

**Tumorspezifische Suizidgenexpression  
zur lokalen Therapie gynäkologischer Karzinome auf der Basis  
viraler und nicht-viraler Vektorsysteme**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gernot Roland Eckehart Röder

aus Hamburg

Düsseldorf

2002

Gedruckt mit der Genehmigung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H.-G. Bender

1. Korreferent: Prof. Dr. D. Riesner

2. Korreferent: Prof. Dr. P. Dall

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2003

**Meiner Familie**

**Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung	1
1.1. Klassische Therapieansätze bei gynäkologischen Tumoren	2
1.2. Alternative, gentherapeutische Therapieansätze	3
1.2.1. Suizidgentherapie mit HSV-TK	4
1.3. Vektorsysteme	5
1.3.1. Liposomale Vektorsysteme	6
1.3.2. Virale Vektorsysteme	8
1.4. Aktuelle Problematik gentherapeutischer Versuchsansätze	9
1.4.1. Steigerung der Gentransfereffizienz	10
1.4.2. Etablierung einer spezifischen Gentherapie	12
1.4.2.1. Gewebe-/Tumorspezifische Promotoren	12
1.4.2.2. Induzierbare Promotoren	14
1.5. Klinische Anwendung einer Suizidgentherapie bei Karzinomen	16
1.6. Fragestellungen	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Reagenzien und Lösungen	20
2.2. Zellkultur	20
2.2.1. Verwendete Zelllinien	20
2.2.2. Kultivierung der Zellen	21
2.2.3. Induktion der MDR-Expression	22
2.2.4. Subkultivierung	22
2.2.5. Kryokonservierung	22
2.3. RNA-/DNA-Analytik	22
2.3.1. RNA-Isolation	22
2.3.2. cDNA-Synthese	23
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	23
2.3.3.1. Überprüfung der Qualität der cDNA durch $\beta$ -Actin-PCR	24
2.3.3.2. Amplifikation der Promotoren aus genomischer DNA	24
2.3.3.3. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression	25
2.3.3.4. Screening der Klonierung	26
2.3.4. Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	26
2.3.5. Sequenzierung	27
2.3.5.1. Einfügen der artifiziellen M13-Sequenz	27

2.3.5.2. Sequenzierungsreaktion	27
2.4. Elektrophoretische Auftrennungsmethoden	28
2.4.1. Elektrophoretische Auftrennung mit dem A.L.F. und A.L.F.express	28
2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen	29
2.5. Mikrobiologische Methoden	29
2.5.1. Bakterienstämme	29
2.5.2. Medien und Aufzucht von E. coli	30
2.5.3. Plasmide	30
2.5.3.1. pGL3-Basic (Promega)	30
2.5.3.2. Plasmide basierend auf pGL3-Basic	30
2.5.3.3. Plasmide zur Klonierung rekombinanter Adenoviren	30
2.5.4. Klonierung	31
2.5.4.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.5.4.2. Restriktionsanalysen	31
2.5.4.3. Ligation	31
2.5.4.4. Transformation von E. coli mittels Elektroporation	31
2.5.4.4.1. Herstellung kompetenter E. coli Zellen	31
2.5.4.4.2. Elektroporation	32
2.5.4.5. Plasmidpräparation	32
2.5.4.6. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Aufreinigung	32
2.5.4.7. Manipulation der DNA	33
2.6. Liposomaler Gentransfer	33
2.6.1. Herstellung der Lipide und Liposomen	33
2.6.2. Lipofektion	33
2.6.3. X-Gal-Färbung	34
2.6.4. Bestimmung der Zytotoxizität	34
2.6.5. Analyse der Gentransfereffizienz	34
2.7. Adenoviraler Gentransfer	34
2.7.1. Klonierung des rekombinanten Adenovirusgenom	35
2.7.1.1. Klonierung in pShuttle	35
2.7.1.2. Homologe Rekombination	36
2.7.1.3. Transfer in Verpackungszelllinie und Klonselktion	36
2.7.2. Produktion von adenoviralen Vektoren	37
2.7.2.1. Zellkultur	37
2.7.2.2. Freisetzung der Adenoviren	37
2.7.2.3. Aufreinigung und Dialyse	38

2.7.2.4. Titerbestimmung	38
2.7.2.4.1. OD-Messung	38
2.7.2.4.2. Tissue Culture Infectious Dose (TCID <sub>50</sub> )	38
2.8. Genexpressions-Assays	40
2.8.1. Luziferase/Galaktosidase-Assay (12-Well-Platten)	40
2.8.1.1. Zellkultur	40
2.8.1.2. Luziferase-Messung (Luciferase Assay, Promega, Mannheim)	40
2.8.1.3. Galaktosidase-Messung (Galactolight-Assay, Tropix, Bedford, MA, USA)	40
2.8.2. Luziferase-Assay (96-Well-Platten: Bright-Glo™, Promega, Mannheim)	41
2.8.3. Zellproliferations-Assay (MTT)	41
2.9. in vivo Experiment: Tierversuch	42
2.10. Statistische Analyse	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Liposomaler Gentransfer	44
3.1.1. Zytotoxizität der Lipide CCQ22 und CCQ32	44
3.1.2. Optimierung der Gentransfereffizienz bei Verwendung von CCQ22 und CCQ32	46
3.1.3. Einfluss von Aszites auf die Gentransfereffizienz	48
3.2. Effizienz und Toxizität des adenoviralen Gentransfers	50
3.3. Transkriptionelle Regulation der Genexpression	51
3.3.1. Klonierung der Promotorsequenzen	52
3.3.2. Sequenzierung der Promotorelemente	52
3.3.3. Überprüfung der Funktionalität der klonierten Promotoren	53
3.3.4. Induktion der spezifischen Promotoren	54
3.3.4.1. Induktion der MDR-Expression	54
3.3.4.2. Quantifizierung der ALA-, CASENH- und MDR-gesteuerten Genexpression	56
3.4. Adenoviraler Gentransfer	57
3.4.1. Klonierung und Produktion der rekombinanten Adenoviren	57
3.4.2. Nachweis der Promotor-Aktivität durch Luziferase-Assays	58
3.4.3. Promotor-regulierte in vitro Suizidgentherapie	60
3.5. Kombination aus Chemo- und Gentherapie in vivo	67

4. Diskussion	72
4.1. Liposomaler Gentransfer	73
4.2. Adenoviraler Gentransfers	76
4.3. Transkriptionelle Regulation und Induktion der Genexpression	78
4.4. Kombination aus Chemo- und Gentherapie im Tierversuch	82
5. Zusammenfassung	86
6. Literaturverzeichnis	87
7. Abkürzungsverzeichnis	95
8. Anhang	97
I. Plasmidkarten	97
9. Danksagung	121
10. Erklärung	122

## 1. Einleitung

Nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellen maligne Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und den westlichen Industrienationen dar. In Deutschland wird jedes Jahr bei 350.000 Personen eine Neuerkrankung an malignen Tumoren diagnostiziert (Deutsche Krebsgesellschaft, 2002). Gynäkologische Tumore bilden in der weiblichen Bevölkerung der westlichen Industrienationen die größte Gruppe maligner Erkrankungen und sind die häufigste Todesursache bei Frauen unter 50 Jahren.

In der Gruppe der gynäkologischen Tumore stellen das Mammakarzinom (Brustkrebs) und das Ovarialkarzinom (Eierstockkrebs) besonders problematische Fälle dar.

Das Mammakarzinom ist mit 25,9% aller Karzinome die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt in Deutschland bei ca. 12%, d.h. etwa jede zehnte Frau wird im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkranken. Geschätzt wird, dass jährlich in Deutschland bei insgesamt rund 46.300 Frauen die Erstdiagnose Brustkrebs gestellt wird. Auch Männer können an Brustkrebs erkranken. Bei Männern handelt es sich jedoch um eine extrem seltene Erkrankung. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland beträgt etwa 400 im Jahr (Deutsche Krebsgesellschaft, 2002).

Das Ovarialkarzinom ist mit einer Rate von 4,2% aller Krebserkrankungen ebenfalls eine häufige Krebserkrankung und es kommt zu ca. 7.500 Neuerkrankungen pro Jahr (Deutsche Krebsgesellschaft, 2002). Die Problematik des Ovarialkarzinoms liegt vor allem in der meist sehr späten Diagnose. Ein Ovarialkarzinom kann lange unbemerkt bleiben, da es sich zunächst in die freie Bauchhöhle ausbreiten kann. Erst wenn es so groß ist, dass es Druck auf andere Organe ausübt, verschlechtert sich das Befinden der Patientin. Meist wird das Ovarialkarzinom erst in diesem Stadium entdeckt, da die Patientinnen aufgrund fehlender Beschwerden vorher keinen Arzt aufsuchen. In diesem fortgeschrittenen Stadium hat der Tumor das ihn umgebende Gewebe oft schon zerstört und intraperitoneal in der Bauchhöhle oder systemisch Metastasen gebildet. Aufgrund der späten Diagnose und der schon oft eingesetzten Metastasierung ergibt sich für Ovarialkarzinom-Patientinnen eine schlechte Prognose, d.h. Überlebensrate der Patientinnen.

Aufgrund der relativ hohen Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, und der sehr schwierigen und oft zu späten Diagnose des Eierstockkrebs gehört die frühzeitige Diagnose und erfolgreiche Therapie des Mamma- und Ovarialkarzinoms zu den wichtigen Forschungsgebieten der gynäkologischen Onkologie.

### 1.1. Klassische Therapieansätze bei gynäkologischen Tumoren

Zur Behandlung von Tumoren stehen klassischerweise die Operation, Bestrahlung, Chemotherapie und Anti-Hormontherapie zur Verfügung. Die Wahl des Therapieverfahrens ist in erster Linie vom Tumorstadium abhängig. Als primäre Maßnahme wird die Tumormasse möglichst vollständig operativ entfernt. Neben der Entfernung des Primärtumors kann dabei die nähere Umgebung und häufig betroffene Organe nach weiteren Tumorherden abgesucht werden. Da bei fortgeschrittenen Krebsleiden eine Heilung durch alleinige Operation normalerweise unwahrscheinlich ist und um das Risiko eines Rezidivs, d.h. ein Wiederauftreten der Tumorerkrankung, zu minimieren, sind weitere Therapiemaßnahmen unverzichtbar. In der Regel werden deshalb nach der Operation Bestrahlungen mit ionisierender Strahlung oder eine Chemotherapie mit Zytostatika durchgeführt. Diese begleitenden Behandlungen sollen die möglicherweise zurückgebliebenen minimalen Tumorreste und eventuelle systemische Mikrometastasen therapieren. Die genaue Auswahl der Therapievariante und mögliche Kombinationen sind dabei stark abhängig von der Art des Primärtumors.

Als weitere ergänzende Therapieform ist die Anti-Hormontherapie zu nennen. Bei allen Varianten der Anti-Hormontherapie ist das Ziel die proliferative und damit Tumorstadiumsfördernde Wirkung des Östrogens oder Progesterons auszuschalten. Das kann durch die Blockade der zellulären Hormonrezeptoren oder durch die Inhibition der Östrogenproduktion erreicht werden.

Trotz aller therapeutischen Möglichkeiten bleibt die Prognose gerade für Mamma- und Ovarialkarzinom-Patientinnen sehr schlecht. Die Prognose ist in erster Linie von der Klassifizierung und Stadieneinteilung des Primärtumors abhängig. Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom mit Metastasen in näherer Umgebung beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur weniger als 25% und in ca. 70% aller Fälle kommt es zur Ausbildung eines Rezidivs (Medicine-Worldwide, 2002). Je früher dabei das Rezidiv auftritt, desto ungünstiger ist die Prognose für die Patientin. Beim fortgeschrittenen Mammakarzinom ist die 10-Jahres-Überlebensrate mit weniger als 30% ebenfalls sehr schlecht, allerdings kann die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs durch eine Chemotherapie um 20-35% gesenkt werden (MedPort, 2002).

Obwohl gerade für die Chemo- und Anti-Hormontherapie in den letzten Jahren viele neue Substanzen mit unterschiedlichen antitumoralen Ansätzen entwickelt wurden und Kombinationsstrategien verschiedener Substanzen eine höhere Wirksamkeit zeigten, ist die Prognose unzureichend geblieben.

Im Falle des Ovarialkarzinoms reagiert der Tumor in der Regel gut auf die primäre Chemotherapie und es kommt zu einem Rückgang der Tumorerkrankung, aber bei vielen Patientinnen kommt es nach dieser Chemotherapie zur Ausprägung einer Resistenz der

Tumorzellen gegen die Wirkstoffe. Dadurch kann das Rezidiv oft weniger erfolgreich mit einer sekundären Chemotherapie behandelt werden.

### 1.2. Alternative, gentherapeutische Therapieansätze

Die unzureichenden Heilungsaussichten bei Mamma- und Ovarialkarzinomen nach klassischer Behandlung und die damit verbundene schlechte Prognose und verringerte Lebenserwartung der Patientinnen zeigen die Bedeutung und den Bedarf, der an neuen und alternativen Therapieansätzen in der Krebstherapie besteht. Unbestrittener Weise führt die klassische Behandlung mit Operation und anschließender Bestrahlung und Chemotherapie zur effizienten Reduzierung der Tumorlast, allerdings können geringe Tumorreste und Mikrometastasen aus der näheren und entfernteren Umgebung des Primärtumors nicht immer operativ entfernt werden und damit steigt die Gefahr eines Rezidivs stark an. Hier bietet sich an, mit alternativen, ergänzenden Therapieansätzen eine bessere Behandlungsstrategie zu entwickeln. Um die Gefahr eines Rezidivs zu verringern und so die Prognose für die Patientin zu verbessern, muss die minimal-residuale Tumorerkrankung möglichst effizient therapiert werden. Durch die Schwierigkeit der Behandlung systemischer Metastasen ist es im Sinne einer maximalen Therapieeffizienz vorteilhaft, die verbleibenden Tumorzellen mit verschiedenen Methoden zu attackieren und dabei alternative Strategien anzuwenden.

Vielen Tumoren gelingt es der Immunabwehr des Körpers zu entkommen. Indem Tumore beispielsweise ihre immunogenen Antigene abspalten (Antigen-Shedding), werden die Antikörper und Effektor-T-Zellen blockiert oder es kommt durch Defekte in der Antigen-Prozessierung zum Verlust der Immunogenität der Tumore (Cromme et al., 1994; Restifo et al., 1993). Ein Verlust der Immunogenität kann auch durch Defekte im MHC-Komplex hervorgerufen werden (Branch et al., 1995). Um dennoch eine Antikörper-vermittelte Immunantwort zu induzieren, können die Tumorantigene ex vivo in autologe Antigen-präsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, eingebracht werden. Diese manipulierten dendritischen Zellen können dann in vivo eine antitumorale Immunantwort auslösen (Ribas et al., 2000; Monahan und Salgaller, 1999).

Weitere Mechanismen der Immunabwehr zu entkommen, bestehen in der Blockade der T-Zell-Funktion durch die Sekretion immunsupprimierender Faktoren (Arteaga et al., 1993) oder durch Blockade der Fas/FasL-vermittelten Zytolyse (Owen-Schaub, 1995). Einige Tumore können sogar durch die Expression des FasL die Apoptose der T-Zellen hervorrufen und sich durch Zerstörung der zytotoxischen T-Lymphozyten vor deren Angriff schützen (Zeytun et al., 1997). Um das Immunsystem gegen das Tumorgewebe zu aktivieren, kann man in den Tumorzellen die Expression und Ausschüttung von Botenstoffen (Zytokine,  $\gamma$ -Interferon, Tumor-Nekrose-Faktor) induzieren. Durch dieses Verfahren sollen spezifisch die T-Zellen angelockt werden, welche dann in ihrer aktivierten Form die Tumorzellen

attackieren können. Gleichzeitig sollen die toxischen Nebeneffekte systemischer Zytokingaben vermieden werden (Vieweg und Gilboa, 1995; Meazza et al., 1996; Gillies et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit das Immunsystem gegen die Krebszellen zu aktivieren besteht in der Auslösung einer adoptiven Immunantwort. Hierfür werden die T-Zell-Rezeptoren der zytotoxischen T-Lymphozyten gentechnisch manipuliert, so dass sie ein Tumorzell-spezifisches Antigen erkennen und so gezielt diese Tumorzellen attackieren und lysieren (Herrmann et al., 2002; Dall et al., 1997). Durch die Verwendung von modifizierten, chimären T-Zell-Rezeptoren erfolgt die MHC-unabhängige Antigenerkennung, -Bindung und Zytolyse der Tumorzellen.

Neben diesen immunologischen Ansätzen besteht die Möglichkeit Gendefekte, die an der Entstehung der Krebserkrankung beteiligt sind, zu substituieren. Ein geeigneter Kandidat ist das Tumorsuppressorgen p53. Das Genprodukt von p53 spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation und damit der normalen Zellproliferation, in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose (programmierter Zelltod) (Harris und Holstein, 1993). Mutationen oder Deletionen von p53 sind in vielen Karzinomen als auffälligste genetische Veränderung beschrieben worden (von Gruening et al., 1999). Das Einbringen von Wildtyp-p53 (Wt-p53) in die p53-defekten Tumorzellen führt zur Induktion der Apoptose in proliferierenden Krebszellen (Nielsen et al., 1998a).

Eine andere Strategie zur Tumorbekämpfung liefert die Suizidgentherapie. Dabei wird ein nicht-humanes Gen in die Tumorzellen eingeschleust. Dieses Suizidgen vermittelt eine Sensitivität gegenüber einer nicht-toxischen Substanz, die intrazellulär von dem Genprodukt zu einem Toxin umgewandelt wird und so die Tumorzelle abtötet.

### 1.2.1. Suizidgentherapie mit HSV-TK

Die Thymidin-Kinase aus dem Herpes Simplex-Virus (HSV-TK) ist ein bekanntes Suizidgen. Das Genprodukt ist ein Enzym, das an der DNA-Synthese beteiligt ist. Die Expression der HSV-TK alleine ist nicht toxisch für die Zelle (Wigler et al., 1977). Im Gegensatz zum humanen Homolog kann die HSV-TK neben den normalen Substraten aber auch Nukleosid-Analoga, wie z.B. das Ganciclovir (GCV) enzymatisch umbauen. Dabei katalysiert HSV-TK die Monophosphorylierung zum GCV-Monophosphat (Elion et al., 1977) und zelleigene Kinasen die Umwandlung zum GCV-Triphosphat. Dieses Nukleotid-Analogon wird in die DNA eingebaut und führt dort zur Inhibition der DNA-Synthese und zur Blockade der RNA-Polymerase und so zum Tod der Zelle (Furman et al., 1980). Es handelt sich also um ein System, das aus zwei Komponenten besteht (HSV-TK und GCV), die beide alleine nicht toxisch wirken, aber zusammen zum Zelltod führen.

Beim Einsatz der HSV-TK stellt der sogenannte „Bystander-Effekt“ eine zusätzliche Effizienzverbesserung dar. Er beschreibt das Phänomen, dass eine größere Anzahl an Tumorzellen abgetötet wird, als ursprünglich mit dem HSV-TK-Gen transduziert wurden (Culver et al., 1992). Mit Hilfe des Bystander-Effekts können Tumorzellen in vitro zu 100% abgetötet werden, wenn initial nur ca. 10% der Zellen die HSV-TK exprimieren (Freeman et al., 1992). Der Mechanismus des Bystander-Effekts basiert auf dem interzellulären Transport von GCV-Triphosphat oder Botenstoffen, die den Zelltod auslösen. Für den Transport sind vor allem die Gap Junctions wichtig, denn in Zellen ohne Gap Junctions zeigte sich kein Bystander-Effekt (Burrows et al., 2002; McMasters et al., 1998).

Die erfolgreichen in vitro-Versuche führten schon 1997 zur Entwicklung einer klinischen Phase I-Studie mit HSV-TK bei Krebspatienten (Alvarez und Curiel, 1997). Bis zum heutigen Tag zeigen klinische Protokolle und Studien im Vergleich zum Tiermodell (Anderson et al., 1999) eine unerwartet niedrige Reaktion des Tumors auf die Suizidgentherapie, die auf eine zu geringe Gentransfereffizienz zurückzuführen sein könnte.

Für die Suizidgentherapie ist ein Gentransfer in bestimmte Zielzellen/Tumorzellen nötig. Die essentielle Voraussetzung für einen Erfolg der Gentherapie ist also der effiziente Gentransfer mithilfe geeigneter Vektorsysteme.

### 1.3. Vektorsysteme

Die Methode des Gentransfers in Zellen gehört seit Jahrzehnten zur Routinearbeit in der biologischen Forschung. Die verschiedenen Methoden basieren auf physikalischen (z.B. Elektroporation), chemischen (z.B. Kalzium-Phosphat, Liposomen) oder biologischen Systemen (z.B. Viren). Diese Vektorsysteme sorgen für die Übertragung der genetischen Information, indem sie DNA in Zielzellen transportieren. Dabei unterscheiden sich die Vektorsysteme im Prinzip der DNA-Einschleusung und somit in der Effizienz und der Toxizität des Gentransfers.

Obwohl in vitro mit allen Methoden ein erfolgreicher Gentransfer durchgeführt werden kann, haben die klinischen Studien der letzten Jahre gezeigt, dass die Gentransfereffizienz das größte Problem einer erfolgreichen gentherapeutischen Behandlung von Krebspatienten darstellt. Deshalb ist es für die Gentherapie von entscheidender Bedeutung die Gentransfereigenschaften der Vektorsysteme zu verbessern. Neben den viralen Vektorsystemen zeigen vor allem die liposomalen Vektoren in vitro eine gute Gentransfereffizienz. Ihre natürliche Funktion des Gentransfers verleiht den viralen Systemen prinzipiell gute Gentransfereigenschaften. Durch die biologische Komplexität der Viren und den daraus resultierenden Schwierigkeiten einer cGMP-konformen Produktion, Beschränkungen in der Aufnahmekapazität von neuem genetischen Material und ihrer Immunogenität in vivo ist der Einsatz von viralen Vektoren limitiert. Im Gegensatz dazu zeigen nicht-virale Systeme geringere

Immunogenitäten, leichtere Produktion unter cGMP-Bedingungen und hohe DNA-Aufnahmekapazitäten (Mahato et al., 1997; Cristiano et al., 1998).

Da sowohl virale als auch nicht-virale Vektorsysteme spezifische Vorteile bieten, wird die Optimierung beider Systeme verfolgt.

### 1.3.1. Liposomale Vektorsysteme

Unter den nicht-viralen Vektorsystemen repräsentieren die liposomalen Transfersysteme auf der Basis kationischer Lipide die wichtigste Gruppe. In den letzten Jahren haben verschiedene pharmazeutisch-forschende Unternehmen eigene nicht-virale Vektorsysteme auf Basis kationischer Lipide auf den Markt gebracht. Diese kommerziell erhältlichen Lipofektionssysteme vermitteln in vitro gute Gentransferraten mit akzeptablem Toxizitätsprofil (Madry et al., 2000; Haines et al., 2001). In unseren gynäkologischen Tumorzelllinien zeigt Fugene6™ (Roche, Mannheim) die höchsten Gentransferraten. Trotzdem liegt die Gentransfereffizienz noch deutlich unter denen viraler Systeme. Für eine mögliche klinische Anwendung der Gentherapie werden Vektorsysteme benötigt, deren Produktion unter cGMP-Bedingungen möglich ist. Da Fugene6™ nicht in cGMP-Qualität hergestellt werden kann (Angaben des Herstellers) und die Gentransfereffizienz nicht optimal ist, hat unsere Arbeits-

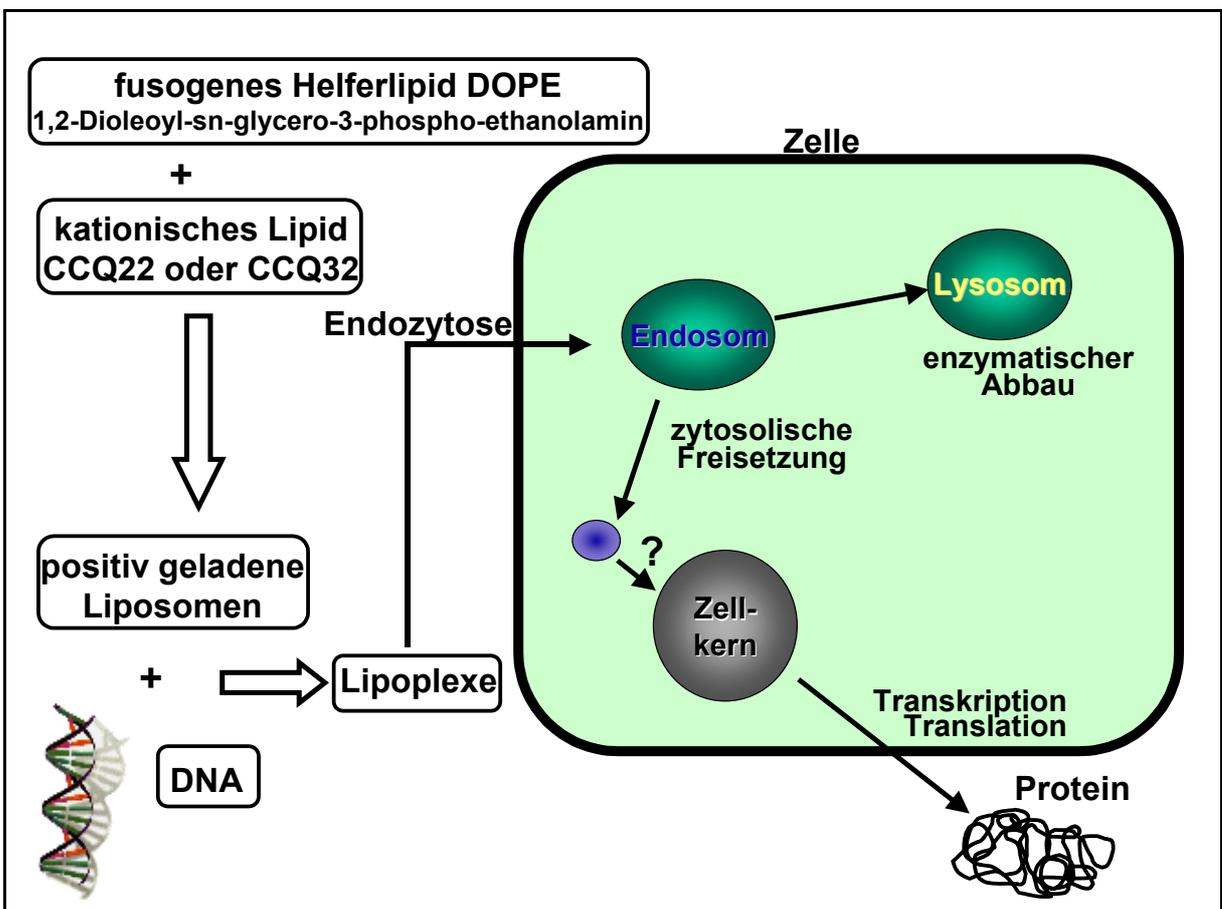


Abbildung 1.3.1. Schematische Darstellung der Lipofektion

gruppe ein neues liposomales Vektorsystem entwickelt (Keil et al., 2001), das in GMP-Qualität produziert werden kann. Es besteht aus neuartigen kationischen Lipiden (CCQ22 oder CCQ32) und dem Helferlipid DOPE, das invertierte hexagonale Phasen induzieren kann und deshalb Membran-fusogene Eigenschaften besitzt (Koltover et al., 1998). Das Prinzip der Lipofektion ist in Abbildung 1.3.1. dargestellt. Die neuartigen Carboxycholesteryl-modifizierten Chloroquin-Analoga CCQ22 und CCQ32 kombinieren die Puffer-Kapazität des Chloroquins und die Lipidstruktur des Cholesterins. Zusammen mit dem Helferlipid DOPE bilden sich nach Rekonstitution der Lipide in Wasser Liposomen aus, die sich mit der DNA zu sogenannten Lipoplexen verbinden. Die Lipoplexe werden endozytotisch in die Zellen aufgenommen, können in den Endosomen den pH puffern und so die Degradation der DNA verhindern (Keil et al., 2001; Geall et al., 1998). Über noch unbekannte Wege gelangt die DNA in den Zellkern und es kommt zur Expression der eingeschleusten Genkassette.

Wie alle Gentransfertechniken beinhaltet auch die Lipofektion zytotoxische Nebeneffekte (Cortesi et al., 1996; Kono et al., 2001). Durch die Verwendung einer Kombination aus zwei verschiedenen Lipiden (CCQ, DOPE) besteht die Möglichkeit eine Balance zwischen maximalem Gentransfer und minimaler Zytotoxizität zu entwickeln. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass sich unterschiedliche Mischungsverhältnisse von kationischem Lipid (CCQ) und Helferlipid (DOPE) in ihren Gentransfer- und Toxizitätseigenschaften unterscheiden (Keil et al., 2001).

Einige liposomale Vektoren auf der Basis kationischer Lipide sind in klinischen Studien bei Krebserkrankungen oder zystischer Fibrose getestet worden (Nabel et al., 1993; Caplen et al., 1995). Allerdings zeigten die Lipide in vivo geringe Gentransferraten und nur eine transiente Expression des Transgens (Li und Huang, 2000).

Liposomale Vektorsysteme müssen also hinsichtlich der Gentransfereffizienz weiter optimiert werden. Ein weiteres Problem bei der Anwendung von Liposomen als gentherapeutische Vehikel in der Krebstherapie von Ovarialkarzinom-Patientinnen liegt in der Sensibilität gegenüber Serum und Aszites. Bei vielen Ovarialkarzinom-Patientinnen kommt es zur intraperitonealen Ausbreitung des Tumors, die oft mit einer Überproduktion von Aszites einhergeht. Aszites ähnelt in vielen Belangen dem Serum. Gerade Serum ist aber bekannt für seinen negativen Einfluss auf einen liposomalen Gentransfer. Es verhindert die korrekte Komplexbildung von DNA und Lipid und bewirkt so eine Aggregation der Lipoplexe, gefolgt von DNA-Freisetzung und Abbau aus dem Lipoplex (Li S et al., 1999). Neben einer verbesserten Gentransfereffizienz benötigen Liposomen eine Resistenz gegen die negativen Einflüsse des Aszites, um effektiv in der Behandlung von Ovarialkarzinom-Patientinnen eingesetzt werden zu können.

### 1.3.2. Virale Vektorsysteme

Aufgrund ihres effizienten Gentransfers in eukaryotische Zellen sind Viren die vielversprechendsten Vektoren für eine erfolgreiche Gentherapie. Die Vektoren können auf vielen Virusklassen basieren (Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Lentiviren, etc.). Adenoviren sind zur Zeit die meist-genutzten Vektoren, da sie ein breites Wirtszellspektrum besitzen, teilende und ruhende Zellen infizieren können und relativ leicht in großen Mengen herzustellen sind.

Adenoviren sind ca. 80-100 nm groß, haben eine ikosaedrische Struktur und ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 36 kb Größe (Abbildung 1.3.2.A).

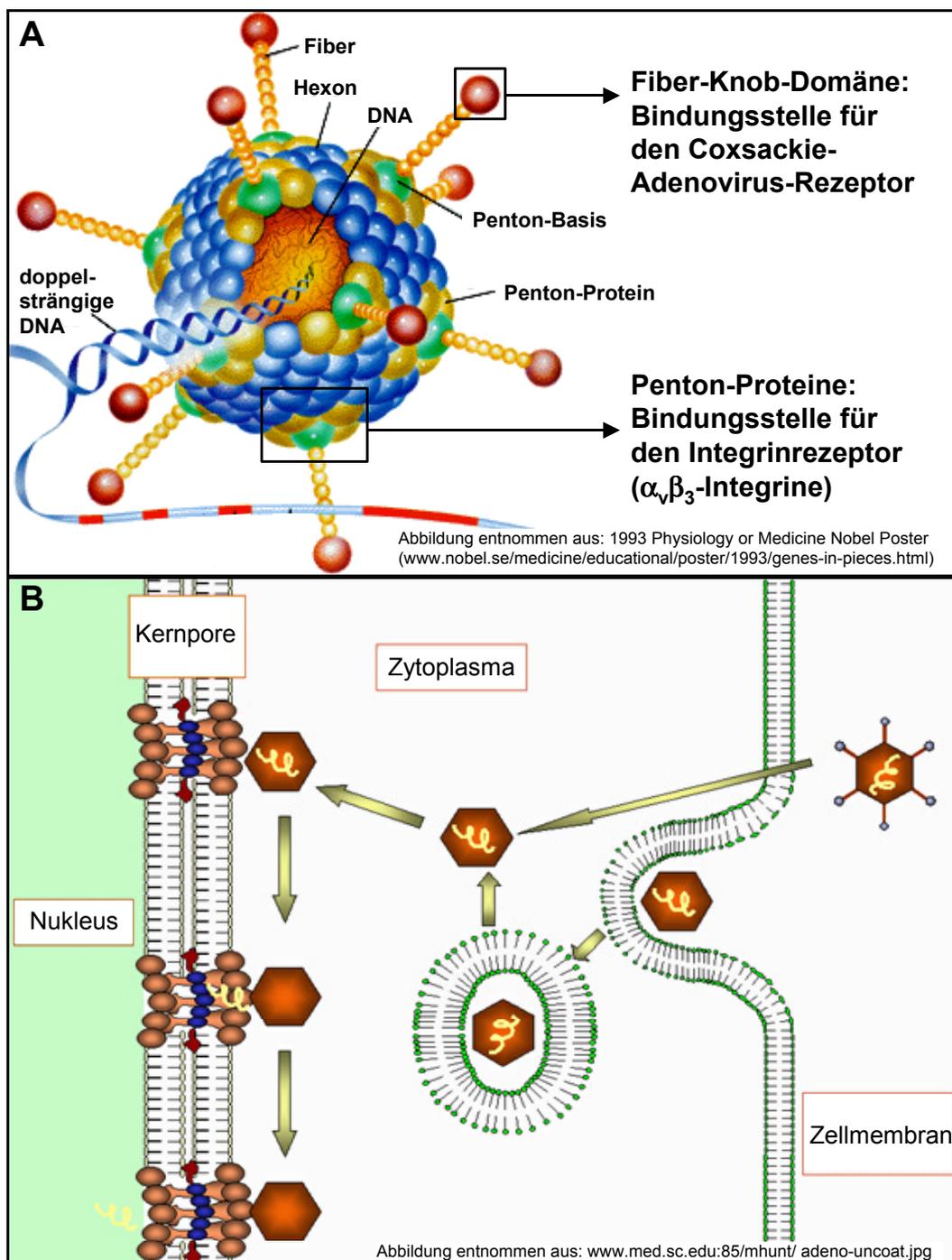


Abbildung 1.3.2. Schematische Darstellung eines Adenovirus (A) und Prinzip der Infektion (B)

Die Infektion der Adenoviren erfolgt über den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und den Vitronectin-Rezeptor, der aus  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen aufgebaut ist. Die Internalisierung des Adenovirus läuft in zwei Schritten ab. Bei der initialen Bindung des Adenovirus an die Zelle kommt es zur Interaktion zwischen dem zellulären CAR und der Fiber-Knob-Domäne des Virus. Erst nach der initialen Bindung kommt es in einem zweiten Schritt zur zusätzlichen Interaktion von adenoviralen Penton-Proteinen mit dem Integrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dadurch wird das Adenovirus in Vesikeln in die Zelle aufgenommen (McDonald et al., 1999) und verliert dabei seine Fiber-Strukturen (siehe Abbildung 1.3.2.B). Die Ansäuerung des Endosomen-Vesikels bewirkt eine Konformationsänderung der Virus-Kapsid-Proteine, die daraufhin mit der Endosomen-Membran interagieren können und die Zerstörung der Vesikel zur Folge hat (Varga et al., 1991). Die in das Zytoplasma freigesetzten Adenoviren lagern sich an Kernporen der Kernmembran an und die virale DNA wird durch die Kernporen in den Zellkern eingeschleust, wohingegen die leeren Virushüllen abgebaut werden. Die Adenovirus-DNA liegt extrachromosomal, episomal im Nukleus vor und wird nicht in die zelluläre DNA integriert.

Adenovirale Vektoren mit Deletionen der Genbereiche E1 und E3 können bis zu 7,5 kb Fremd-DNA aufnehmen. Der Genbereich E1 ist verantwortlich für die Regulation der Virusreplikation und E3 dient dem Schutz der infizierten Zelle vor dem Immunsystem. Durch die Deletion des Regulator-Bereichs E1 sind die rekombinanten adenoviralen Vektoren replikations-inkompetent. Die Produktion der rekombinanten Adenoviren muss deshalb in bestimmten Wirtszellen erfolgen, welche die Deletion der E1-Gene komplementieren und so die Replikation ermöglichen. Um die DNA-Kapazität der adenoviralen Vektoren zu erhöhen, ist es möglich weitere Genbereiche zu deletieren. In den sogenannten 3. Generationsvektoren ist nahezu das gesamte Adenovirusgenom entfernt und es kann bis zu 37 kb Fremd-DNA integriert werden. Allerdings ist die Produktion sehr kompliziert und aufwendig und benötigt spezielle Helferviren, um alle Gendeletionen zu komplementieren (Danthinne und Imperiale, 2000).

Nach Infektion liegt das rekombinante Adenovirus-Genom episomal im Zellkern vor und es kommt zur transienten Expression der eingefügten Gene.

#### 1.4. Aktuelle Problematik gentherapeutischer Versuchsansätze

Obwohl adenoviral vermittelte Gentherapien in vitro sehr vielversprechende Ergebnisse zeigen und ein effektives Tumor-Zell-Killing vermitteln, lässt sich die hohe Wirksamkeit in vivo bisher nicht bestätigen. In diversen klinischen Studien konnten die adenoviralen Vektorsysteme die vielversprechenden in vitro-Resultate bisher nicht bestätigen.

Ein Grund für die mangelhafte Effizienz in vivo liegt in der unzureichenden Gentransferrate. Ein entscheidender Faktor für dieses Phänomen ist der Mangel Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) auf primären Tumorgeweben (Li, Pong et al., 1999). Aufgrund von fehlendem CAR auf der Zelloberfläche kommt es zu keiner Adenovirus-Infektion und somit auch zu keiner Transgen-Expression in diesen Tumorzellen.

Neben dem Mangel an CAR spielt auch die Auslösung einer Immunantwort eine wichtige Rolle für den fehlenden Erfolg der adenoviralen Gentherapie in vivo. Die Gabe von Adenoviren löst eine starke Entzündungsreaktion und eine Immunantwort aus. Die schnell einsetzende Ausschüttung inflammatorisch wirkender Zytokine führt zur Infiltration von Lymphozyten in das betroffene Gewebe, gefolgt von der Auslösung einer spezifischen T-Zell-Antwort und der Ausschüttung neutralisierender Antikörper (Dai et al., 1995). Das Transgen und virale Gene werden in transfizierten Zellen über MHC I oder MHC II (major histocompatibility complex) präsentiert und lösen so eine spezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort aus. Diese immunogenen Eigenschaften limitieren die Transduktionseffizienz der adenoviralen Vektoren (Coukos und Rubin, 2001) und verhindern eine Wiederholung der Vektorapplikation zur Erhöhung der Effizienz.

Gerade für das Ovarial-Karzinom spielt die Präsenz neutralisierender Antikörper gegen adenovirale Vektoren eine wichtige Rolle. Ein klinischer Aspekt der Erkrankung ist das häufige Vorkommen von malignem Aszites, der beträchtliche Konzentrationen an neutralisierenden Antikörpern enthalten kann (Stallwood et al., 2000). Intraperitoneale Therapien der malignen Erkrankung stellen also eine wichtige Herausforderung bei der Therapie des Ovarialkarzinoms dar.

Neben der unzureichenden Effizienz in vivo stellt die Spezifität der Gentherapie ein weiteres entscheidendes Problem dar. Die adenovirale Infektion erfolgt unspezifisch in allen Zellen mit CAR, also auch außerhalb des Zielgewebes. In Abhängigkeit von ihrer CAR-Expressionsstärke kann es in lebenswichtigen Organen (Leber, Niere, Milz) zu Dosis-limitierenden und lebensbedrohlichen toxischen Nebenwirkungen kommen (Marshall, 1999; Bilbao et al., 2000). Um starke bis tödliche Nebenwirkungen zu verhindern, ist es zwingend notwendig, die Gentherapie spezifisch auf das Zielgewebe einzuschränken bzw. keinerlei Suizidgentherapie-Effekte in den lebenswichtigen Organen zu induzieren (Casado et al., 2001a).

#### 1.4.1. Steigerung der Gentransfereffizienz

Die Limitierung der Gentransfereffizienz ist hauptsächlich auf die Immunogenität der adenoviralen Vektoren bzw. die Abwesenheit von CAR auf den Tumorzellen zurückzuführen. Durch die Reduktion der Immunogenität der Vektoren sollte es möglich sein, die Gentransfereigenschaften in vivo zu verbessern. Bei der Entwicklung der sogenannten 3. Generations-

vektoren wurden nahezu alle viralen Genomsequenzen entfernt (Hammerschmidt, 1999). Durch das Fehlen jeglicher viraler Gene ist die Präsentation viraler Gene durch die infizierten Zellen ausgeschaltet und die Immunabwehr kann nicht mehr spezifisch diese Zellen eliminieren. Dadurch vermitteln diese 3. Generationsvektoren eine längere Expression des Transgens bei geringerer Virus-assoziiierter Toxizität (Balague et al., 2000).

