

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Untersuchungsmaterial

##### 3.1.1. Versuchstiere

Für den Tierversuch wurden weibliche Mäuse vom Stamm C57/BL6 verwendet, die zum Zeitpunkt der Injektion des Vektors ein Alter von 8 Wochen hatten. Sowohl das Futter als auch das Wasser wurden den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Injektion der Vektoren erfolgte mit Hilfe einer sterilen 1 ml Einmalspritze (Braun®; 0,45 x 12 mm, 26G x 1/2“) in die Schwanzvene. Die Konzentration betrug  $2 \times 10^{10}$  Partikel/Tier des Luciferase-exprimierenden AdV Ad5CMVLuc. Zwei weitere Gruppen erhielten zusätzlich den replikations-kompetenten AdV Ad5CMVAnf-Serca (RCA; E1+, ΔE3) in einer Konzentration von 1:50 bzw. 1:10. Nach 24 h bzw. 7 Tagen wurden die Tiere mittels Kohlendioxid-Inhalation getötet, und es wurden anschließend jeweils pro Tier und Organ (Leber, Herz, Lunge) Proben von ca. 60 mg entnommen, die für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität genutzt wurden. Eine zusätzliche Probe der hier untersuchten Organe wurde für die Anfertigung histologischer Gewebsschnitte in 4%iges Formalin eingelegt.

##### 3.1.2. Zellkulturen

Für die Konstruktion der AdV war die Ad5-transformierte Zelllinie HEK293, die aus humanen embryonalen Nierenzellen gewonnen werden, entscheidend. Aufgrund der festen Integration der E1-Region des Adenovirus in ihr Genom und der konstitutiven Expression der entsprechenden Proteine, ist neben anderen Herstellungsmethoden nur in diesen permissiven Zellen eine Replikation E1-deletierter Vektoren möglich. Die Zelllinie EA.hy926 wurde durch Fusion humaner Nabelschnur-Endothelzellen mit der humanen epithelialen Zelllinie A549 entwickelt und hat viele biochemische und physiologische Eigenschaften der primären Endothelzellen beibehalten. Somit dient sie als gutes Modellsystem für das Endothelsystem und zeichnet sich gegenüber zahlreichen anderen permanenten Zelllinien durch einfache Vermehrung auch im größeren Maßstab, gleichbleibende Qualität und bessere Wachstumseigenschaften aus.

Für die Zellversuche wurden neben der Zelllinie EA.hy926 noch weitere verschiedene permanente Karzinom-Zelllinien verwendet. Hierbei handelte es sich um ösophageale (OE-33, Kyse140), kolorektale (Colo320, Colo205, HT-29, LS174-T) und hepatogene (HepG2) Tumorzellen. Als primäre Nicht-Tumorzelllinien wurden Ratten-Kardiomyozyten und humane Keratinozyten eingesetzt.

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Zellkulturexperimente wurden die Zellen grundsätzlich auf 24-well Zellkulturplatten (nunc®) ausgesät. Vor der Infektion mit einem AdV bzw. RCA wurde, soweit nicht anders vermerkt, die Zellzahl pro well bestimmt und die Infektionsdosis auf der Grundlage einzusetzender Partikel pro Zelle (p/c) berechnet. Die Anzahl der Zellen der unterschiedlichen Zelllinien lag bei den Versuchen zwischen 0,3 – 1,1 x 10<sup>6</sup> Zellen/well, wobei während der Experimente die Zellzahl einer Zelllinie möglichst konstant gehalten wurde.

Primäre Ratten-Kardiomyozyten wurden bei 37°C ohne CO<sub>2</sub> kultiviert.

Folgende Kulturmedien wurden verwendet:

Zelllinie	Verwendetes Medium
EA.hy926	GIBCO Dulbecco's HAT Medium® + FKS (10%) + Penicillin/Streptomycin (1% Endkonzentration)
Kardiomyozyten (Ratte)	Biochrom CMRL 1415® + FKS (1%)
humane Keratinozyten	GIBCO Keratinozyten-Medium® + EGF (Epidermal Growth Factor, 5 ng/ml) + BPE (Bovine Pituitary Extract) + Gentamycin (50 mg/ml; 1%)
OE-33	GIBCO RPMI 1640 Medium with Glutamax I® + FKS (10%) + L-Glutamin (2 mmol)
Kyse140, HT-29, Colo320, Colo205, HepG2	Biochrom RPMI 1640® + FKS (10%) + Penicillin/Streptomycin (1%)
LS174-T:	GIBCO DMEM® + FKS (10%) + Penicillin/Streptomycin (1%)

**Tabelle 3.6.:** verwendete Kulturmedien; FKS: fötales Kälberserum

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit 1x PBS (Gibco BRL®) gewaschen und mit 500 µl 0,25%igem Trypsin-EDTA (Sigma®) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale wurde unter einem

Mikroskop kontrolliert, die Reaktion durch Zugabe von 500 µl frischem Medium gestoppt und die Zellen gezählt. Hierzu wurden 100 µl von den in 1 ml Medium resuspendierten Zellen mit 100 µl 1x PBS und 100 µl Tryptophanblau versetzt, gevortext und anschließend in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt .

### 3.2. RNA- und DNA-Präparation

#### 3.2.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen mit RNAClean™

Diese Methode beruht auf einer Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA. Die Zellen eines wells wurden mit 1 ml RNAClean™ direkt auf der Zellkulturplatte lysiert und die RNA anschließend nach dem *RNAClean Präparationsprotokoll für adhärente Zellen* des Herstellers und auf Eis präpariert. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser (Amersham®) gelöst, für 10 min bei 60°C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

weitere benötigte Reagenzien:

- Chloroform (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- 70% Ethanol (Mallinckrodt Baker)

#### 3.2.2. Präparation von genomischer DNA aus Zellen

Genomische zelluläre und AdV-DNA aus transduzierten Zellen wurde mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II* (Peqlab Biotechnologie GmbH) anhand des *Isolierungsprotokolls für eukaryotische Zellen und Gewebe* nach den Angaben des Herstellers präpariert und in 400 µl Elutionspuffer gelöst. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung der DNA. Hierzu wurde diese mit 8 µl 5 M NaCl und 800 µl 100%igem Ethanol versetzt, durch Vortexen sorgfältig gemischt, für 20 min bei -20°C gefällt und darauf 15 min bei 10000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 700 µl 80%igem Ethanol mittels 2-minütiger Zentrifugation bei 10000 min<sup>-1</sup> gewaschen. Der Überstand wurde abermals verworfen, die DNA im Anschluß 2 min luftgetrocknet und in 30 µl A. bidest. gelöst.

### 3.2.3. Quantifizierung der RNA- und DNA-Ausbeute

Die Konzentrationsbestimmung der RNA und der DNA erfolgte fotometrisch mit dem UV-Spektrometer. Dabei wurden die RNA-Proben in Abhängigkeit von der erwarteten Konzentration 1:10 bis 1:70, die DNA-Proben im allgemeinen 1:70 mit A. bidest. verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) bestimmt (eine  $A_{260}$ -Einheit entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bzw. 50 µg DNA/ml).

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

RNA-Konzentration der Probe in µg/µl = ( $A_{260}$  x Verdünnung x 40 µg/ml):1000.

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

DNA-Konzentration der Probe in µg/µl = ( $A_{260}$  x Verdünnung x 50 µg/ml):1000.

Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  erlaubte in Abhängigkeit vom pH-Wert der Verdünnungslösung eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA bzw. DNA. Hochreine RNA bzw. DNA hat bei einem pH-Wert von 7,5 einen  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten von 1,8 bis 2,1.

## 3.3. DNA-Analyse

### 3.3.1. Amplifikation spezifischer DNA durch die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR mit *Taq*-Polymerase wurde für verschiedene Zielsetzungen eingesetzt. In Abhängigkeit davon kamen unterschiedliche Reaktionsansätze (Reaktionsvolumen) und Reaktionsbedingungen (Zykluszahl, Annealingtemperatur) zum Einsatz. Die für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, „House-Keeping-Gen“) und Luciferase jeweils separat durchgeführte kompetitive PCR erfolgte in Reaktionsansätzen von 20 µl, die PCR zur Amplifikation und späteren Isolierung spezifischer DNA-Fragmente und die Overlap-PCR in 50 µl-Reaktionsansätzen. Für die GAPDH- und Luciferase-PCR wurden unterschiedlich fluoreszenz-markierte Primer (an das 5'-Ende gekoppelte, fluoreszierende Farbstoffe (FAM =blau, TAMRA =rot)) verwendet, die eine spätere gleichzeitige Analyse der Amplifikate im Genetic Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems) ermöglichten. Die PCR erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700 (PE Applied Biosystems) nach folgenden Protokollen:

Reagentien	Volumen (20 µl Reaktionsansatz)	Volumen (50 µl Reaktionsansatz)	Endkonzentration
10x Taq-Puffer* <sup>1</sup>	2,0µl	5,0µl	1x
dNTPs 10mM	0,5µl	1,0µl	200µM (100-200µM)
Primer: 100µM			Je Primer 1µM (0.1-1.0µM)
Sense-Primer	0,25µl	0,5µl	
Antisense-Primer	0,25µl	0,5µl	
Taq-Polymerase 5U/µl	0,125µl	0,25µl	1.0 Unit (1-2.5Unit)
DNA-Template	--µl	--µl	0.1-0.5µg
A.bidest.	ad 20µl	ad 50µl	

**Tabelle 3.7:** analytische PCR (20 µl Reaktionsansatz) & präparative PCR (50 µl Reaktionsansatz)

\*<sup>1</sup>10x Taq Puffer  
 100mM HCl (pH 8.3 at RT°)  
 500mM KCl  
 15mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1% (w/v) gelatine.

