryonen von Schaf und Nagern zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Schafen kam es zu einer transienten Expression in der Lunge, bei Mäusen und Ratten zu verschiedenen Expressionsmustern (keine Expression bis Expression im Epithel von Lunge, Gastrointestinaltrakt und Amnionmembran) (Holzinger *et al.* 1995; McCray *et al.* 1995; Sekhon and Larson 1995; Vincent *et al.* 1995). Die intrathorakale Gabe eines AdV bei Kaninchenfeten führte zu einer transienten Expression in der Leber (Wang *et al.* 1998). Die Vektorapplikation in die Dottersackgefäße von Mäuseembryonen zeigte, dass vor allem das sich entwickelnde kardiovaskuläre System dem adenoviralen Gentransfer zugänglich ist. So kam es zwischen dem Tag 13 p.c. und dem Tag 1 p.p. neben einer Expression in der Leber auch im Herzen und im Gefäßendothel der großen Arterien zu einer Genexpression (Schachtner *et al.* 1999).

2.5. Quantitative kompetitive PCR

Konventionelle Methoden der mRNA-Analyse wie Northern-Blot- und Dot-Blot-Hybridisierungen oder Nuklease Protection Mapping sind oftmals nicht sensitiv genug, um mRNA in Proben mit geringen Zellzahlen bzw. Volumen oder einer niedrigen Expression der gesuchten mRNA nachzuweisen und erlauben zudem nur eine grobe Quantifizierung (Gilliland *et al.* 1990)

Die PCR, zuerst beschrieben durch (Saiki *et al.* 1985) ist, auch aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität [RT-PCR ca. 1000- bis 10000 –fach sensitiver als Northern-Blot (Byrne *et al.* 1988; Wang *et al.* 1989; Mocharla *et al.* 1990)] die meistgenutzte Methode zur Nukleinsäureamplifikation und gerade bei der Amplifikation von cDNA-Kopien aus limitierten mRNA-Mengen von großer Bedeutung. Sie erlaubt in ihrer konventionellen Anwendung jedoch keine Quantifizierung einer spezifischen Nukleinsäure (NS) in der Ausgangsprobe, also vor der PCR (Ferre F. *et al.* 1994). Aufgrund ihres exponentiellen Charakters nach der Formel N (Endmenge der spezifischen NS) = N_0 (initiale Menge der spezifischen NS) $\times (1+E [\text{Effizienz}])^n$ (Zykluszahl) (Cross 1995) haben schon kleine Differenzen in der Amplifikationseffizienz einen großen Effekt auf die Endmenge des PCR-Produktes (Zimmermann and Mannhalter 1996). Dabei ist die Effizienz zum einen von zahlreichen

Faktoren wie der Qualität der Nukleinsäure, der Sequenz und Länge der Zielsequenz, den genauen Reaktionsbedingungen und insbesondere von der Primersequenz abhängig (Diviacco *et al.* 1992). Zum anderen nimmt sie mit zunehmender Zykluszahl durch die Limitierung einzelner Reaktionskomponenten, der Konkurrenz zwischen Reaktionsprodukten und Primern und die Entstehung von Inhibitoren (z.B. Pyrophosphat) ab (Siebert and Larrick 1992; Cross 1995), so dass es zu einer Plateauphase kommt, die oftmals dann beginnt, wenn Nukleinsäure-Banden im Gel sichtbar gemacht werden können (Cross 1995).