Um die Problematik der CAR-Abwesenheit in den Tumorgeweben zu umgehen, ist es möglich den Virustropismus zu modifizieren. Die initiale Bindung des Adenovirus an den CAR der Zelle wird von der Knob-Domäne des Fiber-Proteins vermittelt (Louis et al., 1994). Durch das Einfügen heterologer Ligandendomänen in den HI-Loop der Fiber-Knob-Domäne ist es gelungen die Beteiligung dieser Domäne an der initialen Zellbindung zu beweisen (Krashnyk et al., 1998). Durch das Einfügen eines RGD-4C Motivs in den HI-Loop der Fiber-Knob-Domäne (siehe Abbildung 1.4.1.) wird die Bindung und Internalisation des Adenovirus unabhängig vom CAR verlaufen und nur von den  $\alpha_v\beta_3$ - bzw.  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen abhängen (Dmitriev et al., 1998), die von den meisten Ovarialkarzinomen exprimiert werden (Cannistra et al., 1995). Diese RGD-modifizierten Adenoviren können vor allem beim Ovarialkarzinom eine deutliche Verbesserung der Gentherapie-Ergebnisse bewirken, denn es zeigt sich eine

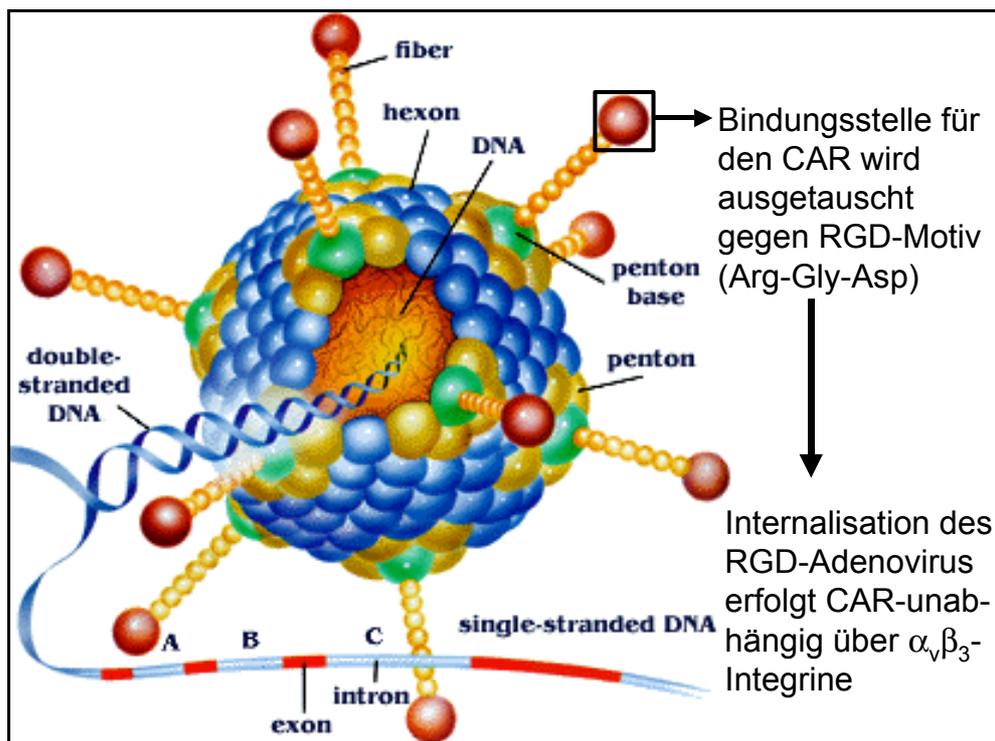


Abbildung 1.4.1. RGD-Modifikation des Adenovirus. Abbildung entnommen aus: 1993 Physiology or Medicine Nobel Poster (<http://www.nobel.se/medicine/educational/poster/1993/genes-in-pieces.html>)

um das 100- bis 1000-fach erhöhte Reporterexpression in primären Tumorzellen (Dmitriev et al., 1998). Neben dieser Erhöhung des Gentransfers bzw. der Genexpression zeigt das RGD-modifizierte Adenovirus eine geringere Sensitivität gegenüber den inhibitorischen Einflüssen durch malignen Aszites. Adenoviren mit Wildtyp(Wt)-Hülle zeigen bei Gegenwart von Aszites eine deutlich reduzierte Gentransferrate aufgrund von anti-

adenoviralen Antikörpern, wohingegen RGD-modifizierte Adenoviren keine Beeinträchtigung ihrer Gentransfereigenschaften durch Aszites zeigen (Hemminki et al., 2001; Blackwell et al., 2000).

#### 1.4.2. Etablierung einer spezifischen Gentherapie

Um die Spezifität der gentherapeutischen Behandlung zu erhöhen, sind prinzipiell zwei Ansätze möglich. Durch transfektionelles Targeting kann die Infektiosität der adenoviralen Vektoren spezifisch auf gewünschte Zielzellen gesteuert werden. Dafür müssen die rekombinanten Vektoren gentechnologisch modifiziert werden, so dass sie ihre Infektion und Internalisation nicht mehr an den nativen CAR gekoppelt ist, sondern nur noch über einen neuen, tumorspezifischen Rezeptor funktioniert (Wickham, 2000).

Die zweite Möglichkeit ist die Etablierung eines transkriptionellen Targetings. Basis des transkriptionellen Targetings ist die Verwendung von regulativen Promotor-Elementen, die eine Aktivität hauptsächlich in den Tumorzellen zeigen, d.h. die Expression des Transgens findet nur in den Tumorzellen statt (Nettelbeck et al., 2000), obwohl auch normale Körperzellen transduziert wurden. Idealerweise sollte der Promotor vor allem in der Leber keinerlei Aktivität besitzen, denn dort werden bei systemischer Applikation der rekombinanten Adenoviren ein Großteil der Vektoren herausgefiltert. Da Hepatozyten eine starke Expression von CAR zeigen, werden die gentherapeutischen Adenoviren die Leberzellen effektiv infizieren. Für eine gefahrlose Anwendung der systemischen Suizidgentherapie mit adenoviralen Vektorsystemen muss also gewährleistet sein, dass es in den transduzierten Hepatozyten zu keiner Expression des Suizidgens kommt. Nur so kann die potentielle Gefahr einer lebensbedrohlichen Hepato-Toxizität minimiert werden (Bauerschmitz et al., 2002b; van der Elb et al., 1998).

Potentielle Kandidaten von Promotoren können beispielsweise aus der Klasse gewebs- bzw. tumorspezifischer Promotoren kommen oder es handelt sich um induzierbare Regulatorelemente, die durch eine spezielle Behandlung temporär induziert werden (Nettelbeck et al., 2000). Idealerweise kombiniert der Promotor beide Eigenschaften, d.h. er ist nach gezielter Induktion für einen definierten Zeitraum nur in Tumorzellen aktiv.

##### 1.4.2.1. Gewebe-/Tumorspezifische Promotoren

Gewebespezifische Promotoren zeigen eine Aktivität in speziellen Geweben, wohingegen sie in den restliche Geweben keine Genexpression vermitteln. Vielen Genen kann man keine spezifische Funktion allein in einem bestimmten Gewebetyp zuordnen, da ihre Funktion allgemeiner Natur ist und deshalb in vielen Zelltypen benötigt wird.

Allerdings kann für das Brustgewebe eine einzigartige Funktion, die Milchbildung während der Stillzeit, identifiziert werden. Kein anderes Gewebe wird die Milchproduktion durchführen und deshalb keine Gene exprimieren, die für Milchproteine kodieren. Das Mammakarzinom entsteht oft aus den Zelltypen, die auch für die Milchbildung verantwortlich sind. Mammakarzinome zeigen charakteristische Eigenschaften, die auch während der Stillzeit im normalen Brustgewebe auftreten (Wiseman und Werb, 2002). Es gibt also Ähnlichkeiten zwischen laktierendem Brustgewebe und Mammakarzinomgewebe. Mit Promotoren der Gene von Milchproteinen sollte es möglich sein, eine spezifische Genexpression in Mammakarzinomen hervorzurufen. Als Hauptbestandteile der Milch sind das  $\alpha$ -Lactalbumin (ALA) und  $\beta$ -Casein (CAS) bekannt.

Für ALA ist eine Expression in über 60% von Brustkrebsgeweben beschrieben (Thean und Toh, 1990) und somit auch der Promotor für ALA aktiv. Die Verwendung des ALA-Promotors für die transkriptionell regulierte Suizidgenexpression zeigt, dass der ALA-Promotor in der Lage ist, spezifisch in Mammakarzinomzelllinien die Expression des Suizidgens zu induzieren, wohingegen Tumorzelllinien mit anderem Ursprung keine ALA-gesteuerte Suizidgenexpression zeigen (Anderson et al., 1999). Für die Untersuchungen wurde eine Sequenz der 5'Region (Nukleotide -737 bis +14) des ALA-Gens verwendet (Anderson et al., 1999).

Als weiterer wichtiger Faktor der Milch ist das CAS ein potentieller Kandidat, um eine Spezifität gegen das Mammakarzinom zu entwickeln. Der Promotorbereich des CAS ist gut charakterisiert (Winklehner-Jennewein et al., 1998). Durch Homologie-Untersuchungen mit anderen Spezies sind zwei homologe Regionen identifiziert worden, die eine spezifische Expression im Milch-produzierenden Brustgewebe vermitteln. Der proximale Promotor (Nukleotide -468 bis +20) und das 5'-Enhancer-Element (Nukleotide -4817 bis -4170) enthalten viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die bei der Regulation der Milchbildung in Nagern eine wichtige Rolle spielen (Rosen et al., 1998; Winklehner-Jennewein et al., 1998). Die Induktion der CAS-Expression ist vor allem von Hormonen, Prolactin und Glucocorticoidhormonen, abhängig. Für das Prolactin wird eine Beteiligung an der Proliferation von Brustkrebszellen diskutiert (Goffin et al., 1999), so dass der CAS-Promotor ein möglicher, Brustkrebs-spezifischer Kandidat ist.

Neben den Gewebe-spezifischen Promotoren sind eine Reihe von Promotoren beschrieben worden, die eine Tumor-spezifische Aktivität zeigen, aber im Normalgewebe nicht aktiv sind. Die Cyclooxygenase 2 (COX2) ist eine induzierbare Isoform aus der Familie der Cyclooxygenasen. Diese sind essentiell notwendig in der Synthese von Eicosanoiden, dazu gehören Prostaglandine und Prostazykline. Die COX2-Isoform ist unter normalen physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben nicht nachweisbar (Dubois et al., 1998), wohingegen ein Zusammenhang mit der Karzinogenese besteht (Williams et al., 1999) und eine erhöhte Expression des COX2-Gens in einer Reihe von Karzinomen vorliegt

(Wesseling et al., 2001). Die Charakterisierung des Promotors (Nukleotide –1432 bis +59) zeigte eine Tumor-spezifische Reporterexpression (Yamamoto et al., 2001), die ein transkriptionelles Targeting beim Ovarialkarzinom ermöglicht (Casado et al., 2001b).

Der Heparin-bindende Wachstums- und Differenzierungsfaktor Midkine (MK) zeigt eine mittlere bis schwache Expression im humanen Darm, Lunge und Schilddrüse, ist aber induziert in embryonalen Karzinomzellen und zeigt eine erhöhte Expression in vielen Karzinomen (Wesseling et al., 2001). Die Analyse des Promotorbereichs (Nukleotide –2285 bis +28) zeigt eine Tumor-spezifische Expression des Reportergens (Adachi et al., 2000).

Ein entscheidender Vorteil der Promotoren COX2 und MK ist, neben der Tumor-spezifischen Aktivität bzw. erhöhten Aktivität in Karzinomen, die Inaktivität in der Leber (Adachi et al., 2000; Yamamoto et al., 2000). Das ermöglicht ihre Verwendung als gentherapeutische Regulatorelemente, da nicht mit einer Hepatotoxizität zu rechnen ist.

#### 1.4.2.2. Induzierbare Promotoren

Induzierbare Promotoren zeigen eine niedrige basale Expressionsaktivität, aber nach Induktion steigt die Aktivität stark an und es kommt zu einer starken Genexpression. Als Induktor können hierbei pharmakologische Präparate, Hormone, Wachstumsfaktoren oder bestimmte physiologische Bedingungen dienen. In der Krebstherapie ist die Verwendung von pharmakologischen Induktoren sinnvoll, die gleichzeitig Bestandteil der konventionellen Therapiemodalität sind (Nettelbeck et al., 2000).

Nach der operativen Entfernung der Haupttumorlast wird als ergänzende Therapiemaßnahme eine Chemotherapie durchgeführt. Gerade bei Ovarialkarzinomen entwickelt sich relativ häufig eine Resistenz des Tumors gegen die eingesetzten Chemotherapeutika. Die Folge ist, dass die chemoresistenten Tumorzellen überleben und zur Rezidiv-Ausprägung bzw. zur Metastasierung der Erkrankung und damit der geringeren Überlebenschancen der Patientin beitragen. Bei vielen chemoresistenten Tumoren kann eine Erhöhung der Expression des Multidrug Resistance Gens MDR1 nachgewiesen werden (Nooter et al., 1991; Schondorff et al., 2002). Das Gen kodiert für das P-Glykoprotein, einen Membrantransporter, der hydrophobe Fremdstoffe, Peptide und bestimmte Chemotherapeutika aktiv aus der Zelle befördert (Geick et al., 2001). Dadurch wird verhindert, dass die zytostatisch-wirkenden Chemotherapeutika ihre Toxizität intrazellulär entfalten. Des Weiteren ist beschrieben, dass die MDR-Expression durch verschiedene Steroidhormone und Chemotherapeutika induziert bzw. erhöht wird (Walther et al., 1997; Geick et al., 2001). Zu den MDR-induzierenden Chemotherapeutika zählen die Stoffgruppen der Taxane und Anthrazykline (Miller et al., 2001; Schondorff et al., 2002). Die Induktion der MDR-Expression erfolgt über zwei „drug responsive elements“, die im Promotorbereich identifiziert wurden (Walther et al., 1997). Ein Promotorelement (Nukleotide

-207 bis +158) vermittelt die Konzentrations- und Zeit-abhängige Expression eines Reportergens nach Induktion durch die Gabe von Taxanen oder Anthrazyklinen (Walther et al., 1997).

Obwohl auch in der Leber und der Niere geringe MDR-Expressionslevel dokumentiert sind (Geicke et al., 2001), eignet sich der MDR-Promotor besonders für die regulative Kontrolle der Suizidgenexpression beim Ovarialkarzinom. Hier kommt es sehr oft zur Ausprägung einer MDR-assoziierten Chemoresistenz, so dass eine alleinige Chemotherapie keine Effekt auf das Tumorwachstum haben kann. Durch eine Kombination von Chemo- und Genterapie (Abbildung 1.4.2.2.) ist theoretisch auch die Eliminierung der chemoresistenten Tumorzellen

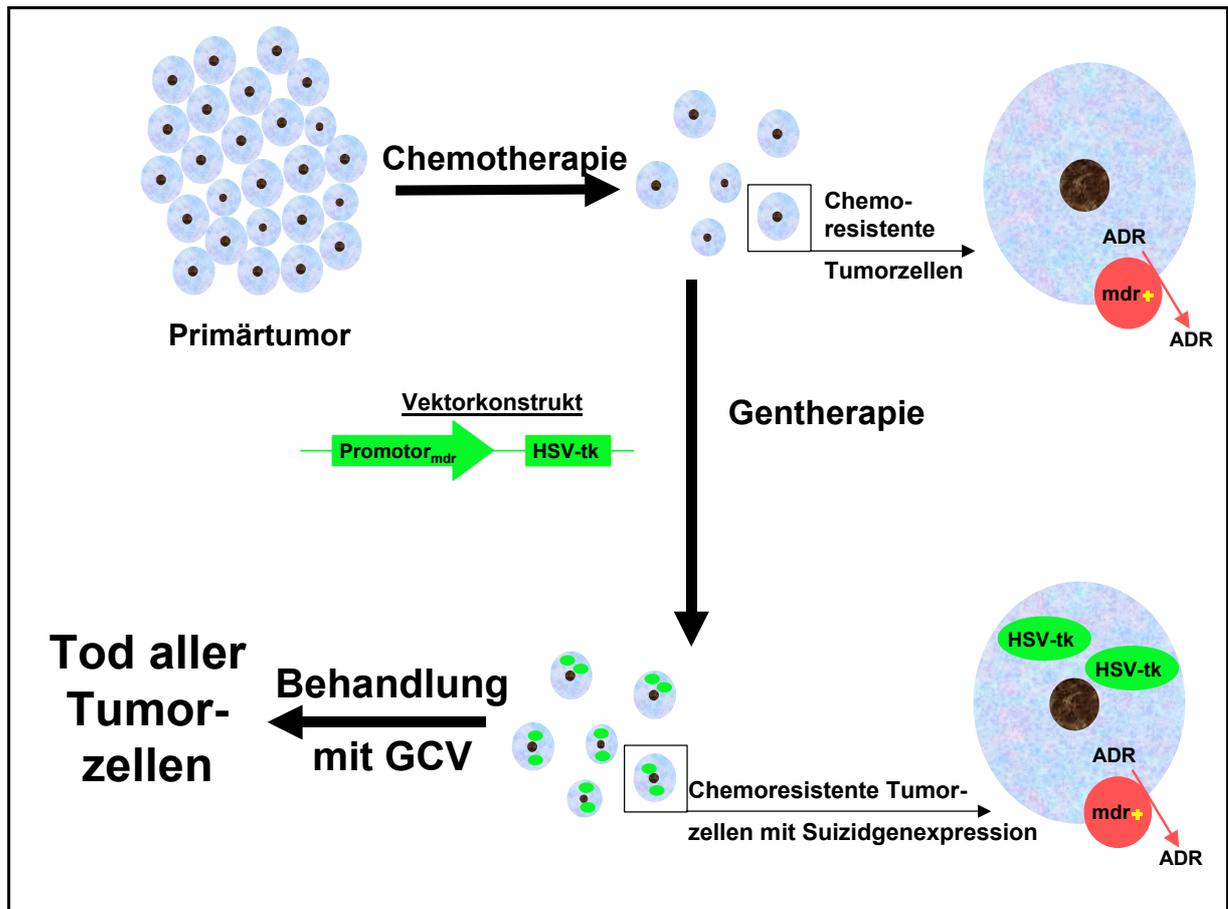


Abbildung 1.4.2.2. Mögliche Kombination aus Chemotherapie mit Adriamycin (ADR) und Genterapie möglich. Nach operativer Entfernung der Haupttumormasse wird der Rest des Primärtumors mit einer Chemotherapie mit Taxanen oder Anthrazyklinen behandelt. Die überlebenden Tumorzellen sind chemoresistent, zeigen also eine MDR-Expression, die eine Aktivität des MDR-Promotors in den Tumorzellen voraussetzt. Nun wird eine Genterapie mit einem Suizidgen unter der regulativen Kontrolle des MDR-Promotors durchgeführt. Da die chemoresistenten Tumorzellen das MDR-Gen exprimieren, wird auch das Suizidgenprodukt hergestellt. Damit sind die Tumorzellen sensitiv gegenüber GCV und können durch anschließende GCV-Gabe getötet werden.

### 1.5. Klinische Anwendung einer Suizidgentherapie bei Karzinomen

Da die Ausschöpfung aller konventionellen Strategien bei der Behandlung von Mamma- und Ovariakarzinomen nur unbefriedigende Heilerfolge zeigt und vor allem beim Ovariakarzinom die Prognose der Patientinnen unverändert schlecht bleibt, besteht akuter Bedarf an weiteren, alternativen und ergänzenden Therapiemaßnahmen.

Die Suizidgentherapie sollte bei einem möglichst geringen Tumolvolumen gestartet werden, denn die tierexperimentellen Suizidgentherapien zeigen vielversprechende Erfolge, wenn die Tumormasse bei Beginn der Therapie nicht zu groß ist (Bauerschmitz et al., 2002b). Nach Ausschöpfung aller konventionellen Methoden zur Reduktion der Tumormasse verspricht eine zusätzliche Gentherapie bessere Heilungschancen (Tong et al., 1997) und vermindert das Risiko einer Rezidiv-Ausprägung oder Metastasierung des Tumors.

Bei der Suizidgentherapie handelt es sich um eine neuartige Behandlungsstrategie, die in der Klinik bisher nicht routinemäßig eingesetzt wird. Deshalb ist die klinische Anwendung zunächst nur im Rahmen von Phase I-III Studien an Patientinnen möglich, die bereits aus therapiert sind, denen also mit konventionellen Behandlungen nicht mehr geholfen werden kann. Aus diesem Grund ist es von generellem Interesse, ob eine Suizidgentherapie kompatibel mit einer Chemotherapie, als letztem Schritt der konventionellen Behandlungsstrategie, ist oder sich beide Methoden eventuell gegenseitig beeinflussen. Die Chemotherapie ist ein wichtiger Bestandteil der konventionellen Behandlung und durch eine zusätzliche Suizidgentherapie sollten sich keine inhibitorischen Effekte zeigen. Die antitumorale Effizienz der jeweiligen Einzeltherapie, Chemo- oder Suizidgentherapie, soll in der Kombination nicht negativ beeinflusst werden. Idealerweise zeigen sich synergistische, antitumorale Effekte bei der kombinierten Behandlung mit konventioneller Chemo- und Suizidgentherapie.

Bisher sind in *in vitro* Untersuchungen verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von Chemo- und Suizidgentherapie getestet worden. Dabei sind die zeitliche Abfolge der Therapien und die Wahl des Chemotherapeutikums variiert worden (Tong et al., 1998). Die Ovariakarzinom-Zelllinien zeigten nach Virusinfektion ihre normale Sensitivität gegenüber den anschließend eingesetzten Chemotherapeutika, aber eine Vorbehandlung der Zellen mit einer Chemotherapie beeinflusste die Effizienz der anschließenden Gentherapie. Nach Absetzen der Chemotherapie zeigten die Zellen wieder die normale Sensitivität gegenüber der Gentherapie. Nach Virusapplikation bewirkte die gleichzeitige Gabe von GCV und dem Chemotherapeutikum Topotecan ein höheres Killing der Tumorzellen, als die Topotecan-Gabe nach Ende der Gentherapie (Tong et al., 1998). Synergistische Effekte bei der Kombination von Suizidgentherapie und Topotecan-Gabe sind auch *in vivo* im Tierversuch bestätigt worden. Tiere, die mit einer Kombinationstherapie behandelt wurden, zeigten höhere Überlebensraten als nach Einzeltherapie (Wildner et al., 1999). Eine klinische Studie

(Phase I) zeigte, dass die intraperitoneale Applikation der adenoviralen Vektoren, gefolgt von GCV- und Topotecan-Gabe, ohne anhaltende Toxizitätssymptomatik gut vertragen wurde, obwohl der Vektor eine konstitutive Expression des Suizidgens in allen transduzierten Zellen vermittelte (Hasenburg et al., 2000).

Neben den synergistischen Effekten von Suizidgentherapie und Topotecan-Chemotherapie sind auch mit einer Taxol-Chemotherapie in Kombination mit einer Gentherapie erhöhte antitumorale Effekte beschrieben worden. Allerdings handelte es sich hier um Gensubstitutionstherapien (Nielsen et al., 1998b) oder es wurden onkolytische Adenoviren verwendet (Yu et al., 2001).

Die Chemotherapeutika Topotecan bzw. Taxol werden in der Kombination mit der Suizidgentherapie eingesetzt, da es sich um moderne Zytostatika handelt, die bei der Behandlung von primären gynäkologischen Tumoren und auch Rezidiven verwendet werden.

Topotecan ist ein Inhibitor für das Enzym Topoisomerase I. Dieses ist essentiell für das Zellwachstum und die Proliferation. Es katalysiert die Entspiralisierung der DNA durch Schneiden und Religation eines DNA-Strangs und wird für die DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Genexpression benötigt. Der zytotoxische Effekt von Topotecan entsteht durch die Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes. Dadurch kommt es zur Blockade der DNA-Reparatur, Doppelstrangbrüchen und Fragmentation der DNA, die im Zelltod resultiert (Bothmann et al., 1989).

Taxol inhibiert die Zellreplikation durch Verstärkung der Polymerisation der Tubulin-Monomere zu stabilen Mikrotubuli, die nicht mehr in der Lage sind, den korrekten Mitose-Spindel-Apparat auszubilden. Dadurch kommt es zur Zellzyklusblockade in der Mitose und anschließender Aktivierung der Apoptose (Rowinsky et al., 1990; Donaldson et al., 1994).

### 1.6. Fragestellungen

Die Entwicklung einer erfolversprechenden tumorspezifischen Suizidgentherapie zur Behandlung gynäkologischer Karzinome erfordert die Optimierung der Gentransfereffizienz und Etablierung einer spezifischen Suizidgenexpression.

Für den Gentransfer stehen generell virale und nicht-virale Vektorsysteme zur Verfügung. Mit den Carboxycholesteryl-modifizierten Chloroquin-Analoga (CCQs) steht ein liposomales Vektorsystem zur Verfügung, dessen Potential für die Gentherapie noch nicht untersucht ist (Keil et al., 2000). Bei den viralen Vektorsystemen sind die Adenoviren die am häufigsten benutzten Gentransfersysteme. Die Problematik des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor-Mangels (CAR-Mangel) auf Tumorzellen und damit mangelhafter adenoviraler Gentransfereffizienz bei vielen Tumoren kann mit Modifikationen des Virustropismus (RGD-Modifikation der Fiber Knob-Domäne) gelöst werden.

Um eine Spezifität der Gentherapie zu erreichen, kann die Transkription des Suizidgens über Promotorelemente auf bestimmte Gewebetypen eingeschränkt werden. Neben den Karzinom-bezogenen Promotoren MK und COX2 bieten sich für das Mammakarzinom Promotoren für die Milchprotein-Gene ALA und CAS und für das Ovarialkarzinom der Chemotherapie-induzierbare Promotor MDR an.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Aufgabenstellungen:

#### 1.) nicht virale Systeme:

Die CCQ-vermittelte Lipofektion soll an Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien optimiert und mit kommerziell erhältlichen Lipofektionssystemen verglichen werden. Neben der Gentransfereffizienz sind auch die Toxizität der Lipofektion, sowie der Einfluss von malignem Aszites auf die Gentransfereigenschaften der Lipofektion Gegenstand der Arbeit.

#### 2.) virale Systeme:

Die adenoviral-vermittelte Suizidgentherapie in Mamma- und Ovarialkarzinom wird in vitro mit Adenoviren ohne Modifikation der Hülle und mit RGD-modifizierten Adenoviren untersucht. Besonderes Interesse besteht an der Überprüfung der erhöhten Infektiosität der RGD-Viren in Zelllinien mit CAR-Mangel.

#### 3.) Transkriptionelle Regulation der Genexpression

Nach Klonierung der Promotoren ALA und CAS werden diese zusammen mit den Promotoren MK, COX2 und MDR hinsichtlich ihrer Aktivität in den Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien getestet. Durch Zellproliferationsassays wird untersucht, ob die Promotoraktivität für die Suizidgentherapie ausreicht.

#### 4.) Kombination aus Chemo- und Suizidgentherapie

Für die klinische Anwendung sind negative Auswirkungen von Chemo- und Suizidgentherapie aufeinander auszuschließen. Die Kompatibilität der adenoviral-vermittelten Suizidgentherapie mit der Taxol- oder Topotecan-Chemotherapie ist in Tierversuchen bestätigt worden. Allerdings sind bisher immer Adenoviren mit der Wt-Hülle verwendet worden. Um aber die Vorteile der RGD-Hüllenmodifikation auch klinisch nutzen zu können, fehlt der Nachweis der Kompatibilität RGD-Virus vermittelter Suizidgentherapie und Chemotherapie. Dafür wird in Tierversuchen die Kombination aus Chemotherapie mit Taxol oder Topotecan in unterschiedlichen zeitlichen Kombinationen mit der RGD-Adenovirus-vermittelten Suizidgentherapie am subkutanen Ovarialkarzinommodell untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Reagenzien und Lösungen

A.L.F.-Auftragspuffer	Monomerenlösung (29:1)
100 ml Formamid	29% Acrylamid
5 g Amberlite	1% N,N-Methylen-bisacrylamid
600 mg Dextran	
4 ml 20 mM EDTA, pH 8,3	Monomerenlösung (19:1)
	19% Acrylamid
Bindsilan	1% N,N-Methylen-bisacrylamid
4 ml Ethanol absolut	
15 µl Bindsilan (Pharmacia)	Probenpuffer
1 ml 10% Essigsäure	7 mol/l Harnstoff
	40% (v/v) Glycerin
Dialysepuffer	50 mmol/l EDTA
10 mM Tris pH 8,0	10 mmol/l Tris
2 mM MgCl <sub>2</sub>	0,1% (w/v) Bromphenolblau
5% Sucrose	
	1 x TBE
Färbelösung	0,2 M Tris
100 mmol/l Natriumphosphat	0,17 M Borsäure
1,3 mmol/l MgCl <sub>2</sub>	2 mM EDTA, pH 8,0
3 mmol/l K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	
3 mmol/l K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1 x TE
0,4 mg/ml X-Gal	10 mM Tris, pH 8,0
	1 mM EDTA
Fixierlösung	
0.5% Glutaraldehyd in PBS	Viruslysepuffer
	0,1% SDS (w/v)
Gellösung für A.L.F.-Gele	10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
25,2 g Harnstoff	1 mM EDTA
9 ml Monomerenlösung (40 %)	
25,5 ml Aqua dest.	Virusverdünnungspuffer
6 ml 6 x TBE	8 g NaCl
0,2 ml 10% APS	0,2 g KCl
40 µl TEMED	3 g Tris
	ad 800 ml H <sub>2</sub> O; autoklavieren, Zugabe 10 % Glycerin (steril)

### 2.2. Zellkultur

Alle Zellkulturen werden unter aseptischen Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete, sterile Plastikmaterial wird von den Firmen Greiner (Frickhausen), Gibco (Karlsruhe) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

#### 2.2.1. Verwendete Zelllinien

Für die in vitro- und in vivo Versuche werden humane Zelllinien gynäkologischen Ursprungs eingesetzt. Die Produktion von Adenoviren wird in der Zelllinie 293 (s.u.) durchgeführt, die Teile des adenoviralen Genoms als stabile Integration enthält.

Die Kulturmedien enthalten fötales Kälberserum (10% v/v), L-Glutamin (2mM), Glukose (1,0 bzw. 4,5 g/l) und das Antibiotikum Gentamicin (50 µg/ml). Im Kulturmedium für die Normalgewebszelllinie MCF-12A wird Pferdeserum (HS) anstelle von fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Weitere zelllinienspezifische Zusätze zu den Kulturmedien sind der Tabelle 2.2.1. zu entnehmen.

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Zusätze	Bezugsquelle
293	Nierenkarzinom	Minimum Essential Medium	--	Qbiogene, Heidelberg
BT-20	Mammakarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-19)
Hey	Ovarialkarzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	Prof. Pfeleiderer, Universität Freiburg, Deutschland
MCF-7	Mammakarzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% (v/v)	ATCC (HTB-22)
MCF-12A	Mamma-Gewebe	DMEM:DMEM/NutMix-F12 (1:1)	Cholera-Toxin(100 ng/ml) EGF (20 ng/ml) Insulin (0,01 mg/ml) Hydrocortison (500 ng/ml)	ATCC (CRL-10782)
MDAH 2774	Ovarialkarzinom	DMEM (4,5 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (CRL-10303)
SK-BR-3	Mammakarzinom	McCoy's 5A	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-30)
SK-OV-3	Ovarialkarzinom	RPMI1640	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-77)
SKOV3.IP1	Ovarialkarzinom	DMEM/NutMix-F12	---	Prof. Curiel, University of Alabama at Birmingham, USA
T-47-D	Mammakarzinom	Minimum Essential Medium	Vitamine (1% v/v)	ATCC (HTB-133)
ZR-75-1	Mammakarzinom	Minimum Essential Medium	Vitamine (1% v/v)	ATCC (CRL-1500)

Tabelle 2.2.1. Auflistung der Zelllinien, Kultivierungsmedien und Bezugsquellen

### 2.2.2. Kultivierung der Zellen

Die Zellen werden in Gewebekulturflaschen kultiviert und bis zu konfluentem Wachstum im Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Zweimal wöchentlich erfolgt ein Mediumwechsel mittels steriler Einmalpipetten.

### 2.2.3. Induktion der MDR-Expression

Um eine Resistenz der Zellkulturen gegenüber Anthrazyklinen zu erreichen, werden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des Chemotherapeutikums Doxorubicin inkubiert. Die langsame Steigerung der Konzentration ermöglicht den Zellen den Aufbau der Resistenz basierend auf dem MDR1-Gen. Im niedrigen Konzentrationsbereich erfolgt eine Steigerung in Schritten von 50 ng/ml; ab einer Konzentration von 500 ng/ml wird die Konzentration in Stufen von 100 ng/ml erhöht.

### 2.2.4. Subkultivierung

Zur Passagierung konfluenten Kulturen werden die adhären wachsenden Zellen mit einer 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung geerntet und vereinzelt. Durch Zentrifugation (5 min, 1200 Upm) werden die Zellen sedimentiert und dann ihrem Wachstum entsprechend anteilig neu ausgesät.

### 2.2.5. Kryokonservierung

Die sedimentierten Zellen werden in Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

## 2.3. RNA-/DNA-Analytik

### 2.3.1. RNA-Isolation

Um bei der Isolierung der RNA Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden, müssen alle verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. Hierzu wird DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt, im Verhältnis 1:100 den Lösungen zugesetzt und die Lösung nach Inkubation bei 37°C über Nacht autoklaviert.

Bei der Isolierung der gesamten Ribonukleinsäuren wird TRIzol™ (Gibco, Karlsruhe) verwendet. Dieses Verfahren ist eine Weiterentwicklung der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) und basiert auf einer monophasischen aus Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, die während des Homogenisierens und der Lyse die Integrität der RNA schützt.

Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben ca. 15 Sekunden geschüttelt. Nach 2-3 min Inkubation bei RT werden die Proben für 15 min bei 4°C und 12000 Upm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 10

min Inkubation bei RT wird die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 12000 Upm) pelletiert, mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut für 5 min bei 9500 Upm und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wird das RNA-Pellet im Heizblock bei 55°C für 5-10 min getrocknet und in 20 bis 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgt photometrisch.

### 2.3.2. cDNA-Synthese

Bei der cDNA Synthese werden mit Hilfe der Reversen Transkriptase mit Random-Primer (Hexaoligonukleotide) Gesamt-RNA in cDNA translatiert. Die Verwendung unspezifischer Random-Primer ermöglicht es, mehrere Transkripte gleichzeitig zu untersuchen und zu quantifizieren. Zunächst wird die RNA (5 µg) für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wird der Reaktionsansatz zugeben, sodass folgende Konzentrationen vorliegen: 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 15 mM DTT, je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U/µl RNasin, 1000 pmol Random-Primer und 9.5 U (0,5 µl) Reverse Transkriptase. Für die cDNA Synthese wird der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 25°C und danach 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wird die Reverse Transkriptase durch 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Nach Abkühlung auf Eis werden die cDNA Proben bei -20°C gelagert.

### 2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR Reaktionen werden in 50 µl Ansätzen pipettiert. Sie enthalten 50 ng DNA (5 µl), 1 x PCR Reaktionspuffer, jeweils 125 µM dNTPs, 5'- und 3'- Primer sowie Taq-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Sequenzen der einzelnen Primer sind der Tabelle 2.3.3.1 zu entnehmen. Soll eine Detektion mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers erfolgen, so ist der 5'-Primer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5-markiert. Für die Reaktionen wird ein Hybaid Omnigene PCR-Cycler benutzt. Zum Schutz vor Verdunstung müssen diese Reaktionen mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet werden. Zur Vermeidung unspezifischer Nebenreaktionen werden die PCR-Reaktionen mit einem "Hot-Start" gestartet, d.h. die Polymerase wird während einer Vorlaufphase von 10 Minuten bei 94°C zugegeben. Am Schluss jeder PCR-Reaktion wird eine "final extension" (8 Minuten bei 72°C) durchgeführt, um einen vollständigen Abschluss aller Reaktionen zu ermöglichen.

amplifizierte DNA	Basensequenz	Fragmentlänge
β-Actin	5'-agagatggccacggctgctt-3' 5'-attgCGgtggacgatggag-3'	446 bp (cDNA) 652 bp (gen. DNA)
β-Casein-Enhancer	5'-tccccgggggagcaagcctctattctagtgc-3' 5'-ccgctcgagcgggttggctgactgtgttga-3'	680 bp
β-Casein-Promotor	5'-ggaagatctccggagaaacagttgcctcaca-3' 5'-ccaagcttgggtccatcagcttctgtgactg-3'	511 bp
α-Lactalbumin-Promotor	5'-gaagatctcgagctcctgggctcaagtgatccaccagac-3' 5'-ccaagcttgggccaagaacctgaaatgga-3'	772 bp
GAPDH-Expression	5'-ccatggagaaggctgggg-3'* 5'-caaagttgcatggatgacc-3'	195 bp
MDR-Expression	5'-tcattcgagtagcggctctt-3'* 5'-cttcttgctcctcattgc-3'	177 bp
Screen-Luc	5'-tggaagacgcaaaaaacataaag-3' 5'-gatctttccgaccttcttg-3'	1643 bp
Screen-Promotor	5'-ctagcaaaataggctgtcccca-3' 5'-ctttatgttttggcgtctcca-3'	variabel
Screen-HSV-TK	5'-gcttaccatggcttctgacc-3' 5'-ccccctgaacctgaaacata-3'	1337 bp
Sequenzierprimer	5'-cgacgttgtaaaacgacggccag-3'* 5'-caggaacagctatgac-3'*	variabel
pGL3-Sequenzierung	5'-cgacgttgtaaaacgacggccagctctagcaaaataggctgtccc-3' 5'-caggaacagctatgacctttatgttttggcgtctcca-3'	variabel

Tabelle 2.3.3: Primer-Sequenzen; gekennzeichnete Primer (\*) sind zur Detektion im A.L.F. CY5 markiert; die Sequenz der GAPDH-Expression-Primer ist von Taylor et al. 1994 übernommen

### 2.3.3.1. Überprüfung der Qualität der cDNA durch β-Actin-PCR

Die synthetisierte cDNA wird mittels β-Actin-PCR (Tabelle 2.3.3.1.) auf ihre Qualität und eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA untersucht. Die Primer sind so gewählt, dass genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen ein größeres Fragment (652 bp) ergibt als das cDNA-Fragment (446 bp).

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 62°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 27
10x Puffer	5	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.1. β-Actin-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

### 2.3.3.2. Amplifikation der Promotoren aus genomischer DNA

Die Promotoren der Gene α-Lactalbumin und β-Casein werden mittels PCR aus genomischer Blut-DNA amplifiziert. Die Primersequenzen sind so gewählt, dass artifizielle Erkennungssequenzen für definierte Restriktionsendonukleasen eingefügt werden. Dadurch kann das PCR-Produkt direkt für die Insertion in die Klonierungs- und Expressionsvektoren verwendet werden.

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 62°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklusanzahl: 27
10x Puffer	5	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.2.1 α-Lactalbumin-Promotor-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 57°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklusanzahl: 35
10x Puffer	5	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.2.2. β-Casein-Promotor-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	34,3	94°C → 1 min 56°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklusanzahl: 30
10x Puffer	5	
5'Primer	1,5 (15 pmol)	
3'Primer	1,5 (15 pmol)	
dNTPs	2,5 (6,25 nmol)	
Taq-Polymerase	0,2 (1 U)	

Tabelle 2.3.3.2.3. β-Casein-Enhancer-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

### 2.3.3.3. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA Expression

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wird die mRNA Expression des Gens MDR1 bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens und eines "single copy" Gens, d.h. eines in nur einer Kopienzahl vorliegenden Referenzgens in einem PCR Ansatz. Als Referenzgen wird GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Die Bedingungen (Tabelle 2.3.3.) müssen so gewählt sein, dass

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	24,5	94°C → 1 min 60°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklusanzahl: 25
CDNA	5 (1µg)	
10x Puffer	5	
5'Primer GAPDH	2,0 (20 pmol)	
3'Primer GAPDH	2,0 (20 pmol)	
5'Primer MDR	4,0 (40 pmol)	
3'Primer MDR	4,0 (40 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.3. Reaktionsansatz der quantitativen RT-PCR und Bedingungen

Die 5'-GAPDH-Primer werden sowohl CY5-markiert, als auch unmarkiert in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt.

allein die Menge der eingesetzten cDNA limitierend ist, also keine Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Primer, Nukleotiden und Taq-Polymerase besteht. Die Detektion der PCR Produkte sowie die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgt mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers und der Fragment Manager Software wie unter 2.4.1. beschrieben.

### 2.3.3.4. Screening der Klonierung

Zur Überprüfung der korrekten Insertion von Promotoren und Genen in die Vektoren zur Adenovirus-Produktion werden die Klone mittels PCR analysiert. Hierbei sind die Primer so gewählt, dass sie entweder außerhalb des Promotorbereichs, also 5' und 3' ansetzen, so dass alle Promotoren mit einem Primerpaar amplifiziert werden können, oder sie setzen innerhalb der kodierenden Sequenz der Gene Luciferase und HSV-TK an.

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 62°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 27
10x Puffer	5	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (6 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.4.1. Promotor-Screening-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 62°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 27
10x Puffer	5	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.4.2. Luciferase-Screening-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 60°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 27
10x Puffer	5	
5'Primer	2,0 (20 pmol)	
3'Primer	2,0 (20 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.4.3. HSV-TK-Screening-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

### 2.3.4. Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Feststellung der Nukleinsäure-Konzentration in Lösungen wird eine photometrische Bestimmung durchgeführt. Die spektralphotometrische Messung erfolgt bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm.

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt bei 260 nm für RNA und einzelsträngige DNA 25 cm<sup>2</sup>/mg, für doppelsträngige DNA 20 cm<sup>2</sup>/mg und für Oligonukleotide 30 cm<sup>2</sup>/mg.

Die Konzentration der RNA ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus folgender Formel:  $c = E \cdot 1/\epsilon \cdot 1/d$  (c: Konzentration in mg/ml; E: Extinktion bei 260 nm; d: Schichtdicke der Küvette = 1 cm).

### 2.3.5. Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Klonierung wird das resultierende Plasmid bzw. das Insert sequenziert. Die Sequenzierreaktion wird mit dem "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Dieses Kit beruht auf dem Prinzip der Sequenzierung nach Sanger und setzt den Einsatz fluoreszenzmarkierter Primer zur Detektion der Sequenzierprodukte auf einem automatischen Laser-Sequencer voraus. Um Störsignale durch bei der Reaktion nicht verbrauchte Primer und dNTPs zu vermeiden, müssen die PCR Produkte vor der Sequenzierung aufgereinigt werden. Dies geschieht mit Hilfe der MicroSpin™ S400 Säulen von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Die mit TE-Puffer voräquilibrierten Säulen werden 1 Minute bei 3000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend werden sie mit 50 µl PCR Produkt beladen und erneut für 3 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Das Eluat kann direkt in die Sequenzierung eingesetzt werden.