Die Reaktionsbedingungen der PCR wurden nach folgendem Schema eingerichtet:

Initiale Denaturation	94°C , 2 min.
25 – 40 cycles:	
Denaturation	95°C, 30 sec.
Annealing	45-65°C, 30 sec.
Extension	72°C, 30-90 sec. (je nach Fragmentlänge)
Finale Extension	72°C, 5 min.
Kühlung auf	4°C, ∞.

**Tabelle 3.8:** Reaktionsbedingungen der PCR mit *Taq*-Polymerase

### 3.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde sowohl zur Konzentrationsbestimmung von DNA als auch zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente und zur Charakterisierung von PCR-Produkten eingesetzt. RNA konnte durch Nachweis der 18S- und 28S-RNA auf ihre Qualität und Integrität nach der Präparation überprüft werden.

Abhängig von der zu erwartenden Größe der Fragmente wurden 0,8 bis 2%ige, zur RNA-Kontrolle 1%ige Agarose-Gele (Lösung der Agarose (Saekem LE Agarose; FMC Bio-Products®) in 100 ml 1x TAE-Puffer\*<sup>2</sup> und Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml; Sigma®) in Elektrolyse-Puffer (1x TAE) verwendet.

Die aufzutragenden DNA-Lösungen (40-50 µl für die Isolierung von Fragmenten, 1-2 µl für die Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung von PCR-Produkten) wurden mit 1/10 Volumenanteil Ladepuffer\*<sup>3</sup> versetzt und in die Geltaschen pipetiert. Je nach gewünschtem Auftrennungsgrad und Größe des Gels wurde eine Spannung von 120-140 V für ca. 10-15 min angelegt.

Nach der Elektrophorese konnte die DNA unter UV-Licht visualisiert werden. Durch den Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen internen Längenstandard bzw. Marker X (Boehringer Mannheim) konnte die Fragmentgröße bestimmt werden.

\*<sup>2</sup> 1x TAE-Puffer

Stammlösung 20x TAE (pH 8,0):  
0,8 M (96,8g) Tris-Base (Trizma-Base; Sigma)  
22,8 ml Essigsäure  
40 ml 0,5 M EDTA  
A. bidest. ad 1000 ml

\*<sup>3</sup> Ladepuffer

4 g D(+)Sucrose (Sigma)  
25 µl gesättigte Bromphenolblau-  
Lösung (Sigma)  
A. bidest. ad 1 ml

### 3.3.3. Restriktionsfragment-Analyse

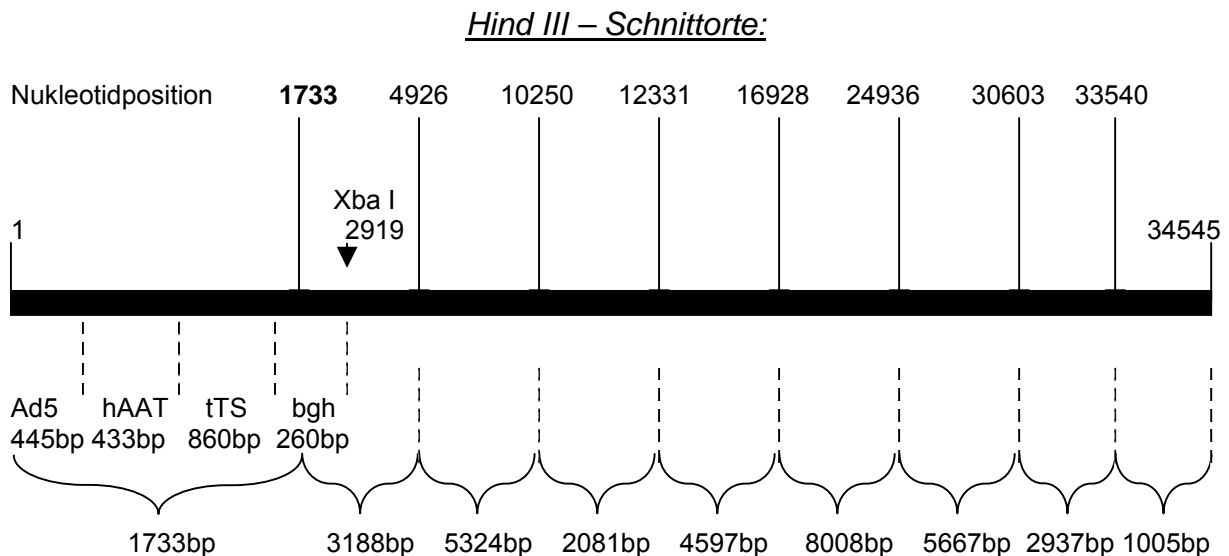
Die Restriktionsfragment-Analyse stellte zum einen während der Plasmidkonstruktion ein hilfreiches Element zur Prüfung des hergestellten Plasmids dar, zum anderen wurde sie zur Kontrolle der AdV-DNA nach der Viruspräparation eingesetzt.

Das aus einer Plasmidminipräparation (siehe 3.7.3.) gewonnene Plasmid wurde auf das Vorhandensein des inserierten Gens überprüft, indem spezifische Schnittorte in der Sequenz aufgesucht und die entsprechenden Restriktionsenzyme eingesetzt wurden. Die aus dem Verdau entstehenden Banden wurden durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und auf die spezifische Größe hin untersucht.

Die zu spaltenden DNA-Fragmente und Plasmide wurden gemäß den vom Hersteller (New England Biolabs<sup>®</sup>) empfohlenen Reaktionsbedingungen (Puffersysteme, Reaktionstemperatur, Mengenverhältnisse etc.) gespalten.

Zur Restriktion der AdV-DNA wurde 1 µg DNA mit 20 Einheiten *Hind III* über Nacht bei 37°C in einem 50 µl Reaktionsansatz unter Verwendung des entsprechenden 10x Reaktionspuffers geschnitten. Die Größe der sichtbaren Banden wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Als Beispiel sei hier die Spaltkarte des Vektors Ad5hAAT-tTS aufgeführt:

## Spaltkarte Ad5hAAT-tTS:



**Abbildung 3.21.:** Spaltkarte Ad5hAAT-tTS; die Bande von 1733bp ist die spezifische Bande des Ad5hAAT-tTS, alle weiteren Banden entstehen aus spezifischen *HindIII*-Orten im RR5-longarm

### 3.3.4. Quantitative PCR

#### 3.3.4.1. Konstruktion eines verkürzten DNA-Längenstandards

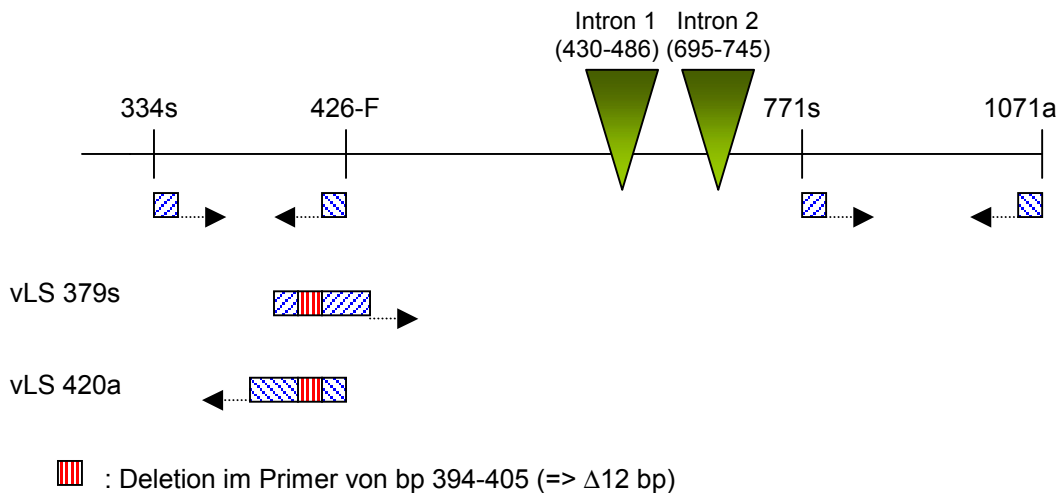
Die verkürzten DNA-Längenstandards wurden für die Quantifizierung der Luciferase-Expression mittels quantitativer bzw. semiquantitativer PCR benötigt. Diese entsprechen in der Gensequenz der des Gens von Interesse (hier der Luciferase und des zellinternen Standards GAPDH), sind allerdings um eine bestimmte Basenpaar-Anzahl verkürzt, um sie nach der PCR von dem spezifisch nachzuweisenden nativen DNA-Fragment unterscheiden zu können. Die hier eingesetzten Längenstandards beinhalten eine 10 (GAPDH-Standard) bzw. eine 12 (Luciferase-Standard) Basenpaare (bp) umfassende Deletion. Der verkürzte DNA-Längenstandard für GAPDH war bereits im Labor vorhanden (Fechner et al., 1999).

Der Luciferase-exprimierende AdV (Ad5CMVLuc), der bei diesen Untersuchungen zur Anwendung kam, trägt in der kodierenden Sequenz nur noch die Exons. Er ist demnach kürzer als die ursprüngliche cDNA der Luciferase und somit stimmen die Positionsbezeichnungen im Primernamen nicht immer mit den Basenpaar-Positionen überein. Das erste deletierte Intron reicht von der Nukleotidposition (np) 430 bis np

486, das zweite von np 695 bis np 745. Dies ergibt eine Deletion um 107 Basenpaare, die bei der Größenberechnung einzelner Fragmente beachtet werden mußte.

