

Abb. 4.39.

GFP-Expression in nRKMZ

nRKMZ wurden auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät (3×10^5 Zellen pro Well), 2 Tage später wurden die Zellen mit Ad5CMVGFP (5×10^4 Partikel pro Zelle) für 2 h infiziert. Der Nachweis der GFP-Expression (grün) erfolgte 24 h später mittels Fluoreszenzmikroskopie (B; A als Durchlichtaufnahme von B) und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (C). Die Pfeile zeigen das für nRKMZ-Kulturen typische Wachstum zu strangartig vernetzten Strukturen.

4.4.3. Adenovektorvermittelte hCAR-Expression in Rattenkardiomyozytenkulturen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nRKMZ eine hohe AdV-Transduktionseffizienz besitzen, folgten analog zu 4.4.1.2. Untersuchungen zur Expression des rekombinanten hCAR. Dazu wurden nRKMZ mit Ad5CMVhCARs bzw. dem Kontrollvektor Ad5CMVrTTP infiziert und anschließend die Expression des rekombinanten hCAR-Proteins auf der Zelloberfläche mittels Flow Cytometry unter Verwendung des anti-hCAR-Ak RmcB sowie eines Isotypen-Ak untersucht. In der Isotypen-Ak-Kontrolle waren 3,2% der Zellen positiv und es wurde eine MFI von 34,44 ermittelt. Bei der Infektion der nRKMZ mit dem Kontroll-

AdV waren 3,06% der Zellen positiv und wiesen eine MFI von 13,81 auf. Nach Infektion der Zellen mit dem Ad5CMVhCARs hingegen exprimierten 73,94% der Zellen den rekombinanten hCAR auf der Zelloberfläche und es wurde eine deutliche Steigerung der MFI auf 332 ermittelt..

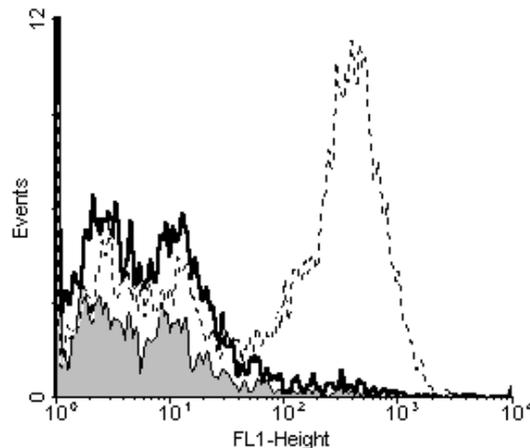


Abb. 4.40.

FACS-Analyse zum Nachweis der Expression des rekombinanten hCAR in nRKMZ.

nRKMZ wurden 24 h nach der Isolierung mit Ad5CMVhCARs bzw. Ad5CMVrTTP (5×10^4 Partikel pro Zelle) für 2 h transduziert und 24 h später mittels FACS-Analyse analysiert.

grau = Isotypen-Ak-Kontrolle (nicht transduzierte Zellen); schwarze Linie = mit dem Kontroll-AdV Ad5CMVrTTP transduzierte nRKMZ und deren, mit dem anti-hCAR-Ak analysierte hCAR-Expression; gestrichelte Linie = mit Ad5CMVhCARs transduzierte nRKMZ und deren, mit dem anti-hCAR-Ak analysierte hCAR-Expression

4.4.4. Einfluß der hCAR-Expression auf die Adenovektor-Bindung, -Aufnahme und -Transgenexpression

Um die Auswirkungen der CAR-Expression auf das AdV-Attachment, die AdV-Aufnahme und die Transgenexpression eines AdV in nRKMZ zu untersuchen, wurden diese mit Ad5CMVhCARs bzw. dem Kontroll-AdV Ad5CMVGFP infiziert und anschließend mit Ad5CMVluc retransduziert. Die Untersuchung des AdV-Attachments durch Bestimmung der sich an der Zelloberfläche befindlichen Ad5CMVluc-DNA zeigte, dass von mit Ad5CMVGFP behandelten Zellen 1,46-mal mehr Ad5CMVluc im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (nur mit Ad5CMVluc behandelt) gebunden wurde, während auf den mit Ad5CMVCARs behandelten Zellen 2,54-mal mehr Ad5CMVluc als auf den Kontrollzellen nachweisbar war. Dies entspricht dem 1,74-fachen der mit Ad5CMVGFP behandelten Zellen (Abb. 4.41.)