Um die Automatisierung der Sequenzierung zu ermöglichen, wird die Sequenzierung in 2 Teilschritten vorgenommen. Zuerst wird in einer PCR der zu sequenzierende DNA-Doppelstrang 5' und 3' mit einer Erkennungssequenz für die M13 Universal- oder Reversal-Primer versehen. In der zweiten, automatisierten PCR werden alle Fragmente mit einer standardisierten PCR mit M13-Primern sequenziert.

#### 2.3.5.1. Einfügen der artifiziellen M13-Sequenz

Die Primer dieser PCR erkennen die Basensequenz des benutzten Klonierungsvektor pGL3-Basic (Promega, Mannheim) und können deshalb für alle Klonierungsprodukte verwendet werden. Zusätzlich zu der Erkennungssequenz enthalten sie eine Basensequenz aus dem Bakteriophagen M13, die für die Automatisierung von Sequenzierungsreaktionen verwendet wird.

Substanz	Volumen (µl)	Temperatur- und Zeitbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C → 1 min 58°C → 1 min 72°C → 1 min Zyklenanzahl: 30
DNA	5 (50 ng)	
10x Puffer	5	
5'Primer	3,0 (30 pmol)	
3'Primer	3,0 (30 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

Tabelle 2.3.3.5.1. Reaktionsansatz und Bedingungen der ersten Sequenzierungs-PCR

#### 2.3.5.2. Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion erfolgt in 4 PCR-Gefäßen pro Probe (je ein Cup pro Base). Als Sequenzier-Primer werden die Cy5-markierten M13 Universal- oder Reversal-Primer

eingesetzt. Die Reaktion wird mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und wie folgt durchgeführt.

Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
1 µl Sequenzierprimer (1pMol/µl)
2 µl Reaktionsmix (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP)
8 µl Gesamtvolumen

PCR	Bedingungen
Universal	60°C 30 sec 95°C 30 sec 30 Zyklen
Reversal	55°C 30 sec 95°C 30 sec 30 Zyklen

Tabelle 2.3.3.5.2. Bedingungen der zweiten Sequenzierungs-PCR

Durch die Zugabe von 5 µl Stopplösung wird die Sequenzierungsreaktion abgebrochen und das Sequenzier-Produkt anschließend vom Mineralöl abgetrennt. Die Auftragung und Detektion mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers erfolgt wie unter 2.4.1. beschrieben.

## 2.4. Elektrophoretische Auftrennungsmethoden

### 2.4.1. Elektrophoretische Auftrennung mit dem A.L.F. und A.L.F.express

Mit Hilfe von Sequenzierautomaten (A.L.F. und A.L.F.express, Pharmacia) ist die Auftrennung und Quantifizierung auch geringer Probemengen möglich. Die Fluoreszenz der markierten PCR-Produkte wird durch einen Laserstrahl im unteren Drittel des vertikalen Polyacrylamidgels angeregt. Senkrecht zum Laserstrahl erfolgt die Detektion der emittierten Strahlung über Photodioden bei einer Wellenlänge von 632,8 nm (Helium-Neon-Laser). Den Detektoren vorgelagert sind optische Filter, um die Hintergrundstrahlung und das Streulicht zu eliminieren. In der Analyse mit dem A.L.F. werden Cy5-markierte PCR-Produkte verwendet. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz wird direkt während der elektrophoretischen Auftrennung durch das optische System des A.L.F. oder A.L.F.express gemessen und die Daten werden durch eine gekoppelte EDV erfasst und gespeichert. Nach Beendigung des Laufs können die Rohdaten mit Hilfe der Software (Fragment-Manager) ausgewertet werden. Je nach Experiment werden die Gelzusammensetzung und der Lauf unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Für die Gellösung werden 25,2 g Urea und 9 ml Monomerenlösung in 25,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 5 g Amberlite für 10 Minuten gerührt. Für ein Sequenziergel wird die Mono-

merenlösung 19:1, für eine Fragmentanalyse die Monomerenlösung 29:1 eingesetzt. Nach dem Filtrieren von 6 ml 6 x TBE und der Lösung wird die Gellösung entgast. Dann werden 40 µl TEMED und 200 µl 10%iges APS zugegeben und die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen.

Für die Fragmentanalysen werden die PCR-Produkte mit Aqua dest. 1:5 verdünnt. 5 µl der Verdünnung werden mit 5 µl A.L.F.-Probenauftragspuffer versetzt. Sowohl für die Fragment- als auch für die Sequenzanalysen werden die Proben vor dem Gelauftrag 5 Minuten bei 95°C denaturiert und 3 Minuten auf Eis abgekühlt.

Laufbedingung	Fragmentanalyse	Sequenzieranalyse
Spannung	1500 Volt	1500 Volt
Strom	34 mA	34 mA
Leistung	38 Watt	30 Watt
Temperatur	40°C	50°C
Laufpuffer	0,6 x TBE	0,6 x TBE

Tabelle 2.4.1. Bedingungen für A.L.F.-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

#### 2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen

Um die Größe der PCR-Produkte zu überprüfen, werden die PCR-Produkte auf 1,5%-ige Agarosegele aufgetragen. Als Längenstandard wird ein 1 kb DNA-Standard von EuroGentec (Seraing, Belgien) aufgetragen, mit deren Hilfe die Fragmentlänge der aufgetrennten PCR-Produkte ermittelt werden kann. Die Elektrophorese erfolgt je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 100 bis 110 Volt für 45 bis 90 Minuten. Das Gel wird nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) für mindestens 30 Minuten gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda=312$  nm) kann die Fluoreszenz des interkalierten Agens angeregt und die DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

### 2.5. Mikrobiologische Methoden

#### 2.5.1. Bakterienstämme

Es wird mit den E. coli Stämmen DH5 $\alpha$  und BJ8183 gearbeitet, die wie folgt charakterisiert sind:

DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA, supE44,  $\lambda$  thi-1, gyrA96, relA1

BJ5183: endA, sbcBC, recBC, galK, met, thi-1, bioT, hsdR (Str<sup>I</sup>)

### 2.5.2. Medien und Aufzucht von E. coli

Alle E. coli werden generell in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) und bei 37°C kultiviert. Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wird dem Medium nach dem Autoklavieren 50 µg/µl Ampicillin bzw. Kanamycin zugesetzt (Selektionsmedium).

Feste Nährmedien enthalten zusätzlich 2% Agar.

### 2.5.3. Plasmide

#### 2.5.3.1. pGL3-Basic (Promega)

Der pGL3-Basic dient der Untersuchung von Genexpression regulierenden Faktoren bei Säugerzellen. Diese Faktoren können cis-aktivierende Elemente sein, wie z. B. Promotoren oder Enhancer, aber auch trans-aktivierende Elemente, wie z. B. DNA-bindende Proteine. Dieser Vektor enthält die für Luziferase (aus *Photinus pyralis*) kodierende Region, die zur Kontrolle für die Transkriptionsaktivität transformierter eukaryontischer Zellen eingesetzt wird. Für die Selektion transfizierter E. coli Zellen besitzt der Vektor eine Ampicillinresistenz.

#### 2.5.3.2. Plasmide basierend auf pGL3-Basic

Neben der Insertion der verschiedenen Promotoren in pGL3-Basic werden auch Vektoren mit alternativen Reportergenen verwendet. Anstelle der Luziferase wird die kodierende Region für die  $\beta$ -Galactosidase (*lacZ* aus E. coli) oder die Thymidin-Kinase des Herpes simplex-Virus (HSV-TK) benutzt. Die Details der verschiedenen Plasmid-Vektoren sind dem Anhang I zu entnehmen.

#### 2.5.3.3. Plasmide zur Klonierung rekombinanter Adenoviren

Zur Klonierung rekombinanter Adenoviren wird das AdEasy™-System der Firma Qbiogene (Heidelberg) verwendet. Dabei wird das DNA-Fragment in ein pShuttle-Plasmid eingefügt. Die Insertion in das Adenovirusgenom erfolgt mittels homologer Rekombination. Als homologe Bereiche dienen hierbei entweder die Region des linken und rechten Arms oder der rechte Arm und der Replikationsursprung der Plasmide. Diese Regionen sind in beiden Plasmiden, pShuttle und pAdEasy (Adenovirusgenom), sequenzidentisch. Die Details der verschiedenen Plasmide können dem Anhang I entnommen werden.

### 2.5.4. Klonierung

#### 2.5.4.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Nach der Auftrennung werden die gewünschten Banden unter einer UV-Licht aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf Cup überführt. Nach der Gewichtsbestimmung des Agarosestückchens wird dieses mit dem dreifachen Volumen des Puffers QG versetzt und bei 50°C geschmolzen. Nach Zugabe eines Volumens Isopropanol wird das Gemisch auf die Säule aufgetragen und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Aufreinigung der an die Siliconmembran der Säule gebundenen DNA wird diese nach Herstellerangaben mit einer Waschlösung (Puffer PE) behandelt und erneut 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird die DNA mit 30 µl Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation von der Säule eluiert.

#### 2.5.4.2. Restriktionsanalysen

Alle Restriktionen werden unter den vom Hersteller der Restriktionsenzyme angegebenen Bedingungen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Die Restriktion wird in 20 µl Ansätzen durchgeführt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.5.4.3. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt in einem 20 µl Gesamtvolumen, wobei die molare Menge des Insertionsfragmentes das 4-fache der Vektor-DNA ausmachen soll. Die Vektor- und Insert-DNA wird zusammen mit Wasser für 5 min auf 65°C erhitzt, um vorhandene Sekundärstrukturen der DNA aufzuschmelzen. Nach Zugabe von Puffer erfolgt die Ligation in Gegenwart von 1U T4-Ligase (Roche, Mannheim) bei Raumtemperatur über Nacht bei 15°C. Zur Inaktivierung der Ligase wird der Reaktionsansatz abschließend für 10 min auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

#### 2.5.4.4. Transformation von E. coli mittels Elektroporation

##### 2.5.4.4.1. Herstellung kompetenter E. coli Zellen

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wird zunächst eine 10 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezüchtet. Mit dieser Vorkultur werden 500 ml LB-Medium angeimpft. Das Zellwachstum wird photometrisch bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  verfolgt. Bei einer optischen Dichte von ca.

$OD_{600nm} = 0,6$  werden die Zellen geerntet und in Zentrifugenröhrchen 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden bei 4°C und 4000 g für 15 Minuten pelletiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit eiskaltem Wasser (500 ml und 250 ml) gewaschen und zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml 10%igem Glycerin und erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 1,5 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, á 40 µl in Eppendorf Cups aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.5.4.4.2. Elektroporation

Kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit dem Vektor gemischt. Das Gemisch wird in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand = 0,2 cm) gegeben. Die Elektroporation erfolgt in einem Gene Pulser (BioRad, München) durch einen exponentiell abfallenden Spannungspuls bei 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω und  $\tau = 4,0$ . Nach dem Puls werden die Zellen mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette herausgespült und in einem Eppendorf Cup für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Zellen auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.5.4.5. Plasmidpräparation

Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA werden verschiedene Kits verwendet. Die Plasmidpräparation aus einer 2 ml Übernachtkultur erfolgte mittels des GFX™ Micro Plasmid Prep Sample Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Für eine Midipräparation aus einer 250 ml Übernachtkultur wird das EndoFree Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die Präparationen erfolgten nach den vom Hersteller beschriebenen Angaben.

#### 2.5.4.6. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Aufreinigung

Für die Klonierung der rekombinanten Adenoviren wird die verwendete DNA prinzipiell mittels Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Fällung (25:24:1) aufgereinigt. Hierzu wird die DNA-haltige Ausgangslösung mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, durch Vortexen gemischt und zur Phasentrennung für 15 sec bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die wässrige, DNA-haltige obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaAcetat-Lösung und 2,5-3 Volumen Ethanol (-20°C) erfolgt die DNA-Fällung bei -80°C (> 30 min). Die gefällte DNA wird durch Zentrifugation (4°C, 14000 Upm, 5 min) pelletiert, das Pellet mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und nach Trocknen in H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 2.5.4.7. Manipulation der DNA

Um bei der Klonierung die unerwünschte Religation der Basisvektoren zu verhindern, werden die linearisierten Basisvektoren mit der CIP (calf intestine phosphatase) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Dephosphorylierung der DNA-Enden und verhindert durch die Entfernung der Phosphatreste die Religation der DNA-Enden. Nur durch die Insertion eines DNA-Fragments mit intakten Phosphatresten kann der linearisierte Vektor wieder zu einem zirkulären Plasmid geschlossen werden.

Für die Dephosphorylierung wird der Restriktionsansatz abschließend für 2 x 30 min mit je 1 µl CIP (1 U) inkubiert. Zur Inaktivierung der CIP wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt.

### 2.6. Liposomaler Gentransfer

Der nicht-virale Gentransfer mit Hilfe von Lipiden findet über sogenannte Lipoplexe statt, die aus DNA und Liposomen bestehen. Diese Lipoplexe werden endozytotisch in die Zellen aufgenommen und die DNA gelangt im Anschluß in den Zellkern, wo die Transkription stattfindet.

#### 2.6.1. Herstellung der Lipide und Liposomen

Die kationischen Lipide CCQ22 und CCQ32 werden entsprechend der Anleitung in Keil et al. (2001) hergestellt. Anschließend werden sie mit dem neutralen Phospholipid DOPE in unterschiedlichen molaren Verhältnissen gemischt und in H<sub>2</sub>O rehydriert. Das molare Mischungsverhältnis von kationischem Lipid (CCQ22 bzw. CCQ32) zu fusogenem Helferlipid (DOPE) dient hierbei auch der genauen Namensgebung. Die Liposomen bestehend aus 30 mol% CCQ32 und 70 mol% DOPE werden als CCQ32-30 bezeichnet. Für eine optimale Liposomenbildung wird die Lösung 5 min in einem Ultraschallbad behandelt.

#### 2.6.2. Lipofektion

Die Liposomen bestehend aus CCQ22 bzw. CCQ32 und DOPE, sowie das Lipofektionsreagenz Fugene<sup>6</sup>™ (Roche, Mannheim) und DC-Chol werden 5 min in Kulturmedium ohne FCS bei RT inkubiert. Zu den verdünnten Liposomen wird 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben, so dass ein Mischungsverhältnis DNA/Liposomen von 1:3 (BT-20, MCF7, SK-BR-3), 1:4 (MDAH 2774) bzw. 1:5 (Hey, SK-OV-3, ZR-75-1) entsteht. Nach Inkubation für 15 min bei RT werden die entstandenen Lipoplexe tröpfchenweise zu den in normalem Kulturmedium gehaltenen Zellen gegeben.

### 2.6.3. X-Gal-Färbung

Für die X-Gal-Färbung werden  $1-2 \times 10^5$  Zellen/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wird die Lipofektion bei einer Konfluenz von 60–80% durchgeführt und hierbei das Plasmid pRC/CMVlacZ (Keil et al. 2001) übertragen. Anschließend werden die Zellen für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Waschen mit PBS werden die Zellen mit einer eisgekühlten Fixierlösung fixiert (5 min bei RT), 3x mit PBS gewaschen und danach die Färbelösung zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die blau-gefärbten Zellen im Lichtmikroskop ausgezählt.

### 2.6.4. Bestimmung der Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Toxizität der Lipofektion wird eine Analyse durchgeführt, bei der die Aktivität des zelleigenen Enzyms „Saure Phosphatase“ als Maßstab für die Vitalität der Zellpopulation gemessen wird (Groth et al. 1998). In einer 96-Well-Platte werden  $1,2 \times 10^4$  Zellen/Well ausgesät und die Lipofektion mit verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zwei Tage später wird die Saure Phosphatase-Aktivität der lysierten Zellpopulation in jedem Wells gemessen, wie in Keil et al. (2001) beschrieben.

### 2.6.5. Analyse der Gentransfereffizienz

Zur detaillierten Analyse der Gentransfereffizienz wird das Plasmid pEGFP-C (Clontech, Heidelberg) verwendet. Dieses Reporterplasmid kodiert für das Green Fluorescent Protein (GFP). Die GFP-Expression kann auf zellulärer Ebene mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) detektiert werden. Für die FACS-Analyse werden  $0,4-1 \times 10^4$  Zellen/Well in einer 24 Well-Platte ausgesät und 24h später die Lipofektion durchgeführt. Nach weiteren 48h werden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert und auf Eis gelagert. Im Durchflusszytometer wird die GFP-Expression von 3000-5000 Zellen gemessen.

## 2.7. Adenoviraler Gentransfer

Der Gentransfer basierend auf Viren ist die effizienteste Methode, um Fremd-DNA in Zielzellen einzubringen. Die Adenoviren sind zur Zeit die bedeutendste Gruppe der viralen Vektorsysteme, da sie ein sehr breites Wirtszell-Spektrum besitzen und in vitro und in vivo gute Gentransferraten zeigen.

### 2.7.1. Klonierung des rekombinanten Adenovirusgenom

Beim Adenovirusgenom handelt es sich um ein ca. 36 kb großes lineares DNA-Molekül, das die Erkennungssequenz von jedem kommerziell erhältlichen Restriktionsenzym mehrfach enthält. Deshalb eignet sich das Adenovirusgenom nicht zur direkten Klonierung.

Zur Herstellung rekombinanter, adenoviraler Vektoren wird das AdEasy™-System (Qbiogene, Heidelberg) verwendet. Um nun die gewünschte Fremd-DNA in das Adenovirusgenom zu integrieren, wird dabei der „Umweg“ über sogenannte Shuttle-Plasmide gewählt. Dabei wird, wie in Abbildung 2.7.1. gezeigt, in einem ersten Schritt das gewünschte DNA-Fragment in den Shuttle-Vektor eingebaut und dieses in einem zweiten Schritt über homologe Rekombination in das Adenovirusgenom integriert.

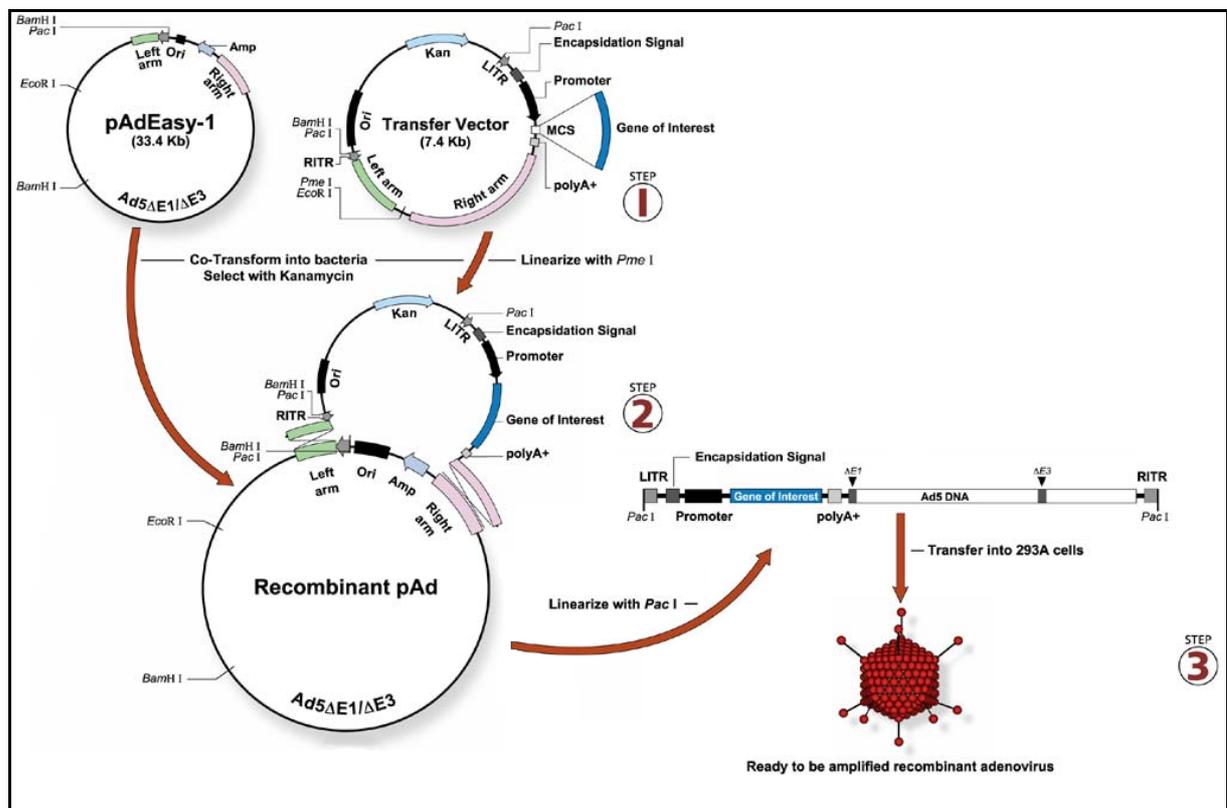


Abbildung 2.7.1. Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem AdEasy-System™ (Übersicht)

#### 2.7.1.1. Klonierung in pShuttle

Um das Reporter-gen Luziferase bzw. das Suizidgen HSV-TK unter der Kontrolle der verschiedenen Promotoren in adenovirale Vektoren zu klonieren, wird das entsprechende DNA-Fragment aus Promotorbereich und Genkassette über die Restriktionsendonukleasen Not I und Sal I in den pShuttle-Vektor eingefügt. Nach Kontrolle der Klonierung über den Verdau des resultierenden Plasmids mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wird der rekombinante pShuttle-Vektor mit Pme I linearisiert. Der Reaktionsansatz wird nach Dephosphorylierung mittels PCI-Aufreinigung von allen Proteinen und Ionen befreit und in

die Elektroporation eingesetzt. Aus den resultierenden Klonen werden die Plasmide isoliert und mittels Restriktionsverdau auf das korrekte Insert untersucht.

#### 2.7.1.2. Homologe Rekombination

Um eine erhöhte Effizienz bei der homologen Rekombination zu erreichen, werden die Plasmide pAdEasy und pShuttle nacheinander in E.coli (BJ5183) transfiziert. BJ5183 ist ein Bakterienstamm, der die Rekombination möglich macht, allerdings sind die rekombinanten Plasmide in BJ5183 nicht über längere Zeit stabil, sodass für eine Präparation größerer Plasmidmengen auf den Stamm DH5 $\alpha$  zurückgegriffen werden muss. Nach Transfektion des pAdEasy-Plasmids, welches das Resistenzgen gegen Ampicillin enthält, in BJ5183 werden die Klone mittels Ampicillin-Resistenz auf die Präsenz von pAdEasy selektioniert. Von einem positiven Klon werden elektrokompetente Bakterien hergestellt. In diese BJ5183+pAdEasy wird nun das linearisierte, rekombinante pShuttle-Plasmid transfiziert und über die dort enthaltene Kanamycin-Resistenz selektioniert. Die korrekten rekombinanten Klone werden durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen detektiert und die Plasmide in größerer Menge mit dem EndoFree Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) hergestellt.

#### 2.7.1.3. Transfer in Verpackungszelllinie und Klonselktion

Um die rekombinanten Plasmide aus Adenovirusgenom und eingefügter Genexpressionskassette als adenovirale Partikel zu verpacken, müssen diese in die Verpackungszelllinie 293 transferiert werden. Die Zelllinie 293 stammt von einem embryonalen Nierenzellkarzinom ab und enthält Fragmente der Adenovirus-DNA. Durch die stabile Integration der E1-Region des Adenovirusgenoms in 293 kann diese Zelllinie die Deletion des E1-Bereichs in adenoviralen Vektoren komplementieren und es kommt zur Replikation des rekombinanten Adenovirus in 293-Zellen.

Nach Linearisierung des in 2.7.1.2. hergestellten rekombinanten Adenovirus-Plasmids mit Pac I und anschließender PCI-Aufreinigung wird die DNA in die 293-Zellen eingebracht. Als Transfektionsmethode dient die Kalziumphosphat-Technik, die entsprechend den Angaben des Herstellers (Qbiogene, AdEasy<sup>TM</sup>-System) durchgeführt wird. Nach der Transfektion der 293-Zellen und Replikation kommt es zur lytischen Freisetzung der rekombinanten Adenoviren. Damit die Diffusion der viralen Partikel minimiert wird, werden die Zellen mit Agarose-haltigem Nährmedium (1,25% Agarose w/v) überschichtet. Dadurch können nach 2-3 Wochen isolierte Plaques im Zellmonolayer gepickt werden, um damit an einzelne Klone des rekombinanten Adenovirus zu gelangen. Bei den Klonen wird mittels PCR ein Screening auf die eingefügten Promotoren und Genexpressionskassetten durchgeführt (siehe 2.3.3.4.) und mit einem Genexpressions-Assay (siehe 2.8.) die Funktionalität der Viren überprüft.

### 2.7.2. Produktion von adenoviralen Vektoren

Um für die Experimente eine ausreichende Menge an Adenoviren zur Verfügung zu haben, wird die Virusproduktion in großem Maßstab durchgeführt. Das Eintreten des zytopathischen Effekts (CPE) dient hier als Maßstab für die erfolgreiche Virusproduktion. Der CPE beschreibt ein Phänomen, das bei der Virusreplikation und –Produktion in 293-Zellen auftritt, da diese die Deletion des Wildtyp-Adenovirusgenoms komplementieren. Dadurch kommt es zum Durchlaufen des lytischen, adenoviralen Infektionszyklus und in der Folge zum Absterben der Zellen nach Adenovirus-Produktion. Dieses zeigt sich primär in der Abkugelung und der Ablösung der Zellen vom Kulturgefäß. Die Adenoviren sind bis zur Lyse der Zellen, die erst 1-2 Tage später einsetzt, innerhalb der Zellen eingeschlossen und können so durch die Ernte der Zellen angereichert werden.

#### 2.7.2.1. Zellkultur

293-Zellen werden in 40 Zellkulturplatten (à 175 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bei einer Konfluenz von >90% die adenovirale Infektion durchgeführt. Für die Virusinfektion wird ein Aliquot des vorhergehenden Produktionsmaßstab (2 x 75 cm<sup>2</sup>) verwendet. Die Infektion wird mit Kulturmedium durchgeführt, das 2% FCS enthält. Für die Infektion wird das Kulturmedium von den Zellen entfernt und das virushaltige Medium (7 ml) zugegeben. Nach 2 h wird mit Kulturmedium (2% FCS) auf das normale Kultivierungsvolumen (30 ml) aufgefüllt. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen durch die virale Infektion unter großem Stress stehen und sich nun sehr leicht von dem Schalenboden ablösen. Um das zu verhindern, muss das Kulturmedium äußerst vorsichtig zugegeben werden. Die infizierten Kulturen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sich ein vollständiger zytopathischer Effekt (CPE) einstellt. Die 293-Zellen beginnen ca. 2 Tage nach Infektion sich abzukugeln und lösen sich bis zum 3. Tag vom Boden des Kultivierungsgefäßes ab. Nach der Ernte müssen die Zellen möglichst bei 4°C gelagert werden, um eine vorzeitige Lyse der Zellen zu verhindern.

#### 2.7.2.2. Freisetzung der Adenoviren

Um die Adenoviren gezielt aus den Verpackungszellen freizusetzen, wird das Pellet nach der Ernte der Zellen durch einen sogenannten Gefrier-Tau-Zyklus aufgeschlossen. Dabei wird die Zellsuspension abwechselnd für 20 min in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und sofort wieder im 37°C Wasserbad aufgetaut (20 min). Nach viermaligem Gefrier-Tau-Zyklus sind alle Zellen lysiert und die Viren liegen frei in der Lösung vor. Zur Abtrennung der

Zelltrümmer wird für 10 min bei 4°C und 1200 Upm zentrifugiert und der Virus-haltige Überstand in ein neues Gefäß überführt.

### 2.7.2.3. Aufreinigung und Dialyse

In der Virussuspension liegen neben den infektiösen viralen Partikeln auch defekte virale Partikel und Reste von Zelltrümmern vor. Um nun die infektiösen Partikel zu isolieren, wird die Virussuspension über zwei CsCl-Gradienten aufgereinigt. Dafür wird ein diskontinuierlicher CsCl-Gradient in Zentrifugenröhrchen (Quick-Seal, Beckman, Palo Alto, CA, USA) gegossen, indem zuerst die Virussuspension eingefüllt wird. Anschließend wird die leichtere CsCl-Lösung (Dichte: 1,2 g/cm<sup>3</sup>) unterschichtet und durch Unterschichten der schwereren CsCl-Lösung (Dichte: 1,4 g/cm<sup>3</sup>) das Volumen des Röhrchens aufgefüllt. Dieser Gradient wird für 90 min bei 5°C und 60.000 Upm zentrifugiert. Die Bande der infektiösen viralen Partikel wird eluiert und über einen zweiten identischen diskontinuierlichen Gradienten weiter aufgereinigt. Dieser zweite Gradient wird bei 5°C und 60.000 Upm für >18h zentrifugiert. Die infektiösen, adenoviralen Partikel werden zur Entfernung des CsCl über Nacht dialysiert. Das Volumen des Dialysepuffer beträgt hierbei mindestens das 200fache Volumens der Viruslösung. Nach Abschluss der Dialyse können die Viren bei -80°C gelagert werden.

### 2.7.2.4. Titerbestimmung

Um die Ausbeute der Virusproduktion bestimmen zu können, wird die Anzahl der viralen Partikel über zwei Bestimmungsmethoden ermittelt.

#### 2.7.2.4.1. OD-Messung

Diese Methode basiert auf der Messung der Extinktion viraler DNA. Ein Aliquot der Viruslösung wird durch ein äquivalentes Volumen des Viruslysepuffers lysiert, indem unter Schütteln für 20 min bei 56°C inkubiert wird. Anschließend wird die Probe mit Dialysepuffer so verdünnt, dass eine Endverdünnung der Viruslösung von 1:30 erreicht wird. Durch Messung der optischen Dichte dieser Probe kann auf die Anzahl viraler Partikel in der Lösung geschlossen werden. Dabei entspricht die Extinktion von 1 OD<sub>260nm</sub> = 1,1x10<sup>11</sup> Viren. Der Virustiter berechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1,1 \times 10^{11} = \text{Titer in VP/ml.}$$

#### 2.7.2.4.2. Tissue Culture Infectious Dose (TCID<sub>50</sub>)

Diese Methode basiert auf der Ausprägung des CPE in 293-Zellen. Der Test wird in 96-Well-Platten durchgeführt. Die Zellen werden in einer Dichte von 1x10<sup>4</sup> Zellen/Well und 100 µl

Volumen ausgesät und direkt im Anschluss mit den Viren infiziert. Die Spalten 11 und 12 (siehe Abbildung 2.7.2.4.2.) stellen die Negativ-Kontrollen dar und werden deshalb nicht mit Virus infiziert. Für die virale Infektion werden die entsprechenden Verdünnungen der Stammlösung in 293-Kulturmedium mit 2% FCS angesetzt. Die Infektion wird mit den in Abbildung 2.7.2.4.2. angegebenen Virusverdünnungen und einem Volumen von 90 µl durchgeführt. Die Platte wird nun 10 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch Auszählung der Wells, die CPE zeigen. Ein Well wird als CPE-positiv gewertet, wenn nur wenige Zellen CPE zeigen. Zu beachten ist, dass die Virusverdünnungen so gewählt sind, dass die niedrigste Verdünnung CPE in allen Wells und die höchste Verdünnung in keinem Well CPE zeigt.

Der Virustiter T berechnet sich nach folgender Formel:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)} \quad \text{mit} \quad d = \log(\text{Verdünnungsfaktor}) \quad \text{und} \quad S = \sum \text{CPE-Wells}/10$$

In dem angegebenen Beispiel (Abbildung 2.7.2.4.2.) ist die Verdünnung jeweils um den Faktor 10 erhöht worden, d.h.  $d=1$  und die Summe aller Wells mit CPE ist 85, da auch die

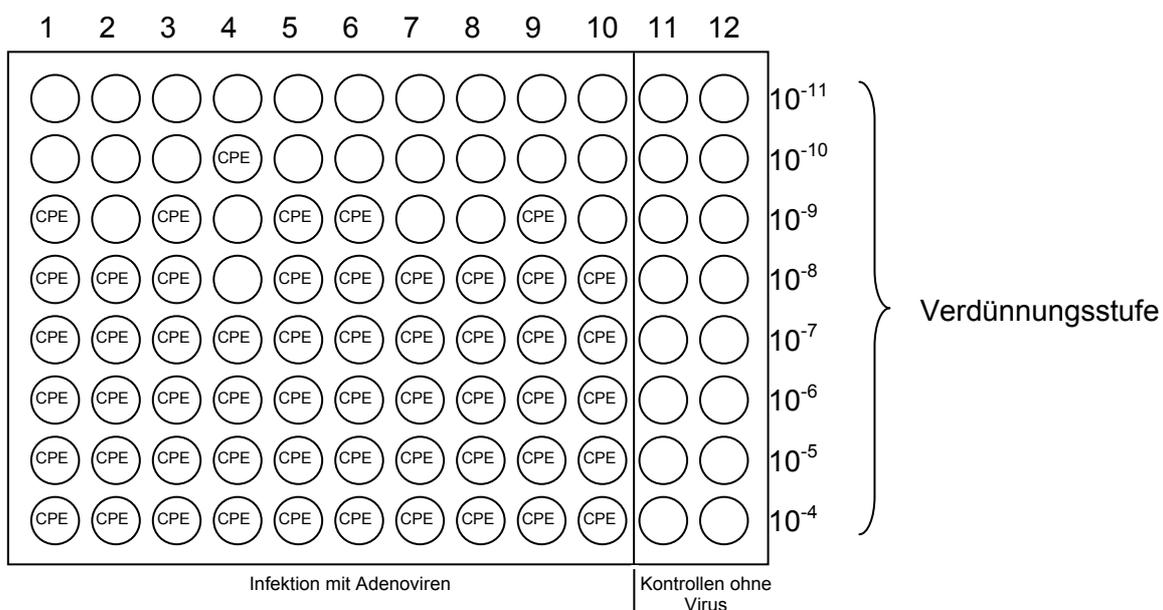


Abbildung 2.7.2.4.2. Pipettierschema und exemplarisches Ergebnis eines TCID<sub>50</sub>

ausgelassenen Verdünnungsstufen 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-3</sup> für die Berechnung gewertet werden müssen. Demnach ergibt sich ein Titer von  $T = 10^{1+1(8,5-0,5)} = 10^9$  pro 90 µl, die für die Infektion verwendet worden sind. Um den Titer in die gebräuchliche Einheit „plaque forming unit“ (PFU) umzurechnen, muss vom TCID<sub>50</sub>-Titer 0,7 log subtrahiert werden. In dem Beispiel ergibt sich also:

$$T = 1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}/90 \mu\text{l} = 1 \times 10^{9-0,7}/90 \mu\text{l} = 1 \times 10^{8,3} \text{ PFU}/90 \mu\text{l}$$

## 2.8. Genexpressions-Assays

### 2.8.1. Luziferase/Galaktosidase-Assay (12-Well-Platten)

Mit diesem Assay wird der Nachweis der Funktionalität und die Induzierbarkeit der verwendeten Promotoren erbracht. Dafür werden die klonierten Expressionsplasmide mittels liposomaler Transfektion (Fugene6™, Roche, Mannheim) in die gut transfizierbare Zelllinie SK-OV-3 gebracht. Um unterschiedliche Gentransferraten zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen auszugleichen, werden die Ergebnisse der Promotor-Aktivität mithilfe eines Kontrollplasmids normiert. Dieses Kontrollplasmid enthält das Gen lacZ unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors für das  $\beta$ -Aktin-Gen (Flötotto, 2001). Bei der Normierung wird der Quotient aus Luciferase- und Galaktosidase-Expression gebildet und als relative Licht-Emission (RLU) bezeichnet.

#### 2.8.1.1. Zellkultur

Für das Luziferase/Galaktosidase-Assay werden  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Die liposomale Transfektion erfolgt 24 h später. Nach weiteren 48 h werden die Zellen lysiert. Dafür wird das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Pro well werden 100  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (Reporter Lysis Buffer, Promega, Mannheim) zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und die Zellsuspension 10 Sekunden gevortext. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wird das Lysat für mindestens 30 Minuten bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 2.8.1.2. Luziferase-Messung (Luciferase Assay, Promega, Mannheim)

20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension werden in ein Messröhrchen überführt. Die Messung erfolgt in einem Luminometer der Firma Berthold. Durch automatische Injektion werden 100  $\mu\text{l}$  Luziferase Assay Substratlösung (Promega, Mannheim) zugesetzt. Die Messung erfolgt automatisch 5 Sekunden nach der Injektion über einen Zeitraum von 15 Sekunden.

#### 2.8.1.3. Galaktosidase-Messung (Galactolight-Assay, Tropic, Bedford, MA, USA)

Dem Galactolight Assay Reagenz (Light Emission Accelerator II) wird vor Gebrauch eine 30%-ige  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung (1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Accelerator) zugegeben. 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension werden vorgelegt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Galactolight Reaktionspuffer wird die Suspension gut gemischt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgt im Luminometer der Firma Berthold. Dazu wird nach automatischer Injektion von 100  $\mu\text{l}$  Light

Emission Accelerator II und einer Inkubationsphase von 5 Sekunden die Lichtemission über einen Zeitraum von 5 Sekunden gemessen.

### 2.8.2. Luziferase-Assay (96-Well-Platten: Bright-Glo™, Promega, Mannheim)

Bei diesem Assay handelt es sich um eine spezielle Variante des Luziferase-Assays, das für die Messung von 96-Well-Platten entwickelt wurde. Einerseits ist die Signalintensität der Luziferase-Reaktion stabiler (Halbwertszeit >25 min im Vergleich zu < 1 min), so dass die reproduzierbare Messung von 96 Proben gewährleistet werden kann und andererseits ist die Sensitivität gegenüber anderen Signal-stabilisierten Luziferase-Assays höher. Dadurch können auch geringe Luziferaseaktivitäten im letzten Well der Messplatte analysiert werden. Für das Bright-Glo™-Assay werden die Zellen entsprechend den Angaben in Tabelle 2.8.2.1. ausgesät. Die adenovirale Infektion der Zellen erfolgt 24 h später. Nach weiteren 48 h werden die Zellen lysiert. Dafür wird das Kulturmedium von den Zellen entfernt und die Zellen einmal mit PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Pro well werden 100 µl Lysispuffer (Glo Lysis Buffer, Promega, Mannheim) zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur ist die Zelllyse abgeschlossen und 50 µl des Lysats werden in die Messplatte überführt. Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Bright-Glo™-Assay Reagenz und 5 Minuten Inkubation bei RT wird die Luziferase-Aktivität gemessen. Dazu misst das Plattenluminometer (Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim) die Lichtemission jedes Wells für die Zeitdauer von 1 Sekunde.

Zelllinie	Zellzahl pro Well
BT-20	7.000
Hey	7.000
MCF7	7.000
MCF12A	2.500
MDAH 2774	3.500
SK-BR-3	7.000
SK-OV-3	15.000
SKOV3.IP1	15.000
T-47D	15.000
ZR-75-1	15.000

Tabelle 2.8.2.1. Zellzahl/Well für 96-Well-Platten

### 2.8.3. Zellproliferations-Assay (MTT)

Mit Hilfe dieses Zellproliferations-Assays wird die Expression des Suizidgens HSV-TK analysiert. Die Suizidgenexpression führt zusammen mit der Gabe von Ganciclovir (GCV) zum Absterben der Zellen und damit zu einer negativen Zellproliferation.

Der nicht-radioaktive Test basiert auf die Umsetzung des gelben Tetrazoliums Salzes MTT zu rotem Formazan durch metabolisch aktive Zellen. An dieser Umsetzung sind neben dem

zelleigenen Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System auch die zellulären Elektronendonatoren NADH und NADP beteiligt.

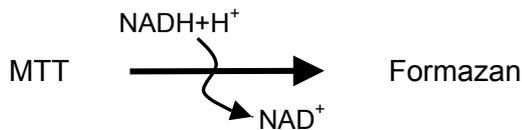


Abbildung 2.8.3. Farbreaktion des MTT-Zellproliferations-Assays

Die Umsetzung von MTT zu Formazan kann spektrometrisch quantifiziert werden. Die Zellen (siehe Tabelle 2.8.2.1.) werden in 100 µl Medium in 96-Wellplatten ausgesät und 24h später transfiziert. Dazu wird die entsprechende Anzahl adenoviraler Partikel in 20 µl Virusverdüpfungspuffer angesetzt und nach Entfernung des Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Zwei Stunden später wird das Kulturvolumen mit normalem Kulturmedium auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wird täglich ein Mediumwechsel durchgeführt und GCV dem Medium zugesetzt. Am fünften Tag nach adenoviraler Infektion wird 10 µl MTT-Reagenz (5 mg/ml MTT in PBS) zugegeben. Nach 4 h Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wird 100 µl SDS (10% (w/v) in 0,01 mol/l HCl) hinzu pipettiert, um den Farbniederschlag des Formazans wieder zu lösen. Die Platte wird dann über Nacht inkubiert und anschließend die Absorption des Formazans bei 573 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

### 2.9. in vivo Experiment: Tierversuch

Im murinen Nacktmausmodell wird die Wirksamkeit des therapeutischen Ansatzes in vivo überprüft. Dafür werden den Mäusen subkutan Tumorzellen der Zelllinien SKOV3.IP1 oder MDAH 2774 (je 1x10<sup>7</sup> Zellen) implantiert. Wenn der entstehende subkutane Tumor das Volumen von ca. 150 – 200 mm<sup>3</sup> erreicht hat (= Tag 1), wird mit der Therapie begonnen. Die Tumorgroße V wird dabei nach folgender Formel bestimmt:

$$V = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,5 \quad (\text{nach Arteaga et al. 1993})$$

Der Therapieplan kann der Tabelle 2.9. entnommen werden.

Die Chemotherapie besteht in der intraperitonealen Injektion von Topotecan (2 mg/kg Körpergewicht) bzw. Taxol (5 mg/kg Körpergewicht) an vier Tagen. Bei der Gentherapie wird intratumoral das Adenovirus RGD-CMV-TK injiziert. Hier werden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 5 x 10<sup>9</sup> Viren in 3 Stichkanälen verabreicht und zwei Tage später mit der Gabe von GCV begonnen. Die GCV-Gabe erfolgt intraperitoneal über 14 Tage mit einer täglichen Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht.