### 3.3.4.1.1. Herstellen der benötigten Fragmente mittels PCR

Vorhandene Primer:



**Abbildung 3.22.:** grafische Darstellung zur Konstruktion des verkürzten Längenstandards

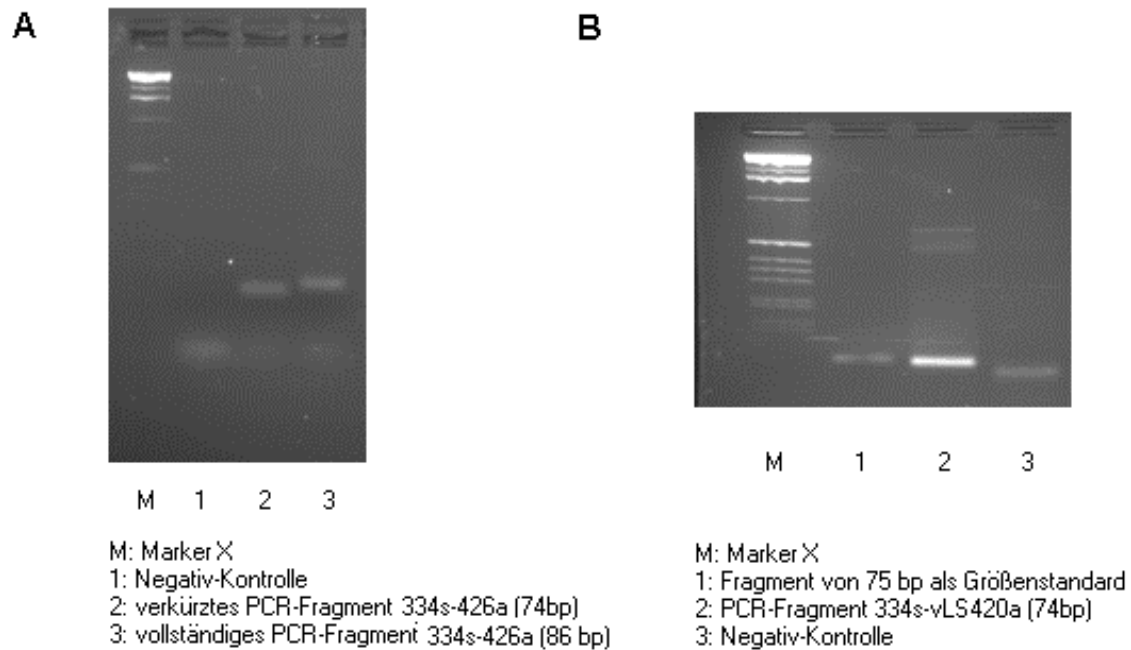
Luc334s	bp 334 – bp 350
Luc426-F	bp 426 – bp 407
Luc771s	bp 771 – bp 790
Luc1071a	bp 1071 – bp 1055
Luc-vLS 379s	bp 379 – bp 425; Δ394-405
Luc-vLS 420a	bp 420 – bp 373; Δ405-394

**Tabelle 3.9.:** verwendete Primer zur Herstellung des verkürzten Längenstandards

Die beiden Luc-vLS-Primer 379s und 420a (s.o.) besitzen jeweils eine Deletion um 12 Basenpaare, die am identischen Sequenzabschnitt der Luciferase-cDNA lokalisiert ist (bp 394 – bp 405). Sie überlappen sich sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts um 15 Basenpaare.

Durch eine PCR mit dem sense-Primer *Luc334s* und dem antisense-Primer *Luc-vLS 420a*, der die Deletion beinhaltet, entstand ein Fragment von 74 Basenpaaren, das im Gegensatz zur ursprünglichen cDNA der Luciferase um 12 Basenpaare verkürzt war.

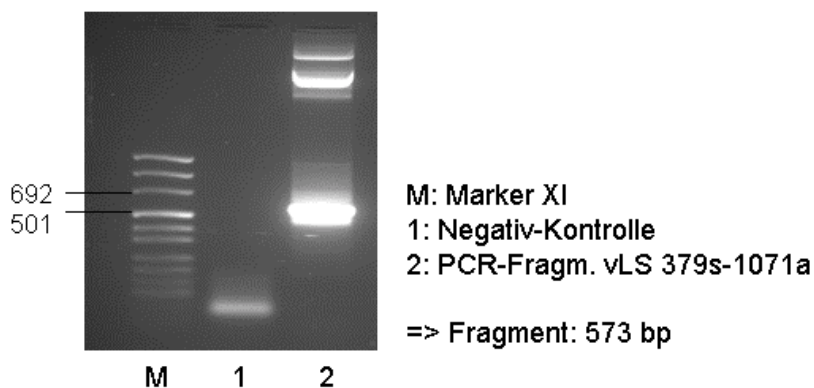




**Abbildung 3.23.:** 1. Fragment zur Herstellung des verkürzten Längenstandards

A: das Fragment des Luciferase-Längenstandards (2) neben dem nativen Luciferase-Fragment (3); B: Fragment von 75 bp als Größenstandard (1) neben dem Luciferase-Längenstandard (2).

Durch eine zweite PCR mit dem Primerpaar *Luc-vLS 379s/Luc1071a* wurde ein Fragment amplifiziert, das die Deletion an der gleichen Stelle des Luciferase-Gens trägt wie das Produkt der vorangegangenen PCR und statt der ursprünglichen 595 Basenpaare eine Größe von 573 Basenpaaren aufwies.



**Abbildung 3.24.:** 2. Fragment zur Herstellung des verkürzten Längenstandards

#### 3.3.4.1.2. Overlap-PCR und Analyse des Längenstandards

Nach Präparation und Aufreinigung der beiden oben beschriebenen PCR-Produkte mittels Gelextraktion wurde eine Overlap-PCR nach Methode 3.3.1. durchgeführt. Die verkürzten Luciferase-Fragmente dienten hierbei als Matrize, indem sie gleichzeitig im PCR-Ansatz eingesetzt wurden, und als Primer wurden *Luc334s* und *Luc426-F* (FAM markiert) gewählt. Das entstandene markierte Produkt konnte somit zusätzlich im GeneScan ABIPrism 310 überprüft werden.

#### 3.3.4.2. Kompetitive PCR

Die kompetitive PCR wurde mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Sie erfolgte für GAPDH und Luciferase in separaten Reaktionsansätzen zu jeweils 20 µl, wobei unterschiedlich fluoreszenz-markierte Primer verwendet wurden, die eine spätere Analyse der Amplifikate im Genetic Analyzer ABI 310 ermöglichten (Primerpaare GAPDH-682s-T/GAPDH-826a, *Luc426-F/Luc334s*). Der fluoreszierende Farbstoff (FAM [F] bzw. TAMRA [T]) war an das 5'-Ende des Primers gekoppelt.

Reagenzien	Volumen
10x PCR-Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
dNTP-Set 10 mM	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl
PCR-Primer 10 µM; sense/antisense	je 1 µl
DNA-Template (30 ng)	-- µl
A.bidest.	ad 20 µl

**Tabelle 3.10.:** Reaktionsansatz für die kompetitive PCR

#### 3.3.4.3. Nachweis der Produkte mittels GeneScan-Analyse

Die fluoreszenz-markierten Amplifikationsprodukte wurden, nachdem je 1 µl Luciferase- und GAPDH-PCR-Produkt in 12 µl *Template Supression Reagent* (TSR; PE Applied Biosystems) im Trio-Thermoblock (Biometra) für 2 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt wurden durch Kapillarelektrophorese mit Polymer 4 (PE Applied Biosystems) im Genetic Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems) nachgewiesen. Dabei zeigt die ABI 310 *Collection Software* einen

Ausschlag in Form eines Peaks für jedes Signal, der in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Fluoreszent-Farbstoffe unterschiedliche Farben besitzt. Die Fläche und die Höhe jedes Peaks sind abhängig von der Intensität des Signals und werden durch die *Gene scan Software* (ABI) errechnet, wobei nur die Peakfläche zur Auswertung genutzt wurde.

Das Verhältnis zwischen nativem Luciferase-PCR-Produkt und Standard-Luciferase-PCR-Produkt wurde zur Berechnung der Luciferase-DNA-Konzentration der Zellen bzw. des entsprechenden Gewebes genutzt.

Unterschiede bei den in der PCR eingesetzten DNA-Mengen wurden durch Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen nativem Luciferase-PCR-Produkt und Standard-GAPDH-PCR-Produkt korrigiert. Die folgende Formel wurde zur Berechnung genutzt:

$$\frac{\frac{\text{Luciferase}}{\text{Luc. - Stand.}} \times \text{Konzentration Luc. - Stand.}}{\frac{\text{GAPDH}}{\text{GAPDH - Stand.}} \times \text{Konzentration GAPDH - Stand.}} = \text{relative Luciferase - Expression}$$

### 3.3.5. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 400 ng geschnittener Plasmid-DNA bzw. 50-100 ng PCR-Fragment verwendet, 1 µl 10 µM Primer und 2 µl *Big Dye Prämix* (Applied Biosystems®) zugefügt und mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt.

Für die Sequenzierung des Luciferase-Längenstandards wurde der Primer *Luc334s* bzw. *Luc426a* verwendet. Zur Überprüfung der korrekten Insertion und der Sequenz der Transgen-cDNA in einen AdV wurden die nachzuweisenden PCR-Fragmente mit dem Primerpaar *Ad5CMV480s/pZS2-3'UTRA* aus der AdV-DNA amplifiziert (Methode 3.3.1.) und diese, falls notwendig, mit internen transgenspezifischen Primern in beide Richtungen sequenziert. Die Sequenzreaktion erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700 (PE Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen:

25 Zyklen mit jeweils:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 96°C 10 sec</li> <li>• 58°C 5 sec</li> <li>• 60°C 4 min</li> </ul>
Abkühlung auf 4°C

Im Anschluss daran wurde die DNA für die Sequenzierung aufgearbeitet. Hierfür wurden 90 µl A. bidest, 10 µl 3M Natriumazetat (pH 4,8) und 250 µl 100%iger Ethanol zum amplifizierten DNA-Produkt hinzugefügt und 15 min bei 14000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen, 400 µl 70%iger Ethanol zugegeben, gevortext und 5 min bei 14000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, die DNA 10 min im Vakuum getrocknet, mit 25 µl *Template Supression Reagent* (TSR; Applied Biosystems®) gemischt und für 2 min auf 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Detektion mit Hilfe des Gene Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems®) unter Verwendung der *ABI DNA Sequencing Analysis Software*.