Aufgrund des wachsenden Interesses an quantitativen Anwendungen der PCR wurden zahlreiche Assays entwickelt, wie die Verdünnungsmethode (Verdünnungsgrad, bei der Zielsequenz nicht mehr amplifizierbar ist, wird zur Kalkulierung der Anzahl initialer Zielsequenzen verwendet (Simmonds *et al.* 1990; Brillanti *et al.* 1991; Zhang *et al.* 1991; Sykes *et al.* 1992; Luque *et al.* 1994), die Verwendung externer Standards (Vergleich mit der Amplifikation einer Verdünnungsreihe einer bekannten Menge Zielsequenz) oder die gemeinsame Amplifikation der Zielsequenz und eines Referenzgens (Kellogg *et al.* 1990; Neubauer *et al.* 1990; Noonan *et al.* 1990), die jedoch durch mögliche Variationen in der Amplifikationseffizienz und der unterschiedlichen Thermodynamik maximal semiquantitative Ergebnisse liefern und nur in sehr gut charakterisierten Systemen angewendet werden können. Eine weit gefächerte Anwendung zum quantitativen Nachweis von mRNA und DNA bietet neben der real-time-q-PCR mittels Taq ManTM die kompetitive PCR bzw. kompetitive RT-PCR (Ferre 1992; Siebert and Larrick 1992; Clementi *et al.* 1993; Foley *et al.* 1993; Cross 1995). Dabei kann durch die gleichzeitige Amplifikation der Zielsequenz und eines um die Reaktionskomponenten konkurrierenden Kompetitors in Form von RNA oder DNA (auch als interner Standard bezeichnet) und den Nachweis der jeweiligen PCR-Amplifikate, nach der Ermittlung des Endverhältnisses zwischen Zielsequenz und Kompetitor, anhand der bekannten eingesetzten Menge an Kompetitor die initial vorhandene Menge an Zielsequenz bestimmt werden. Voraussetzung ist, dass der Kompetitor die gleichen Primerbindungsstelle, eine ähnliche Größe und das gleiche Verhalten in der PCR wie die Zielsequenz aufweist (Becker-Andre and Hahlbrock 1989) und dadurch die Unabhängigkeit von Variablen garantiert (Wang *et al.* 1989; Gilliland *et al.* 1990), die einen Effekt auf die Amplifikation haben können (Diviacco *et al.* 1992). Unter der Bedingung, dass Kompetitor und Zielsequenz mit der gleichen Effizienz und von identischen Primern amplifiziert werden, bleibt das initiale Verhältnis gleich (Diviacco *et al.* 1992) und es ist nicht notwendig in der exponentiellen Phase zu arbeiten (Bouaboula *et al.* 1992; Higuchi *et al.* 1992; Siebert and Larrick 1992; Higuchi *et al.* 1993; Cottrez *et al.* 1994; Morrison and Gannon 1994; Cross 1995;

Haberhausen *et al.* 1998). Dadurch ist die PCR nicht zyklusabhängig und die Amplifikation kann über so viele Zyklen erfolgen, bis die PCR-Produkte gut nachweisbar sind (Gilliland *et al.* 1990). Einige Untersucher empfehlen jedoch, in der exponentiellen Phase zu arbeiten (Wiesner *et al.* 1993; Dostal *et al.* 1994; Ruster *et al.* 1995), da die Auswirkungen möglicher Amplifikationseffizienzunterschiede in diesem Bereich geringer sind (Becker-Andre and Hahlbrock 1989; McCulloch *et al.* 1995).

Die genauesten Ergebnisse werden erreicht, wenn äquivalente Mengen an Kompetitor und Ziel-DNA bzw. -RNA eingesetzt werden (Arnold *et al.* 1992; Raeymaekers 1993). Aus diesem Grund werden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen des Kompetitors ausgetestet.

Für die Konstruktion eines Kompetitors mit den oben aufgeführten Eigenschaften kommen in Abhängigkeit vom PCR-Produktnachweis verschiedene Techniken in Frage.