Die Tumorgroße wird täglich mit einer Schieblehre bestimmt, um Unterschiede des Tumorwachstums in den verschiedenen Gruppen festzustellen.

Nr.	Bezeichnung	Therapie	Tumore
1	SKOV:NK	---	8
2	SKOV:GCV	GCV (Tag 1-14)	8
3	SKOV: CT1	Topotecan (Tag 1-4)	8
4	SKOV: CT2	Taxol (Tag 1-4)	8
5	SKOV: Virus	RGD-CMV-TK (Tag 1-3)	8
6	SKOV: GT	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18)	8
7	SKOV: Kombi 1	Topotecan (Tag 1-4); RGD-CMV-TK (Tag 6-8); GCV (Tag 10-23)	8
8	SKOV: Kombi 2	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18) Topotecan (Tag 19-22)	8
9	SKOV: Kombi 3	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18); Topotecan (Tag 5-8)	8
10	SKOV: Kombi 4	Taxol (Tag 1-4); RGD-CMV-TK (Tag 6-8); GCV (Tag 10-23)	8
11	SKOV: Kombi 5	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18) Taxol (Tag 19-22)	8
12	SKOV: Kombi 6	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18); Taxol (Tag 5-8)	8
13	MDAH:NK	---	8
14	MDAH:GCV	GCV (Tag 1-14)	8
15	MDAH: CT1	Topotecan (Tag 1-4)	8
16	MDAH: CT2	Taxol (Tag 1-4)	8
17	MDAH: Virus	RGD-CMV-TK (Tag 1-3)	8
18	MDAH: GT	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18)	8
19	MDAH: Kombi 1	Topotecan (Tag 1-4); RGD-CMV-TK (Tag 6-8); GCV (Tag 10-23)	8
20	MDAH: Kombi 2	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18) Topotecan (Tag 19-22)	8
21	MDAH: Kombi 3	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18); Topotecan (Tag 5-8)	8
22	MDAH: Kombi 4	Taxol (Tag 1-4); RGD-CMV-TK (Tag 6-8); GCV (Tag 10-23)	8
23	MDAH: Kombi 5	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18) Taxol (Tag 19-22)	8
24	MDAH: Kombi 6	RGD-CMV-TK (Tag 1-3); GCV (Tag 5-18); Taxol (Tag 5-8)	8

Tabelle 2.9. Therapieschema und Gruppeneinteilung des Tierversuchs

### 2.10. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse werden die Daten aus separaten Experimenten verwendet. Die Zytotoxizitäts-Assays liegen in doppelter und die FACS-Analysen, Luziferase- und MTT-Assays in dreifacher Ausführung vor. Es werden immer Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Im Falle einer Berechnung der Signifikanz wird der Student's t-Test (paarweise, doppelseitig) verwendet. P-Werte  $<0,05$  werden als signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Liposomaler Gentransfer

Die entscheidenden Kriterien für den Erfolg neuartiger Gentransfersysteme sind einerseits die Transfektionseffizienz und andererseits das Ausmaß der unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. der Zytotoxizität, die von den neuen Systemen ausgelöst werden. Diese zwei Faktoren, Gentransfereffizienz und Zytotoxizität, wurden bei den neuen liposomalen Systemen auf Basis der kationischen Lipide CCQ22 und CCQ32 untersucht und jeweils mit den etablierten Gentransfersystemen Fugene6™ bzw. DC-Chol und Fugene6™ verglichen.

##### 3.1.1. Zytotoxizität der Lipide CCQ22 und CCQ32

Um die Toxizität der Liposomen, bestehend aus CCQ22 bzw. CCQ32 und DOPE, zu untersuchen, wurde ein Reporter-gen-Assay verwendet, das auf der Quantifizierung der Aktivität des zelleigenen Enzyms saure Phosphatase basiert (Groth et al., 1998). Die enzymatische Phosphatase-Aktivität diente dabei als Maßstab für die Zellvitalität.

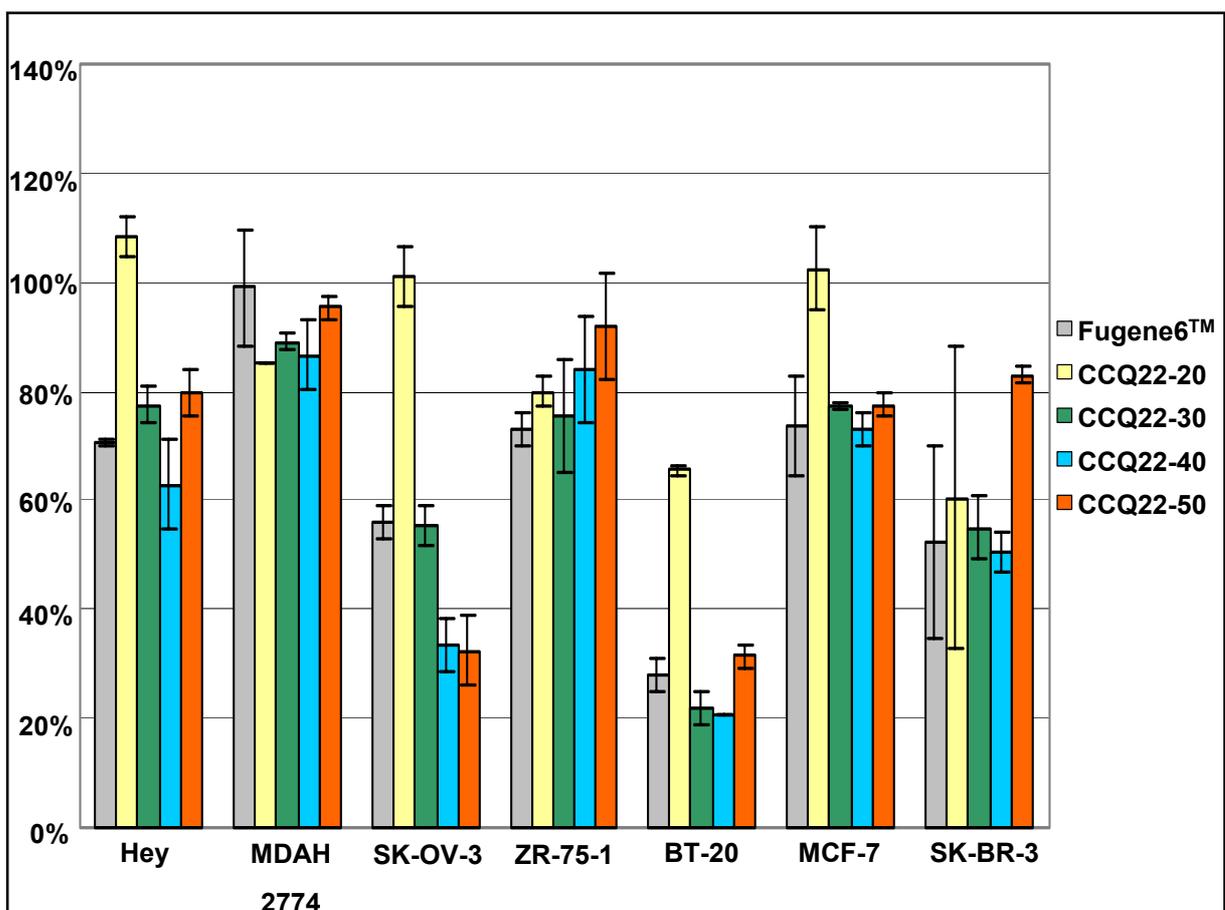


Abbildung 3.1.1.1. Zellvitalität nach liposomalem Gentransfer mittels CCQ22. Der Bezugswert (100% vitale Zellen) ergibt sich aus nicht-transfizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von zwei separaten Experimenten.

Um die zytotoxischen Nebenwirkungen des liposomalen Gentransfers zu reduzieren, wurden die Konzentrationen von DNA und Lipid sowie das Mischungsverhältnis von DNA und Lipid bzw. von kationischem Lipid zu Helfer-Lipid variiert.

Erfahrungsgemäß zeigen Liposomen, die aus 20–50 mol% kationischem Lipid CCQ22 bzw. CCQ32 bestehen, gute Gentransferraten bei geringer Zytotoxizität (Keil et al., 2001). Die Abbildungen 3.1.1.1. und 3.1.1.2. zeigen die Zusammenfassungen der Zytotoxizitätsmessungen in den getesteten Zelllinien.

Die Zytotoxizität liposomaler Gentransfers-Techniken ist in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich.

Generell konnte zwischen Zelllinien unterschieden werden, die anfällig (BT-20, SK-OV-3) oder unempfindlich (MDAH 2774, ZR-75-1) für zytotoxische Schäden aufgrund eines liposomalen Gentransfers waren. Die Zytotoxizität der Lipofektion wurde durch den Vergleich mit untransfizierten Zellen bestimmt. Bei Verwendung von Fugene6™ überlebten nur 28% der BT-20-Zellen, aber 99% der MDAH 2774-Zellen (Abbildung 3.1.1.1.).

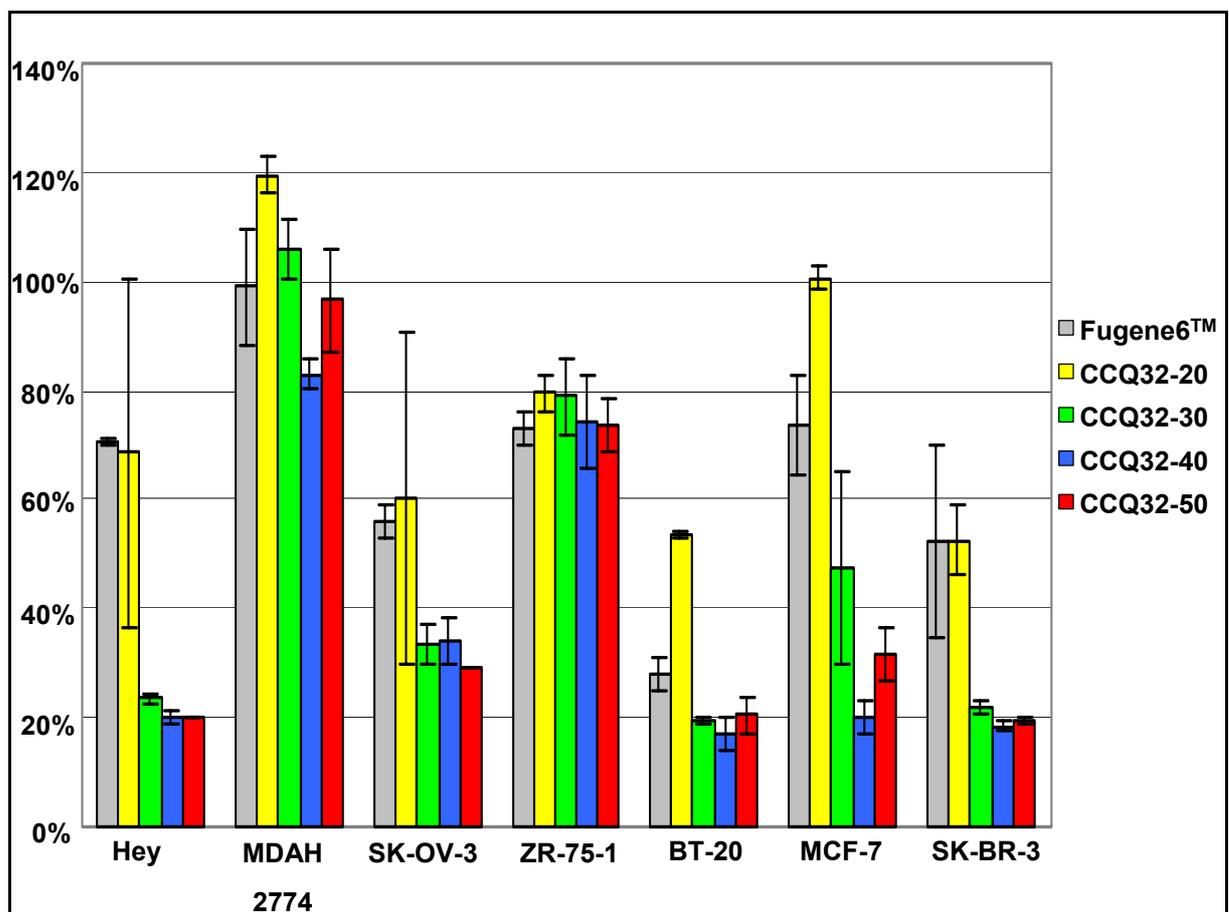


Abbildung 3.1.1.2. Zellvitalität nach liposomalem Gentransfer mittels CCQ32. Der Bezugswert (100% vitale Zellen) ergibt sich aus nicht-transfizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von zwei separaten Experimenten.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Verwendung von CCQ32-30 (30 mol% CCQ32 und 70 mol% DOPE). Bei BT-20-Zellen ergaben sich 19,5% und bei MDAH 2774-Zellen 106% vitale Zellen (Abbildung 3.1.1.2.). Somit wurden MDAH 2774-Zellen durch einen liposomalen

Gentransfer mittels Fugene6™ (P=0,049) und CCQ32-30 (P=0,033) signifikant geringer geschädigt als BT-20-Zellen.

Mit Ausnahme der MDAH 2774-Zellen war der Gentransfer mit CCQ22-Liposomen in allen Zelllinien weniger toxisch als bei Verwendung von CCQ32. Bei CCQ22-vermitteltem Gentransfer zeigte sich in den meisten Zelllinien kein Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und Mischungsverhältnis von kationischem und Helfer-Lipid (Abbildung 3.1.1.1.). Die Lipofektion mit CCQ32 führte allerdings zu erhöhter Toxizität bei steigendem Anteil des kationischen Lipids in den Liposomen (Abbildung 3.1.1.2.).

Im Vergleich zum Referenzsystem Fugene6™ bewirkte CCQ22 eine vergleichbare und je nach Mischungsverhältnis auch eine zum Teil deutlich geringere Zytotoxizität, so dass in den meisten Zelllinien nach Lipofektion über 50% vitale Zellen nachzuweisen waren (Abbildung 3.1.1.1.). Liposomen bestehend aus 20 mol% CCQ32 zeigten in allen Zelllinien eine zum Teil deutlich schwächere Toxizität als Fugene6™. Alle anderen Mischungsverhältnisse führten jedoch zu einer erhöhten Zytotoxizität und damit zur Abnahme der vitalen Zellen (Abbildung 3.1.1.2.).

### 3.1.2. Optimierung der Gentransfereffizienz bei Verwendung von CCQ22 und CCQ32

Unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lipide CCQ mit DOPE hatten je nach Zelllinie sehr verschiedene Auswirkungen auf die Vitalität der transfizierten Zellpopulation. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse von kationischem Lipid und Helferlipid analog zur Zytotoxizität auch unterschiedliche Gentransfereigenschaften aufweisen könnten.

Die Gentransfereffizienz der neuen Liposomen wurde nach Transfer des Reportergens Green fluorescent protein (GFP) durch fluorozytometrische Messung (FACS-Analyse) bestimmt und mit den Ergebnisse nach DC-Chol- bzw. Fugene6™-Lipofektion verglichen.

Die Gentransfereffizienz war abhängig von der Zelllinie und den Lipofektionsbedingungen (siehe Abbildung 3.1.2.1.). In Hey-Zellen erreichte man die höchsten Gentransferraten mit den Liposomen CCQ22-40 (30,9%), wohingegen mit Fugene6™ 14,5% und mit DC-Chol 40,9% GFP-positive Zellen erreicht wurden (Abbildung 3.1.2.1.). Die Unterschiede in den Gentransferraten zwischen CCQ22, Fugene6™ und DC-Chol waren nicht signifikant.

In MDAH 2774-Zellen, die relativ resistent gegen eine Lipofektion waren, lag die Gentransferrate zwischen 10% (CCQ22-30) und 17,2% (CCQ22-50) je nach Lipofektionsvariante. Im Vergleich mit 7,1% GFP-exprimierenden Zellen nach Fugene6™-Transfektion war die Erhöhung der Gentransferrate auf 17,2% bei Verwendung von CCQ22-50 signifikant (P=0,015).

Die Ergebnisse der analogen Experimente mit dem Lipid CCQ32 sind in Abbildung 3.1.2.2. dargestellt. Es zeigte sich wiederum eine Abhängigkeit der Gentransfereffizienz von der Zelllinie und dem Verhältnis kationisches Lipid/Helferlipid. In Hey-Zellen erreichte man mit

CCQ32-30 eine Gentransferrate von 51,9%, was einer signifikant höheren Effizienz als 14,5% GFP-positiver Zellen bei Verwendung von Fugene6™ entspricht ( $P=0,042$ ).

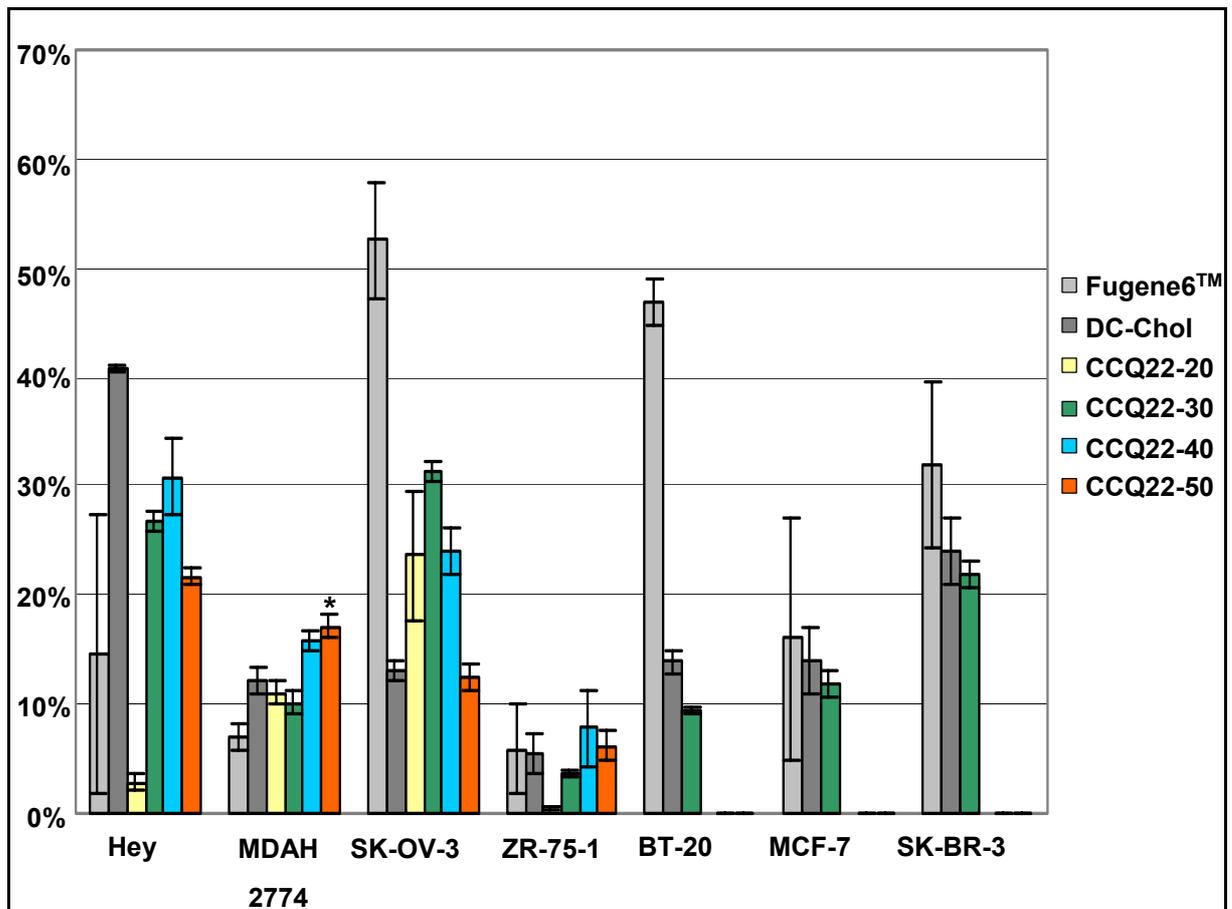


Abbildung 3.1.2.1. Gentransferraten (% GFP-positive Zellen) nach Lipofektion mit CCQ22 in unterschiedlichen molaren Mischungsverhältnissen mit DOPE. Zur Kontrolle dient die Transfektion mit einem Plasmid ohne GFP-Reporter. In den Zelllinien BT-20, MCF-7 und SK-BR-3 sind nur die Liposomen CCQ22-30 getestet worden, da diese in den meisten Fällen gute Gentransferraten liefern. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei separaten Experimenten. Die markierten Balken (\*) zeigen signifikant höhere Gentransferraten im Vergleich zur Transfektion mit Fugene6™.

Die Mammakarzinom-Zelllinie ZR-75-1 zeigte besonders eindrucksvoll, wie stark die Gentransferrate durch die Wahl der Lipofektionsbedingungen mit den CCQs beeinflusst werden konnte (Abbildung 3.1.2.2.). Der Anteil GFP-exprimierender Zellen stieg von 0,3% bei Verwendung von CCQ32-20 mit steigendem Anteil an kationischem Lipid bis auf 36,2% bzw. 36,5% mit CCQ32-40 und CCQ32-50. In Relation zu 5,9%- und 5,4%-GFP-positiven Zellen nach Lipofektion mit Fugene6™ bzw. DC-Chol war die Erhöhung der Gentransferrate mit CCQ32 signifikant ( $P=0,0043$  und  $P=0,0057$ ).

Den absolut höchsten Anteil an GFP-positiven Zellen zeigte die Zelllinie SK-OV-3 nach Lipofektion mit CCQ32-40. Hier ergab sich eine Gentransferrate von 55,5%, die aber nur unwesentlich höher lag als bei Verwendung von Fugene6™ (52,5%).

Zusammengefasst ergaben die Lipofektionsexperimente, dass CCQ22 und CCQ32 in allen getesteten Zelllinien mit Ausnahme von BT-20 vergleichbare oder signifikant höhere Gentransferraten zeigten als die Referenzsysteme Fugene6™ und DC-Chol.

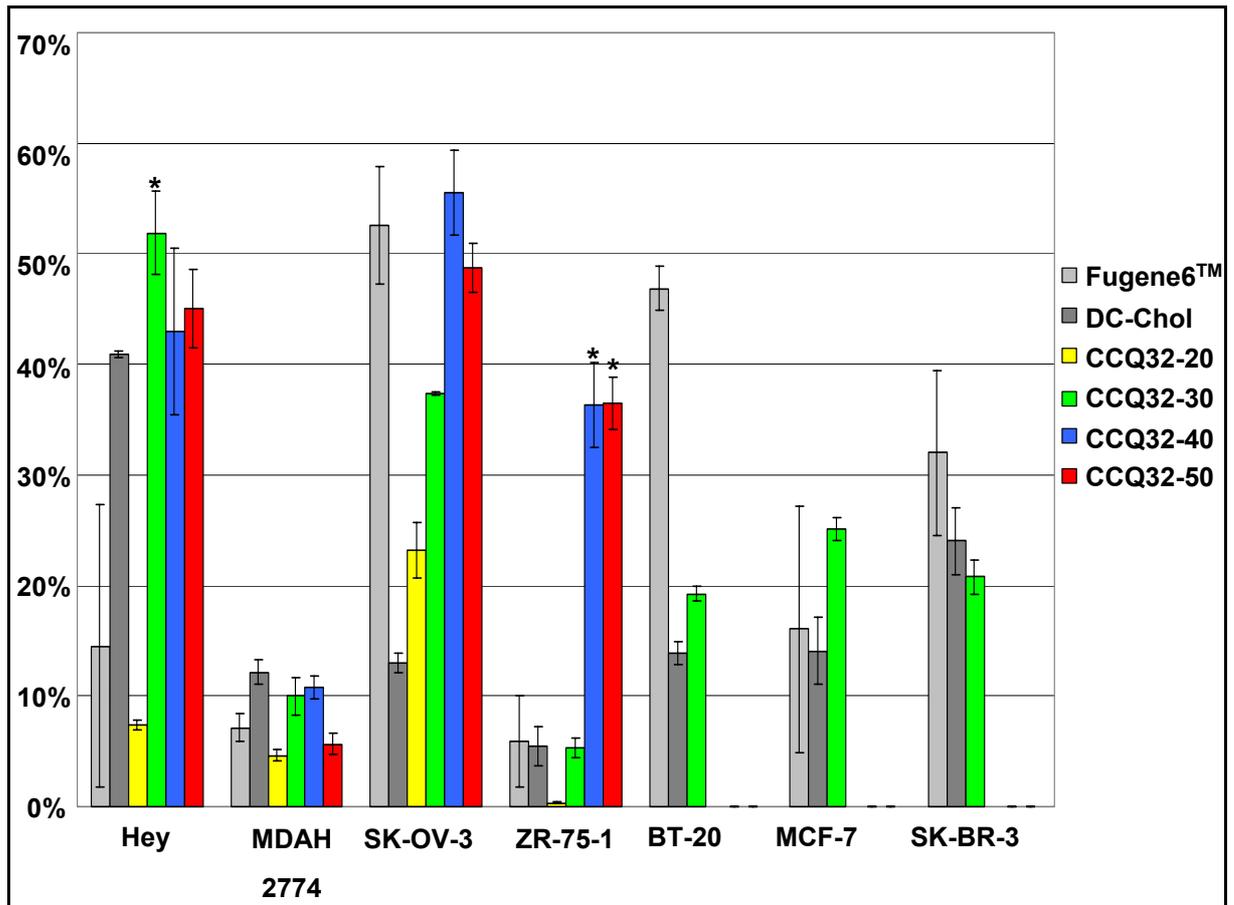


Abbildung 3.1.2.2. Gentransferraten (% GFP-positive Zellen) nach Lipofektion mit CCQ32 in unterschiedlichen molaren Mischungsverhältnissen mit DOPE. Zur Kontrolle dient die Transfektion mit einem Plasmid ohne GFP-Reportergen. In den Zelllinien BT-20, MCF-7 und SK-BR-3 sind nur die Liposomen CCQ32-30 getestet worden, da diese in den meisten Fällen gute Gentransferraten liefern. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei separaten Experimenten. Die markierten Balken (\*) zeigen signifikant höhere Gentransferraten im Vergleich zur Transfektion mit Fugene6™.

### 3.1.3. Einfluss von Aszites auf die Gentransfereffizienz

Patientinnen mit intraperitoneal metastasiertem Ovarialkarzinom leiden oftmals an der Überproduktion von Aszites. Die Nutzung einer liposomal-vermittelten Gentherapie bei intraperitonealer Applikation setzt die Resistenz des Gentransfers gegenüber dem Einfluss des Aszites voraus. Um die Beeinflussung der Lipofektion durch Aszites zu untersuchen, wurden die Zelllinien in Kultivierungsmedium mit 10% FCS oder alternativ mit verschiedenen Aszites-Konzentrationen transfiziert.

Der Einfluss von unterschiedlichen Aszites-Konzentrationen auf die Gentransfereffizienz der Lipofektion ist in der Abbildung 3.1.3.1. dargestellt. Als Testsystem dienten hier SK-OV-3-Zellen, eine Ovarialkarzinomzelllinie, bei der gute Gentransferraten erreicht werden konnten. Bei Verwendung der CCQ-Liposomen zeigte sich eine geringe Reduktion der Gentransfereffizienz von 41,3% auf 26,8% bis 33,8%. Interessanterweise war der Effekt bei 5% Aszites stärker ausgeprägt (26,8% GFP-positive Zellen) als bei 40% Aszites-Anteil (33,8% GFP-

positive Zellen). Der Rückgang der Gentransferrate schwächte sich also bei steigender Aszites-Anteil ab.

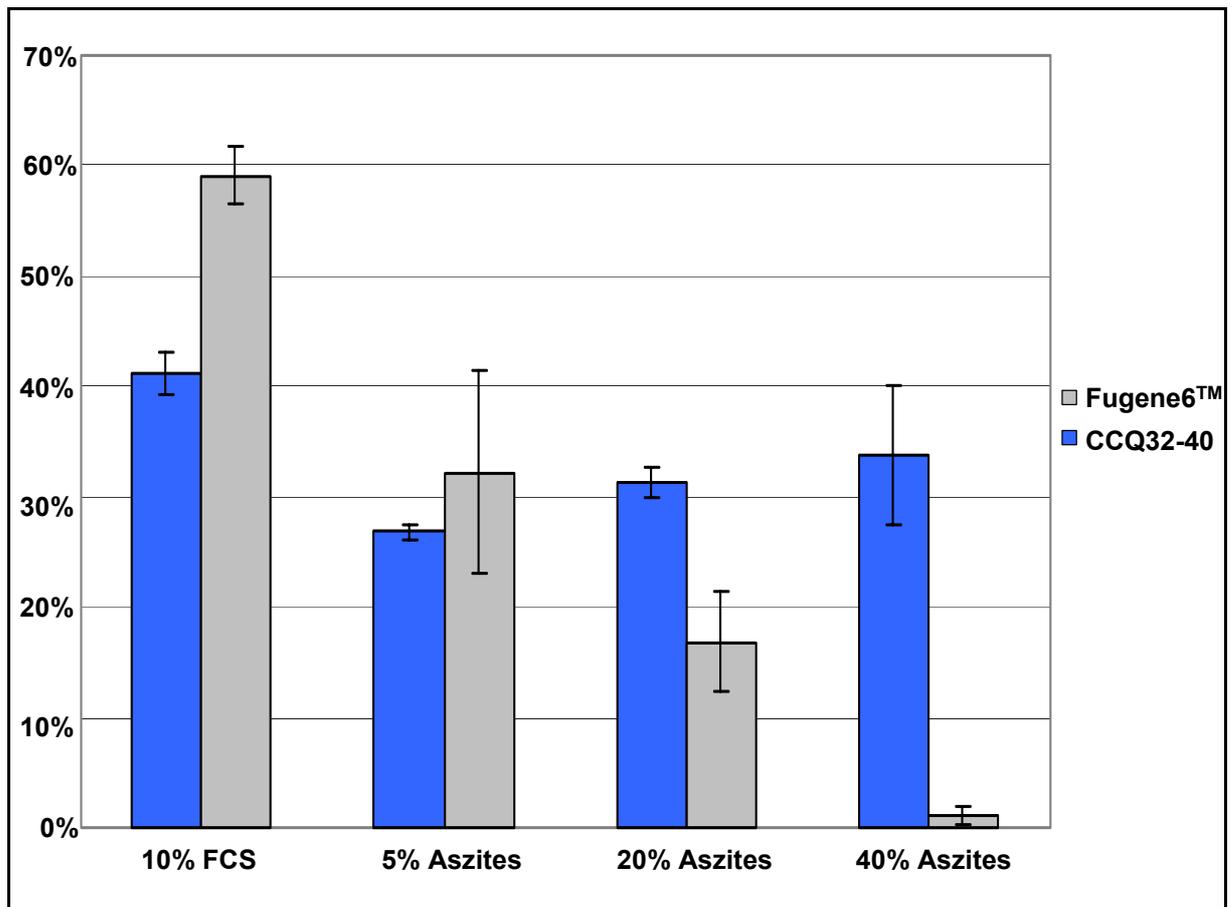


Abbildung 3.1.3.1. Einfluss von Aszites auf die Gentransferraten (% GFP-positive Zellen) der Lipofektion mit Fugene6™ und CCQ 32-40 in SK-OV-3. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei separaten Experimenten.

Bei der Lipofektion mit Fugene6™ hatte Aszites einen dramatischen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. Fugene6™ wurde durch die Gegenwart von Aszites im Gegensatz zu den CCQs sehr stark inhibiert. Ohne Aszites wurden Gentransferraten von 59,2% erreicht, wohingegen der Anteil GFP-positiver Zellen mit zunehmender Aszites-Konzentration auf 32,2% (5% Aszites), 16,4% (20% Aszites) bzw. 1,0% (40% Aszites) sank.

Durch die Variierung der molaren Mischungsverhältnisse von CCQ und DOPE wurde versucht, die Reduktion der Gentransfereffizienz bei Gegenwart von Aszites in den Ovarialkarzinomzelllinien zu minimieren (Abbildung 3.1.3.2.). Dafür wurden die Ovarialkarzinomzelllinien Hey, MDAH 2774 und SK-OV-3 mit vier verschiedenen CCQ-Liposomen transduziert, wobei sich der Rückgang der Gentransferrate relativ konstant bei allen getesteten Lipofektionsbedingungen zeigte. Allerdings war die Aszites-abhängige Reduktion der Gentransfereffizienz in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. In SK-OV-3-Zellen betrug der Rückgang der Gentransferrate 10-15%, in Hey-Zellen 5-10% und in MDAH 2774-Zellen nur weniger als 3%.

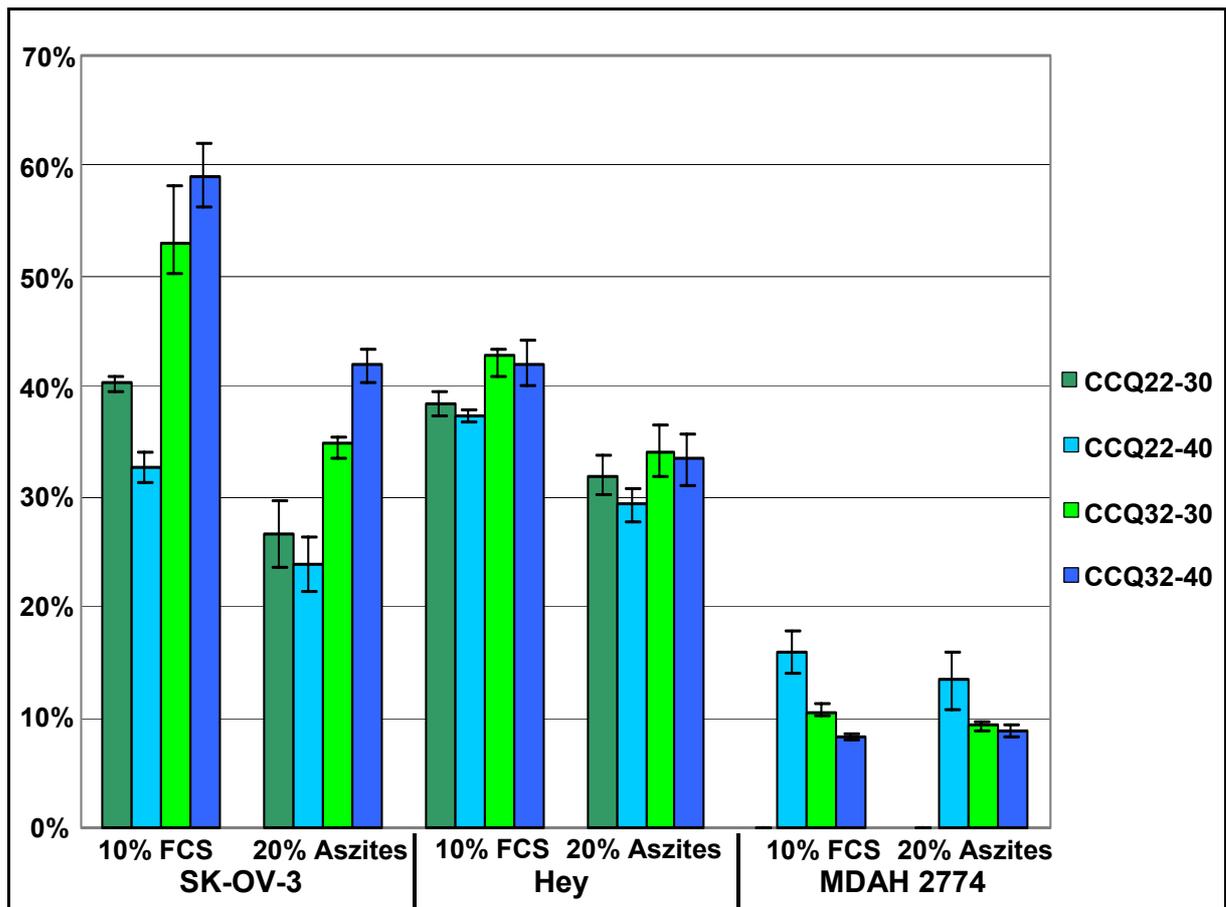


Abbildung 3.1.3.2. Einfluss von Ascites auf die Gentransferraten (% GFP-positive Zellen) in den Ovarialkarzinomzelllinien bei verschiedenen Lipofektionsbedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei separaten Experimenten.

### 3.2. Effizienz und Toxizität des adenoviralen Gentransfers

Die Adenoviren stellen aufgrund ihrer guten Gentransfereigenschaften in teilende und ruhende Zellen das zur Zeit bedeutendste virale Vektorsystem dar. Sie vermitteln in vitro und in vivo einen effizienten Gentransfer (Robbins et al., 1998), allerdings ist auch eine virale Infektion toxisch für die Zelle. Aus diesem Grund wurde der Anteil vitaler Zellen nach adenoviraler Infektion gynäkologischer Tumorzelllinien untersucht. Dabei wurden verschiedene Virusmengen für die Infektion eingesetzt. Die Virustiter wurden als „multiplicity of infection“ (MOI) angegeben. Eine MOI von 100 bedeutet, dass pro Zelle 100 infektiöse adenovirale Partikel eingesetzt wurden, wobei die Anzahl infektiöser Partikel auf den TCID<sub>50</sub>-Titer bezogen war. Die Quantifizierung der vitalen Zellen erfolgte mit MTT-Assays.

Die Abbildung 3.2.1. zeigt erwartungsgemäß, dass hohe Virusdosen stärker toxisch auf die Zellen wirkten. Man sah in allen Zelllinien eine Abnahme der vitalen Zellen nach viraler Infektion. Wie auch bei der Lipofektion wurden bei der adenoviralen Transfektion Zelllinienabhängige Unterschiede in der Zytotoxizität beobachtet.

Die Infektionsdosis von 10 viralen Partikeln pro Zelle (10 MOI) führte bei den meisten Zelllinien zu einer relativ geringen Toxizität, so dass über 60% vitale Zellen gemessen wurde.

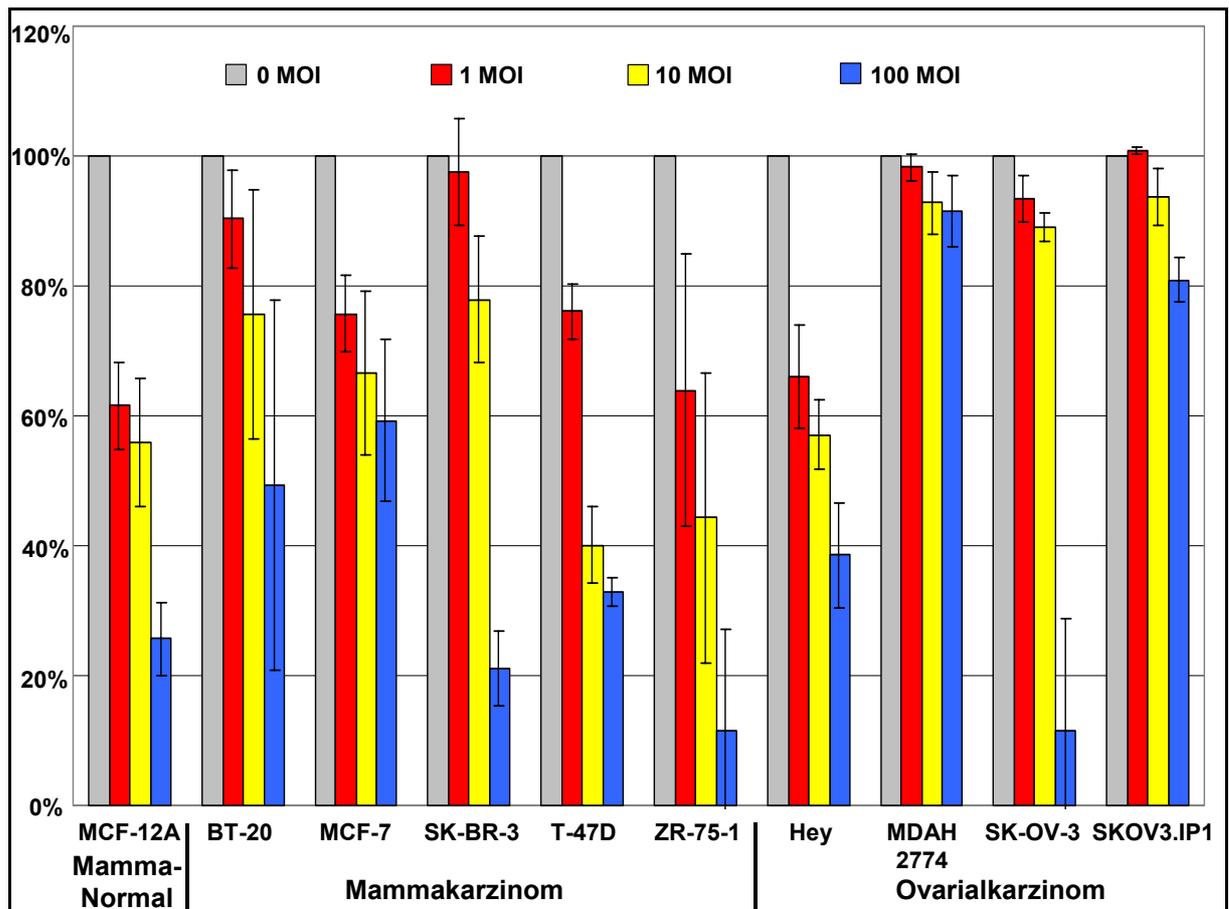


Abbildung 3.2.1. Toxizität einer adenoviralen Infektion am Beispiel des Ad-CMV-TK in den gynäkologischen Zelllinien. Aufgetragen ist der Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellkulturen (0 MOI). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Einzelmessungen.

Bei 100 MOI zeigten sich starke Unterschiede. MDAH 2774- und SKOV3.IP1-Zellen waren relativ unempfindlich gegenüber der adenoviralen Transfektion, hier überlebten 91% (MDAH 2774) bzw. 81% (SKOV3.IP1) der Zellen. Die Zelllinien ZR-75-1 und SK-OV-3 waren dagegen sehr empfindlich gegen die hohe Virusdosis, denn es konnten nur 12% vitale Zellen detektiert werden. Nach Infektion mit 100 MOI von Ad-CMV-TK konnten also in der Zelllinie MDAH 2774 signifikant mehr vitale Zellen nachgewiesen werden, als in den Zelllinien ZR-75-1 ( $P=0,014$ ) und in SK-OV-3 ( $P=0,016$ ).