### 3.4. RNA-Analyse

#### 3.4.1. Reinheit und Qualität der präparierten RNA

1 µl der aus der Präparation mittels *RNAclean*<sup>TM</sup> gewonnenen RNA wurde mit 3 µl Lade-Puffer (siehe 3.3.2) vermischt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese zeigte sich ein typisches Bandenmuster, das auf die Qualität der präparierten RNA schließen ließ. Deutlich sollten sich hierbei die Banden der 9S-, 18S- und 28S-rRNA abzeichnen, und eine leichte Schlierenbildung zwischen den Banden ließ auf das Vorhandensein der mRNA schließen.

Neben der Konzentrationsbestimmung der RNA im UV-Spektrometer (siehe 3.2.3.) konnte gleichzeitig durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) die Reinheit des Präparats bestimmt werden. Der Quotient aus  $A_{260}/A_{280}$  sollte bei hochreiner RNA in einem Bereich von 1,8 bis 2,1 liegen.

#### 3.4.2. Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden mittels „PCR-like“-Markierung

Als Sonde diente mit <sup>32</sup>P-dCTP radioaktiv markierte Einzelstrang-DNA, die unter Verwendung des entsprechenden *antisense*-Primers mit Hilfe einer PCR hergestellt wurden. Dazu diente folgendes Protokoll:

Reagentien	Volumen
10x PCR-Reaktions-Puffer	2,5 µl
dNTP ohne dCTP (1 mMol)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 Units/µl)	0,25 µl
<sup>32</sup> P dCTP (10 µCi/µl)	3-4 µl
Primer (100 µM)	0,25 µl
DNA-Matrize (100 ng)	-- µl
A.bidest.	ad 25 µl
Mineralöl zur Überschichtung	30 µl

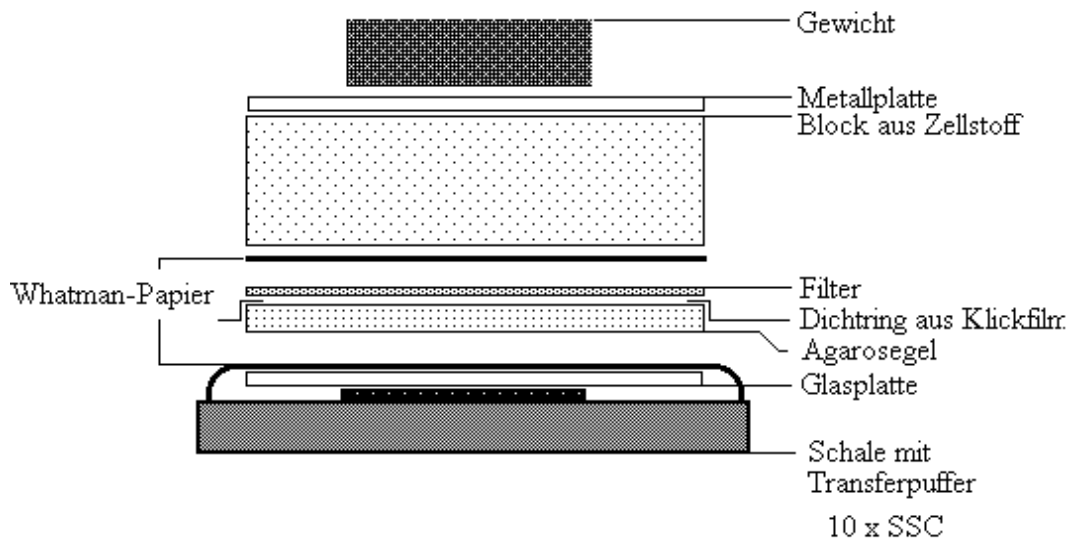
**Tabelle 3.11.:** Reaktionsansatz für die Herstellung von Einzelstrang-DNA-Sonden

### 3.4.3. Northern-Blot

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde die Agarose (Seakem LE Agarose; FMC Bio-Products<sup>®</sup>) in autoklaviertem 1x MOPS-Puffer<sup>\*4</sup> gelöst, nach dem Abkühlen auf 60°C 6 % Formaldehyd (Formaldehyd, 37%; Sigma<sup>®</sup>) zugegeben und das Gel in die zuvor mit 1%igem SDS gründlich gereinigte und mit A. bidest gespülte Kammer, einschließlich Kamm, gegossen. 10 bis 25 µg Gesamt-RNA wurden auf Eis mit 10 µl Ladepuffer<sup>\*5</sup> und 0,1 µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid 10 mg/ml; Sigma<sup>®</sup>) versetzt und mit RNase-freiem Wasser (Amersham<sup>®</sup>) auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert, um entstandenes Kondenswasser zu entfernen, und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der aufgetragenen Proben erfolgte in 1x MOPS-Puffer<sup>\*4</sup> bei 100-120 V. Nach Kontrolle der 18S- und 28S-rRNA-Banden mit dem Transilluminator wurde das Gel 2 mal 30 min in A. bidest gewässert.

<sup>\*4</sup> 10x MOPS-Puffer  
 (autoklavieren, abgedunkelt lagern)  
 0,2M MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure)  
 0,05 M Na-Acetat  
 0,01 M EDTA (pH 7,0)

<sup>\*5</sup> Ladepuffer pro 1,5 ml:  
 720 µl deionisiertes Formamid (Amresco)  
 260 µl Formaldehyd 37% (Sigma)  
 160 µl 10x MOPS-Puffer  
 80 µl gesättigtes Bromphenolblau (Sigma)  
 180 µl RNase-freies Wasser (Amersham)



**Abbildung 3.25.:** Aufbau der Bloteinrichtung

Der Aufbau der Bloteinrichtung erfolgte anhand der Abbildung, wobei das Gel mit den Geltaschen nach unten auf der Whatman-Membran lag. Als Transferpuffer diente 10x SSC<sup>\*6</sup>. Der RNA-Transfer auf den Filter erfolgte in 12 bis 16 h. Darauf wurde der vollständige Transfer der RNA durch eine Überprüfung des Gels unter dem Transilluminator kontrolliert. Die Position der 18S- und 28S-rRNA-Bande wurde auf dem Filter markiert, der Filter beschriftet und 30 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die RNA durch 2-maliges Cross-linken unter UV-Licht an den Filter gebunden und die Aufbewahrung des Filters konnte in einer sterilen Klarsichttüte bei 4°C erfolgen.

<sup>\*6</sup> Stammlösung 20x SSC-Puffer  
 3 M (175,3 g/l) NaCl (Sigma)  
 0,3 M (88,2 g/l) Na-citrat (Sigma)

#### 3.4.4. Hybridisierung

Die Filter wurden in den zuvor mit 1%igem SDS und A. bidest gereinigten Hybridisierungsröhren mit 5-10 ml/100 cm<sup>2</sup> Filter der auf 68°C erwärmten *ExpressHyb Hybridization Solution* (Clontech®) für 30 min und bei 68°C unter kontinuierlichem Schwenken im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und die Filter mit 5 ml der auf 68°C erwärmten *ExpressHyb Hybridization Solution* unter Zugabe von 200-400 µl der

entsprechenden Einzelstrang-*antisense*-Sonde (3.4.2.) für 1 h bei 68°C unter ständigem Schwenken hybridisiert. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurden die Filter 3 mal mit je 10-20 ml Waschlösung 1<sup>\*7</sup> für 10-15 min bei Raumtemperatur unter Schwenken gewaschen. Die Waschlösung 1 wurde verworfen und, nach 2-maligem Waschen mit je 10-20 ml der Waschlösung 2<sup>\*8</sup> für 20 min bei 50°C und Verwerfen der Waschlösung, die Filter entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

<sup>\*7</sup> Waschlösung 1  
0,1xSSC  
0,1% SDS

<sup>\*8</sup> Waschlösung 2  
2x SSC  
0,05% SDS

Bei einer alternativen Methode erfolgte die Prähybridisierung mit 5 ml der auf 50°C erwärmten Prähybridisierungslösung<sup>\*9</sup> pro 150 cm<sup>2</sup> Filter bei 50°C unter ständigem Schwenken. Anschließend wurden 0,4 ml der 18S-rRNA-Einzelstrang-*antisense*-Sonde direkt in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über 12-16 h bei 50°C unter ständigem Schwenken. Die Hybridisierungslösung mit der überschüssigen Sonde wurde abgegossen, aufgefangen und bis zur möglichen Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Filter wurden 3 mal mit 10 ml Waschlösung I<sup>\*10</sup> pro 150 cm<sup>2</sup> Filter für je 10 min bei 50°C unter Schwenken gewaschen. Nach Verwerfen der Waschlösung I wurde 10 min mit 10 ml Waschlösung II<sup>\*11</sup> pro 150 cm<sup>2</sup> Filter bei 55°C unter Schwenken gewaschen. Die Filter wurden entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

<sup>\*9</sup> Prähybridisierungslösung  
Zusammensetzung  
*absolut*  
1,0% BSA  
350 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
7,0% SDS  
30,0% deionisiertes Formamid

*pro 10 ml*  
0,1 g bovines Serumalbumin Fraktion V  
3,5 ml 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
35 ml 20% SDS  
3,0 ml desionisiertes Formamid

<sup>\*10</sup> Waschlösung I  
30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,1% SDS

<sup>\*11</sup> Waschlösung II  
150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,5% SDS

### 3.4.5. Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

Die hybridisierten Filter wurden in eine Kassette eingelegt und die Fuji Film-Platte BAS-1500 in Abhängigkeit von der Expressionsstärke der gesuchten RNA 20 min bis 4 Stunden bei Raumtemperatur exponiert. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde mittels Phosphoimaging unter Verwendung der Software BASReader 2.21 bestimmt. Als Alternative konnte bei hoher Strahlungsintensität der Filter in eine Röntgenkassette eingelegt und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die Auswertung erfolgte hierbei visuell.