Eine Möglichkeit ist der Einbau eines neuen Restriktionsortes in die Sequenz oder kleinere Sequenzmodifikationen, die jedoch den Nachteil besitzen, dass es beim Nachweis der PCR-Produkte zu Ungenauigkeiten kommen kann (zum einen durch Unterschiede im enzymatischen Verdau mittels Restriktionsenzymen, zum anderen bei der Hybridisierung) (Orlando *et al.* 1998). Daher erfolgt die Konstruktion meist durch die Einführung einer kurzen Deletion im Inneren des Kompetitors (verkürzter Längenstandard) mittels Overlap-Extensionstechnik (Diviacco *et al.* 1992; Porcher *et al.* 1992; Telenti *et al.* 1992; Grassi *et al.* 1994; Schanke *et al.* 1994; Sestini *et al.* 1994; Sestini *et al.* 1996), wobei eine Deletion um 10 bis 15 % der Originalgröße keine signifikante Veränderung der Amplifikationsrate in der PCR bewirkt (McCulloch *et al.* 1995). Der genaue Nachweis der unterschiedlich großen PCR-Fragmente kann mittels Gelelektrophorese, durch die Verwendung radioaktiv oder fluoreszenz-markierter dNTP's und entsprechender Analysesysteme oder bei Verwendung fluoreszenz-markierter Primer mit DNA-Sequenzern erfolgen.

Einen kritischen Punkt, sowohl beim Vergleich von quantitativen Bestimmungen als auch bei der absoluten Quantifizierung, stellt die genaue Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Kompetitormenge dar (Orlando *et al.* 1998). Während bei DNA-Kompetitoren neben der elektrofotometrischen Bestimmung auch ein Vergleich mit mehreren Referenzpräparationen möglich ist, kann die RNA-Kompetitorkonzentration aufgrund der relativen Instabilität von RNA nur elektrofotometrisch bestimmt werden (Piatak *et al.* 1993). Deshalb werden im allgemeinen Aliquote der RNA-Kompetitorpräparationen gelagert und zur Überprüfung der Konzentration eines neu synthetisierten Kompetitors genutzt oder soweit möglich nur mit einer Charge Kompetitor gearbeitet. Der Lagerung des RNA-Kompetitors gilt dabei eine

besondere Aufmerksamkeit und die Integrität und Menge des Kompetitors sollte periodisch überprüft werden (Orlando *et al.* 1998).

Für die Quantifizierung von mRNA stellt die hohe Variabilität in der reversen Transkription (Noonan *et al.* 1990; Simmonds *et al.* 1990; Henrard *et al.* 1992) ein Problem dar, das bei der Verwendung von DNA-Kompetitoren zu Ungenauigkeiten führen kann (Zimmermann and Mannhalter 1996; Orlando *et al.* 1998). Dies kann durch die Verwendung von RNA-Kompetitoren, die bereits bei der reversen Transkription eingesetzt werden, vermieden werden (Gilliland *et al.* 1990; Orlando *et al.* 1998).

Bei der Bestimmung von zeitlichen und funktionalen Unterschieden in der mRNA-Menge (Genexpressionsmessungen) können die ermittelten Werte durch den Vergleich mit der Expression eines Referenzgens, sogenannter Housekeeping-Gene wie β -Aktin, GAPDH, β_2 -Mikroglobulin, ribosomale RNA (Murphy *et al.* 1990; Noonan *et al.* 1990; Park and Mayo 1991; Horikoshi *et al.* 1992; de Kant *et al.* 1994) relativiert werden, um Fehlern durch eine ungenaue Bestimmung der total-RNA-Konzentration oder Unterschieden in der RNA-Qualität vorzubeugen. Dabei besteht die Möglichkeit gleichzeitig mit RNA-Kompetitoren für die Zielsequenz und das Referenzgen zu arbeiten (Watzka *et al.* 1997; Haack *et al.* 1999) oder bei DNA-Quantifizierungen einen DNA-Kompetitor für die Zielsequenz zu verwenden und eine zweite kompetitive PCR für das Referenzgen durchzuführen (van Rhee *et al.* 1995).

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass auch für diese Referenzgene Expressionsunterschiede zwischen unterschiedlichen Zelllinien und Geweben und während verschiedener Zellzyklusphasen gefunden wurden (Siebert and Fukuda 1985; Elder *et al.* 1988; Murphy *et al.* 1990; Schmidt and Merrill 1991; Horikoshi *et al.* 1992; Zimmermann and Mannhalter 1996).