Bei Verwendung von unterschiedlichen adenoviralen Vektoren fiel die toxische Wirkung in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark aus (siehe auch 3.4.3.). In den meisten Fällen zeigten sich aber grundsätzliche Tendenzen, d.h. eine bestimmte Zelllinie war generell empfindlich gegenüber einer adenoviralen Infektion bzw. ein bestimmtes Virus war in allen Zelllinien relativ aggressiv und zytotoxisch.

### 3.3. Transkriptionelle Regulation der Genexpression

Um eine Zell- bzw. Gewebe-spezifische Gentherapie zu entwickeln, wurde versucht, mit geeigneten Promotorelemente die Expression der transfizierten Gene nur in bestimmten

Zelltypen zu induzieren. Für diese transkriptionelle Steuerung der Gentherapiespezifität wurden die Promotoren der Gene multiple drug resistance (MDR),  $\alpha$ -Laktalbumin (ALA),  $\beta$ -Casein (CAS), Midkine (MK) und Cyclooxygenase-2 (COX2) verwendet. Für die Analyse der Promotoraktivität mussten die Promotoren dafür vor geeignete Reportergene bzw. das Suizidgen HSV-TK kloniert werden. Als Reportergene wurden neben der Luziferase (aus *Photinus pyralis*) auch die  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ* aus *E.coli*) verwendet. Die Promotoren MDR, ALA und CAS wurden im Rahmen dieser Arbeit in geeignete Vektoren kloniert, wohingegen die Promotoren MK und COX2 in Kombination mit dem Reportergen Luziferase bzw. dem Suizidgen HSV-TK als rekombinante Adenoviren von der Arbeitsgruppe um Prof. Curiel (University of Alabama, Birmingham, Alabama, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Als Kontrollpromotor wurde der konstitutive, starke virale „immediate early“ Promoter des Cytomegalovirus (CMV) verwendet und in allen Experimenten eingesetzt.

### 3.3.1. Klonierung der Promotorsequenzen

Die Promotorelemente ALA und CAS wurden mittels PCR aus genomischer DNA von Lymphozyten amplifiziert. Die Primer enthielten neben den homologen Regionen zusätzlich die Sequenzen für die Restriktionsendonukleasen Bgl II bzw. Hind III, so dass die Promotorregionen direkt in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Reportervektors pGL3-Basic (Promega, Mannheim) kloniert werden konnten. Das Enhancer-Element des CAS-Promotors wurde ebenfalls aus genomischer DNA von Lymphozyten amplifiziert. Die Primer enthielten artifizielle Schnittstellen für die Enzyme Sma I und Xho I, so dass das Enhancer-Element direkt vor den CAS-Promotor in die MCS des Vektors integriert werden konnte.

Die Regulatorelemente MDR und CMV wurden aus den Plasmiden pSP72-*mdr*<sub>Prom</sub> (zur Verfügung gestellt von Prof. Walter, Dr. Stein, Max-Dellbrück-Zentrum, Berlin) bzw. pRC/CMV (Invitrogen, Karlsruhe) über Bgl II- und Hind III-Verdau in pGL3-Basic eingefügt.

Zum Austausch des Reportergens wurde die Luziferase über die Enzyme Hind III/Xba bzw. Hind III/Bam HI ausgeschnitten und gegen die Genkassetten für  $\beta$ -Galaktosidase (Hind III/Bam HI) oder HSV-TK (Hind III/Xba I) ausgetauscht. Die  $\beta$ -Galaktosidase wurde aus dem Plasmid pRSV- $\beta$ Gal (zur Verfügung gestellt von Dr. Makri, Onkologische Chemie, Universität Düsseldorf) und HSV-TK aus dem Vektor pVP22&TK (zur Verfügung gestellt von Dr. Prisack, Onkologische Chemie, Universität Düsseldorf) entnommen. Die Plasmidkarten aller klonierten Vektoren sind in Anhang I aufgelistet.

### 3.3.2. Sequenzierung der Promotorelemente

Zur Kontrolle der korrekten Klonierung wurden die Promotorbereiche der pGL3-Vektoren (ALA, CASENH, CMV, MDR) sequenziert, damit eine Mutation der Basensequenz

ausgeschlossen werden konnte. Die Sequenzierung lieferte eine Basensequenz, die vor der MCS begann und im Reporter gen Luziferase endete, so dass die gesamte MCS mit den eingefügten Promotorsequenzen analysiert werden konnte. Die ermittelte Basensequenz zeigte keinerlei Abweichungen von der veröffentlichten Sequenz.

### 3.3.3. Überprüfung der Funktionalität der klonierten Promotoren

Trotz der überprüften Promotorbasensequenz liefert erst der Nachweis der Genexpression Gewissheit über die korrekte regulatorische Funktion. Die Promotoren ALA, CASENH, CMV und MDR wurden in Kombination mit dem Reporter gen lacZ untersucht, da der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression mittels der X-Gal-Färbung zeit- und kostensparend durchgeführt

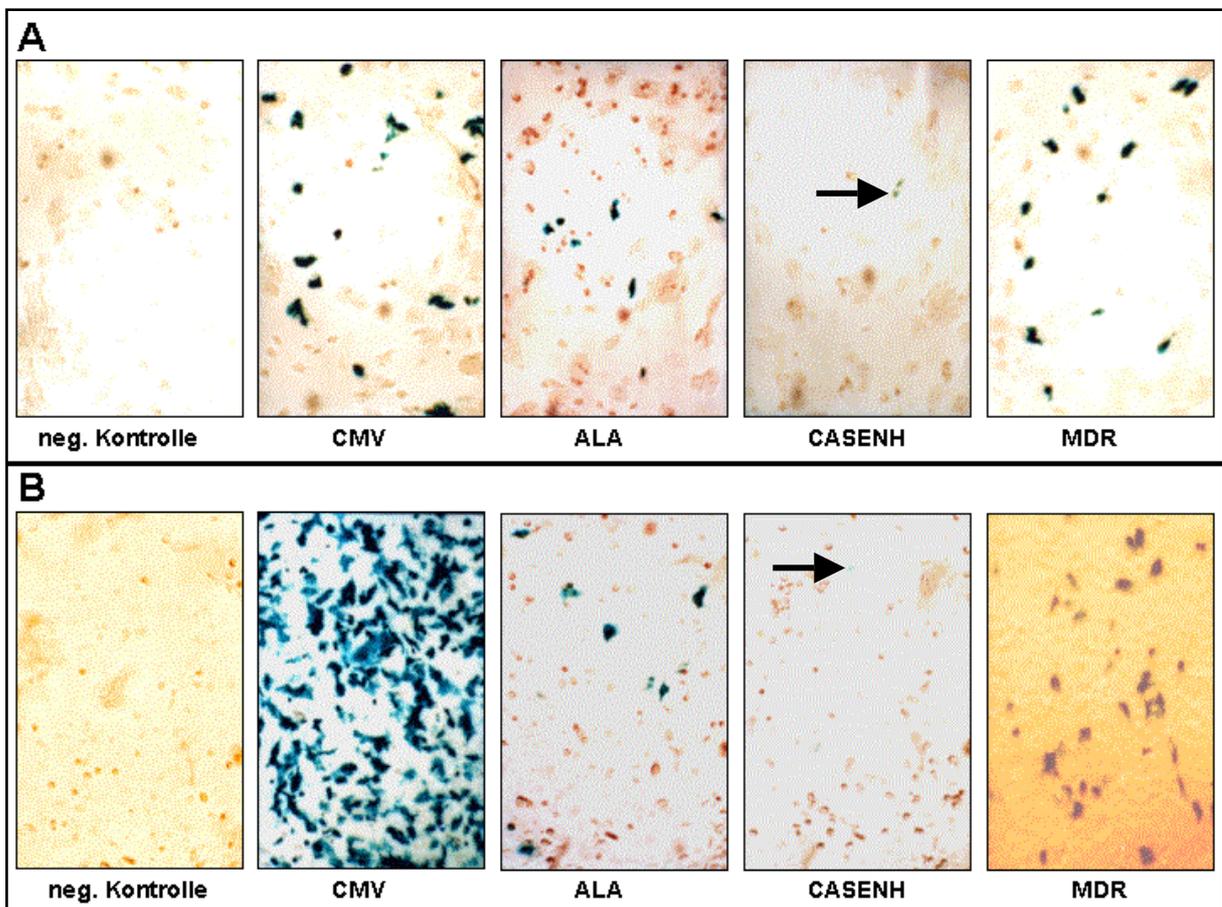


Abbildung 3.3.3.1. X-Gal-Färbung der Zelllinien ZR-75-1 (A) und SK-OV-3 (B) nach Lipofektion mit Expressionsplasmiden ohne (neg. Kontrolle) bzw. mit den Promotoren ALA, CASENH, CMV und MDR

werden kann. Das X-Gal dient als Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase und führt zu einer Blaufärbung der lacZ-exprimierenden Zellen. In Abbildung 3.3.3.1. sind exemplarisch die X-Gal-Färbungen von zwei Zelllinien (ZR-75-1, SK-OV-3) dargestellt. Bei den Promotoren ALA und CASENH wurden die Zellen vor der liposomalen Transfektion mit den Hormonen Prolactin (5  $\mu$ g/ml) und Dexamethason (1  $\mu$ mol/l) inkubiert. Dadurch sollten die hormonellen Bedingungen optimiert werden, um die Aktivität der Promotoren und so die Genexpression

zu ermöglichen. Für den Promotor MDR wurden im Falle von SK-OV-3 MDR-resistente Zellen und bei ZR-75-1 MDR-native Zellen eingesetzt.

In beiden Zelllinien war bei Verwendung eines Kontrollplasmids mit dem lacZ-Reportergen ohne vorgeschalteten Promotor keine Färbung der Zellen zu sehen. Bei Verwendung des starken CMV-Promotors konnte man deutlich die Blau-Färbung der transfizierten Zellen erkennen. Im Vergleich von ZR-75-1 und SK-OV-3 fiel der höhere Anteil an gefärbten SK-OV-3-Zellen auf. Bei Verwendung von ALA und MDR zeigte die X-Gal-Färbung die Funktionalität der spezifischen Promotoren, da ein deutlicher Anteil der Zellen blau-gefärbt war. Der CASENH-Promotor allerdings bewirkte nur in einzelnen Zellen eine sehr geringe Blaufärbung (Markierung durch Pfeil), die auch durch längere hormonelle Induktion nicht verbessert werden konnte.

Die X-Gal-Färbung lieferte den Nachweis der lacZ-Expression bei Verwendung der Promotoren CMV, ALA und MDR. Die Genexpression unter der regulativen Kontrolle des CASENH-Promotors konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

#### 3.3.4. Induktion der spezifischen Promotoren

Mit Hilfe von sensibleren und quantifizierbaren Analysemethoden wurden die Aktivitäten der Promotorregionen untersucht, um die Induzierbarkeit der Genexpression durch die regulativen Elemente näher zu definieren.

##### 3.3.4.1. Induktion der MDR-Expression

Die Analyse der MDR-gesteuerten Genexpression erfolgte mittels RT-PCR. Das Chemotherapeutikum Doxorubicin gehört zur Wirkstoffklasse der Anthrazykline und eine Resistenz gegen diesen Wirkstoff wird über das MDR-Gen ausgeprägt. In der Zellkultur konnte nur in SK-OV-3-Zellen ein Wachstum in Kulturmedium mit Doxorubicin erreicht werden. Diese Resistenz der Zellkultur gegen Doxorubicin basierte auf der Expression des Resistenzgens MDR. Für die Analyse der Expressionsstärke des MDR-Gens und damit der Aktivität des MDR-Promotors wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde die RNA von Zellkulturen eingesetzt, die mit verschiedenen Konzentrationen von Doxorubicin präinkubiert wurden. Zur Detektion und Quantifizierung diente ein DNA-Sequencer (A.L.F., Pharmacia), der die Fluoreszenz-markierten RT-PCR-Produkte nach Laseranregung mithilfe einer Photodiode messen kann. Zur Relativierung der Messergebnisse wurde ein Referenzgen parallel gemessen, das konstitutiv exprimiert wird. Hier wurde als Referenzgen die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, dessen RNA ein PCR-Produkt von 195 bp lieferte, wohingegen MDR in einem 177 bp-großen Produkt resultierte. Die elektrophoretische Auftrennung im A.L.F. trennte die beiden PCR-Produkte, so dass

zwei Signale detektiert werden konnten. Das frühere Signal zeigt die Menge an MDR-PCR-Produkt und das spätere Signal die GAPDH-Produkte. Die Abbildung 3.3.4.1.1. zeigt das Ergebnis der A.L.F.-Analyse von SK-OV-3 Kulturen, die mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen inkubiert wurden.

Die Relativierung der Messung auf das Ergebnis mit GAPDH ermöglichte einen Vergleich der zwei unterschiedlichen PCR-Produkte, denn Unregelmäßigkeiten aufgrund variabler Qualität der isolierten RNA, in der cDNA-Synthese oder der anschließenden PCR-Amplifikation wurden minimiert, da es sich bei GAPDH um ein konstitutiv exprimiertes Gen handelt. Daher sollte die Expressionsstärke in allen Zellkulturen gleich stark erfolgen.

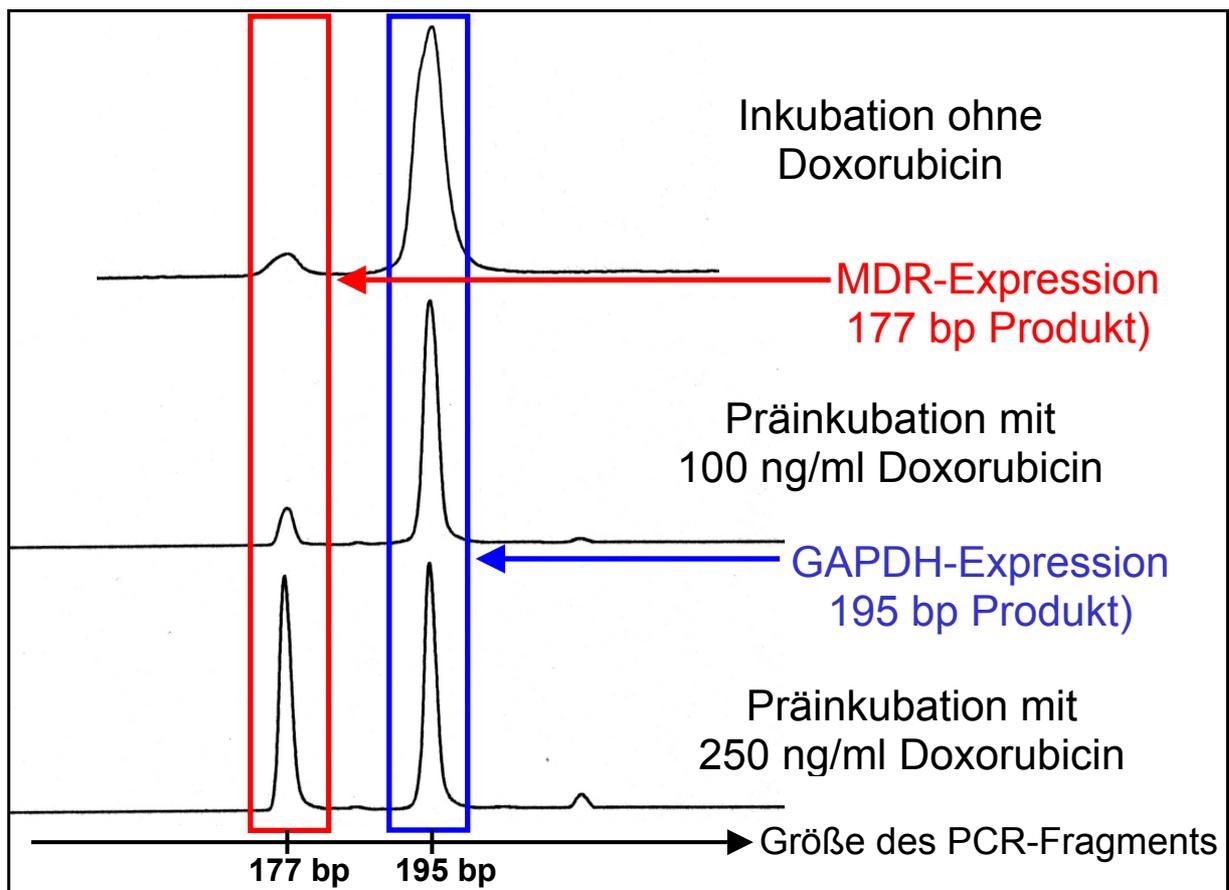


Abbildung 3.3.4.1.1. A.L.F.-Analyse der MDR-Expression in SK-OV-3 nach Inkubation mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen

Die Ergebnisse zeigten eine geringe MDR-Expression der SK-OV-3 Zellen, auch wenn sie ohne Doxorubicin kultiviert wurden. Diese Basalexpression des MDR-Gens konnte durch die Präinkubation mit Doxorubicin gesteigert werden. Bei beiden Doxorubicin-Konzentrationen stieg die Menge an detektiertem MDR-PCR-Produkt, erkenntlich an der Fläche unter der Signalkurve, deutlich an. Im Vergleich zu GAPDH konnte man eine Zunahme der MDR-Expression bei Erhöhung der Doxorubicin-Konzentration von 100 ng/ml auf 250 ng/ml erkennen. Die Stärke der MDR-Genexpression nahm mit steigender Doxorubicin-Konzentration zu. Also scheint die MDR-Promotor-Aktivität, abgesehen von einer geringen basalen Aktivität, durch Doxorubicin konzentrationsabhängig induzierbar zu sein.

### 3.3.4.2. Quantifizierung der ALA-, CASENH- und MDR-gesteuerten Genexpression

Die Aktivität der Promotoren ALA, CASENH und MDR wurde mit einem Luziferase-Assay nachgewiesen. Das Meßsystem basiert auf der Promotor-regulierten Luziferase-Expression. Die emittierte Lumineszenz kann quantifiziert werden und so die Aktivität der Luziferase und damit die Promotor-Aktivität bestimmt werden. Zur Relativierung der Messergebnisse wurde ein Referenzsystem verwendet. Hierbei handelte es sich um das Gen  $\beta$ -Galaktosidase unter der regulativen Kontrolle des konstitutiven  $\beta$ -Aktin-Promotors (Flötotto, 2001). Da zum Transfer der Expressionsplasmide die Lipofektion verwendet wurde, braucht man das Referenzsystem, um z.B. Schwankungen in der Gentransfereffizienz auszugleichen.

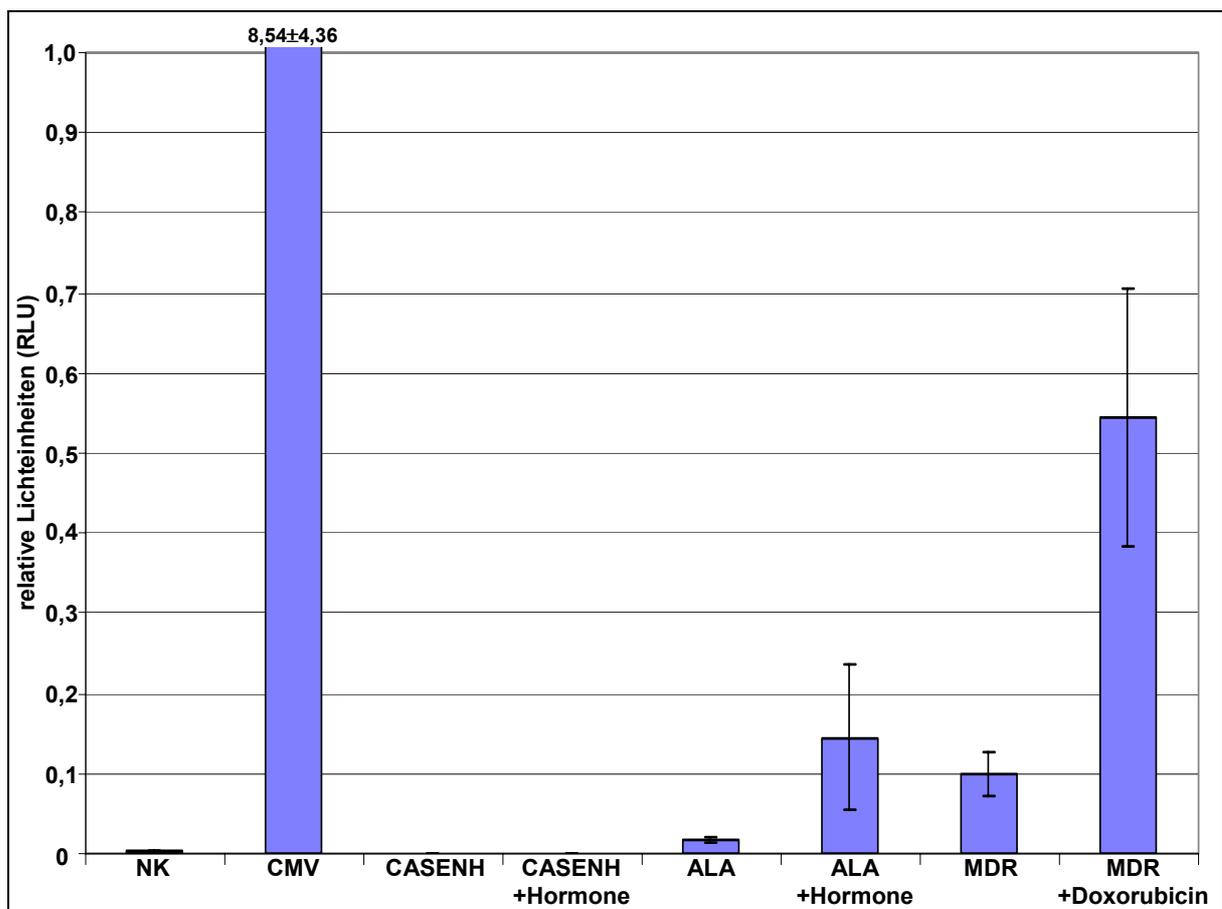


Abbildung 3.3.4.2.1. Luziferase/Galaktosidase-Assay nach Fugene6<sup>TM</sup>-Transfektion von Luziferase-Reporterplasmiden mit unterschiedlichen Promotoren in SK-OV-3. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten.

Die prinzipielle Funktionalität der Promotoren wurde in SK-OV-3-Zellen gezeigt. Deshalb wurden für die Quantifizierung der Promotoraktivität ebenfalls SK-OV-3-Zellen verwendet, die je nach getestetem Promotor unterschiedlich vorbehandelt wurde. Zur Stimulation des ALA- und CASENH-Promotors wurden die Hormone Prolactin (5  $\mu$ g/ml) und Dexamethason (1  $\mu$ mol/l) eingesetzt, für den MDR-Promotor das Zytostatikum Doxorubicin (3,2  $\mu$ g/ml).

Bei diesen Versuchen diente das Plasmid pGL3-Basic (Promega, Mannheim) als Negativkontrolle (NK), da es sich hierbei um einen Expressionsvektor handelt, der das Reporter-gen Luziferase ohne vorgeschalteten Promotor enthält und nur eine minimale Hintergrundaktivität

zeigte. Der virale Promotor CMV führte zur starken Expression der Luziferase (8,54 RLU), wohingegen der CASENH-Promotor, unabhängig von Hormonen, keine Reporterexpression vermitteln konnte (Abbildung 3.3.4.2.1.). Für den Promotor ALA konnte die induzierbare Reporterexpression durch die Behandlung der Zellen mit Dexamethason und Prolactin gezeigt werden. In den unbehandelten Zellen war der Promotor nahezu inaktiv (0,016 RLU), durch hormonelle Stimulation wurde eine 9-fach höhere Promotoraktivität erreicht (0,145 RLU). Der MDR-Promotor zeigte, wie schon in der RT-PCR-Analyse gesehen, eine geringe Aktivität in SK-OV-3 (0,099 RLU). Diese basale Aktivität ließ sich durch die Vorbehandlung der Zellen mit Doxorubicin um den Faktor 5,5 steigern (0,544 RLU).

### 3.4. Adenoviraler Gentransfer

Um die Vorteile des effizienteren Gentransfers durch adenovirale Vektorsysteme nutzen zu können, wurden die erfolgsversprechenden Promotoren ALA und MDR, sowie der Kontrollpromotor CMV, mithilfe des AdEasy™-Systems in das adenovirale Genom integriert. Die resultierenden rekombinations-defizienten Adenoviren des Serotyps 5 enthielten die Promotorelemente, die jeweils die Expression des Reportergens Luziferase bzw. des Suizidgens HSV-TK regulierten. Da für den CASENH-Promotor trotz Hormon-Behandlung der Zellen weder in der X-Gal-Färbung noch in den Luziferase/Galaktosidase-Assays eine Funktionalität bzw. Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Promotor nicht mehr in den weiteren experimentellen Ansätzen verwendet.

Zusätzlich zu den selbst klonierten Promotoren lagen für die adenoviralen Experimente die Promotoren der Gene Midkine (MK) und Cyclooxygenase2 (COX2) vor, die in Kombination mit Luziferase und HSV-TK von Prof. Curiel (Birmingham, Alabama, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Desweiteren kam das RGD-modifizierte Adenovirus RGD-CMV-TK zum Einsatz, das die HSV-TK unter der regulativen Kontrolle des CMV-Promotors enthält.

#### 3.4.1. Klonierung und Produktion der rekombinanten Adenoviren

Für die Klonierung der Expressionskassetten, bestehend aus Promotorelement und Reporterogen, wurden pShuttle-Plasmide des AdEasy™-Systems verwendet. Zur Herstellung der Kontrollviren konnte ein pShuttle-CMV mit integriertem CMV-Promotor genutzt werden, so dass nur noch das Gen eingefügt werden musste. Die Gene HSV-TK und Luziferase wurden aus den pGL3-basierenden Vektoren (siehe 3.3.1. und Anhang I) mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I ausgeschnitten und in pShuttle-CMV eingefügt. Die Genkassetten ALA-Luc und ALA-HSVTK wurden mittels Not I und Sal I in pShuttle integriert. Für den MDR-Promotor musste eine 2-Schritt-Klonierung angewendet werden. Es wurde zuerst das Gen (HSV-TK oder Luc) durch die Enzyme Not I und Sal I in pShuttle eingefügt und in

einem zweiten Schritt der MDR-Promotor über Nhe I und Hind III vor das Gen kloniert. Die Plasmidkarten aller klonierten Vektoren sind in Anhang I aufgeführt. Die homologe Rekombination mit dem Adenovirus-Genom ( $\Delta E1\Delta E3$ ) erfolgte in *E.coli*. Nach Transfer des rekombinanten Adenovirus-Genoms in die Verpackungszelllinie 293 kam es dort zur Produktion der adenoviralen Vektoren. Um Fehler während der Klonierung und Verpackung des Genoms auszuschließen, wurden die resultierenden Adenovirus-Plaques hinsichtlich ihrer eingefügten DNA-Fragmente analysiert und ein Funktionstest durchgeführt. Mittels PCR wurden alle Plaques auf das Vorhandensein der eingefügten Promotorelemente und Gene überprüft. Dem Nachweis der korrekten PCR-Produkte folgte ein funktioneller Nachweis der Genexpression. Die Luciferase-Expression wurde mit einem Luciferase-Assays und die HSV-TK-Expression mittels MTT-Assay bestimmt. Die Plaques mit den höchsten Genexpressionen wurden für die Virusproduktion verwendet. Nach Aufreinigung der Viren und Bestimmung der Virentiter wurden die rekombinanten Adenoviren in Luciferase- bzw. MTT-Assays eingesetzt.

### 3.4.2. Nachweis der Promotor-Aktivität durch Luciferase-Assays

Die Aktivität der Promotoren ALA, CMV, COX2, MDR und MK wurde durch Luciferase-Assays in den verfügbaren gynäkologischen Zelllinien analysiert. Als Negativ-Kontrolle diente das Virus RGD-CMV-TK, da es keine Luciferase-Genkassette enthält und somit auch keine Luciferase-Aktivität besitzen kann. Lumineszenzen nach Infektion mit RGD-CMV-TK wurden als Hintergrundsignale der Zellkulturen gewertet.

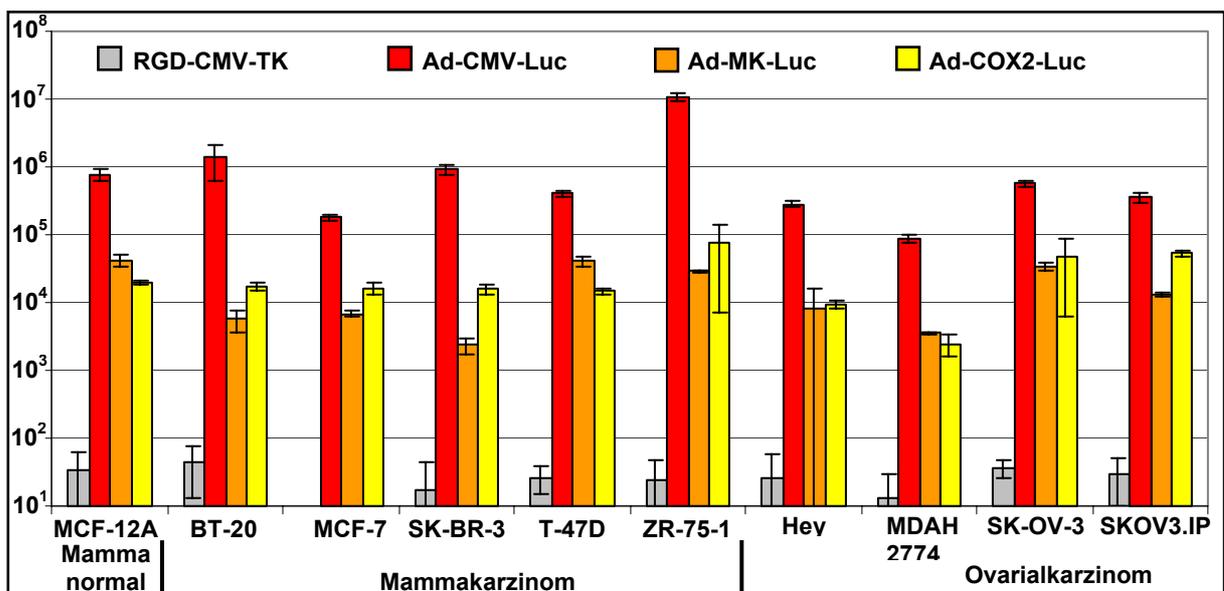


Abbildung 3.4.2.1. Luciferase-Aktivitäten (RLU) der Promotoren CMV, MK und COX2 in den gynäkologischen Zelllinien nach Infektion mit 100 MOI. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten.

Da es sich in allen adenoviralen Konstrukten um isogenetische Vektoren handelte, konnte innerhalb einer Zelllinie eine Relativierung der Promotorstärke auf die Aktivität des CMV-

Promotors vorgenommen werden. In den Versuchen wurde keine Relativierung der Luziferase-Aktivität auf ein Referenzsystem, z.B. den Proteingehalt der Zellsuspension, durchgeführt. Deshalb waren keine Vergleiche zwischen zwei Zelllinien möglich, da Unterschiede in der Zellzahl, der Gentransfereffizienz oder der Toxizität der Virusinfektion in den unterschiedlichen Zelllinien unberücksichtigt blieben.

Der CMV-Promotor führte in allen Zelllinien zu einer starken Luziferase-Expression (Abbildung 3.4.2.1.). Allerdings deuten die Abweichung in den Luziferase-Aktivitäten um den Faktor 100 in den Zelllinien ZR-75-1 und MDAH 277) auf Unterschiede in der Gentransfereffizienz hin, denn diese starken Abweichungen lassen sich nur schwer alleine auf Unterschiede in der Zellzahl und der Toxizität zurückführen.

Die Promotoren MK und COX2 zeigten ebenfalls in allen Zelllinien eine deutliche Aktivität, d.h. die Promotoren MK und COX2 können eine Genexpression in gynäkologischen Tumorzelllinien auslösen.

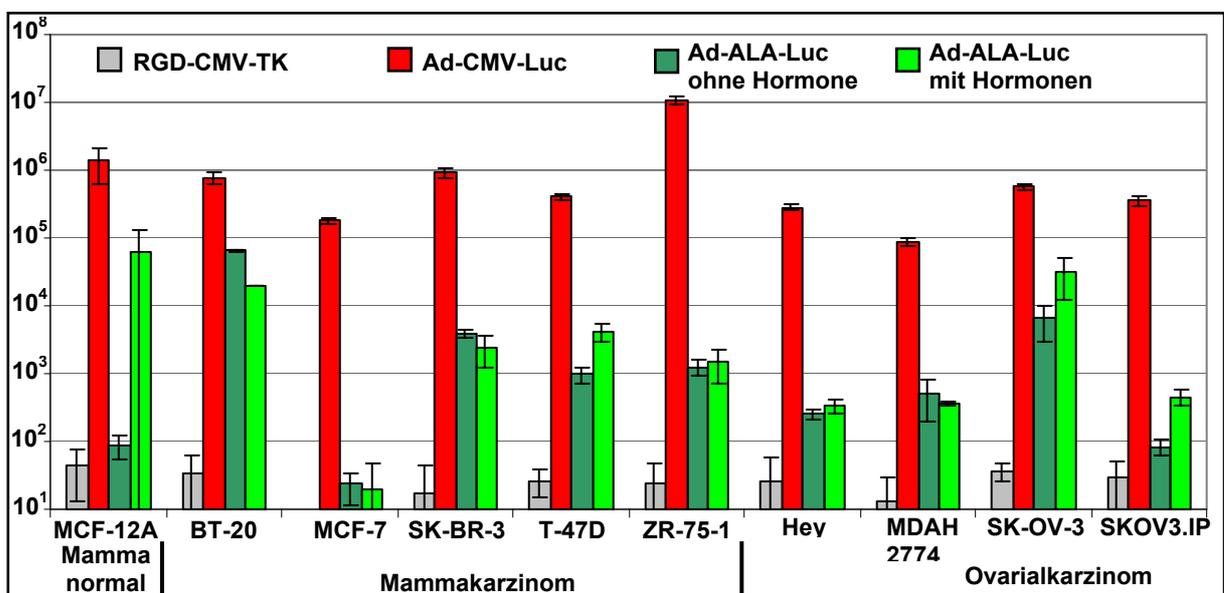


Abbildung 3.4.2.2. Luziferase-Aktivität (RLU) der Promotoren CMV und ALA in den gynäkologischen Zelllinien nach Infektion mit 100 MOI. Für den ALA-Promotor sind die Versuche mit und ohne Hormoninkubation (5 µg/ml Prolactin, 1 µmol/l Dexamethason) der Zellen durchgeführt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei Experimenten.

Im Vergleich zu MK und COX2 zeigte sich bei Verwendung des ALA-Promotors ein differenzierteres Bild (Abbildung 3.4.2.2.). Es ließen sich Zelllinien unterscheiden, die ohne Hormon-Vorbehandlung entweder keine ALA-vermittelte Reporterexpression (MCF-7) bzw. relativ hohe Expressionsstärken zeigten (BT-20, SK-OV-3). In MCF-7-Zellen lag die Stärke des Luziferase-Signals nur unwesentlich höher als bei Verwendung des RGD-CMV-TK-Virus ohne Luziferase-Gen, aber in BT-20- und SK-OV-3-Zellen wurden 100-1000x höhere Messwerte gemessen.

Bei der Analyse des Hormoneinflusses auf die ALA-vermittelte Luziferase-Expression ergab sich, dass vor allem die Normalgewebe-Zelllinie MCF-12A einen starken Anstieg der

Luziferase-Expression um ca. den Faktor 1000 nach Hormongabe zeigte (Abbildung 3.4.2.2.). In 3 weiteren Zelllinien (T-47D, SK-OV-3, SKOV3.IP1) ließ sich eine hormonelle Induktion der Luziferase-Expression um ca. den Faktor 7 beobachten, wohingegen die anderen Zelllinien keine Zunahme der Signal-Intensität nach Hormongabe zeigten.

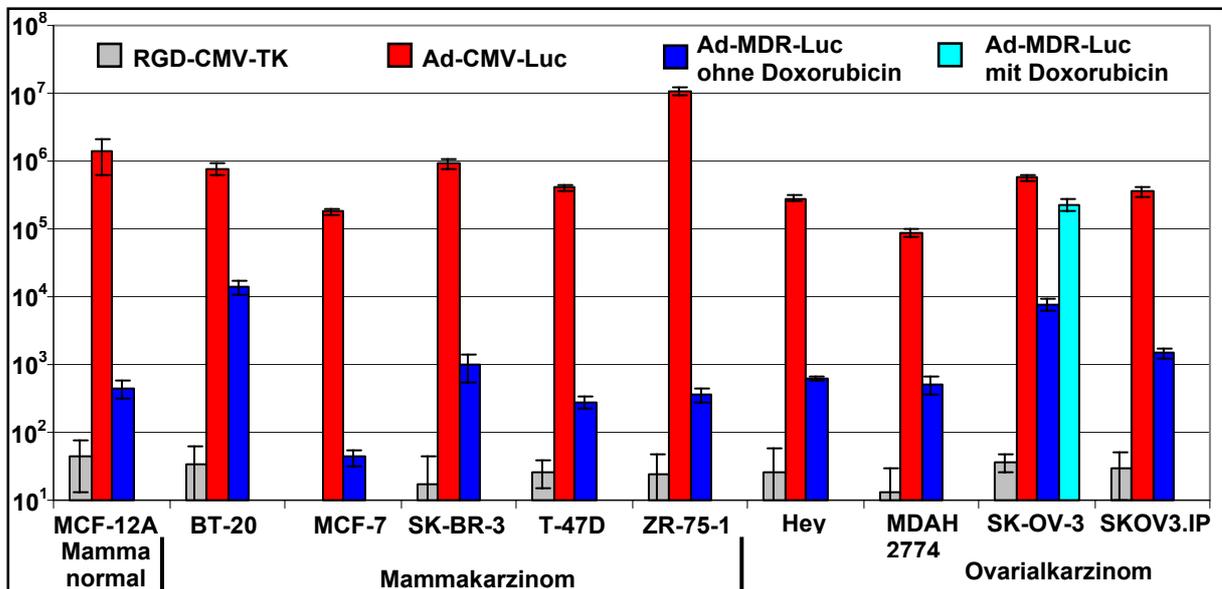


Abbildung 3.4.2.3. Luziferase-Aktivität (RLU) der Promotoren CMV und MDR in den gynäkologischen Zelllinien nach Infektion mit 100 MOI. Für den MDR-Promotor sind in SK-OV-3 die Versuche mit und ohne Doxorubicin-Inkubation (3,2 µg/ml) der Zellen durchgeführt worden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei Experimenten.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Verwendung des MDR-Promotors (Abbildung 3.4.2.3.). Die Expressionsstärken der Zellkulturen ohne Vorbehandlung mit Doxorubicin ergab unterschiedliche Basisaktivitäten in den diversen Zelllinien. In MCF-7-Zellen zeigte der MDR-Promotor nur eine minimale Aktivität, da die Signalstärke nur wenig stärker als das Hintergrundsignal (RGD-CMV-TK) war. In BT-20- und SK-OV-3-Zellen konnten deutlich höhere Luziferase-Aktivitäten gemessen werden. Die Präinkubation von SK-OV-3-Zellen mit Doxorubicin zeigte einen deutlichen Anstieg der MDR-Promotor-Aktivität. Die Zunahme des Luziferase-Signals um einen Faktor 25 verdeutlicht die Induzierbarkeit des MDR-Promotors durch Anthrazyklin-Gabe.

Die Luziferase-Assays zeigten, dass die Promotoren MK und COX2 in allen getesteten gynäkologischen Zelllinien aktiv waren, wohingegen ALA und MDR nur in einigen Zelllinien geringe Aktivität besaßen, die aber durch die Vorbehandlung der Zellen mit Hormonen bzw. Anthrazyklinen induziert oder verstärkt werden konnte.

### 3.4.3. Promotor-regulierte in vitro Suizidgentherapie

Obwohl in 3.4.2. die Aktivität der Promotoren gezeigt wurde, bleibt fragwürdig, ob die Promotoren geeignet sind, um eine spezifische Suizidgentherapie zu induzieren. Für eine erfolgreiche Suizidgentherapie wird eine Promotoraktivität benötigt, die eine ausreichende

HSV-TK-Expression in den Zelllinien ermöglicht. Die ausreichende Promotoraktivität wurde in vitro in MTT-Assays zum Nachweis der Suizidgen-Wirkung analysiert.

Als adenovirale Vektoren wurden RGD-CMV-TK bzw. Ad-CMV-TK verwendet, die beide das Suizidgen unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthalten und eine RGD-modifizierte bzw. Wildtyp (Wt)-Virushülle besitzen. Desweiteren wurden die Vektoren Ad-MK-TK, Ad-COX2-TK, Ad-ALA-TK und Ad-MDR-TK eingesetzt, die jeweils die HSV-TK unter der Kontrolle des angegebenen Promotors in einer Wt-Adenovirushülle enthalten. Die Zellen wurden bei Verwendung der ALA-TK-Variante mit den Hormonen Prolactin (5 µg/ml) und Dexamethason (1 µmol/l) vorbehandelt, da die meisten Zelllinien in den Luziferase-Assays (Abbildung 3.4.2.2.) eine erhöhte Genexpression nach Hormonbehandlung gezeigt haben. Bei Verwendung des MDR-Promotors wurden SK-OV-3 Zellen eingesetzt, die mit (3,2 µg/ml) bzw. ohne Doxorubicin vorbehandelt wurden. Für alle anderen Zelllinien war die Zugabe von Doxorubicin toxisch, so dass nur Zellen ohne Doxorubicin-Vorbehandlung verwendet wurden.

Da es sich bei der Suizidgentherapie um ein 2-Komponenten-System handelt, das seine Zytotoxizität erst entfaltet, wenn Suizidgenexpression und Ganciclovir (GCV)-Gabe kombiniert vorliegen, wurde die Wirkung von adenoviralem Gentransfer und GCV-Gabe jeweils einzeln und in Kombination analysiert.