Nach Auswertung der Filter wurde die Sonde mit Hilfe eines Wasserbades bei  $95-98^{\circ}\text{C}$  durch 3-minütiges Schwenken in 0,5%igem SDS vom Filter gelöst (stripfen). Die Filter konnten anschließend für eine weitere Hybridisierung genutzt werden oder wurden in Klarsichtfolie eingeschlagen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 3.5. Bestimmung der Transgenexpression

### 3.5.1. Luciferase-Assay

Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Abgabe eines Photons. Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte mit dem *Luciferase detection Kit* (Boeringer Mannheim®). Nach Abnehmen des Mediums und Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden die Zellen direkt mit 250  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (im Kit enthalten) überschichtet. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurden die abgelösten Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend 15 Sekunden bei  $14000\text{ min}^{-1}$  zentrifugiert. 10  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Luciferase-Substrat gemischt und die Luciferase-Aktivität innerhalb von 20 s im Luminometer bestimmt.

### 3.5.2. Cell-Killing-Assay/Vitalitätstest

Für das Cell-Killing-Assay wurden jeweils fünf wells mit der gleichen Vektordosierung und übereinstimmender AdV-Konstellation infiziert, wobei jeweils zwei wells für die Bestimmung der Zellzahl (Vitalitätstest) genutzt wurden und drei für die



Visualisierung der Zellrasendestruktion. Während einer Zelltransfektion wurde auf eine Dosisgleichheit der insgesamt eingesetzten AdV geachtet und wenn nötig mit dem inerten AdV Ad5CMV-TTP ausgeglichen. Die Infektion erfolgte nach Waschen der Zellen mit 1x PBS in 1 ml OPTIMEM für 20 Minuten. Die Zellen wurden darauf nochmals gewaschen und mit dem zellspezifischen Medium versehen. Nach 4-5 tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Von jeweils zwei wells wurden die Zellen abtrypsinisiert und gezählt. Die Zellen der restlichen drei wells wurden zur Fixation mit 500 µl 4%igem Formalin für 45 min überschichtet, nochmals gewaschen und mit 400 µl Kristallviolett/Ethanol 100% (1:800) für 15 Minuten angefärbt. Nach Absaugen des überschüssigen Farbstoffs und zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurde die Zellkulturplatte ausgewertet und fotografiert.

### 3.5.3. Nachweis der GFP-Expression

Für den Nachweis der GFP (green fluorescent protein) -Expression wurden die Zellen mit dem Ad5CMVGFP (1x10<sup>3</sup> p/c) für 20 min transduziert und 24 h später die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25 nachgewiesen.

## 3.6. Gewinnung und Präparation der histologischen Gewebsschnitte

### 3.6.1. Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung der in 4%igem Formalin fixierten Organe erfolgte automatisch in einem Gewebe-Entwässerungs- und Einbettungsgerät (Sakura<sup>®</sup>; Tissue-Tek VIP<sup>™</sup> 5; Vacuum Infiltration Processor). Hierbei wird das Fixierungsmittel zunächst mit Leitungswasser ausgewaschen, und es folgt eine Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%). Da Paraffin nicht in Alkohol löslich ist, wird dieser durch Benzol ausgewaschen. Die Gewebeteile werden in flüssiges (58-60°C) Paraffin eingelegt und durchtränkt. Die Organe wurden anschließend in Formen gelegt, wodurch durch Auffüllen mit Paraffin und Abkühlung auf 4°C der zum Schneiden geeignete Block angefertigt werden konnte. Die fertigen Blöcke konnten bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 3.6.2. Herstellen der histologischen Gewebsschnitte

Zum Scheiden wurde der Paraffinblock in ein Mikrotom eingespannt und die Schnitte auf einen Objektträger aus Glas (2,5 x 7,5 cm) aufgezogen. Die Färbung erfolgte nach der üblichen Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbemethode.

## 3.7. Viruskonstruktion und -präparation

### 3.7.1. PCR mit *Pwo*-Proof-Reading-Polymerase

Die *Pwo*-Proof-Reading-Polymerase (Peqlab<sup>®</sup>) wurde mit dem Ziel eingesetzt, die Fehlerquote, die bei der Amplifikation mittels *Taq*-Polymerase auftritt, zu verringern. Somit wurde sie zur Amplifikation von Fragmenten genutzt, die für die Plasmidkonstruktion bestimmt waren. Durch die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität weist die *Pwo*-Polymerase die niedrigste Fehlerrate aller thermostabilen Polymerasen auf. Im Vergleich zur *Taq*-Polymerase ist dieses Enzym laut Herstellerangaben um den Faktor 10 genauer. Die Reagenzien wurden nach folgendem Schema für einen 50 µl Ansatz eingesetzt und mit Mineralöl überschichtet.

Reagentien	Volumen (für 50 µl Ansatz)	Endkonzentration
10x Puffer incomplete	5 µl	1x
MgSO <sub>4</sub> 25mM	8 µl	4 mM Mg <sup>2+</sup>
dNTP 10mM	4 µl	200 µM je dNTP
Primer 1 100 µM	0,4 µl	0,8 µM
Primer 2 100 µM	0,4 µl	0,8 µM
<i>Pwo</i> 1 Unit/µl	1 µl	1 Unit
A.bidest.	ad 50 µl	--
DNA	-- µl	50 - 200 ng

**Tabelle 3.12.:** Reaktionsansatz für die PCR mit *Pwo*-Polymerase

Die PCR wurde unter folgende Reaktionsbedingungen gestellt:

Vorgang	Wiederholungen
Denaturierung des Templates für 2 min bei 95°C	1 x
Denaturierung für 15 sec bei 94°C	10 x
Annealing für 30 sec bei 45-65°C	
Elongation für 45 sec – 2 min bei 72°C	
Denaturierung für 15 sec bei 94°C	15 – 20 x
Annealing für 30 sec bei 45-65°C	
Elongation für 45 sec – 2 min bei 72°C	
+ Elongationsverlängerung von 20 sec je Zyklus	
Verlängerte Elongation von bis zu 7 min bei 72°C	1 x

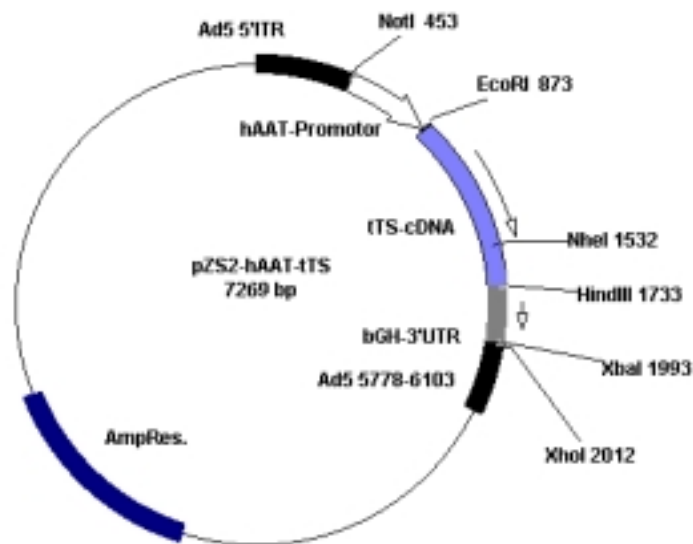
**Tabelle 3.13.:** Reaktionsbedingungen der PCR mit *Pwo*-Polymerase

### 3.7.2. Plasmidkonstruktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Plasmide Ad5hAAT-tTS und Ad5-pTRE2-13S-bgh konstruiert, um daraus adenovirale Vektoren (AdV) zu generieren. Die weiteren AdV, die während dieser Arbeit zur Anwendung kamen (Ad5CMV-Luc, Ad5TRE-Luc, Ad5CMV-rtTA-M2, Ad5hAATrtTA-M2, Ad5CMV-tTS, Ad5hAAT-tTS, Ad5CMV-GFP, Ad5Anf-Serca („RCA“), Ad5CMV-TTP) waren bereits im Labor vorhanden und etabliert.

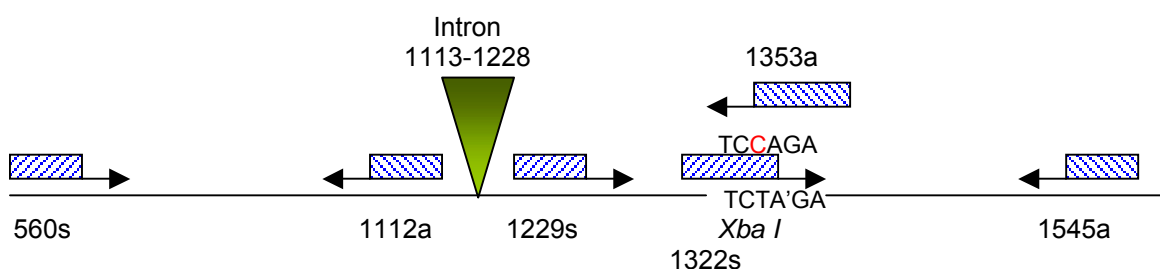
#### 3.7.2.1. Shuttle-Plasmide

*Ad5hAAT-tTS*: Das Plasmid pZS2 (clontech®), bei dem der ursprünglich vorhandene CMV-Promotor bereits durch den hAAT-Promotor ersetzt worden war, stand zur Verfügung (hAAT-pZS2). Die cDNA des Tetrazyklin-kontrollierten transkriptionalen Silencers (tTS) wurde aus dem pTet-tTS Vektor (clontech®) mittels PCR mit Hilfe der Primer tTS-*EcoRI*-763 und tTS-*HindIII*-1632, die an ihrem 5'-Ende mit der jeweiligen Linkersequenz der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* bzw. *HindIII* versehen waren, amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut, durch eine Gelelektrophorese aufgereinigt und mit dem *QuiaEx-Gelextraktions-Kit* (Quiagen®) aus dem Gel gewonnen. Das Fragment wurde in das ebenfalls vorher mit *EcoRI* und *HindIII* verdaute und aufgereinigte hAAT-pZS2 inkloniert (Ligation siehe 3.7.2.2.).