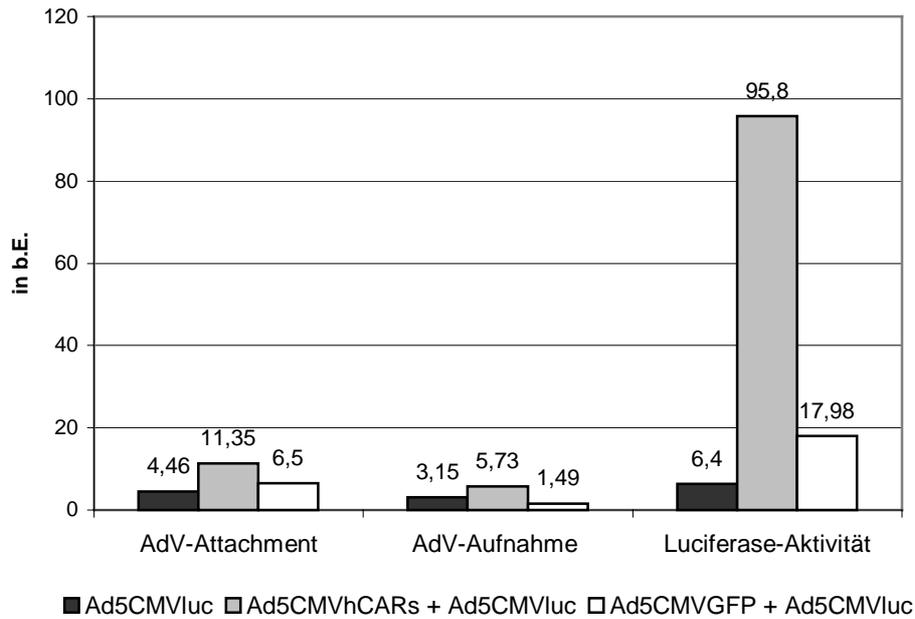


Abb. 4.41.

AdV-Attachment, -Aufnahme und -Transgenexpression nach Expression des rekombinanten hCAR in nRKMZ.

Bestimmung des AdV-Attachment: nRKMZ wurden mit Ad5CMVhCARs oder Ad5CMVGFP (5×10^4 Partikel pro Zelle) für 20 min transduziert, 48 h später wurden die Zellen mit Ad5CMVluc (10^4 Partikel pro Zelle) 10 min bei 0°C transduziert und anschließend sofort die genomische und AdV-DNA isoliert, 5 μg DNA wurden mit *EcoRI* verdaut und mittels Southern-Blot unter Verwendung einer ^{32}P markierten Luciferase-Einzelstrang-DNA-Sonde hybridisiert

Bestimmung der AdV-Aufnahme: nRKMZ wurden mit Ad5CMVhCARs oder Ad5CMVGFP (5×10^4 Partikel pro Zelle) für 20 min transduziert, 48 h später wurden die Zellen mit Ad5CMVluc (10^4 Partikel pro Zelle) für 20 min bei 37°C transduziert, 2 h später wurde genomische und Vektor-DNA isoliert und mittels Southern-Blot-Hybridisierung analysiert (s.o.).

Bestimmung der Luciferase-Aktivität: nRKMZ (3×10^5 Zellen pro Well) wurden mit Ad5CMVhCARs oder Ad5CMVGFP (5×10^4 Partikel pro Zelle) für 20 min transduziert, 72 h später erfolgte die Zugabe von Ad5CMVluc für 20 min und 24 h später die Bestimmung der Luciferase-Aktivität.

Die AdV-Aufnahme bei den mit Ad5CMVGFP behandelten Zellen lag bei dem 0,47-fachen der unbehandelten Kontrollzellen. Im Vergleich dazu war die AdV-Aufnahme nach Expression des rekombinanten hCAR 1,82-fach höher als in den unbehandelten Kontrollzellen und 3,87-fach höher als in den mit Ad5CMVGFP behandelten Zellen (Abb. 4.41.).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung der Transgenexpression durch Bestimmung der Luciferase-Aktivität. Es zeigte sich, dass die mit Ad5CMVGFP behandelten Zellen eine 2,8-mal höhere Luciferase-Aktivität zeigten als die Kontrollzellen, während die mit Ad5CMVhCARs behandelten Zellen eine 15-mal höhere Luciferase-Aktivität aufwiesen (Abb. 4.41.). Dies entsprach einer Steigerung der Luciferase-Aktivität um das 5,3-fache gegenüber der mit Ad5CMVGFP behandelten Zellen.

Zusammenfassend zeigt dieses Experiment, dass in nRKMZ der CAR ein wesentlicher Faktor für das AdV-Attachment und die AdV-Aufnahme ist und durch Erhöhung der CAR-Expression eine erhöhte AdV-Bindung, -Aufnahme, und -Transgenexpression möglich ist.