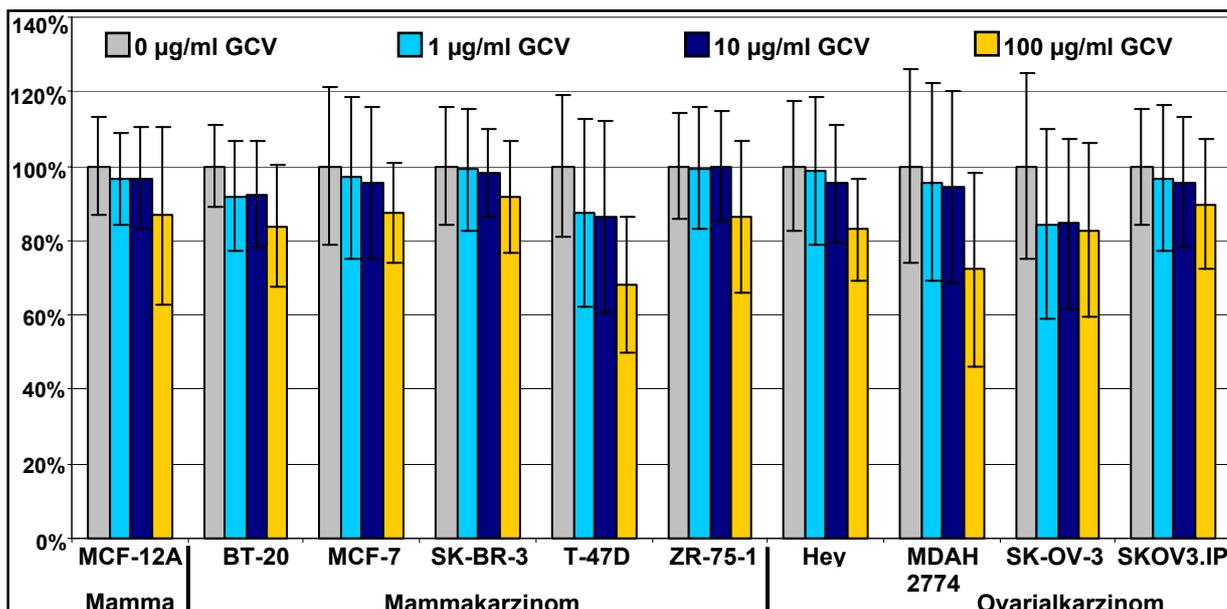


Abbildung 3.4.3.1. Toxizität von GCV in Abhängigkeit von der Konzentration in den gynäkologischen Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 6 Experimenten mit jeweils 6 Einzelmessungen.

Wie schon unter 3.2. gezeigt wurde, führte der alleinige adenovirale Gentransfer zu toxischen Effekten, die von der Zelllinie und dem Virus abhingen. Die virale Toxizität stieg dabei mit der Erhöhung der Virusdosis an. Ebenso verhielt es sich mit der Gabe von GCV. Wie in Abbildung 3.4.3.1. dargestellt, führte GCV in den Zelllinie zu unterschiedlich starken Zytotoxizitäten, die mit Erhöhung der Konzentration anstiegen. In den meisten Zelllinien kam es jedoch selbst mit der höchsten Konzentration (100 µg/ml) nur zu unbedeutenden

Auswirkungen auf die Zellvitalität, da deutlich mehr als 80% der Zellen überlebten. Nur in MDAH 2774- und T-47D-Zellen zeigte sich eine tendenziell stärkere toxische Wirkung, die zum Absterben von ca. 30% der Zellen führte.

Da sich die Toxizitäten von Virus- bzw. GCV-Gabe unspezifisch auf alle Zellen in der Kultur auswirken, ist es wichtig diese Effekte zu berücksichtigen. Um eine verlässliche Aussage über die spezifische Wirkung der Suizidgentherapie in vitro zu bekommen, wurden bei der Analyse jeweils die Versuchsansätze ohne und mit GCV-Gabe bei verschiedenen MOI betrachtet. Aus dem Vergleich der verschiedenen Ansätze konnte gefolgert werden, ob die Messwerte sich durch additive, zytotoxische Effekte der alleinigen GCV- und Adenovirus-Gabe erklären ließen oder synergistische Effekte auftraten, die nur mit einer erfolgreichen Suizidgentherapie zu erklären waren. Zur Relativierung der absoluten Messwerte wurden diese normiert. Dabei diente der Versuchsansatz ohne Virus- und GCV-Applikation als Kontrolle und das Ergebnis wurde als Bezugswert (100% vitale Zellen) ausgewählt.

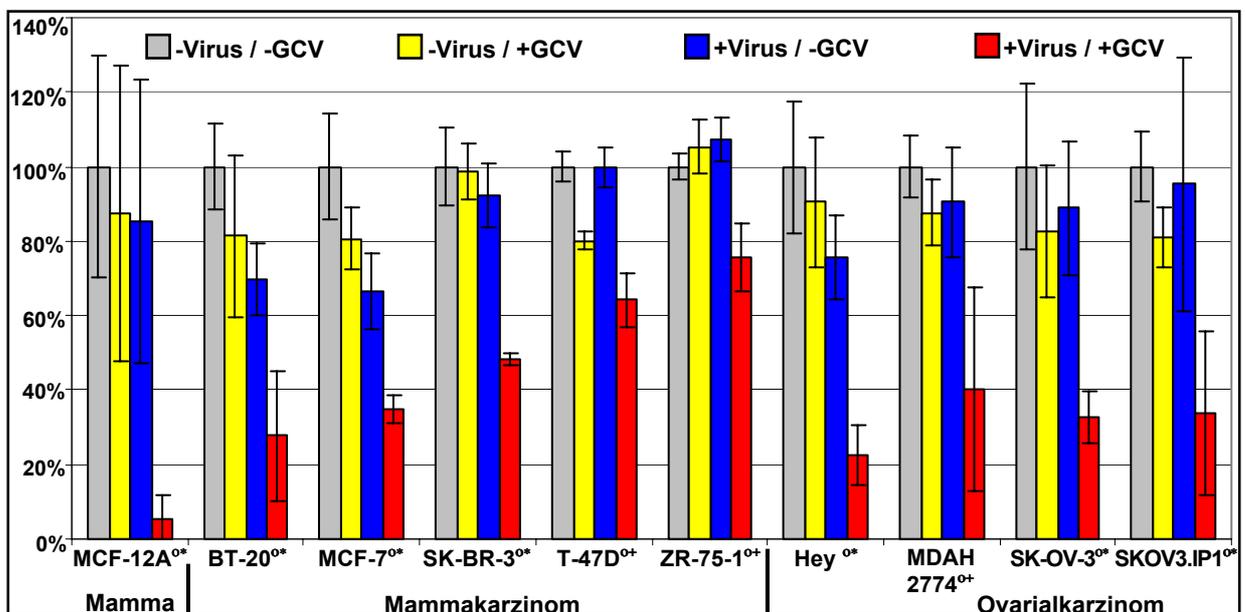


Abbildung 3.4.3.2. Suizidgentherapie in vitro nach Infektion mit RGD-CMV-TK. Die verwendeten GCV-Konzentrationen sind 10 µg/ml (+) oder 100 µg/ml (\*). Die Virusdosis ist 1 MOI (□), 10 MOI (Δ) oder 100 MOI (○). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von sechs Einzelmessungen.

In den Versuchen mit RGD-CMV-TK (Abbildung 3.4.3.2.) zeigte sich nach alleiniger viraler Infektion ein Anteil von 67% (MCF-7) bis 108% (ZR-75-1) vitaler Zellen. Die unspezifische Toxizität der alleinigen GCV-Applikation führte zu einer Abnahme der Zellvitalität. Sie schwankte zwischen 80% (T-47D) und 105% (ZR-75-1). In den therapeutischen Gruppen, also der Gabe von GCV nach adenoviraler Transfektion mit RGD-CMV-TK, sah man in allen Zelllinien eine deutlich stärkere Abnahme der vitalen Zellen. Vor allem in MCF-12A-, BT-20- und Hey-Zellen wurde ein effizientes Abtöten vermittelt und es konnten <30% vitale Zellen nach der Suizidgentherapie mit RGD-CMV-TK detektiert werden.

Die geringste spezifische Toxizität nach Suizidgentherapie mit RGD-CMV-TK zeigte sich in ZR-75-1- und T-47D-Zellen. Da ZR-75-1-Zellen keine unspezifische Toxizität nach alleiniger

GCV- oder Virus-Gabe zeigten, war die geringe Abnahme der Zellvitalität nach Suizidgentherapie signifikant ( $P < 0,005$ ). In T-47D-Zellen hatte die adenovirale Transfektion keine Auswirkungen (100% vitale Zellen), jedoch bewirkte die alleinige Gabe von GCV eine Abnahme der vitalen Zellen um ca. 20%. Die Suizidgentherapie resultierte in einer erhöhten therapeutischen Toxizität im Vergleich mit der unerwünschten Toxizität nach alleiniger Virus- bzw. GCV-Gabe, so dass nur noch ca. 64% vitale Zellen gemessen wurden. Diese Abnahme an vitalen Zellen war signifikant ( $P = 0,0194$ ) bei Vergleich mit den theoretischen Werten für die additiven Effekte von adenoviraler Infektion und GCV-Gabe. Für die Berechnung der theoretischen additiven Effekte wurde die unspezifische Toxizität der GCV-Gabe mit den gemessenen Zellvitalitätsdaten nach adenoviraler Transfektion verrechnet.

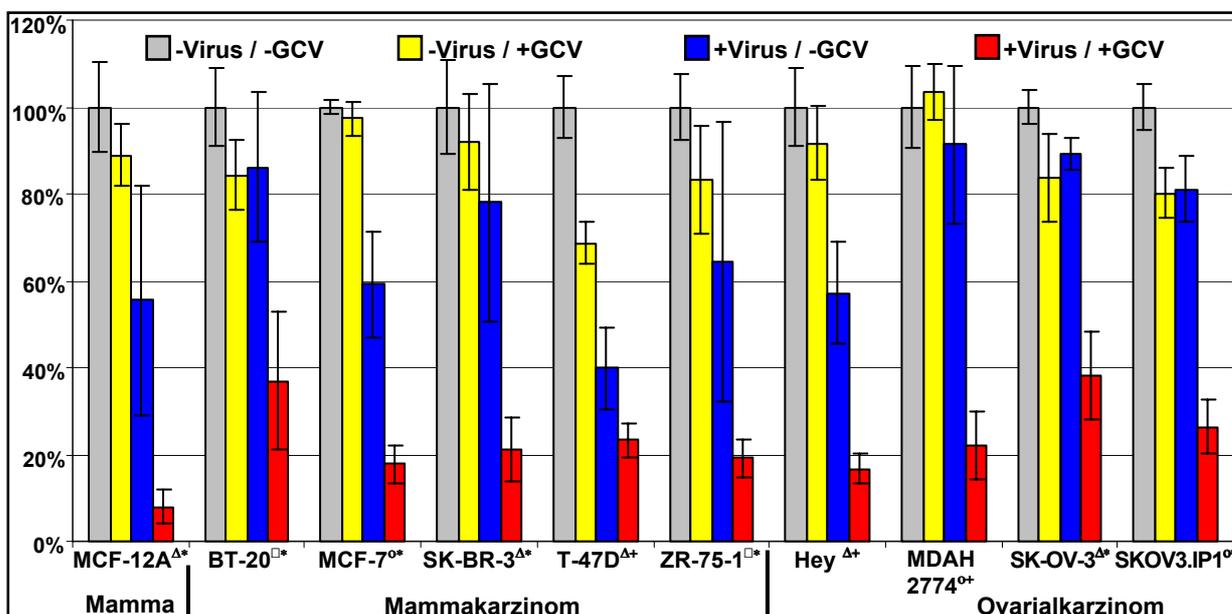


Abbildung 3.4.3.3. Suizidgentherapie in vitro nach Infektion mit Ad-CMV-TK. Die verwendeten GCV-Konzentrationen sind 10  $\mu\text{g/ml}$  (+) oder 100  $\mu\text{g/ml}$  (\*). Die Virusdosis ist 1 MOI ( $\square$ ), 10 MOI ( $\Delta$ ) oder 100 MOI ( $\circ$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von sechs Einzelmessungen.

Bei Verwendung von Ad-CMV-TK (Abbildung 3.4.3.3.), das ebenfalls die HSV-TK unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthält, ergab sich tendenziell eine etwas stärkere, unspezifische Toxizität durch die alleinige Adenovirus-Gabe. Sie resultierte in 40% (T-47D) bis 91% (MDAH 2774) vitalen Zellen. Die GCV-Applikation führte zu Zellvitalitäten zwischen 69% (T-47D) und 103% (MDAH 2774). Bei Betrachtung des Suizidgentherapie-Ansatzes (+Virus / +GCV) zeigte sich eine starke Zytotoxizität in den meisten Zelllinien, so dass nach Suizidgentherapie nur 8-38% vitale Zellen detektiert werden konnten. Nur in T-47D-Zellen blieb fragwürdig, ob die 23% vitale Zellen nach Virus- und GCV-Applikation Resultat einer erfolgreichen Suizidgentherapie waren, da hier schon die alleinige Gabe von GCV oder Virus eine hohe unspezifische Zytotoxizität bewirkte.

Eine Addition der unspezifischen, toxischen Effekte von alleiniger GCV- und Virusapplikation ergab theoretisch eine Zellvitalität von 28% (69% von 40% = 28%). Der Vergleich mit den

23% vitale Zellen nach Suizidtherapie ergab keine signifikante Abweichung ( $P=0,1357$ ), so dass eine erfolgreiche Suizidtherapie statistisch nicht bestätigt werden konnte.

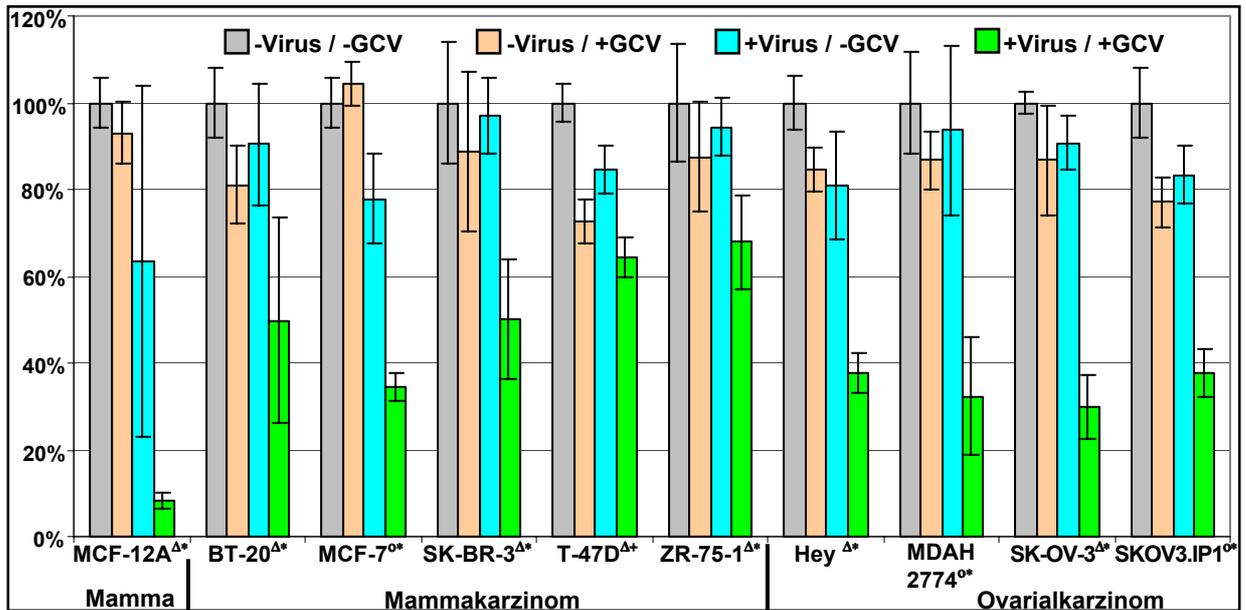


Abbildung 3.4.3.4. Suizidtherapie in vitro nach Infektion mit Ad-COX2-TK. Die verwendeten GCV-Konzentrationen sind 10  $\mu\text{g/ml}$  (+) oder 100  $\mu\text{g/ml}$  (\*). Die Virusdosis ist 1 MOI ( $\square$ ), 10 MOI ( $\Delta$ ) oder 100 MOI ( $\circ$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von sechs Einzelmessungen.

Die Infektion durch Adenoviren mit HSV-TK unter der Kontrolle des COX2-Promotors (Abbildung 3.4.3.4.) führte in den meisten Zelllinien zu einer erfolgreichen Suizidtherapie, da deutliche synergistische Effekte von kombinierter Adenovirus- und GCV-Gabe zu beobachten waren. Nur in der Zelllinie T-47D zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der unspezifischen Wirkung der alleinigen Virus- bzw. GCV-Gabe und der gewünschten, spezifischen Wirkung nach Suizidtherapie. Die T-47D-Zellen zeigten, wie bei den vorhergehenden Viren, eine deutliche Empfindlichkeit gegen die GCV- und die Virus-Applikation (73% bzw. 84% vitale Zellen). Der Anteil vitaler Zellen nach Suizidtherapie war mit 64% unwesentlich höher als bei Addition der singulären Effekte (61% vitale Zellen). Der COX2-Promotor konnte also keine Suizidtherapie in T-47D-Zellen vermitteln.

Das Adenovirus mit MK-Promotor (Abbildung 3.4.3.5.) zeigte in 6 Zelllinien eine deutliche Zytotoxizität nach Suizidtherapie (MCF-12A, BT-20, MCF-7, SK-BR-3, Hey, SK-OV-3, SKOV3.IP1).

In den Zelllinien ZR-75-1 und MDAH 2774 war der Rückgang der Zellvitalität nach Suizidtherapie dem theoretischen Wert der additiven toxischen Effekte der Einzelapplikation sehr ähnlich und die Abweichung nicht signifikant ( $P=0,2276$  und  $P=0,7908$ ).

Obwohl in T-47D-Zellen die Virus-Applikation keine Auswirkungen auf die Zellvitalität hatte, war die erhöhte Toxizität nach Suizidtherapie (69% vitale Zellen) im Vergleich zur alleinigen Virus- (99%) bzw. GCV-Gabe (84%) nicht signifikant ( $P=0,1382$ ), da die Standardabweichung gerade nach Virus-Applikation sehr hoch war.

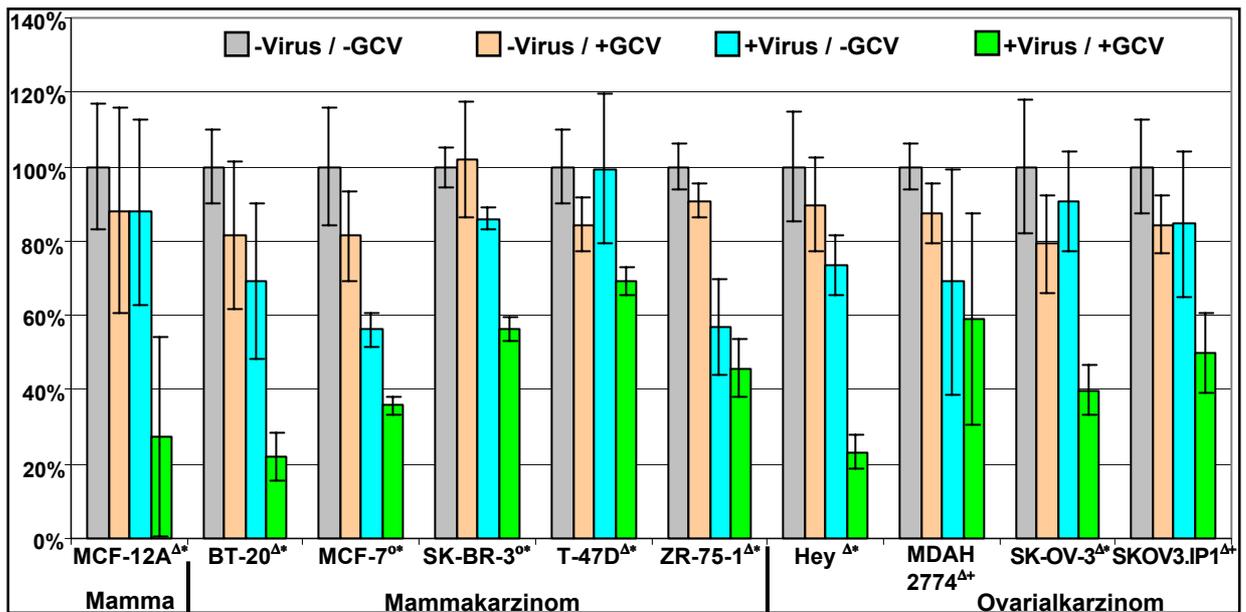


Abbildung 3.4.3.5. Suizidtherapie in vitro nach Infektion mit Ad-MK-TK. Die verwendeten GCV-Konzentrationen sind 10 µg/ml (+) oder 100 µg/ml (\*). Die Virusdosis ist 1 MOI (□), 10 MOI (Δ) oder 100 MOI (○). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von sechs Einzelmessungen.

Die Suizidtherapie unter Kontrolle des ALA-Promotors (Abbildung 3.4.3.6.) ergab in den gynäkologischen Zelllinien sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Zelllinien MCF-7, T-47D, Hey und SKOV3.IP1 ließen keine spezifische ALA-vermittelte Suizidgenwirkung erkennen, da die spezifischen, zytotoxischen Wirkungen der Suizidtherapie nicht signifikant von den unspezifischen toxischen Wirkungen der Einzelapplikation von Virus und GCV war.

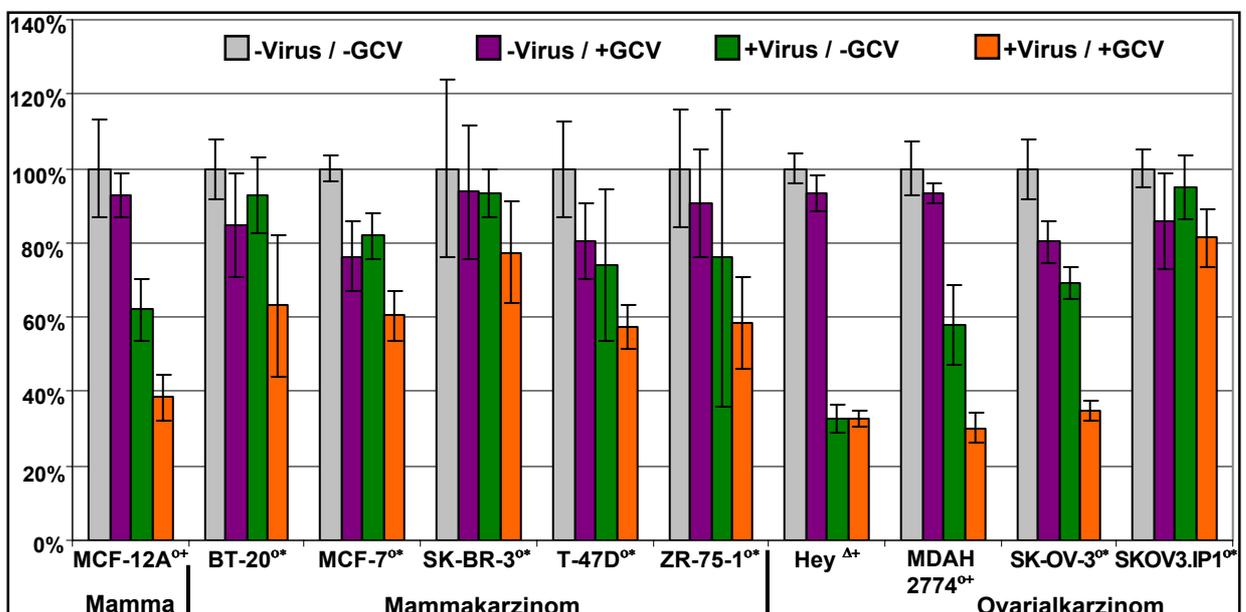


Abbildung 3.4.3.6. Suizidtherapie in vitro nach Infektion mit Ad-ALA-TK. Die verwendeten GCV-Konzentrationen sind 10 µg/ml (+) oder 100 µg/ml (\*). Die Virusdosis ist 1 MOI (□), 10 MOI (Δ) oder 100 MOI (○). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von sechs Einzelmessungen.

Bei ZR-75-1-Zellen konnten nach Suizidtherapie 59% vitale Zellen detektiert werden, wohingegen die Addition der unspezifischen Toxizität von alleiniger GCV- bzw. Virus-Gabe 69% vitale Zellen ergab. Aufgrund der hohen Standardabweichung der alleinigen Virus-Gabe

war die erhöhte Abnahme von vitalen Zellen nach Suizidgentherapie nicht signifikant von den additiven Effekten der unspezifischen Toxizitäten zu unterscheiden ( $P=0,1630$ ).

In den Zelllinien MCF-12A, BT-20, SK-BR-3, MDAH 2774 und SK-OV-3 war die Reduktion der vitalen Zellen nach Suizidgentherapie signifikant von der Addition der unspezifischen Toxizität der Einzelapplikationen zu unterscheiden ( $P<0,05$ ).

Bei Verwendung des MDR-Promotors für die Regulation der Suizidgenexpression (Abbildung 3.4.3.7.) zeigten die Zelllinien BT-20, SK-BR-3, T-47D, ZR-75-1, Hey, MDAH 2774 und SKOV3.IP1 keine Beeinflussung ihrer Zellvitalität, welche die unspezifischen Toxizitäten der GCV- oder Virus-Gabe alleine signifikant überstiegen.

In MCF-12A- und MCF-7-Zellen war der Unterschied zwischen der Addition der unspezifischen Effekte und den spezifischen, therapeutischen zytotoxischen Effekten nach Suizidgentherapie signifikant ( $P<0,01$ ).

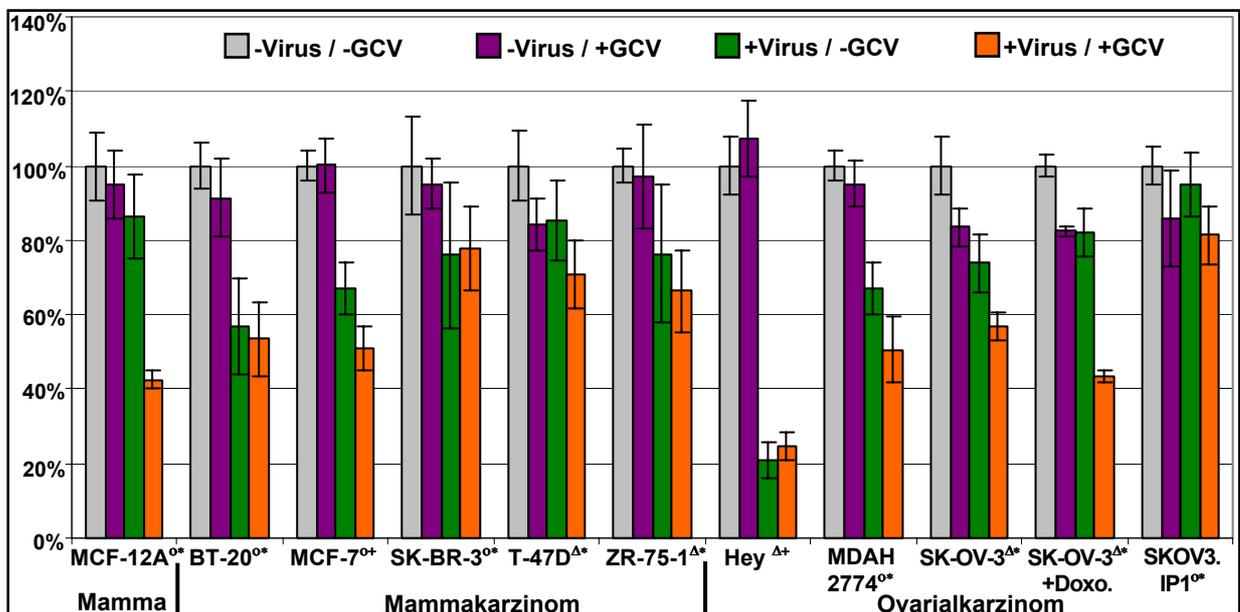


Abbildung 3.4.3.7. Suizidgentherapie in vitro nach Infektion mit Ad-MDR-TK. Die verwendeten GCV-Konzentrationen sind 10  $\mu\text{g/ml}$  (+) oder 100  $\mu\text{g/ml}$  (\*). Die Virusdosis ist 1 MOI ( $\square$ ), 10 MOI ( $\Delta$ ) oder 100 MOI ( $\circ$ ). Für SK-OV-3 sind Experimente ohne und mit Präinkubation der Zellen mit 3,2  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von sechs Einzelmessungen (in MDAH 2774 nur 3 Einzelmessungen).

Interessanterweise zeigte sich in SK-OV-3-Zellen ohne Präinkubation mit Doxorubicin keine signifikante Erhöhung der Toxizität nach Suizidgentherapie mit Ad-MDR-TK im Vergleich zur Addition der unspezifischen Einzeltoxizitäten von Virus- bzw. GCV-Gabe ( $P=0,1795$ ). Nach Präinkubation der Zellen mit Doxorubicin war der Unterschied der toxischen Wirkung von Suizidgentherapie und Einzelapplikation aber deutlich stärker und der Vergleich der spezifischen Toxizität der Suizidgentherapie mit den additiven, unspezifischen Effekten von Virus- und GCV-Gabe lieferte einen signifikanten Unterschied ( $P=0,0027$ ). Also scheint der MDR-Promotor in den Doxorubicin-behandelten Zellen eine stärkere Aktivität zu besitzen und somit eine effizientere Suizidgentherapie zu ermöglichen.

### 3.5. Kombination aus Chemo- und Gentherapie in vivo

Die erhöhte Infektiösität der RGD-modifizierten Adenoviren in Tumoren mit reduzierter oder fehlender Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor-Expression (CAR) könnte ein wichtiger Fortschritt in der Entwicklung adenoviraler Vektoren für die Gentherapie von Karzinomen sein. Für die klinische Anwendung ist die Kompatibilität mit der klassischen Chemotherapie eine Grundvoraussetzung für alle neuen, ergänzenden Therapieformen. Deshalb wurde in Tierexperimenten getestet, ob sich eine Suizidgentherapie mit RGD-CMV-TK-Adenoviren und eine Chemotherapie mit Topotecan oder Taxol gegenseitig beeinflussen. Die beiden Therapien dürfen sich nicht inhibieren, sondern sollten additiv oder idealerweise synergistisch wirken.

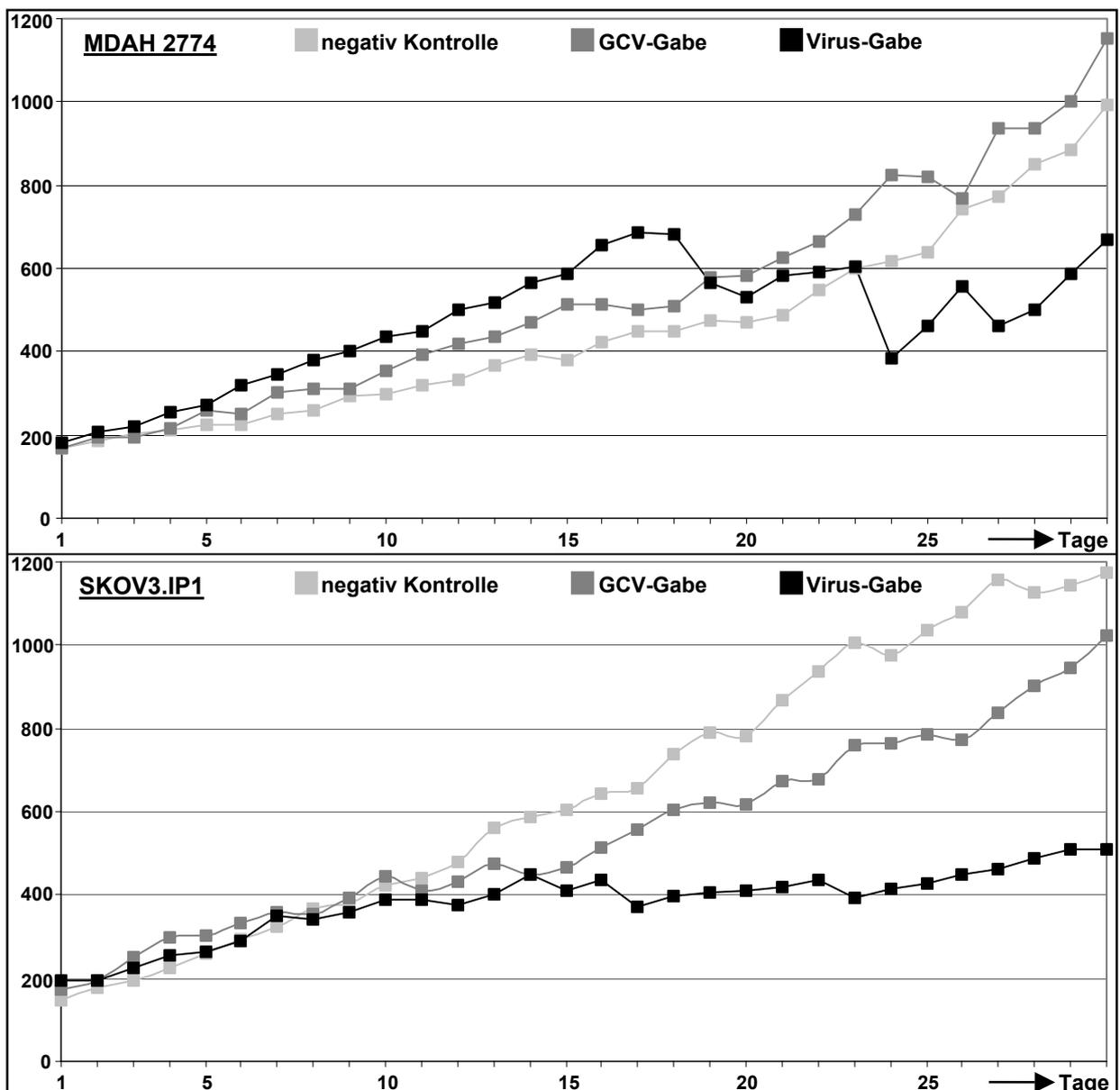


Abbildung 3.5.1. Tumorgößen in  $\text{mm}^3$  im Nacktmausmodell nach unterschiedlichen Therapien (Kontrollen). Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Tumoren. Aus Gründen der Übersicht sind keine Standardabweichungen aufgeführt.

Da es in der Literatur Hinweise gibt, dass die zeitliche Reihenfolge eine Rolle für die Effizienz der Kombination aus Chemo- und Gentherapie spielt, wurden alle zeitlichen Kombinations-

möglichkeiten getestet. Auf Nacktmäusen wurde ein subkutanes Tumormodell mit den Ovarialkarzinom-Zelllinien SKOV3.IP1 und MDAH 2774 etabliert. Die Hemmung des Tumorstwachstums durch verschiedene Therapieschemata wurde miteinander verglichen, indem täglich die Tumorgöße bestimmt wurde.

Die unbehandelten Kontrollgruppen zeigten ein starkes, unbeeinflusstes Tumorstwachstum, das nach 30 Tagen eine Größe von 1200 mm<sup>3</sup> (SKOV3.IP1) bzw. 1000 mm<sup>3</sup> (MDAH 2774) erreichte (Abbildung 3.5.1.). Die Kontrollversuche zur Analyse der unspezifischen, toxischen Wirkung von GCV- bzw. Virus-Applikation alleine führten zum Teil zu leichten Reduktionen der Tumorstgrößen. Während die intraperitoneale Gabe von GCV nur unbedeutenden Einfluss auf die Tumorstgröße hatte, bewirkte die intratumorale Virusinjektion (RGDTKKSSTR) eine Verringerung der Tumorstgröße auf 700 mm<sup>3</sup> (MDAH 2774) bzw. 500 mm<sup>3</sup> (SKOV3.IP1).

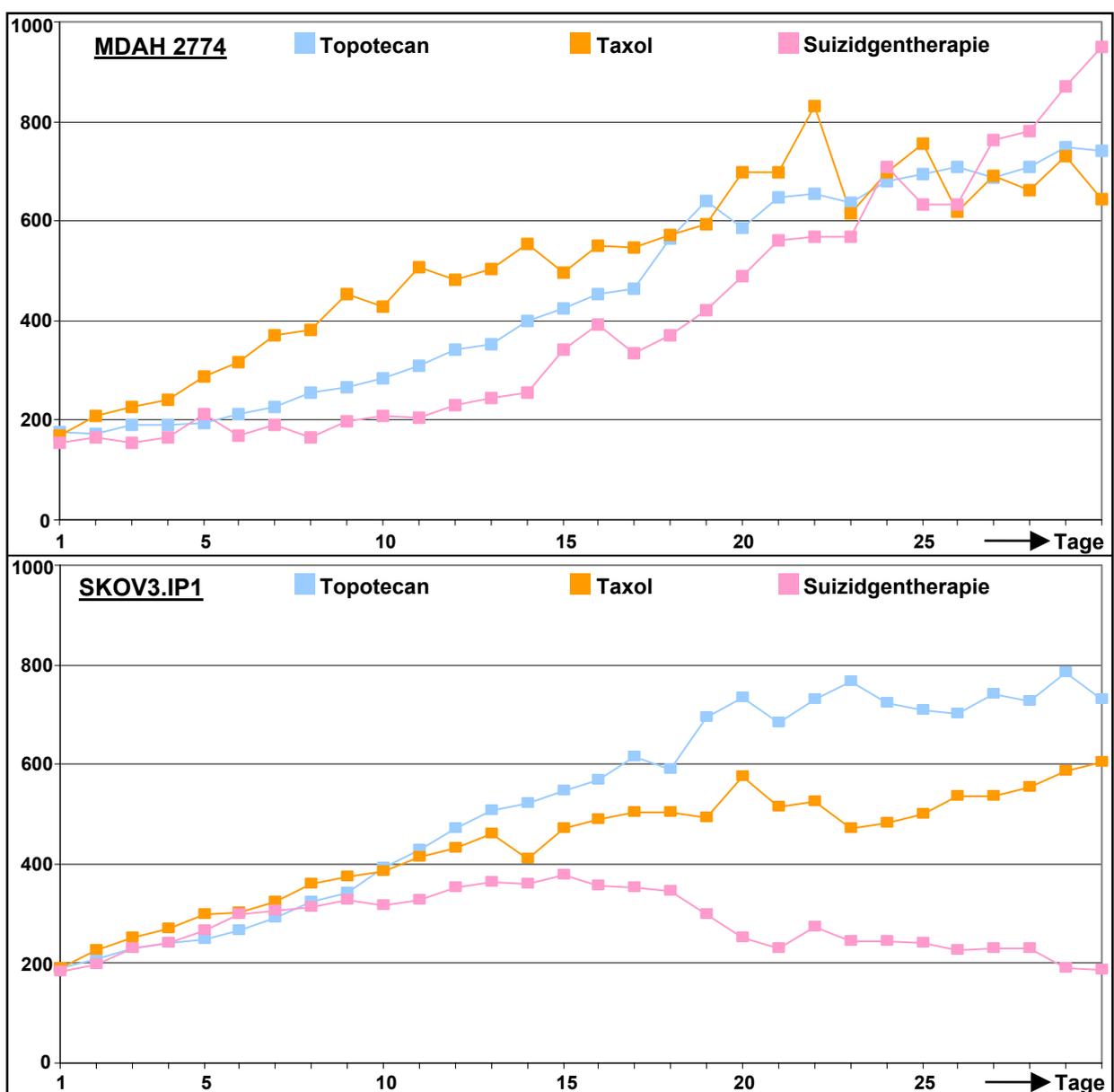


Abbildung 3.5.2. Tumorstgröße in mm<sup>3</sup> im Nacktmausmodell nach unterschiedlicher Therapie. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Tumoren nach Einzeltherapien mit Topotecan, Taxol oder nach Suizidgentherapie. Aus Gründen der Übersicht sind keine Standardabweichungen aufgeführt.

Die Einzeltherapien mit den Chemotherapeutika Topotecan oder Taxol bewirkte in MDAH 2774-Tumoren im Vergleich mit den unbehandelten Negativ-Kontrollen ein geringeres Tumorwachstum nach 30 Tagen, da der Tumor nur noch ca. 700 mm<sup>3</sup> groß war (Abbildung 3.5.2.). Nach Suizidgentherapie mit RGD-CMV-TK-Infektion und anschließender GCV-Gabe zeigte sich nur ein minimaler Rückgang der Tumorgröße auf ca. 950 mm<sup>3</sup>.

In SKOV3.IP1-Tumoren zeigten die Chemotherapeutika und vor allem die Suizidgentherapie eine deutlich stärkere Wirkung als in MDAH 2774-Tumoren (Abbildung 3.5.2.). Nach der Gabe von Topotecan oder Taxol war das Tumorwachstum deutlich gehemmt und nach 30 Tagen wurde eine Tumorgröße von 730 mm<sup>3</sup> (Topotecan) bzw. 600 mm<sup>3</sup> (Taxol) gemessen. Nach Durchführung der Suizidgentherapie zeigte der Tumor normales Wachstum bis zum 7. Tag, danach begann die Wachstumskurve abzuflachen und ab Tag 15 kam es sogar zum Rückgang der Tumorgröße. Nach 30 Tagen war der Tumor wieder etwa auf die Größe vor Beginn der Suizidgentherapie zurückgegangen (200 mm<sup>3</sup>).

Die Kombinationstherapie bestehend aus Chemotherapie mit Topotecan und RGD-CMV-TK-vermittelter Suizidgentherapie (Abbildung 3.5.3.) resultierte bei MDAH 2774-Tumoren generell in kleineren Tumorgößen im Vergleich zu den Einzeltherapien. In SKOV3.IP1-Tumoren zeigte sich ein geringeres Tumorwachstum nach Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Topotecan-Therapie, allerdings war die Tumorgröße nach 30 Tagen größer als nach alleiniger Suizidgentherapie ( $\geq 200$  mm<sup>3</sup>).