**Abbildung 3.26.:** Plasmidkarte Ad5hAAT-tTS

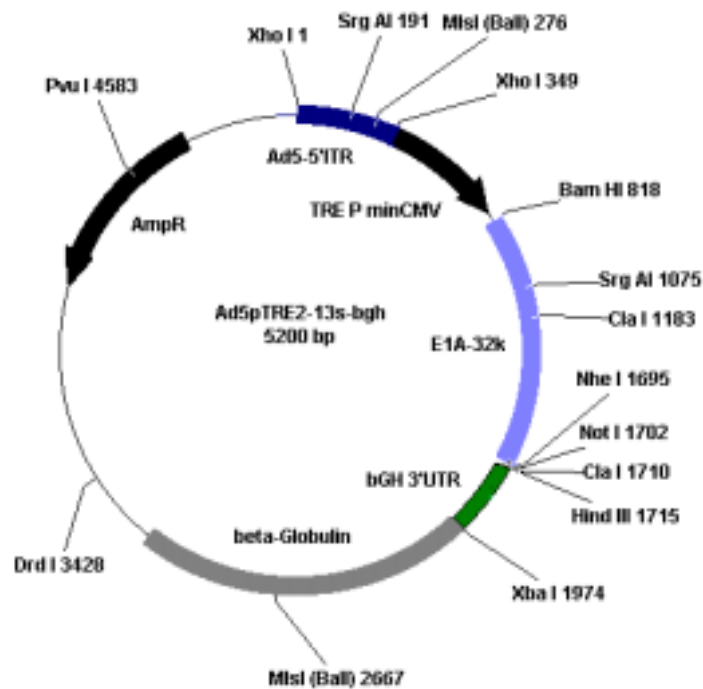
*Ad5-pTRE-13S-bgh*: Das Poly-A-Signal des Bovine Growth Hormons (bgh) wurde bereits in das Basisplasmid pTRE2 (clontech®) inkloniert und war in dieser Form im Labor vorhanden (pTRE-bgh). Aus der E1A-Region des Adenovirus 5 (Nukleotidposition 499-1632) wurde die cDNA der E1A-13S-Region gewonnen und sowohl das darin enthaltene Intron (Nukleotidposition 1113-1228) als auch die an der Nukleotidposition 1339 lokalisierte *Xba I*-Schnittstelle (TCTA'GA) mit Hilfe von Mutagenese-PCRs entfernt. Für die Deletion des *Xba I*-Ortes wurden vorerst mit Hilfe der Primer E1A-1322s und E1A-1353a, die beide einen Nukleoditaustausch an der Position 1338 (T anstelle von C) beinhalten, die Fragmente 1229-1353 und 1322-1545 gewonnen, die in einer weiteren PCR mit dem Primerpaar E1A-1229s/E1A-1545-*NheI* als Matrize dienten. In einem weiteren Schritt wurde das stromaufwärts des Introns gelegene Fragment der 13S-cDNA mit Hilfe des Primerpaares E1A-560s-*BamHI* und E1A-1112a amplifiziert.



**Abbildung 3.27.:** Herstellung der E1A-13S-cDNA aus Ad5; = eingesetzte Primer; **C**=Nukleotidaustausch im Primer zur Deletion der *Xba I*-Schnittstelle

Die Fragmente wurden aufgereinigt und mit den Endprimern E1A-560-*BamHI* und E1A-1545-*NheI* erneut einer PCR unterworfen. Nach einer weiteren Aufreinigung durch eine Gelelektrophorese wurde das entstandene Fragment mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NheI* verdaut und abermals gereinigt. Das Fragment wurde über die Schnittstellen *BamHI* und *NheI* in pTRE-bgh einkloniert, woraus das Plasmid pTRE-13S-bgh resultierte.

Die 5'ITR (Nukleotidposition 1-342) des Adenovirus 5 wurde aus dem Basisplasmid pZS2 (clontech®) mit den Primern E1A-1s-*XhoI* und E1A-342a-*XhoI* amplifiziert, mit *XhoI* geschnitten und über die singuläre *XhoI*-Schnittstelle stromaufwärts des TRE in pTRE-13S-bgh einkloniert. In der folgenden Grafik wird das so entstandene Plasmid Ad5-pTRE-13S-bgh dargestellt.



**Abbildung 3.28.:** Plasmidkarte Ad5-pTRE-13S-bgh; E1A-32kDa = E1A-13S

Die Plasmidkarten aller weiteren hier eingesetzten Shuttle-Plasmide werden unter 9.2. aufgeführt.

### 3.7.2.2. Ligation

Die Ligation eines linearisierten Plasmids und des Gens von Interesse (Insert) wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Reagentien	Volumen
Plasmid (100-300 ng)	-- $\mu$ l
Insert (4-5fache Menge des Plasmids)	-- $\mu$ l
10x Ligationspuffer	3-5 $\mu$ l (1/10 des Endvolumens)
rATP	3-5 $\mu$ l (1/10 des Endvolumens)
T4 DNA-Ligase	1 $\mu$ l
A.bidest	Ad 30-50 $\mu$ l

**Tabelle 3.14.:** Reaktionsansatz für die Ligation

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und 5  $\mu$ l des Ligationsprodukts wurden zur Kontrolle und Quantifizierung auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Das Volumen für die Transformation benötigten 0,1-50 ng des Plasmids konnte so geschätzt werden.

### 3.7.2.3. Transformation in E. coli

Die Transformation in E. coli wurde nach Angaben des Herstellers (Epurican Coli XL2- Blue MRF Ultracompetent Cells; Stratagene®) und auf Eis durchgeführt.

### 3.7.2.4. Ausplattieren der Transformation und Picken der Klone

Die Bakteriensuspension wurde zu je 50  $\mu$ l, 200  $\mu$ l und 400  $\mu$ l auf 6 cm Plastik Kulturschalen ausplattiert. Der Nährboden bestand aus 15 ml mit 150  $\mu$ l Ampicillin (5mg/ml) versetztem LB-Agar (GIBCO®). Die Kulturplatten wurden 16-24 h bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden mit einem Holzzahnstocher gepickt und in 2,5 ml LB-Medium (GIBCO®) versetzt mit 25  $\mu$ l Ampicillin (5mg/ml) überführt. Die Inkubation dauerte über Nacht bei 37°C und 225 rpm. Aus 800  $\mu$ l der nach 16-24 h entstandenen Bakteriensuspension und 200  $\mu$ l Glycerin (75%) wurde ein Bakterien-Stock angelegt und bei -80°C gelagert. Die restliche Bakteriensuspension wurde für die Plasmidminipräparation genutzt.

### 3.7.3. Plasmidminipräparation

Für die Isolation der Plasmide, die in *E. coli* (Stratagen<sup>®</sup>) über Nacht gewachsen waren, wurde der *Fast 'n' Easy Mini Plasmid Prep Kit* (Quiagen<sup>®</sup>) verwendet. 1 ml der Übernachtskultur wurde für 1 min bei 14000 zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Entfernen des restlichen LB-Mediums mittels einer Vakuumpumpe, wurde das Pellet in MPS-1<sup>\*)</sup> resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µl MPS-2<sup>\*)</sup> und 325 µl MPS-3<sup>\*)</sup> wurden die Zellen gelöst und die Plasmid-DNA gebunden, wobei durch vorsichtiges Mischen die Kontamination mit chromosomaler DNA vermieden wurde. Durch Abzentrifugieren des Zelldebris (Proteine, chromosomale DNA, etc.) konnte die Plasmid-DNA in den Spinfilter überführt und durch weiteres Zentrifugieren an die Filtermembran gebunden werden. Nach dem Waschen mit 300 µl MPS-4<sup>\*)</sup> wurde die DNA mit 50 µl A.bidest aus dem Filter gelöst und zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

(*) MPS-1:	Zellsuspensionspuffer: Tris, EDTA, RNase A
MPS-2:	Zellysispuffer: SDS/NaOH
MPS-3:	DNA-Bindepuffer: Kaliumacetat/Bindesalz
MPS-4:	Waschlösung: Tris/NaCl

### 3.7.4. Plasmidmidipräparation

Die Plasmidmidipräparation mit dem *Plasmid Purification Kit* (Quiagen<sup>®</sup>) basiert auf der Bindung der Plasmid-DNA an den Anionen-Austauscher Resin.

Für die Plasmidmidipräparation wurden 100 ml LB-Agar mit 1 ml Ampicillin (5mg/ml) versetzt und mit 5 µl der Bakterien-Stock-Lösung bei 37°C über Nacht bei 225 rpm inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde auf zwei 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und bei 4°C mit 6000g für 15 min zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Überstandes wurde das Pellet in 2 x 2 ml Puffer P1<sup>\*)</sup> resuspendiert und in ein 40 ml Zentrifugenröhrchen gepoolt. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2<sup>\*)</sup>, mischen und weitere 4 ml Puffer P3<sup>\*)</sup> wurden die Zellen lysiert und Zellschrott, genomische DNA und Proteine an SDS gebunden. Durch Zentrifugieren bei 20000g für 30 min bei 4°C wurde die in Lösung befindliche Plasmid-DNA abgetrennt und der klare Überstand in ein vorher mit Puffer

äquiliertes (Puffer QBT<sup>\*)</sup>) Quiagen-Tip überführt. Die durch die Schwerkraft in die Säule eingetretene Plasmid-DNA wurde an das Resin gebunden und durch zweimaliges Waschen mit Puffer QC<sup>\*)</sup> von Kontaminationen und Kohlenhydraten befreit. Durch Zugabe von 5 ml Puffer QF<sup>\*)</sup> wurde die Plasmid-DNA aus der Säule gelöst und durch eine Isopropanol-Präzipitation entsalzt. Nach 10 min Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals für 10 min zentrifugiert, der Alkohol entfernt und luftgetrocknet. Entsprechend der DNA-Menge wurde das Pellet in 250-400 µl TE-Puffer gelöst und 1 µl zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

* <sup>*)</sup> Puffer P1:	Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	Lysierpuffer: 200 mM NaOH; 1% SDS
Puffer P3:	Neutralisationspuffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT:	Äquilibrierungspuffer: 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol; 0,15% Triton <sup>®</sup> X-100
Puffer QC:	Waschpuffer: 1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol
Puffer QF:	Elutionspuffer: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris, Tris-Cl, pH 8,5; 15% Isopropanol

### 3.7.5. Ligation mit dem RR5-longarm

Alle Plasmide, die mit dem Ad5-longarm des RR5 *in vitro* ligiert werden sollen, dürfen nur eine *Xba I* – Schnittstelle besitzen, die direkt stromabwärts des Ploy-A-Signals (bGH-3'UTR) lokalisiert ist, dass heißt stromabwärts der Expressionskassette. Das Plasmid von Interesse wurde zunächst mit *Xba I* verdaut, mit Phenol-Chloroform aufgereinigt und das Pellet in TE-Puffer gelöst.

Der RR5-longarm ist das adenovirale Genom eines Ad-dl309 Derivats mit einer Deletion der E1-Region (von der Nukleotidposition 445 bis 3333), wodurch er replikationsdefizient wird. Dabei sind weite Teile der E3-Region im Genom des Adenovirus Typ5 belassen worden, mit Ausnahme der E3-Proteine 14.7-kDa und RID<sub>α&β</sub> (bp 30005 bis bp 30750). RR5 besitzt eine singuläre *Xba I*-Schnittstelle in der Nukleotidposition 3333. Vor der Ligation mit dem Plasmid von Interesse wurde der RR5-longarm mit *Xba I* verdaut.

Die Konzentrationen des RR5-longarm und des linearisierten Plasmids wurden photospektrometrisch bestimmt.

Folgender Ansatz diente für die Ligation mit dem RR5-longarm:



Reagentien	Volumen
RR5-longarm (500 ng)	-- µl
Plasmid (250 ng)	-- µl
10x Ligationspuffer	4 µl
RATP	4 µl
T4 DNA-Ligase	2 µl
A.bidest	ad 40 µl

**Tabelle 3.15.:** Reaktionsansatz für die Ligation mit dem RR5-longarm

Der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und 5 µl zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

### 3.7.6. Transfektion von HEK293 Zellen und Propagation der AdV

Die Transfektion von HEK293 Zellen mit dem rekombinanten Ad5 wurde nach der *in-situ*-Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Methode durchgeführt. Für die Ausbeute der gesamten viralen Sequenzen durch *in-vitro*-Ligation und Transfektion sind HEK293 die Zelllinie der Wahl. Diese Zellen sind gute Empfänger für die zu transferierende Plasmid-DNA und sie entwickeln rasch und effizient adenovirale Plaques durch *Trans*-Komplementierung der E1-Region.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die HEK293 Zellen mit 2 ml 0.25%igen Trypsin-EDTA in 20 ml Zellkultur-Flaschen trypsinisiert und bei Raumtemperatur für 2-3 min inkubiert. Sobald die Zellen vollständig abtrypsinisiert waren, wurde die Reaktion mit Zellmedium gestoppt und durch Auf- und Abziehen mit der Pipette gemischt. Die Zellen wurden 1:10 verdünnt, 2 ml Kultur und 18 ml Medium (10 ml DMEM +10% FKS +1% P/S), und in eine neue Zellkultur-Flasche (20 ml) für die weitere Passagierung gegeben. Die restlichen Zellen wurden in High-Medium (GIBCO®; +10% FKS, +1% P/S) verdünnt, so dass sie eine Dichte von ca. 25% aufwiesen, und auf eine 60mm Zellkultur-Schale gegeben. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion ungefähr zu 50 - 70% konfluent sein. Hiernach wurden die Zellen bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> übernacht inkubiert.

Der Transfektions-Mix wurde zweckmäßigerweise in 15 ml Falcon Tubes hergestellt. Die Reagenzien wurden folgendermaßen zusammengemischt und die Suspension anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben:

Reagentien	Volumen
Ligationsprodukt RR5+Plasmid	35 µl
Aq. bidest (Filter sterilisiert)	190 µl
Solution II (2x BBS)	250 µl
Solution I (2.5M CaCl <sub>2</sub> )	25 µl
20 min bei RT inkubieren	

**Table 3.16.:** Ansatz für die Transfektion von HEK293 Zellen

Eine Positivkontrolle der Transfektion wurde gleichzeitig mit dem Einsatz der GFP-Vektor-DNA durchgeführt.

Die Zellen wurden danach bei 37°C in einer Feuchtatmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> übernacht inkubiert.

24 h nach der Transfektion der HEK293 Zellen mit den AdV wurden die Zellen unter dem Mikroskop untersucht und das Gelingen der Transfektion durch den visuellen Nachweis der grünen GFP-Fluoreszenz überprüft.

Das Medium wurde gewechselt, indem es mittels einer Pipette abgenommen wurde, und die Zellen mit 3 ml PBS w/o Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> w/o NaHCO<sub>3</sub> gewaschen wurden. Das PBS wurde abgesaugt und durch 5 ml Low-Medium (GIBCO®; +2% FKS, +1% P/S) ersetzt.

Die Zellen wurden hierauf 3-4 Tage inkubiert. Hierauf wurde das Medium wie oben beschrieben gewechselt (High-Medium). Wieder wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und täglich auf Plaquebildung überprüft. Das Medium wurde nun einmal in der Woche gewechselt, wobei weiterhin High-Medium verwendet wurde, bis die ersten Plaques auftraten (meist nach 10-14 Tagen).

Sobald das erste Plaque aufgetreten war, wurde das Medium nicht mehr gewechselt und die Inkubation solange fortgesetzt bis der gesamte Zellrasen vollständig lysiert war bzw. >90% der Zellen Anzeichen der Infektion zeigten (**Primär-Lysat**). Waren die Zellen vollständig lysiert, erschienen sie rund und ein Großteil schwamm losgelöst im Medium.

100-200 µl des **Primär-Lysats** wurden in zwei 60mm Gewebekultur-Schalen überführt, die konfluente HEK293 Zellen (≥90% konfluent oder 3-4 Tage alt) enthielten, suspendiert in 5 ml frischem low-medium. Diese Zellen mußten 3-4 Tage früher in high-medium vorbereitet werden (s.o.). Zudem wurden dreimal 1,5 ml des **Primär-Lysas** in Cryotubes überführt und bei -80°C gelagert (Starterlösung des Primär-Lysats).

Die Inkubation der Zellen wurde bei täglicher Überprüfung auf Zeichen der Infektion ohne Mediumswechsel bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> fortgeführt, bis der Zellrasen vollständige Lyse (ca. 5-7 Tage) aufwies (**Sekundär-Lysat**).

Vom **Sekundär-Lysat** wurden 100 µl in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß für ein PCR screening überführt, um das Vorhandensein von Transgen und RCAs im Sekundär-Lysat zu überprüfen. Ebenso wie beim Primär-Lysat wurden abermals 3 x 1,5 ml in Cryotubes überführt und bei -80°C (Sekundär-Lysat-Starter) gelagert.

#### Plaque Assay:

1, 2, 5 & 10 µl des **Sekundär-Lysats** wurden in 4 60mm Gewebe-Kultur-Schalen, die konfluente 3-4 Tage alte HEK293 Zellen in Low-Medium enthielten, gegeben und bei 37°C für 2 h inkubiert. In der Zwischenzeit wurde für jede Schale folgender Mix vorbereitet:

Agarose (low gelling temperature) 1,3%	2,5 ml
DMEM 2x	2,5 ml

und bei 37°C warmgehalten. Daraufhin wurde das Medium der Zellen abgesaugt, durch die Agaroselösung ersetzt und die Schalen ca. 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Agarose mit 5 ml High-Medium überschichtet.

Nach 3-8 Tagen traten die ersten Plaques auf. Die Plaques wurden unter dem Mikroskop überprüft und auf dem Boden der Platte markiert. Sobald sich genügend Plaques gebildet hatten, wurden diese gepickt und isoliert.

*Isolation eines Einzelplaques:* das überschichtete Medium wurde abgesaugt, und ein isoliert liegendes Plaque wurde samt Agar ausgestochen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, das 500 µl High-Medium enthielt (**Plaque-Lösung**). 400 µl der Plaque-Lösung wurde in eine 60mm Gewebe-Kultur-Schale, die konfluente in 5 ml frischem Low-Medium suspendierte HEK293 enthielt, überführt. 100 µl der Plaque-Lösung wurde für das PCR-screening auf das Vorhandensein des Transgens im AdV und auf RCAs genutzt (siehe 3.7.8.). Die Kultur-Schale wurde nun bei 37°C bis der Zellrasen vollständig lysiert war (**Plaque-Lysat**) inkubiert.

1 ml des Plaque-Lysats wurde auf drei 60mm Gewebe-Kultur-Schalen, die konfluente, in frischem Low-Medium suspendierte HEK293 Zellen enthielten, überführt. Die Gewebe-Kultur-Schalen wurden bis zur vollständigen Lyse des

Zellrasens bei 37°C (in der Regel 4-5 Tage) inkubiert (**Virus-Lösung**). Der Inhalt der drei Schalen wurde in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und in einer sterilen 250 ml Flasche mit 170 ml Low-Medium gemischt.

Zehn 145mm Gewebe-Kultur-Schalen mit konfluenten HEK293 Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen, das PBS abgesaugt und durch 20 ml der Virus-Lösung/Low-Medium-Mischung ersetzt. Eine Schale diente als Negativ-Kontrolle. Nach weiterer Inkubation bei 37°C für 4-5 Tage wurde das entstandene Virus-Lysat der 9 Schalen (+1 Negativkontrolle) in 250 ml Flaschen gefüllt. 10 × 1,5 ml wurden in Cryotubes überführt und bei -80°C (**Virusprep-Starter**) gelagert.