Bei MDAH 2774-Tumoren zeigten die verschiedenen zeitlichen Variationen der Kombination aus Topotecan-Chemotherapie und Suizidgentherapie unterschiedliche Einflüsse auf das Tumorwachstum (Abbildung 3.5.3.). Die schnellste Reaktion auf die Therapie zeigte sich bei der synchronen Anwendung von Topotecan und Suizidgentherapie. In dieser Gruppe setzte der Rückgang der Tumorgröße direkt nach dem Start der GCV- und Topotecan-Gabe ein und hielt bis ca. Tag 15 an. Danach wuchs der Tumor wieder langsam weiter und erreichte nach 30 Tagen eine Größe von ca. 150 mm<sup>3</sup>. In der gestaffelten Anwendung kam es zu einem stärkeren frühen Tumorwachstum. Wenn mit der Gabe von RGD-CMV-TK gestartet wurde, lag die maximale Tumorgröße an Tag 10 vor, bei Start mit Topotecan an Tag 20. Danach setzte ein starker Rückgang der Tumorgröße ein, der bis Tag 24 anhielt. Bis zum Tag 30 wuchs der Tumor wieder auf eine Größe von 200–250 mm<sup>3</sup> an.

In den SKOV3.IP1-Tumoren zeigte sich bei den Kombinationsvarianten (Abbildung 3.5.3.), die mit der Virus-Gabe starteten („1. Suizidgentherapie, 2. Topotecan“; „Topotecan + Suizidgentherapie“), ein ähnlicher Verlauf des Tumorwachstums, wie bei alleiniger Suizidgentherapie. Es kam zu einem langsamen Anstieg der Tumorgröße bis Tag 16, allerdings war der danach einsetzende Rückgang der Tumorgröße etwas weniger stark als bei der alleinigen Suizidgentherapie, so dass bis Tag 30 nur ein Rückgang auf 250–350 mm<sup>3</sup> festzustellen war. Bei Start mit Topotecan-Gabe und anschließender Suizidgentherapie begann der Tumor

schon ab Tag 8 kleiner zu werden, bis an Tag 13 die minimale Tumorgöße erreicht war. Dann wuchs der Tumor, bis an Tag 30 eine Größe von ca. 200 mm<sup>3</sup> erreicht war.

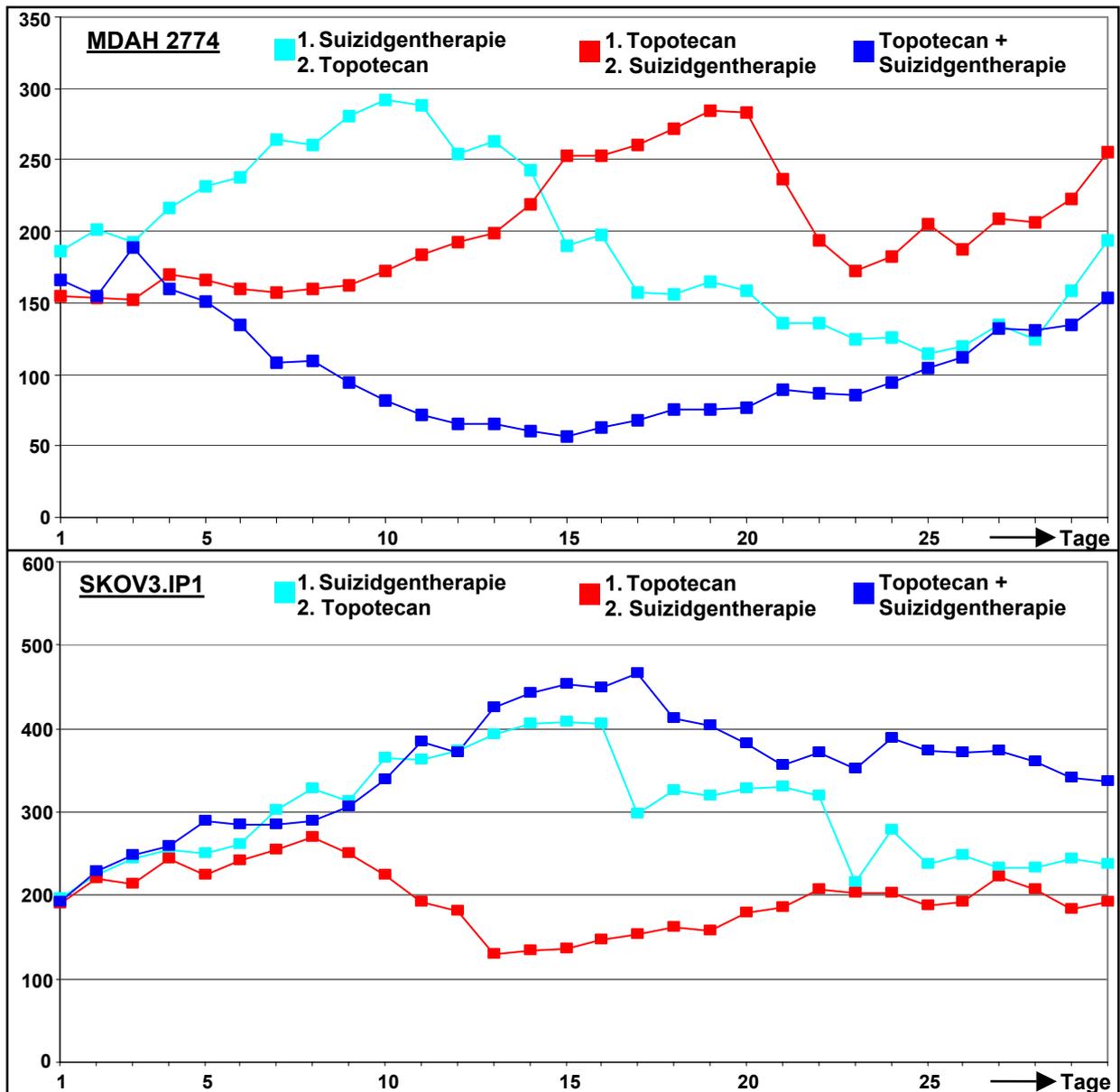


Abbildung 3.5.3. Tumorgößen in mm<sup>3</sup> im Nacktmausmodell nach unterschiedlichen Therapien. Aufgeführt sind die Kombinationen aus Suizidgentherapie mit Topotecan-Gabe in verschiedenen zeitlichen Varianten. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Tumoren über einen Zeitraum von 30 Tagen. Aus Gründen der Übersicht sind keine Standardabweichungen aufgeführt.

Die Kombination der Suizidgentherapie mit einer Taxol-Chemotherapie (Abbildung 3.5.4.) resultierte in beiden Tumor-Modellen in einem stärkeren Rückgang der Tumorgöße als die alleinige Taxol-Therapie. In MDAH 2774-Tumoren lag die Tumorgöße nach 30 Tagen bei 300-550 mm<sup>3</sup> und damit deutlich unter der Größe nach alleiniger Suizidgentherapie. In SKOV3.IP1-Tumoren war die Größe mit ca. 200 mm<sup>3</sup> nach 30 Tagen vergleichbar mit der Tumorgöße nach alleiniger Suizidgentherapie.

In MDAH 2774- und SKOV3.IP1-Tumormodellen der Nacktmaus zeigten alle drei zeitlichen Varianten der Kombination aus Taxol-Chemotherapie und Suizidgentherapie jeweils einen

ähnlichen Verlauf des Tumorwachstums. Bei MDAH 2774-Tumoren zeigte sich über die gesamte Versuchsdauer ein langsamer und relativ gleichmäßiger Anstieg der Tumorgröße, wohingegen in SKOV3.IP1-Tumoren vor Ende der therapeutischen Injektionen eine maxima-

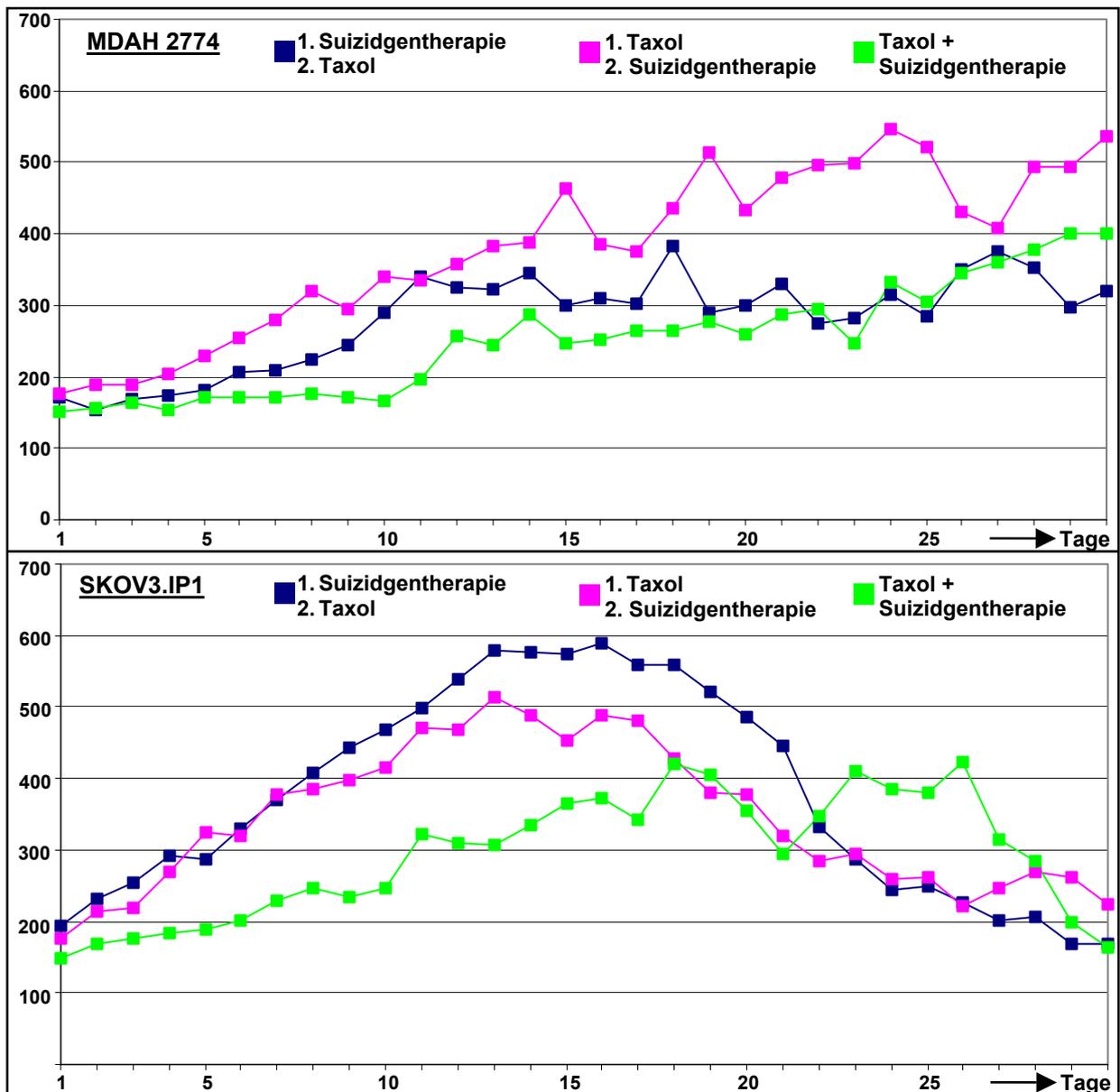


Abbildung 3.5.4. Tumorgrößen in  $\text{mm}^3$  im Nacktmausmodell nach unterschiedlichen Therapien. Aufgeführt sind die Kombinationen aus Suizidgentherapie mit Taxol-Gabe in verschiedenen zeitlichen Varianten. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Tumoren über einen Zeitraum von 30 Tagen. Aus Gründen der Übersicht sind keine Standardabweichungen aufgeführt.

le Tumorgröße nach 15-20 Tagen erreicht wurde und danach ein deutlicher Rückgang der Tumorgröße gemessen werden konnte. Gemeinsam für beide Tumortypen war die schnelle Wirkung der gleichzeitig durchgeführten Chemo- und Genterapie, also die zeitgleiche Gabe von Taxol und GCV nach der Virus-Transduktion, im Vergleich zu einem sequentiellen Therapieschema. Der früher einsetzende Rückgang der Tumorgröße war aber nur ca. bis zum Tage 18 von den anderen Varianten zu unterscheiden, danach verlief das Tumorstadium in allen drei zeitlichen Therapieschemata parallel.

## 4. Diskussion

Aufgrund der geringen Heilungsaussichten nach klassischer Behandlung des Mamma- und Ovarialkarzinoms werden große Anstrengungen zur Entwicklung alternativer Therapieansätze unternommen. Eine innovative Strategie zur Tumorbekämpfung besteht in der Suizidgentherapie mit der Thymidin-Kinase aus dem Herpes simplex-Virus (HSV-TK). Dabei wird die HSV-TK in die Tumorzellen eingeschleust und vermittelt eine spezifische zytotoxische Sensitivität gegenüber der ansonsten nicht-toxischen Substanz Ganciclovir (GCV). Das GCV wird intrazellulär von dem Genprodukt der HSV-TK zu einem Toxin umgewandelt, das die Tumorzelle abtötet. Essentielle Voraussetzungen für die erfolgreiche Suizidgentherapie sind einerseits der effiziente Gentransfer zur optimalen Verteilung des Suizidgens innerhalb des Tumors und die spezifische Wirkung der Therapie im Tumor, um mögliche Nebenwirkungen zu minimieren.

Für den Gentransfer stehen virale und nicht-virale Vektorsysteme zur Verfügung. Bei den viralen Vektoren stellen Adenoviren und bei den nicht-viralen Vektoren die Lipofektion das wichtigste System dar. Da die Vektorsysteme trotz guter in vitro-Ergebnisse in vivo bzw. in der klinischen Anwendung nur unzureichende Gentransfereffizienzen ergeben haben, war eine Verbesserung der vorhandenen Adenovirus- und Lipofektions-Systeme notwendig. Durch die Entwicklung von neuen kationischen Lipiden und Adenoviren mit verändertem Tropismus, die ein RGD-Motiv in der Fiber-Knob-Domäne besitzen, standen zwei neuartige Vektorsysteme zur Verfügung, die hinsichtlich ihres Gentransferpotentials in Mamma- und Ovarialkarzinomen getestet wurden. Zum Vergleich wurden etablierte Lipofektionssysteme (Fugene6™) bzw. adenovirale Vektorsysteme ohne RGD-Modifikation eingesetzt. Ein Ziel dieser Arbeit war die Effizienzsteigerung des Gentransfers mit den innovativen Vektoren im Vergleich zu den etablierten Systemen.

Neben der Effizienzsteigerung in vivo ist die Entwicklung einer Spezifität der Gentherapie ein wichtiger Forschungsschwerpunkt. Da der Gentransfer mit den verwendeten Vektorsystemen unspezifisch in allen Körperzellen erfolgt, muss die Spezifität über die Expression des Suizidgens erreicht werden. Gerade die adenovirale Infektion erfolgt sehr effizient in lebenswichtigen Organen (Leber, Niere, Milz), da dort der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) stark exprimiert wird. So kann es zu Dosis-limitierenden und lebensbedrohlichen toxischen Nebenwirkungen kommen, wenn das Suizidgen konstitutiv exprimiert wird. Um diese Nebenwirkungen zu verhindern, ist es notwendig, die Gentherapie spezifisch auf das Zielgewebe einzuschränken bzw. keinerlei Suizidgentherapie-Effekte in den lebenswichtigen Organen zu induzieren. Durch geeignete Promotorelemente ist es möglich, die Transkription des Suizidgens spezifisch in den Zielzellen zu induzieren. Geeignete Promotoren zur spezifischen Regulation der Suizidgenexpression sollten eine konstitutive bzw. spezifisch induzierbare

Aktivität in Tumorzellen zeigen, während sie im Normalgewebe inaktiv sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential ausgewählter Promotoren in der Suizidgentherapie gynäkologischen Tumorzelllinien getestet.

Für die klinische Anwendung einer Suizidgentherapie muss eine Kompatibilität mit den etablierten Behandlungsmethoden gewährleistet sein. Gerade die Chemo- und Suizidgentherapie sollten nicht inhibierend miteinander interagieren. Um das klinische Potential des Adenovirus RGD-CMV-TK zu testen, wurde die Suizidgentherapie in Kombination mit verschiedenen Chemotherapien durchgeführt. Idealerweise ergeben sich nach Chemo- und Gentherapie additive oder synergistische antitumorale Effekte, die eine Verbesserung der Langzeiterfolge der Krebstherapie ermöglichen.

#### 4.1. Liposomaler Gentransfer

Seit der ersten erfolgreichen Transfektion in vitro (Felgner et al., 1987) wurde der liposomale Gentransfer mit kationischen Lipiden intensiv erforscht. Obwohl die Gentransfereigenschaften der Liposomen in den letzten Jahren deutlich verbessert wurden (Wheeler et al., 1996; Lee et al., 1996; Madry et al., 2000; Haynes et al., 2001), blieb die Gentransfereffizienz im Vergleich mit viralen Vektorsystemen deutlich geringer. Der Vorteil der Lipofektion liegt in der fehlenden Immunogenität und der leichteren Produktion der Liposomen nach cGMP-Richtlinien, was für eine spätere klinische Anwendung von Vorteil ist.

Um die Lipofektion weiter zu verbessern, wurden zwei neue kationische Lipide, CCQ22 und CCQ32, entwickelt (Keil et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die neuen kationischen Lipide für eine Anwendung in der Suizidgentherapie von gynäkologischen Karzinomen geeignet sind und höhere Gentransferraten als die etablierten Lipofektionssysteme ermöglichen. Dafür wurde neben der Gentransfereffizienz und der Toxizität in den Zelllinien auch der Einfluss von FCS oder Aszites auf die Gentransfereffizienz analysiert. Gerade die Gentransfereffizienz in Anwesenheit von Aszites ist für die topische Therapie des Ovarialkarzinoms von weitreichender Bedeutung.

Generell wirken alle Gentransfertechniken toxisch auf die Zellen (Cortesi et al., 1996; Kono et al., 2001; Yamazaki et al., 2001). Die zytotoxischen Nebeneffekte werden dabei von der DNA und den liposomalen Vektoren ausgelöst, die in relativ hohen Konzentrationen der Zellkultur zugesetzt werden. Dabei scheinen gerade Lipide, die einen effizienten Gentransfer ermöglichen, stärker toxisch zu wirken (Cortesi et al., 1996; Kono et al., 2001).

Bei Verwendung der Liposomen auf Basis der CCQ-Lipide und DOPE war die Stärke der Toxizität von der Lipid-Zusammensetzung abhängig. Da sich in den Zelllinien unterschiedlich starke Toxizitäten der gleichen Liposomen zeigten, hatten auch Zelllinien-spezifische Parameter Einfluss auf die Rate der überlebenden Zellen. In den meisten Zelllinien nahm die

Toxizität mit höherem Anteil an kationischem Lipid zu (Abbildung 3.1.1.1. und 3.1.1.2.). Bei Verwendung von CCQ22 war die Toxizität im Vergleich mit Fugene6<sup>TM</sup> ähnlich oder weniger stark ausgeprägt. Nach Lipofektion mit CCQ32 zeigten sich in den meisten Zelllinien höhere Toxizitäten als nach Fugene6<sup>TM</sup>-Lipofektion, wenn der Anteil des kationischen Lipids >30 mol% war. Andere innovative Liposomen auf der Basis kationischer Lipide ergaben 15% bis 60% vitale Zellen nach Lipofektion (Cortesi et al., 1996), wohingegen mit CCQ-Liposomen je nach Zelllinie 17% bis >100% vitale Zellen gemessen wurden. Die Liposomen auf Basis der neuen kationischen Lipide zeigten also ein ähnliches Zytotoxizitäts-Profil (Röder et al., 2002).

Für die Gentransfereffizienz ist der Einfluss Zelllinien-spezifischer Faktoren bekannt (Hernandez et al., 1997) und konnte mit den CCQ-Liposomen bestätigt werden (Abbildung 3.1.2.1. und 3.1.2.2.). Systematische Analysen der Gentransfereffizienzen bei variablen Lipofektionsbedingungen zeigten, dass Zelllinien-spezifische Bedingungen hinsichtlich der DNA- bzw. Lipid-Menge, des DNA/Lipid-Verhältnisses und auch des Mischungsverhältnisses von kationischem Lipid zu Helferlipid nötig waren, um optimale Gentransferraten zu erzielen (Röder et al., 2002). Die Optimierung der Gentransfereffizienz zeigte vor allem in ZR-75-1-Zellen beeindruckende Erfolge. Durch die Veränderung des Mischungsverhältnisses von CCQ32 und DOPE konnten hier signifikante Verbesserungen der Transduktion erreicht werden. Mit CCQ32-20 (20 mol% CCQ32 und 80 mol% DOPE) wurden nur <1% der Zellen transduziert, aber nach Verwendung von CCQ32-40 zeigte mit über 36% ein signifikant ( $P=0,0043$ ) größerer Anteil der Zellen eine GFP-Expression (Abbildung 3.1.2.2.)

Die erzielten Gentransferraten von zum Teil unter 20% (MDAH 2774, BT-20) verdeutlichen die Notwendigkeit, die vorhandenen Lipofektionssysteme weiter zu verbessern. Neben den kationischen Lipiden können zur Steigerung der Transfereffizienz andere Parameter der Lipofektion geändert werden. Durch die Addition eines Polymers, das aus den Aminosäuren Lysin und Histidin besteht, wurde die Gentransfereffizienz von Liposomen gesteigert (Chen et al., 2000) und die Verwendung von modifizierten DOPE-Analoga anstelle von DOPE ermöglichte bessere Transduktionsraten mit kationischen Lipiden (Boussif et al., 2001). Die Kombination der erwähnten Modifikationen mit den CCQ-Lipiden könnte in einer weiteren Verbesserung ihrer Gentransfereigenschaften resultieren.

In der Literatur wurde ein inhibierender Einfluss von Serum oder Aszites auf die Gentransfereigenschaften von viralen und nicht-viralen Vektorsystemen beschrieben (Blackwell et al., 2000; Audouy et al., 2000; Yamazaki et al., 2000; Haines et al., 2001). Im Falle der Lipofektion sind die genauen Ursachen der Inhibition noch nicht bekannt, aber eine Destabilisierung der Lipoplexe mit anschließender Degradation der DNA scheint daran beteiligt zu sein (Li S et al., 1999).

Die Liposomen auf der Basis der CCQs zeigten keine Destabilisierung in Zellkulturen, da bei normalen Kulturbedingungen (10% FCS) Gentransferraten von über 40% erreicht wurden (Abbildung 3.1.3.1.). Da die Anwesenheit von FCS keine negativen Auswirkungen auf den Gentransfer der Lipofektion hatte, wurde die Untersuchung des Aszites-Einflusses als ein neuer Versuchsansatz im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Dafür wurde die Gentransfereffizienz in Gegenwart von Aszites anstelle von FCS ermittelt. Obwohl mit Aszites eine Reduktion der Gentransfereffizienz mit CCQ32-40 um 10% bis 15% gemessen wurde, beruhte dieser Effekt wahrscheinlich nicht auf inhibierenden Einflüssen des Aszites, da die Erhöhung der Aszites-Konzentrationen von 5% auf 40% keine weitere Abnahme der Gentransfereffizienz, sondern eine deutlich geringere Reduktion bewirkte (Abbildung 3.1.3.1.). Eine zunehmende Inhibition des Gentransfers bei steigender Aszites-Konzentration konnte bei der Verwendung von Fugene6<sup>TM</sup> beobachtet werden. Hier sank der Anteil GFP-positiver Zellen bei Zugabe von Aszites dramatisch und bei Verwendung von 40% Aszites wurden nur noch <1% der Zellen transduziert (Röder et al., 2002).

Bei Kultivierung der Zellen mit Aszites anstelle von FCS konnte eine langsamere Zellproliferation beobachtet werden, da ein längerer Zeitraum bis zur Konfluenz der Kultur benötigt wurde. Die Zellproliferation ist als wichtiger Faktor für den Gentransfer bekannt und gerade für die Lipofektion ein kritischer Faktor (Brunner et al., 2000; Mortimer et al., 1999; Wilke et al., 1996; Tseng et al., 1999). Da aber manche Tumorzelllinien ohne Wachstumsfaktoren oder Proliferation-fördernde Substanzen wie FCS kultiviert werden können, sind die unterschiedlich starken Einflüsse des Aszites auf die verschiedenen Zelllinien (Abbildung 3.1.3.2.) möglicherweise mit den verschiedenen hohen Proliferationsraten ohne FCS zu erklären. Die Abhängigkeit der Gentransfereffizienz einer Lipofektion von der mitotischen Aktivität der Zellen schränkt die Nutzung des liposomalen Gentransfers auf stark proliferierende Zellen ein.

Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen, dass die Liposomen auf Basis der kationischen Lipide CCQ22 und CCQ32 in der Lage waren einen effizienten Gentransfer in die getesteten gynäkologischen Krebszelllinien zu vermitteln. In insgesamt 5 Zelllinien (Hey, MDAH 2774, SK-OV-3, ZR-75-1, MCF-7) wurden mit den CCQ-Liposomen höhere Gentransferraten als mit Fugene6<sup>TM</sup> erzielt, in drei Zelllinien (Hey, MDAH 2774, ZR-75-1) war die Erhöhung signifikant. Die zytotoxischen Nebeneffekte der CCQ-Liposomen waren vergleichbar mit denen anderer Lipofektionssysteme und Aszites zeigte keinen dramatischen Einfluss auf die Gentransfereffizienz. Allerdings war eine Optimierung der Lipofektions-Bedingungen für jede Zelllinie erforderlich, um optimale Gentransferraten zu erreichen. Diese Voraussetzung für das Erreichen hoher Gentransferraten schränkt den klinischen Einsatz der Liposomen im Rahmen onkologischer Prozesse ein.

#### 4.2. Adenoviraler Gentransfer

Die hohe Effizienz des Gentransfers mit adenoviralen Vektoren wurde von diversen Arbeitsgruppen beschrieben. Mit hohen Viruskonzentrationen war es möglich 100% der Zellen in vitro zu transduzieren (Tong et al., 1996). Die Problematik des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor-Mangels (CAR-Mangel) und damit der Resistenz vieler Tumorgewebe gegen eine adenovirale Infektion führte zur Entwicklung der RGD-modifizierten Adenoviren, die in Tumoren ohne CAR-Expression eine höhere Gentransfereffizienz zeigen (Dmitriev et al., 1998). Die antitumorale Wirkung der Adenoviren RGD-CMV-TK und Ad-CMV-TK wurde in vitro getestet.

Analog zum Gentransfer mit Liposomen ist auch eine adenovirale Transduktion mit toxischen Nebeneffekten assoziiert. Wie in Abbildung 3.2.1. dargestellt, bestand eine Abhängigkeit der Zytotoxizität von der eingesetzten Virusmenge, die sich in den getesteten Zelllinien verschieden stark ausprägte. Beim Vergleich verschiedener Adenoviren hinsichtlich ihrer Toxizität in einer Zelllinie fielen deutliche Unterschiede auf. Da die gleichen Zellkulturbedingungen und Viruskonzentrationen vorlagen, muss der Unterschied auf anderen Parametern beruhen. Eine Erklärung liefert die Beobachtung, dass reine Virushüllen, ohne intaktes Genom, toxische Effekte auslösen (Muruve et al., 1999). Das macht die Qualität der Virusproduktion und –präparation zu einem wichtigen Parameter in der Analyse der Zytotoxizität eines adenoviralen Gentransfers. Einen Anhaltspunkt für die Qualität der Viruspräparation liefert die Konzentration aller Viruspartikel im Vergleich zu der Konzentration an infektiösen Partikeln, die eine Reporterexpression induzieren können. In Tabelle 4.2.1. sind die Titer aller im MTT-Test eingesetzten Viren und die resultierende Zytotoxizität einer Transfektion mit den entsprechenden Viren aufgelistet.

Virus	virale Partikel VP/ml	infektiöse Partikel TCID <sub>50</sub> /ml	Verhältnis VP/TCID <sub>50</sub>	vitale Zellen nach Infektion mit Virus
RGD-CMV-TK	6,15x10 <sup>12</sup>	2,21x10 <sup>11</sup>	27,8	69,59%
Ad-CMV-TK	1,34x10 <sup>11</sup>	4,25x10 <sup>9</sup>	31,5	38,28%
Ad-COX2-TK	1,57x10 <sup>11</sup>	5,55x10 <sup>9</sup>	28,3	52,30%
Ad-MK-TK	1,25x10 <sup>12</sup>	8,82x10 <sup>9</sup>	141,7	29,21%
Ad-ALA-TK	7,37x10 <sup>11</sup>	3,51x10 <sup>11</sup>	2,1	92,66%
Ad-MDR-TK	1,07x10 <sup>11</sup>	1,63x10 <sup>10</sup>	6,6	56,80%

Tabelle 4.2.1. Virustiter der unterschiedlichen adenoviralen Vektoren und resultierende Toxizität am Beispiel der Zelllinie BT-20. Die virale Infektion wurde mit 100 MOI (TCID<sub>50</sub>-Titer) durchgeführt.

Obwohl verschiedene Adenoviren nur unter Vorbehalt hinsichtlich ihrer toxischen Eigenschaften verglichen werden sollten, bestätigten diese exemplarischen Daten in der Zelllinie BT-20 die Abhängigkeit der Toxizität von der Qualität der Viruspräparation. Das Virus mit dem besten Verhältnis von VP zu TCID<sub>50</sub>, also dem geringsten Anteil an defekten viralen Partikeln (Ad-ALA-TK), zeigte die geringste Toxizität (93% vitale Zellen) nach Transduktion,

wohingegen das Virus mit dem schlechtesten Verhältnis von VP zu TCID<sub>50</sub> die höchste Toxizität (29% vitale Zellen) zeigte.

Die Toxizität von modifizierten Adenoviren, deren Infektion CAR-unabhängig funktioniert, ist vergleichbar mit Adenoviren mit Wildtyp (Wt)-Hülle (Alemany et al., 2001). Auch für das Virus RGD-CMV-TK wurde keine Veränderung der Toxizität im Vergleich mit Adenoviren ohne RGD-Modifikation dokumentiert (Hemminki et al., 2001). Das Virus RGD-CMV-TK, konnte in allen Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellzahl nach Suizidgentherapie auslösen (Abbildung 3.4.3.2.). Die erfolgreiche Suizidgentherapie erkennt man an der signifikant höheren therapeutischen Toxizität der kombinierten Virus- und GCV-Gabe im Vergleich zur Addition der unspezifischen Toxizität von alleiniger GCV- bzw. alleiniger Virus-Gabe. Bei Verwendung von Ad-CMV-TK konnte mit Ausnahme von T-47D-Zellen in allen Zelllinien ein signifikanter Effekt der Suizidgentherapie festgestellt werden (Abbildung 3.4.3.3.). Der Vergleich von RGD-CMV-TK und Ad-CMV-TK zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Stärke ihrer suizidalen Effekte, obwohl eine erhöhte Infektiosität im Vergleich mit Adenoviren ohne RGD-Hüllenmodifikation festgestellt wurde (Hemminki et al., 2001). Die erhöhte Infektiosität von RGD-CMV-TK zeigt sich unter physiologischen Bedingungen, da es hier nur für eine sehr kurze Zeitdauer zur Interaktion von Virus und Wirtszelle kommt und die Infektion mit RGD-CMV-TK im Vergleich mit unmodifizierten Adenoviren zu höheren Gentransferraten führt. In den in vitro Versuchen wurden die Viren für 2h mit den Zellen inkubiert und bei diesen optimalen Bedingungen zeigte sich keine erhöhte Infektiosität der RGD-Viren.

In der Zelllinie T-47D wurde bei Verwendung von RGD-CMV-TK eine therapeutische Wirkung der Suizidgentherapie gemessen, aber nicht bei Verwendung von Ad-CMV-TK. Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert die Beobachtung, dass die Effizienz einer adenoviralen Gentherapie durch niedrige Expressionslevel des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) limitiert wird (Kim et al., 2002; Li Y et al., 1999). Dass in T-47D-Zellen mit Adenoviren, welche die wt-Hülle besitzen, keine zytotoxischen Effekte nach Suizidgentherapie ausgelöst werden konnten, scheint an der geringen Gentransfereffizienz von Wt-Adenoviren zu liegen. Da das RGD-modifizierte Adenovirus CAR-unabhängig infiziert und eine erfolgreiche Suizidgen-vermittelte Zytotoxizität induzieren konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die Zelllinie T-47D eine sehr niedrige oder keine CAR-Expression zeigt. Für die Internalisation des Adenovirus werden neben dem CAR auch die Integrine ( $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ ) benötigt. Diese Moleküle, CAR und Integrine, zeigen kein ubiquitäres Vorkommen in Tumorgeweben (Zeimet et al., 2002). Mögliche Verbesserungen der adenoviralen Suizidgentherapie bestehen in der weiteren Optimierung des adenoviralen Gentransfers durch Modifikationen des Virus. Eine neuartige Möglichkeit stellt der Austausch der Fiber-Knob-Domäne dar. Die meisten adenoviralen Vektoren basieren auf dem Serotyp 5-Adenovirus (Ad5). Dieser Ad5 benötigt

den CAR als primären Rezeptor für die Infektion, der in Tumoren variabel exprimiert wird und bei Mangel an CAR die Adenovirus-Infektion limitieren kann. Durch den Austausch der Ad5-Fiber-Knob-Domäne gegen eine Fiber-Knob-Domäne aus Adenoviren des Serotyp 3 (Ad3) wird der Virus-Tropismus verändert, so dass die Infektion nicht mehr über den CAR erfolgt. Der Rezeptor für das Ad 3 scheint in Ovarialkarzinomen höher exprimiert zu sein als der CAR und bietet deshalb die Möglichkeit höhere Gentransfereffizienzen zu erreichen (Kanerva et al., 2002a). Weitergehende Studien zeigten, dass chimäre Ad5 mit Fiber-Knob-Domäne aus Ad3 in vitro und in vivo bessere Gentransferraten als RGD-modifizierte Viren ergeben und die Toxizität und Verteilung im Organismus der modifizierten Adenoviren vergleichbar mit den Wt-Adenoviren des Serotyp 5 sind (Kanerva et al., 2002b).

Zusammengefasst zeigten die Experimente, dass die Toxizität des adenoviralen Gentransfers stark abhängig von der Qualität der Viruspräparation war und in den getesteten Zelllinien unterschiedlich starke Auswirkungen zeigte. Nur qualitativ gute Viruspräparationen führten bei hohen Virentitern zu relativ geringen Toxizitäten in der Zellkultur. Das modifizierte Virus RGD-CMV-TK ermöglichte in allen getesteten Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien eine effiziente Suizidgentherapie und zeigte in der Ad5-resistenten Tumorzelllinie T-47D mit fehlendem CAR die Verbesserung des Gentransfers im Vergleich mit Ad-CMV-TK.

#### 4.3. Transkriptionelle Regulation und Induktion der Genexpression

Um eine spezifische Expression des Transgens in den Tumorzellen - nicht aber in den Zellen des Normalgewebes - zu erreichen, sollte die Transkription des Suizidgens unter die Kontrolle geeigneter Promotoren gestellt werden. Idealerweise führt ein tumorspezifischer Promotor zu keiner Expression im Normalgewebe, ist aber im Tumorgewebe aktiv oder spezifisch induzierbar.

In der Literatur werden die Promotoren der Gene Cyclooxygenase 2 (COX2) und Midkine (MK) als potentielle Kandidaten für die tumorspezifische Regulation der Suizidgenexpression bezeichnet, da sie einerseits in den lebenswichtigen Organen inaktiv sind (Adachi et al., 2000; Yamamoto et al., 2000) und andererseits eine spezifische Expression in vielen Tumoren vermitteln können (Wesseling et al., 2001; Casado et al., 2001b). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Promotoren COX2 und MK in den Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien analysiert und getestet, ob sie eine Suizidgentherapie in vitro vermitteln können.

Für die Behandlung des Mammakarzinoms scheinen die Promotoren der Gene für die Milchproteine  $\alpha$ -Lactalbumin (ALA) und  $\beta$ -Casein (CAS) geeignet zu sein, da diese nur im laktierenden Brustgewebe gebildet und deshalb sehr restriktiv reguliert werden. Dadurch wird eine Aktivität der Promotoren im Normalgewebe ausgeschlossen. Mammakarzinome zeigen ähnliche Eigenschaften wie Milch-produzierende Zellen, da sie häufig aus Zelltypen

entstehen, die in der laktierenden Brust für die Bildung der Milchproteine verantwortlich sind. Im Laufe der Schwangerschaft, Geburt und Stillzeit kommt es während der Verzweigung der Milchgänge zur Vermehrung und Proliferation von Epithelzellen und diese zeigen Karzinom-ähnliche Eigenschaften, wie z.B. Fähigkeit zur Neoangiogenese und Resistenz gegen Apoptose-Signale (Wiseman et al., 2002; Djonov et al., 2001).

Der Promotor des Multiple Drug Resistance (MDR)-Gens, das eine Resistenz von Tumorzellen gegen die Chemotherapeutika aus der Wirkstoffklasse der Taxane und Anthrazykline vermittelt, schien im Rahmen der Suizidgentherapie für die Behandlung des Ovarialkarzinoms geeignet, da hier besonders häufig eine Resistenz nach Chemotherapie auftritt. Die Chemotherapie-resistenten Tumorzellen stellen bei der klassischen Tumorbehandlung einen negativen Prognosefaktor dar, da sie nur schwer mit zusätzlichen Behandlungen therapierbar sind. Die eigentlich negative Eigenschaft der MDR-basierten Resistenz kann als Angriffspunkt der Suizidgentherapie genutzt werden, indem der MDR-Promotor für die Transkriptionsregulation der HSV-TK eingesetzt wird. Da die chemoresistenten Tumorzellen das MDR-Gen exprimieren, würde auch das Suizidgenprodukt hergestellt werden und die Tumorzellen könnten durch GCV-Gabe getötet werden (siehe Abbildung 1.4.2.2.). Durch eine Kombination aus Chemotherapie und Suizidgentherapie unter regulatorischer Kontrolle des MDR-Promotors sollte also eine synergistische Tumorthherapie möglich sein.

In den Luziferase-Assays zeigten die Promotoren COX2 und MK in allen getesteten Zelllinien eine deutliche Aktivität (Abbildung 3.4.2.1.). Allerdings konnte bei Verwendung Ad-COX2-TK in der Zelllinie T-47D und mit Ad-MK-TK in den Zelllinien T-47D, ZR-75-1 und MDAH 2774 kein signifikanter Effekt der Suizidgentherapie festgestellt werden. Diese anscheinend widersprüchlichen Daten erklären sich wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Analysensysteme. Da im Luc-Assay die Luziferase-Aktivität des Zelllysats analysiert wird, könnten wenige transfizierte Zellen mit starker Luziferase-Expression ein nachweisbares Signal ergeben, obwohl der Prozentsatz transduzierter Zellen vernachlässigbar ist und im MTT-Assay keine signifikante Abnahme der Zellzahl bewirken würde. Im MTT-Assay wird ein Schwellenwert der HSV-TK-Expression benötigt, damit die nicht-transduzierten Zellen den toxischen Effekt der Suizidgentherapie nicht durch vermehrte Zellteilung kompensieren können. Im Falle der Zelllinie T-47D wird dieser Schwellenwert vermutlich aufgrund der mangelhaften Transduktion mit Wt-Adenoviren und in ZR-75-1- und MDAH 2774-Zellen vermutlich durch zu geringe Promotoraktivitäten verfehlt.

Nach Überprüfung der korrekten Klonierung der Promotoren ALA und CASENH durch die DNA-Sequenzierung zeigte sich in der X-Gal-Färbung (Abbildung 3.3.3.1.) bei Verwendung des ALA-Promotors eine deutliche Aktivität, bei Verwendung des CASENH-Promotors aber

keine deutliche Färbung. Der CASENH-Promotor zeigte auch in Luziferase (Luc)-Assays keine Aktivität (Abbildung 3.3.4.2.1.), so dass dieser in den weitergehenden Experimenten nicht mehr verwendet wurde. Der Grund für die fehlende Aktivität des CASENH-Promotors könnte an der unvollständigen bzw. falschen hormonelle Induktion liegen. Obwohl für das Casein-Gen eine Aktivierung durch Prolactin und Glucocorticoid-Hormone beschrieben wurde (Rosen et al., 1998), könnte für die Induktion der CASENH-Promotor-Aktivität die Verwendung weiterer Hormone notwendig sein. Für den ALA-Promotor zeigte sich in den Luc-Assays eine geringe basale Aktivität, die nach Inkubation mit Prolactin und Dexamethason um den Faktor 9 verstärkt wurde (Abbildung 3.3.4.2.1.). Diese Induktion resultierte im Vergleich zum CMV-Promotor in relativ geringen Promotoraktivitäten. Der ALA-Promotor war in den getesteten Zelllinien also relativ schwach (Abbildung 3.4.2.2.). Um die ausreichende Aktivität des ALA-Promotors für eine Suizidgentherapie zu testen, wurden mit den hormonell induzierten Zelllinien eine in vitro-Suizidgentherapie durchgeführt. In den Zelllinien T-47D und SKOV3.IP1 zeigte sich keine erfolgreiche Suizidgentherapie (Abbildung 3.4.3.6.), obwohl im Luc-Assay eine Induktion des ALA-Promotors gezeigt werden konnte. Ursache war vermutlich wieder die Unterschreitung des Schwellenwertes, ab dem ein Effekt der HSV-TK-Expression detektiert werden konnte.

Obwohl in den Zelllinien BT-20 und SK-BR-3 im Luc-Assay keine Induktion der ALA-gesteuerten Genexpression durch die Hormon-Gabe induziert werden konnte, zeigte sich nach Suizidgentherapie mit Ad-ALA-TK ein signifikanter Effekt (Abbildung 3.4.3.6.). Allerdings war die Basisaktivität des ALA-Promotors in diesen Zellen relativ hoch, so dass sie ausreichend gewesen sein könnte, den therapeutischen Effekt nach Suizidgentherapie auszulösen.