Zur restlichen Virus-Lösung wurde Nonidet-P40 bis zu einer Endkonzentration von 0,5% hinzu gegeben (1ml in 200 ml Virus Lösung) und gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde bei 13,000 rpm (20500 ×g) für 10 min bei 4°C (Beckman Zentrifugen-Röhrchen und GSA-Rotor) zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde in sterilen 250 ml Flaschen gesammelt, und 0,5 Volumen PEG/NaCl Puffer (20% PEG, 2.5mM NaCl) wurden hinzugefügt und gemischt. Um die Viruspartikel zu präzipitieren, wurde die Lösung übernacht bei 4°C inkubiert und bei 13,000 rpm (20500 ×g) für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml TBS in einem Polypropylen-Röhrchen gelöst und bei 3,000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand (4 ml) wurde mit CsCl gemischt, so dass die Lösung eine Dichte von 1,34 g/ml (ca. 2 g) aufwies, die Lösung bei 4°C für 60 Minuten inkubiert und der Zellschrott bei 3,000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert bis die Lösung vollkommen klar war. Mit Pasteur-Pipetten wurde der Überstand in zwei Beckman Zentrifugen-Röhrchen (2 ml/Tube) überführt. Das Volumen der beiden Röhrchen wurde nochmals durch 1.34 g/ml CsCl-TBS-Lösung ausgeglichen und die Röhrchen mittels eines Tube-Topper-Heaters versiegelt. Nach der Zentrifugation bei 90,000 rpm für 3 Stunden bei 20°C (Beckman Zentrifuge, TLA-120 Rotor) wurden die rekombinanten viralen Partikel als weißer, opaleszierender Ring sichtbar. Mit einer sterilen Insulin-Spritze wurde der Virus-Ring aspiriert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Virus-Lösung wurde auf eine mit 25 ml TBS gewaschenen Sephadex-G25 Säule gegeben und mit weiteren 2,5 ml TBS aufgefüllt. Die Säule wurde mit weiteren 6 ml TBS gewaschen und das Filtrat in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße (ca. 500µl/Eppi) in 20 Fraktionen aufgefangen. 10 µl jeder Fraktion wurden mit 90 µl TBS gemischt und die Absorption bei 260 nm im

UV-Spektrometer gemessen. Die Fraktionen, die eine hohe Konzentration aufwiesen, wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und die Konzentration erneut bestimmt.

Um das Virus gegenüber dem Gefriervorgang zu stabilisieren, wurde Bovines Serum Albumin (BSA) bis zu einer Endkonzentration von 1,0 mg/ml hinzu gegeben. Die Lösung wurde aliquotiert in 200, 100, 50 & 20 µl Aliquote und bei -80°C gelagert.

### 3.7.7. Isolation der viralen DNA mittels Sorianalyse

Um die DNA auf Vorhandensein des Transgens im AdV und auf RCAs zu überprüfen, wurden 100 µl des Primär-Lysats für die Isolation der viralen DNA durch Sorianalyse in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach dreimaligem Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei 37°C und Zugabe von 100 µl Sorianalyses-Puffer\*<sup>12</sup> wurde mit 50 µg/ml Proteinase K (10 mg/ml) die Lösung bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um die kovalent gebundenen Terminalproteine von der viralen DNA zu lösen. Durch weitere 10 Minuten bei 85°C wurden die Proteine denaturiert, mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:25:1) zusammen mit dem Zelldebris gefällt und für 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die die DNA enthaltende obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA mit 25 µl 5 M NaCl und 2 Volumen 100% Ethanol bei -80°C für mindestens 30 Minuten gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm wurde das DNA-Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

\*<sup>12</sup> Sorianalyses-Puffer (50 ml):

10x Gitschierpuffer	5 ml
SDS 1%	2,5 µl
ProteinaseK (10 mg/ml)	250 µl
A. bidest. ad 50 ml	

10x Gitschier-Puffer (50 ml):

Ammoniumsulfat 1M	8,3 ml
TRIS 1M; pH 8,8	33,5 ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	3,35 ml
β-Mercaptoethanol 12.8M	200 µl
EDTA 0,5M	6,7 µl
A. bidest. ad 50 ml	

### 3.7.8. PCR-screening

Mittels des PCR-screenings wurde die Virus-DNA während und nach der Vektor-Propagation auf das Vorhandensein des Transgens und auf RCAs überprüft. Für die PCR wurde die aus der Sorianalyse gewonnene virale DNA, die für das Transgen spezifischen Primer sowie die Primer Ad5-3315s/Ad5-4600a (Ad5-Primer) zum Nachweis von RCAs nach folgendem Schema verwendet:

1. PCR der aus dem Lysat isolierten DNA und dem transgenspezifischen Primerpaar
2. Positivkontrolle mit dem transgenspezifischen Primerpaar
3. Negativkontrolle mit dem transgenspezifischen Primerpaar
4. PCR der aus dem Lysat isolierten DNA mit Ad5-Primern
5. Positivkontrolle für RCAs mit Ad5-Primern
6. Negativkontrolle für RCAs mit Ad5-Primern

Als weitere Kontrollmethode wurde an dieser Stelle die Restriktionsfragment-Analyse eingesetzt. Die aus der Sorianalyse gewonnene DNA wurde mit *Hind III* verdaut, wonach sich bei korrekter Klonierung des Transgens eine spezifische Bandenkartierung zeigte (siehe 3.3.3.).

### 3.8. Verwendete adenovirale Vektoren

Folgende AdV bzw. RRCAs wurden während der Untersuchungen eingesetzt:

<b>Bezeichnung des AdV</b>	<b>Exprimiertes Transgen</b>	<b>Konzentration der Viruspräparation</b>
Ad5CMV-Luc	Luciferase ( <i>P. pyralis</i> ) unter CMV-Promotorkontrolle	$1,86 \times 10^9$
Ad5pTRE-Luc	Luciferase ( <i>P. pyralis</i> ) unter Kontrolle des Tet-Operons	$3,2 \times 10^8$
Ad5CMVGFP	Green Fluorescent Protein	$4 \times 10^8$
Ad5CMVrtTA-M2	Reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator M2	$3,8 \times 10^8$

Fortsetzung:

Bezeichnung des AdV	Exprimiertes Transgen	Konzentration der Viruspräparation
Ad5hAATrtTA-M2	Reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator M2 unter hAAT-Promotor Kontrolle	4,1 x 10 <sup>8</sup>
Ad5-pTRE-13S-bgh	RRCA; adenovirales E1A-13S-Protein unter Kontrolle des Tet-Operons	7,8 x 10 <sup>8</sup>
Ad5CMV-tTS	Tetrazyklin-kontrollierter transcriptional Silencer unter CMV-Promotor-Kontrolle	2,17 x 10 <sup>9</sup>
Ad5hAAT-tTS	Tetrazyklin-kontrollierter transcriptional Silencer unter hAAT-Promotor-Kontrolle	1,75 x 10 <sup>9</sup>
Ad5CMVAnf-Serca	<i>hier eingesetzt als RCA</i>	5,6 x 10 <sup>8</sup>
Ad5CMVTTP	Tocopherol Transferprotein	2,1 x 10 <sup>9</sup>

**Tabelle 3.17.:** Verwendete adenovirale Vektoren

### 3.9. Adenovirale Transduktion von Zellen

Die auf 24-well-Zellkulturplatten ausgesäten Zellen wurden mit 1 ml 1x PBS (Gibco BRL<sup>®</sup>) gewaschen, die Zellen eines wells gewonnen und gezählt (siehe 3.1.2.). Anschließend erfolgte die Zugabe der AdV in 500 µl OptiMEM (Gibco BRL<sup>®</sup>). Die Vektordosierung erfolgte in AdV-Partikeln pro Zelle (p/c). Die Platten wurden darauf 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend erneut mit 1 ml 1x PBS (Gibco BRL<sup>®</sup>) gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Grundsätzlich wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

In den Experimenten, in denen unter anderem der AdV Ad5CMV-tTS bzw. Ad5hAAT-tTS zur Anwendung kam, wurde dieser bereits 24 h vor den weiteren AdV in die Zellen transfiziert.

Versuche, in denen der RCA zum Einsatz kam, wurden grundsätzlich mit dem AdV Ad5CMVAnf-Serca durchgeführt, der eine nachweisliche RCA-Kontamination von nahezu 100% aufwies. Als Alternative für die Positivkontrolle des PCR-screenings wurde die Virus-DNA des Ad5CMV-CARas genutzt, die ebenfalls eine RCA Kontamination aufzeigte.

### 3.10. Plasmid-Transfektion

Für die Plasmid-Transfektion wurden die Zellen auf 6-well Zellkulturplatten ausgesät und mit Hilfe des *MBS Mammalian Transfection Kit* (Stratagene®) transfiziert, sobald sie konfluent waren. Der Transfektionsansatz wurde gemäß den Protokollangaben des Herstellers folgendermaßen vorbereitet.

Reagenz	Volumen
Solution 1 <sup>*)</sup>	25 µl
Plasmid 1-2 µg	-- µl
A.bidest.	ad 500 µl
Solution 2 <sup>*)</sup> (tropfenweise zugeben)	250 µl

**Tabelle 3.18.:** Reaktionsansatz für Plasmid-Transfektion

Der Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die zu transfizierenden Zellen in der Zwischenzeit zweimal mit PBS gewaschen und mit dem zelleigenen Medium (+6% MBS<sup>\*)</sup>) überschichtet. Hierauf wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Medium gegeben und die Zellen bei 35°C und 3% CO<sub>2</sub> für 3 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und im zelleigenen Medium bis zur Auswertung unter der üblichen Atmosphäre inkubiert.

<sup>*)</sup> Solution 1	2,5 M CaCl <sub>2</sub>
Solution 2	2 x BBS (pH 6,95)
MBS	Modified Bovine Serum