In Bezug auf den MDR-Promotor war von Interesse, ob man in den Zelllinien in vitro eine Resistenz gegen das Zytostatikum Doxorubicin auslösen konnte. Erkennbar war die Resistenz an der Proliferation der Zellen trotz der Zugabe von Doxorubicin zum Kulturmedium. Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien mit Doxorubicin gelang nur im Falle von SK-OV-3-Zellen, für die eine Resistenz basierend auf dem MDR-Gen gezeigt wurde (ATCC, 2002) und hier bestätigt werden konnte. Die Analyse zeigte eine geringe basale Expression, obwohl die Zellen ohne Doxorubicin kultiviert wurden. Nach Zugabe von Doxorubicin erhöhte sich die Expressionsstärke des MDR-Gens und ließ sich konzentrationsabhängig steigern (Abbildung 3.3.4.1.1.). Nach Überprüfung der korrekten Klonierung des MDR-Promotors durch Sequenzierung zeigte sich in der X-Gal-Färbung (Abbildung 3.3.3.1.) eine deutliche Aktivität in SK-OV-3-Zellen.

In Luziferase-Assays (Abbildung 3.3.4.2.1.) konnten die Induzierbarkeit der MDR-gesteuerten Expression nach Inkubation von SK-OV-3-Zellen mit Doxorubicin gezeigt

werden. Hier kam es zu einer Verstärkung der Promotoraktivität um den Faktor 5,5, wohingegen in allen anderen Zelllinien nur relativ schwache Basalaktivitäten gemessen wurden (Abbildung 3.4.2.3.). Erwartungsgemäß zeigten die SK-OV-3-Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin eine therapeutische Wirkung nach Suizidgenexpression mit Ad-MDR-TK, wohingegen die unbehandelten SK-OV-3-Zellen keine Wirkung zeigten (Abb. 3.4.3.7.). Ohne Doxorubicin-Inkubation reichte die Basalaktivität des MDR-Promotors nicht aus, um bei einer Infektionsdosis von 10 MOI und Gabe von 100 µg/ml GCV ein Abtöten der Zellen auszulösen. Bei einer Erhöhung der Virusdosis auf 100 MOI zeigte sich auch in den Zellen ohne Doxorubicin-Vorbehandlung eine starke Reduktion der vitalen Zellen, die sich nicht signifikant von Zellen mit Doxorubicin-Vorbehandlung unterschied. Das bedeutet, dass bei 100 MOI die Kopienzahl von MDR-TK in der Zelle und die basale Promotoraktivität eine ausreichende Expression der HSV-TK und damit eine therapeutische Wirkung der Suizidgenexpression vermitteln konnte.

Zusammengefasst zeigten die Promotoren CMV, COX2, MK, ALA und MDR eine ausreichende Aktivität, um eine Suizidgenexpression in vitro durchzuführen. Die antitumorale Effizienz war dabei von der Zelllinien-spezifischen Aktivität der Promotoren und der ausreichenden CAR-Expression abhängig. Im Falle der Promotoren ALA und MDR war die optimale Stimulation der Zellen mit Hormonen bzw. Doxorubicin wichtige Voraussetzung für die ausreichende Transgenexpression. Diese vielversprechenden Daten zeigen, dass die Promotor-gesteuerte Suizidgenexpression eine geeignete Strategie zur Etablierung einer Tumor-spezifischen Therapie sein könnte. In weitergehenden Experimenten sollte vor allem das Potential des MDR-Promotors in einem in vivo-Therapieansatz analysiert werden, da sich für austherapierten Patientinnen mit chemoresistenten Tumoren eine Behandlungsstrategie ergeben würde.

Weitere Verbesserungsmöglichkeiten der Effizienz und Spezifität der Suizidgenexpression ergeben sich aus den systematischen, vergleichenden Analysen der Genexpression von Tumor- und Normalgeweben. Neben den verwendeten Promotoren werden immer weitere vielversprechende Promotor-Kandidaten für eine tumorspezifische Expression entwickelt. Hierbei sind vor allem Promotoren von wichtigen Genen der Neoangiogenese von Bedeutung. Ein potentieller Kandidat ist der Promotor des Flt-1-Gens, das für einen Rezeptor des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) kodiert. Das VEGF ist einer der Hauptfaktoren in der Regulation der Blutgefäßbildung. Da die Blutgefäßbildung in den Tumorzellen fehlreguliert ist, kommt es in Tumorzellen zur Überexpression des Flt-1-Gens, die für eine Transgenexpression durch den Flt-1-Promotor genutzt werden konnte (Bauerschmitz et al., 2002b).

Falls die Aktivität des spezifischen Promotors zu gering sein sollte, gibt es weitere Möglichkeiten, um die transkriptionelle Aktivität zu verstärken. Der spezifischen Promotor kann die Expression eines synthetischen Transkriptionsaktivator regulieren. Vor das eigentliche Reportergen unter der Regulationskontrolle des spezifischen Promotors werden die entsprechenden Bindungsstellen für den Transkriptionsaktivator eingefügt. Dadurch wird die Expression des Reportergens über den synthetischen Transkriptionsfaktor um bis zu 100-fach verstärkt und die Spezifität bleibt erhalten (Nettelbeck et al., 1998 und 2000).

Zur Minimierung der unerwünschten Nebenwirkungen bei einer basalen Expression des verwendeten Promotors in lebenswichtigen Organen wie z.B. der Leber können spezielle Transgenkonstrukte verwendet werden (Reynolds et al., 2001). Dabei werden die übertragenen Transgene über eine nicht-humane Rekombinase inaktiviert. Diese nicht-humane Rekombinase wird in dem gefährdeten Organ exprimiert, blockiert die Expression des Transgens und damit die potentielle Toxizität.

Eine weitere Effizienzsteigerung der Suizidgentherapie ist durch die Anwendung anderer Purin-Analoga anstelle von GCV möglich. Dadurch konnte der Bystander-Effekt in der Suizidgentherapie um den Faktor 3 gesteigert werden (Degrève et al., 1999).

#### 4.4. Kombination aus Chemo- und Gentherapie im Tierversuch

Für die klinische Anwendung der Gentherapie zur Behandlung des Ovarialkarzinoms ist der Einfluss des Aszites auf die Gentransfereffizienz ein wichtiger Faktor. Für RGD-modifizierte Adenoviren wurde im Gegensatz zu Adenoviren mit Wildtyp(Wt)-Hülle keine Inhibition des Gentransfers durch neutralisierende Antikörper aus dem Aszites beschrieben (Blackwell et al., 2000). Da diese Antikörper, die gegen die Fiber-Knob-Domäne des Adenovirus gerichtet sind, in einem hohen Prozentsatz der Bevölkerung nachgewiesen wurden (Schulick et al., 1997; Rosenberg et al., 1998), sollten für eine erfolgreiche, klinische Gentherapie Adenoviren mit modifiziertem Tropismus verwendet werden. Durch die RGD-Modifikation der Fiber-Knob-Domäne verlieren die Antikörper ihre neutralisierende Wirkung, so dass mit diesen RGD-Adenoviren eine erfolgreiche, intraperitoneale Gentherapie möglich ist (Blackwell et al., 2000). Um das Potential des RGD-CMV-TK-Virus für die klinische Anwendung einzuschätzen, muss auch eine Kompatibilität mit den etablierten Therapiemaßnahmen vorhanden sein. In der klinischen Anwendung würde eine Suizidgentherapie nur ergänzend und begleitend neben den klassischen Methoden angewendet werden. Die Wirkung der Suizidgentherapie mit RGD-CMV-TK und der Chemotherapie dürfen sich nicht gegenseitig inhibieren, sondern sollten sich idealerweise additiv oder synergistisch verstärken.

Im subkutanen Tumormodell mit Nacktmäusen wurden unterschiedliche Kombinationen von Chemo- und Gentherapie hinsichtlich ihrer antitumoralen Effekte am Beispiel von 2 Ovarialkarzinom-Zelllinien analysiert. Dabei wurden neben zwei Chemotherapeutika auch drei

zeitliche Kombinationen von Chemo- und Suizidgentherapie untersucht. In Tabelle 4.5.1. sind die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst. Neben der finalen Tumorgröße nach einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen und den unterschiedlichen Behandlungsstrategien ist auch die Tumorgröße am Tag der letzten therapeutischen Injektion von GCV bzw. dem Chemotherapeutikum angegeben. Bei der alleinigen Suizidgentherapie wurde die letzte GCV-Injektion an Tag 14 verabreicht, bei der gleichzeitigen Durchführung von Chemo- und Gentherapie wurde die letzte therapeutische Injektion an Tag 18 und bei der gestaffelten Anwendung an Tag 23 (1. Chemotherapie) bzw. an Tag 22 (1. Gentherapie) gegeben.

Therapie	nach Tag 30		letzte therapeutische Injektion	
	MDAH 2774	SKOV3.IP1	MDAH 2774	SKOV3.IP1
NK	991	1175	--	--
GCV	1152	1023	--	--
Topo	743	730	--	--
Taxol	644	603	--	--
Virus	667	510	--	--
ST	951	187	256	360
1. Topo, 2. ST	255	192	173	203
1. ST, 2. Topo	194	237	135	321
ST + Topo	154	336	76	411
1. Taxol, 2. ST	538	225	499	296
1. ST, 2. Taxol	321	168	275	333
ST + Taxol	402	165	266	420

Tabelle 4.5.1. Tumorgrößen in mm<sup>3</sup> am Tag 30 bzw. am Tag der letzten therapeutischen Injektion von GCV oder dem Chemotherapeutikum. Als Therapien wurden neben den Kontrollgruppen verschiedene zeitliche Kombinationen von Chemo- und Suizidgentherapie durchgeführt (NK: Negativ-Kontrolle; GCV: GCV-Gabe; Topo: Topotecan-Gabe; Taxol: Taxol-Gabe; Virus: RGD-CMV-TK-Injektion; ST: Suizidgentherapie). Aufgeführt sind die Mittelwerte von 8 Tumoren.

Interessanterweise zeigten die zwei Tumormodelle (MDAH 2774, SKOV3.IP1) eine unterschiedliche Wachstumsdynamik (Tabelle 4.5.1.). Offensichtlich trat die Wirkung der Suizidgentherapie in MDAH 2774-Tumoren schnell ein, so dass es schon nach wenigen Tagen zu einer Hemmung des Tumorwachstums kam. Nach der letzten therapeutischen Injektion nahm die Tumorgröße wieder zu, da sich die überlebenden Tumorzellen wieder vermehren konnten. In SKOV3.IP1-Tumoren setzte die Therapie-Wirkung erst später ein, aber die kontinuierliche Größenreduktion des Tumors führte nach 30 Tagen oft zu kleineren Tumoren als im MDAH 2774-Modell. Da auch in der Klinik des Ovarialkarzinoms solche unterschiedlichen Wachstumsverläufe bekannt sind, wurden beide Modelle experimentell intensiv weiterverfolgt. In MDAH 2774-Tumoren zeigte die Kombination mit Topotecan die höhere antitumorale Effizienz, aber in SKOV3.IP1-Tumoren besaßen beide Kombinationen keinen deutlichen Vorteil gegenüber der alleinigen Suizidgentherapie. Taxol zeigte lediglich tendenziell eine etwas bessere Wirkung.

In MDAH 2774-Tumoren zeigte sich eine synergistische Wirkung von Chemo- und Suizidgentherapie. Nach alleiniger Suizidgentherapie wurden nur minimale Effekte gemessen, aber die Kombinationstherapie mit Topotecan oder Taxol verursachte sehr viel stärkere antitu-

morale Effekte, die auch deutlich stärker waren als die Addition der antitumoralen Effekte von alleiniger Suizidgen- bzw. Chemotherapie. Diese synergistische Wirkung einer Kombinationstherapie trotz ineffektiver Suizidgentherapie wurde schon für andere Adenoviren und Chemotherapeutika beschrieben (Gurnani et al., 1999; Wildner et al., 1999).

In SKOV3.IP1-Tumoren zeigte die Suizidgentherapie einen starken Rückgang der Tumorgroße, deshalb verblieb wenig Spielraum für additive oder synergistische Effekte einer Kombinationstherapie. In drei Kombinationstherapie-Ansätzen waren die Tumore an Tag 30 sogar größer als nach alleiniger Suizidgentherapie. Die fehlende Verbesserung der antitumoralen Effizienz der Kombinationstherapie kann mit der identischen Wirkungsstrategie von Chemo- und Suizidgentherapie erklärt werden. Beide Methoden wirken vor allem gegen proliferierende Zellen. Da aber beide Methoden schon alleine in SKOV3.IP1-Tumoren gute antitumorale Effekte erzielen und die proliferierenden Zellen töten, kann die zweite Therapie nicht mehr effizient wirken.

Eine möglichst frühe Behandlung mit mehreren Wirkstoffen führte in der Chemotherapie zu höheren antitumoralen Effekten als die Gabe von nur einem Wirkstoff. Analog dazu bestand die Erwartung, dass die simultane Durchführung der Chemo- und Suizidgentherapie effizienter sein sollte als die sequentielle Kombination, die mit normalen Adenoviren bestätigt wurde (Wildner et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte für MDAH 2774-Tumore diese Hypothese nur bei Verwendung von Topotecan eindeutig bestätigt werden (Tabelle 4.5.1.).

Die Wirksamkeit der Suizidgentherapie ist oft limitiert, da das replikations-defiziente Adenovirus den meist soliden Tumor nur ineffizient infiltrieren und penetrieren kann. Deshalb bleibt die Wirkung auf den äußeren Bereich des Tumors beschränkt. Durch die Verwendung von onkolytischen, replikationskompetenten Adenoviren, deren Replikation selektiv nur in Tumorzellen erfolgen kann, ist eine bessere Penetration des Tumors und so eine effiziente Tumorbehandlung möglich (Heise et al., 2000; Kirn et al., 2001; Bauerschmitz et al., 2002a). Durch die Kombination der selektiven, onkolytischen Virusreplikation und der spezifischen Suizidgenexpression mit Bystander-Effekt sollte eine Verbesserung der antitumoralen Effizienz der Krebs-Gentherapie möglich sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kombination der Suizidgentherapie und der Chemotherapie in MDAH 2774-Tumoren wirksamer war als die Einzeltherapien. Dass in SKOV3.IP1-Tumoren die kombinierte Therapie nur in Einzelfällen wirksamer war als die alleinige Suizidgentherapie, erklärt sich aufgrund der hohen antitumoralen Effizienz der Suizidgentherapie. Dadurch gab es nur wenige proliferierende Tumorzellen, die durch die zusätzliche Chemotherapie abgetötet werden konnten. Aufgrund variabler Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze konnte keine zeitliche Kombinationsmöglichkeit als

optimale Lösung für alle Versuche identifiziert werden. Da keine inhibierenden Einflüsse von Chemo- und Suizidgentherapie mit RGD-CMV-TK aufgetreten sind, bietet die Kombination die Möglichkeit, stärkere antitumorale Effekte als mit der jeweiligen Einzeltherapie zu erreichen. Die synergistische Wirkung in Tumoren, die schlecht auf eine Chemotherapie reagieren, sollte nach operativer Entfernung der Haupttumorlast und Behandlung des minimalen Tumorrests mit einer Kombination aus Chemo- und Gentherapie zu einer deutlichen Verbesserung der Langzeit-Therapie-Erfolge führen.

## 5. Zusammenfassung

Die Suizidgentherapie mit HSV-TK bietet die Möglichkeit einer vielversprechenden, innovativen Therapieergänzung in der gynäkologischen Onkologie, um die Prognose und Heilungsaussichten der Patientinnen zu verbessern.

In vitro und in Tierversuchen konnten bisher gute Therapieergebnisse erzielt werden, aber erste klinische Anwendungen lieferten enttäuschende Resultate. Aufgrund einer zu geringen Gentransfereffizienz und fehlender Spezifität der verfügbaren Systeme ergaben sich unbefriedigende Ergebnisse, so dass Verbesserungen der Suizidgentherapie für die effiziente klinische Anwendung nötig waren.

Durch RGD-Modifikation von adenoviralen Vektoren konnte eine erhöhte Infektiosität der Vektoren erreicht werden, die sich vor allem bei Tumoren mit verringerter oder fehlender CAR-Expression auswirkte. In der vorliegenden Arbeit konnte mit einem RGD-modifizierten Adenovirus in allen getesteten Zelllinien eine Suizidgentherapie induziert werden, obwohl diese zum Teil durch einen analogen Wt-Vektor nicht therapiert werden konnten. Für die potentielle klinische Anwendung der RGD-Viren war die Kompatibilität mit einer klassischen Chemotherapie von besonderem Interesse. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass in Tumoren, die schwach auf eine singuläre Suizidgen- bzw. Chemotherapie reagierten, eine Kombination der beiden Therapien synergistische antitumorale Effekte hervorrief. Dabei konnte in verschiedenen Tumorsystemen keine zeitliche Kombinationsfolge favorisiert werden.

Hinsichtlich der Immunogenität haben nicht-virale Vektorsysteme (z.B. Lipofektion) gegenüber den viralen Vektoren den Vorteil keine Immunantwort auszulösen. Das in unseren Zelllinien effizienteste Lipofektionssystem kann aber nicht in cGMP-Qualität hergestellt und deshalb nicht klinisch angewendet werden. Das neue CCQ-basierte Lipofektionssystem wurde im Rahmen dieser Arbeit auf seine Gentransfereffizienz und Toxizität in vitro getestet und zeigte im Vergleich mit dem Referenzsystem bessere bis vergleichbare Resultate. Die Präsenz von Aszites, ein klinisch relevanter Faktor, hatte auf das neue CCQ-basierte System keinen deutlichen Einfluss, wohingegen das Referenzsystem stark inhibiert wurde.

Die transkriptionelle Kontrolle der Suizidgenexpression mit spezifischen Promotoren ermöglicht die Einschränkung der Therapiewirkung auf das Tumorgewebe. Die mit der Karzinogenese assoziierten und in wichtigen Organen inaktiven Promotoren MK und COX2 zeigten ebenso wie der ALA- und MDR-Promotor eine Aktivität in den getesteten Zelllinien. Allerdings ist für die erfolgreiche Suizidgentherapie mit den Promotoren ALA und MDR eine Induktion der Promotoraktivität notwendig. Im Falle des MDR-Promotors lässt sich die ungünstige klinische Situation von Chemotherapie-resistenten Tumoren ausnutzen, da eine MDR-Promotor-regulierte Suizidgentherapie nur in den resistenten Zellen toxisch wirken sollte.

**6. Literaturverzeichnis**

- Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Grizzle WE, et al. Midkine promoter-based adenoviral vector gene delivery for pediatric solid tumors. *Cancer Res*, 60, 4305-4310, 2000
- Alemanly R, Curiel DT. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther*, 8, 1347-1353, 2001
- Alvarez RD, Curiel DT. A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HSV-TK) gene and intravenous ganciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Human Gene Ther*, 8, 597-613, 1997
- ATCC-Homepage, 2002 (<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=ce,4882943,HTB-77&text=sk%2Dov%2D3&max=20>)
- Anderson LM, Swaminathan S, Zackon I, Tajuddin AK, Thimmapaya B, Weitzman SA. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of the HSVtk gene for the treatment of breast cancer. *Gene Ther*, 6, 854-864, 1999
- Arteaga CL, Hurd SD, Winner AR, Johnson MD, Fendley BM, Forbes JT. Anti-transforming-growth-factor (TGF)- $\beta$  antibodies inhibit breast-cancer-cell tumorigenicity and increases mouse spleen natural-killer-cell activity. *J Clin Invest*, 92: 2569-2576, 1993
- Audouy S, Molema G, de Leij L, Hoekstra D. Serum as a modulator of lipoplex-mediated gene transfection: dependence of amphiphile, cell type and complex stability. *J Gene Med*, 2, 465-476, 2000
- Balague C, Zhou J, Dai Y et al. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood*, 95, 820-828, 2000
- Bauerschmitz GJ, Lam JT, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I, Krashnyk V, Mikheeva GV, Barnes MN, Alvarez RD, Dall P, Alemanly R, Curiel DT, Hemminki A. Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res*, 62, 1266-1270, 2002a
- Bauerschmitz GJ, Nettelbeck DM, Kanerva A, Baker AH, Hemminki A, Reynolds PN, Curiel DT. The flt-1 promoter for transcriptional targeting of teratocarcinoma. *Cancer Res*, 62, 1271-1274, 2002b
- Bilbao R, Gomez-Navarro J, Bralet MP, Qian C, Tran PL, Tennant B, Prieto J, Brechot C. Transduction efficacy, antitumoral effect, and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: the woodchuck animal model. *Cancer Gene Ther*, 7, 657-662, 2000
- Blackwell JL, Li H, Gomez-Navarro J, Dmitriev I, Krashnyk V, Richter CA, Shaw DR, Alvarez RD, Curiel DT, Strong TV. Using a tropism-modified adenoviral vector to circumvent inhibitory factors in ascites fluid. *Hum Gene Ther*, 11, 1657-1669, 2000
- Boothman DA, Trask DK, Pardee AB. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by beta-lapachone, an activator of topoisomerase 1. *Cancer Res*, 49, 605-612, 1989
- Boussif O, Gaucheron J, Boulanger C, Santaella C, Kolbe HVJ, Vierling P. Enhanced in vitro and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid. *J Gene Med*, 3, 109-114, 2001
- Branch P, Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF, Karran P. Immune surveillance in colorectal carcinoma. *Nature Genet*. 9, 231-232. 1995
- Brunner S, Sauer T, Carotta S, Cotton M, Saltik M, Wagner E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*, 7, 401-407, 2000

- Burrows FJ, Gore M, Smiley WR, Kanemitsu MY, Jolly DJ, Read SB, Nicholas T, Kruse CA. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther*, 9 (1), 87-95, 2002
- Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, DiCarlo J. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 58, 216-225, 1995
- Caplen NJ et al. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med*, 1, 39-46, 1995
- Casado E, Nettelbeck DM, Gomez-Navarro J, Hemminki A, Gonzalez Bron M, Siegal GP, Barnes MN, Alvarez RD, Curiel DT. Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol*, 82, 229-237, 2001a
- Casado E, Gomez-Navarro J, Yamamoto M, Adachi Y et al. Strategies to accomplish targeted expression of transgenes in ovarian cancer for molecular therapeutic applications. *Clin Cancer Res*, 7, 2496-2504, 2001b
- Chen Q-R, Zhang L, Stass S, Mixson AJ. Co-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes. *Gene Ther*, 7, 1698-1705, 2000
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987
- Cortesi R et al. Effect of cationic liposome composition on in vitro cytotoxicity and protective effect on carried DNA. *Int J Pharm*, 39, 69-78, 1996
- Coukos G, Rubin SC. Gene therapy for ovarian cancer. *Oncology*, 15 (9), 1197-1205, 2001
- Cristiano RJ. Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy. *Front Biosci*, 3, D1161-D1170, 1998
- Cromme FV, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CJLM Walboomers JMM: Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J. Exp. Med.* 179, 335-340, 1994
- Culver KW, Ram Z, Walbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producing cells for the treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256, 1550-1552, 1992
- Dai Y, SchwarzEM, Gu D, et al. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1401-1405, 1995
- Dall P, Hekele A, Beckmann MW, Bender HG, Herrlich P, Ponta H. Efficient lysis of CD44v7/8-presenting target cells by genetically engineered cytotoxic T-lymphocytes--a model for immunogene therapy of cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 66 (2), 209-216, 1997
- Danthinne X, Imperiale MJ. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene The*, 7, 1707-1714, 2000
- Degrève B, De Clerq E, Balzarini J. Bystander effect of purine nucleoside analogues in HSV-1tk suicide gene therapy is superior to that of pyrimidine nucleoside analogues. *Gene Ther*, 6, 162-170, 1999
- Deutsche Krebsgesellschaft, Homepage 2002 (<http://info.krebsgesellschaft.de/>)
- Djonov V, Andres AC, Ziemicki A. *Microsc Res Tech*, 52, 182, 2001
- Dmitriev I, Krashnyk V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N, Curiel DT. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of

- a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol*, 72 (12), 9706-9713, 1998
- Donaldson KL, Goolsby GL, Wahl AF. Cytotoxicity of the anticancer agents cisplatin and taxol during cell proliferation and the cell cycle. *Int J Cancer*, 57, 847-855, 1994
- DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 12, 1063-1073, 1998
- Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, DeMiranda P, Beauchamp I, Schaffer HJ. Selectivity of action of an antihertic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *PNAS*, 74, 5716-5720, 1977
- Felgner PL, Godek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 7413-7417, 1987
- Flötotto T: Untersuchung alternativer Mechanismen der Genregulation durch Östrogen-Isoformen. Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2001
- Freeman S, Whartenby KA, Koeplin DS et al. Tumor regression when a fraction of the tumor cells contain the HSV-TK gene. *J Cell Biochem*, 16, 47, 1992
- Furman PA, McGujirt PV, Keller PM, FyfeJA, Elion GB. Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpes simplex virus genetic information. *Virology*, 102, 420-430, 1980
- Geall AJ, Taylor RJ, Earll ME, Eaton MAW, Blagbrough IS. *Chem Commun*, 13, 1403-1404, 1998
- Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by Rifampin. *J Biol Chem*, 276 (18), 14581-14587, 2001
- Gillies SD, Lan Y, Brunkhorst B, Wong WK, Li Y, Lo KM. Bi-functional cytokine fusion proteins for gene therapy and antibody-targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 51 (8), 449-460, 2002
- Goffin V, Binart N, Clement-Lacroix P, Bouchard B et al. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 15, 189-201, 1999
- Groth D, Keil O, Schneider M, Reszka R. Transfection assay for dual determination of toxicity and gene expression. *Anal Biochem*, 258: 141-143, 1998
- Gurnani M, Lipari P, Dell J, Shi B, Nielsen LL. Adenovirus-mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 44, 143-151, 1999
- Haines AMR, Irvine AS, Mountain A, Charlesworth J, Farrow NA, Husain RD, Hyde H, Ketteringham H, McDermott RH, Mulcahy AF, Mustoe TL, Reid SCH, Rouquette M, Shaw JC, Thatcher DR, Welsh JH, Williams DE, Zauner W, Phillips RO. CL22 - a novel cationic peptide for efficient transfection of mammalian cells. *Gene Ther*, 8: 99-110, 2001
- Hammerschmidt DE. Development of a gutless vector. *J Lab Clin Med*, 134, C3, 1999
- Hasenburger A, Tong X, Rojas-Martinez A, Nyberg-Hoffmann C, Kieback CG, Kaplan A, Kaufmann RH, Ramzy I, Aguilar-Cordova E, Kieback DG. Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther*, 7 (6), 839-852, 2000
- Harris CC, Holstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 329, 1318-1327, 1993

- Heise C, Hermiston T, Johnston L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, Hawkins L, Kirn D. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med*, 6 (10), 1134-1139, 2000
- Hemminki A, Belousova N, Zinn KR, Liu B, Wang M, Chaudhuri T, Rogers BE, Buchsbaum DJ, Siegal GP, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Curiel DT, Alvarez RD. An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression. *Mol Ther*, 4 (3), 223-231, 2001
- Hernandez A, Zöllner K, Enczmann J, Ebert T, Schmitz-Draeger B, Ackermann R, Wernet P. Differential transfection efficiency of the GM-CSF gene into human renal cell carcinoma lines by lipofection. *Cancer Gene Ther*, 4 (1), 59-65, 1997
- Herrmann I, Durst B, Röder G, Rein DT, Hampl M, Nierderacher D, Bender HG, Dall P. Genetic modification of the target specificity of cytotoxic T-cells – an additive therapeutic strategy for gynaecological tumours. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 62 (9), 856-861, 2002
- Kanerva A, Mikheeva GV, Krashnyk V, Coolidge CJ, Lam JT, Mahasreshti PM, Barker SD, Straughn M, Barnes MN, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT. Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 8 (1), 275-280, 2002a
- Kanerva A, Wang M, Bauerschmitz GJ, Lam JT, Bhoola SM, Barnes MN, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT, Hemminki A. Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber modified adenoviruses. *Mol Ther*, 5 (6), 695-704, 2002b
- Keil O, Bojar H, Prisack HB, Dall P. Novel lipophilic chloroquine analogues for a highly efficient gene transfer into gynecological tumors. *Bioorg Med Chem Lett*, 11 (19): 2611-2613, 2001
- Kim M, Zinn KR, Barnett BG, Sumerel LA, Krashnyk V, Curiel DT, Douglas JT. The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells. *Eur J Cancer*, 38 (14), 1917-1926, 2002
- Kirn D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther*, 2, 89-98, 2001
- Koltover I, Salditt T, Rädler JO, Safinya CR. An inverted hexagonal phase of cationic liposome–DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, 281, 78-81, 1998
- Kono K, Torikoshi M, Mitsutomi M, Itoh T, Emi N, Yanagie H, Takagishi T. Novel gene delivery systems: complexes of fusogenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene Ther*, 8, 5-12, 2001
- Krashnyk V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller RC, Belousova N, Curiel DT. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol*, 72, 1844-1852, 1998
- Lee ER, Marshall J, Siegel CS, Jiang C, Yew NS, Nichols MR, Nietupski JP, Ziegler RJ, Lane MB, Wang KX, Wan NC, Scheule RK, Harris DJ, Smith AE, Cheng SH. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther*, 7, 1701-1717, 1996
- Li S et al. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther*, 6, 585-594, 1999
- Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther*, 7, 31-34, 2000
- Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP, et al. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res*, 59, 325-330, 1999

- Louis N, Fender P, Barge A, Kitts P, Chroboczek J. Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J Virol*, 68, 4104-4106, 1994
- Madry H, Trippel SB. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther*, 7: 286-291, 2000
- Mahato RI, Takakura Y, Hashida M. Non-viral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 14, 133-172, 1997
- Marshall E. Clinical trial: Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286, 2244-2245, 1999
- McDonald D, Stockwin L, Matzow T et al. Coxsackie/Adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells. *Gene Ther*, 6, 1512-1519, 1999
- McMasters RA, Saylor RL, Jones KE, Hendrix ME, Moyer MP, Drake RR. Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin43 gap junction formation. *Hum Gene Ther*, 9 (15), 2253-2261, 1998
- Meazza R, Marciano S, Sforzini S, Orengo AM, Coppoleccia M, Musiani R, Ardizzoni A, Santi L, Azzarone B, Ferrini S: Analysis of IL-2 Receptor expression and of the biological effects of IL-2 gene transfection in small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 74, 788-795, 1996
- Medicine-Worldwide, Homepage 2002 (<http://www.m-ww.de/krankheiten/krebs/eierstockkrebs.html>)
- MedPort, Homepage 2002 ([http://www.medport.de/thema\\_des\\_monats/brustkrebs2.html](http://www.medport.de/thema_des_monats/brustkrebs2.html))
- Miller ML, Ojima I. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. *Chem Rec*, 1 (3), 195-211, 2001
- Monahan SJ, Salgaller ML. Viral vectors for gene transfer into antigen presenting cells. *Curr Opin Mol Ther*, 1 (5), 558-564, 1999
- Mortimer I, Tam P, MacLachlan I, Graham RW, Saravolac EG, Joshi PB. Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther*, 6, 403-411, 1999
- Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA. Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther*, 10, 965-976, 1999
- Nabel GJ, et al. Direct gene expression with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biology activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 11307-11311, 1993
- Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R. A strategy for enhancing the transcriptional activity of weak cell type-specific promoters. *Gene Ther*, 5, 1656-1664, 1998
- Nettelbeck DM, Jerome V, Muller R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet*, 16, 174-181, 2000
- Nielsen LL, Maneval D. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther*, 5, 52-63, 1998a
- Nielsen LL, Lipari P, Dell J, Gurnani M, Hajian G. Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res*, 4, 835-846, 1998b
- Nooter K, Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer*, 63, 663-669, 1991
- Owen-Schaub LB: Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Lett.* 94, 1-8, 1995

- Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, Shamamian P, Taggarse A, Esquivel F, Rosenberg SA: Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J. Immunother.* 14, 182-189, 1993
- Reynolds PN, Holmes MD, Kaliberova L, Curiel DT. A novel system for mitigation of ectopic transgene expression induced by adenoviral vectors. *Gene Ther*, 8, 1271-1275, 2001
- Ribas A, Butterfield LH, Economou JS. Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist*, 5 (2), 87-98, 2000
- Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol*, 16, 35-40, 1998
- Röder G, Keil O, Prisack HB, Bauerschmitz GJ, Hanstein B, Nestle-Krämling C, Hemminki A, BenderHG, Niederacher D, Dall P. Novel cGMP liposomal vectors mediate efficient gene transfer. *Cancer Gene Ther*, zur Publikation akzeptiert im Dezember 2002
- Rosen JM, Zahnow C, Kazansky A, Raught B. Composite response elements mediate hormonal and developmental regulation of milk protein gene expression. *Biochem Soc Symp*, 63, 101-113, 1998
- Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Seipp CA, Einhorn JH, Roberts B, White DE. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1894-1900, 1998
- Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst*, 82, 1247-1259, 1990
- Schondorf T, Kurbacher CM, Gohring UJ, Benz C, Becker M, Sartorius J, Kohlhagen H, Mallmann P, Neumann R. Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res*, 22 (4), 2199-2203, 2002
- Schulick AH, Vassalli G, Dunn PF, Dong G, Rade JJ, Zamarron C, Dichek DA. Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J Clin Invest*, 90, 209-219, 1997
- Stallwood Y, Fisher KD, Gallimore PH, Mautner V. Neutralization of adenovirus infectivity by ascitic fluid from ovarian cancer patients. *Gene Ther*, 7, 637-643, 2000
- Stein U, Walther W, Wunderlich V. Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs. *Eur J Cancer*, 30A, 1541-1545, 1994
- Taylor I, Sorrosian M, Wangoo A, Haynes AR, Kotecha D, Mitchell and Shaw RJ. Platelet-derived growth factor- $\beta$  mRNA in human alveolar macrophages in vivo in asthma. *Eur Resp J*, 7: 1966-1972, 1994
- Thean ET, Toh B. Serum human alpha-lactalbumin as a marker for breast cancer. *Br J Cancer*, 61, 773-775, 1990
- Tong XW, Block A, Chen SH, Woo SLC, Kieback DG. Adenovirus-mediated thymidine kinase gene transduction in human epithelial ovarian cancer cell lines followed by exposure to ganciclovir. *Anticancer Res*, 16, 1611-1618, 1996
- Tong X-W, Agoulnik I, Contant CF et al. Human epithelial ovarian cancer xenotransplants into nude mice can be cured by adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy. *Anticancer Res*, 17, 811-814, 1997

- Tong X, Shine DH, Agoulnik I, Freund CF, Hasenburg A, Aguilar-Cordova E, Woo SLC, Kieback DG. Adenovirus mediated thymidine kinase gene therapy may enhance sensitivity of ovarian cancer cells to chemotherapeutic agents. *Anticancer Res*, 18, 3421-3426, 1998
- Tseng WC, Haselton FR, Giorgio TD. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1445, 53-64, 1999
- Vieweg J, Gilboa E: Considerations for the use of cytokine-secreting tumor cell preparations for cancer treatment. *Cancer Invest*. 13, 193-201, 1995
- van der Elb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FHE, van Krieken JHJM, van der Elb AJ, Rinkes IHMB, van der Velde CJH, Hoeben RC. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene ad ganciclovir administration. *Gene Ther*, 5, 451-458, 1998
- von Grueningen, VE, O'Boyle JD, Coleman RL, Wilson D, Miller DS, Mathis JM. Efficacy of intraperitoneal adenovirus-mediated p53 gene therapy in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 9, 365-372, 1999
- Varga MJ, Weibull C, Everitt E. Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J Virol*, 65, 6061-6070, 1991
- Walther W, Wendt J, Stein U. Employment of the *mdr1* promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy. *Gene Ther*, 4, 544-552, 1997
- Weseling JG, Yamamoto M, Adachi Y, Bosma P et al. Midkine and cyclooxygenase-2 promoters are promising for adenoviral vector gene delivery of pancreatic carcinoma. *Cancer Gene Ther*, 8 (12), 990-996, 2001
- Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Doh SG, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH. A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11454-11459, 1996
- Wickham TJ. Millenium Review: Targeting adenovirus. *Gene Ther*, 7, 110-114, 2000
- Wigler M, Silverstein S, Lee L, Pellier A, Cheng Y, Axel R. Transfer of purified herpes virus thymidine kinas gene to cultured mouse cells. *Cell*, 11, 223-232, 1977
- Wildner O, Blaesse RM, Morris JC. Synergy between the herpes simplex virus tk/ganciclovir prodrug suicide system and the topoisomerase I inhibitor topotecan. *Hum Gene Ther*, 10, 2679-2687, 1999
- Wilke M, Fortunati E, van den Broek M, Hoogeveen AT, Scholte BJ. Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther*, 3, 1133-1142, 1996
- Williams C, Shattuck-Brandt RL, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal cancer. *Ann n Y Acad Sci*, 889, 72-83, 1999
- Winklehner-Jennewein P, Geyrmayer S, Lechner J, Welte T, Hansson L, Geley S, Doppler W. A distal enhancer region in the human beta-casein gene mediates the responses to prolactin and glucocorticoid hormones. *Gene*, 217, 127-139, 1998
- Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, 296, 1046-1049, 2002
- Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y, Grizzle WE, Curiel DT. Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol Ther*, 3 (3), 385-394, 2000
- Yamazaki Y, Nango M, Matsuura M, Hasegawa Y, Hasegawa M, Oku N. Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine. *Gene Ther*, 7, 1148-1155, 2000

- Yu DC, Chen Y, Dilley J, Li Y, Embry M, Zhang H, Nguyen N, Amin P, Oh J, Henderson DR. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res*, 61, 517-525, 2001
- Zeimet AG, Müller-Holzner E, Schuler A, Hartung G, Berger J, Hermann M, Widschwendter M, Bergelson JM, Marth C. Determination of molecules regulating gene delivery using adenoviral vectors in ovarian carcinomas. *Gene Ther*, 9, 1093-1100, 2002
- Zeytun A, Hassuneh M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Fas-Fas ligand-based interactions between tumor cells and tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes: a lethal two-way street. *Blood*, 90 (5), 1952-1959, 1997

## 7. Abkürzungsverzeichnis

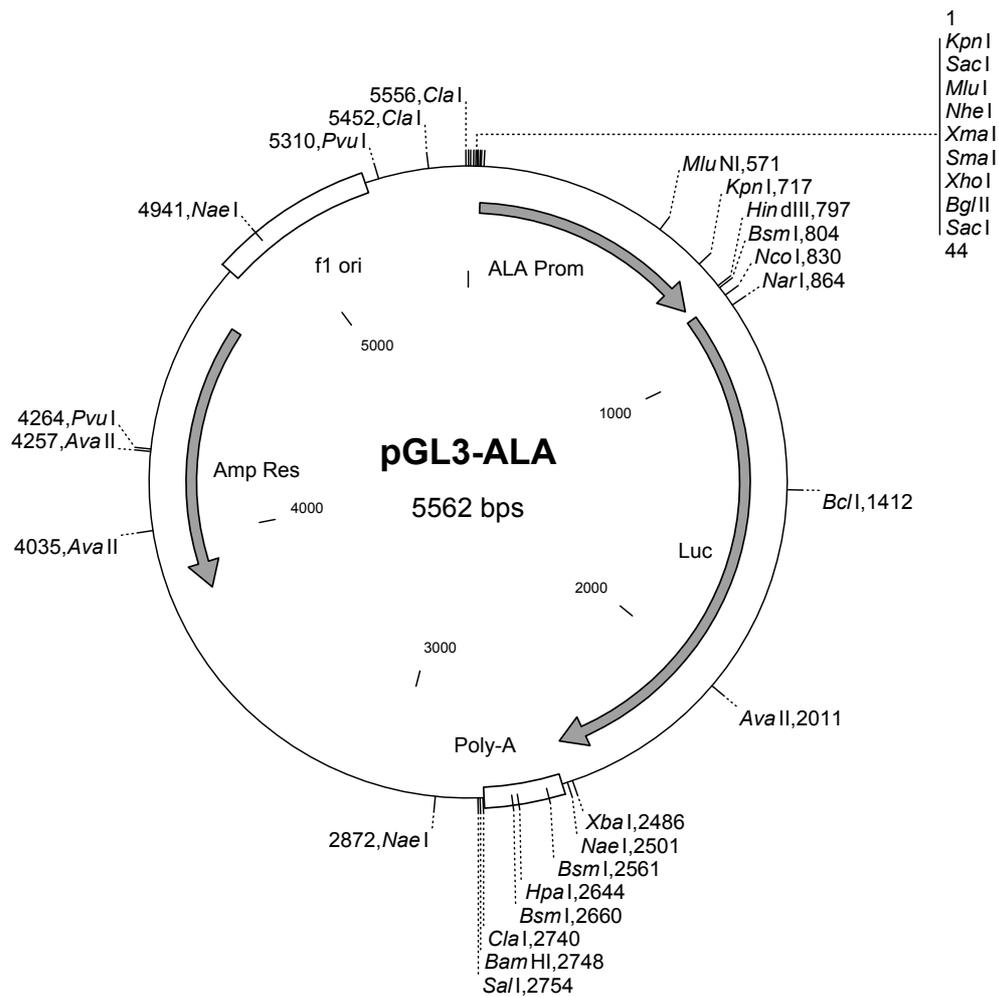
ε	molarer Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
µm	Micrometer
A	Adenin
Ad5	Adenovirus des Serotyp 5
ADR	Adriamycin (=Doxorubicin)
A.L.F.	Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer
Abb.	Abbildung
ALA	alpha-Lactalbumin
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CAS	beta-Casein
CASENH	beta Casein + Enhancer-Element
CCQ	Carboxycholesteryl- modifizierte Chloroquine
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	current good manufacturing practice
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CMV	immediate early Promotor des Cytomegalovirus
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DOPE	1,2-Diolelylglycerol-3-Phosphoethanolamin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
evtl.	eventuell
FACScan	Fluorescence activated cell scanning
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ganciclovir	([±]-9-[1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl]guanine)
GCV	Ganciclovir
h	Stunde
HS	Pferde-Serum
HSV-TK	Thymidin-Kinase aus Herpes simplex-Virus
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Luc	Luziferase

MCS	multiple cloning site
MDR	multiple drug resistance
Min	Minute
ml	Milliliter
mol%	molare Prozent
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	Plaque forming unit
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natrium-dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
T	Thymin
t	Zeit
Taq	Taq-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U	Unit (Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VP	Virus Partikel
wt	Wildtyp
X-Gal	(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)
z.B.	zum Beispiel

## 8. Anhang

## I. Plasmidkarten

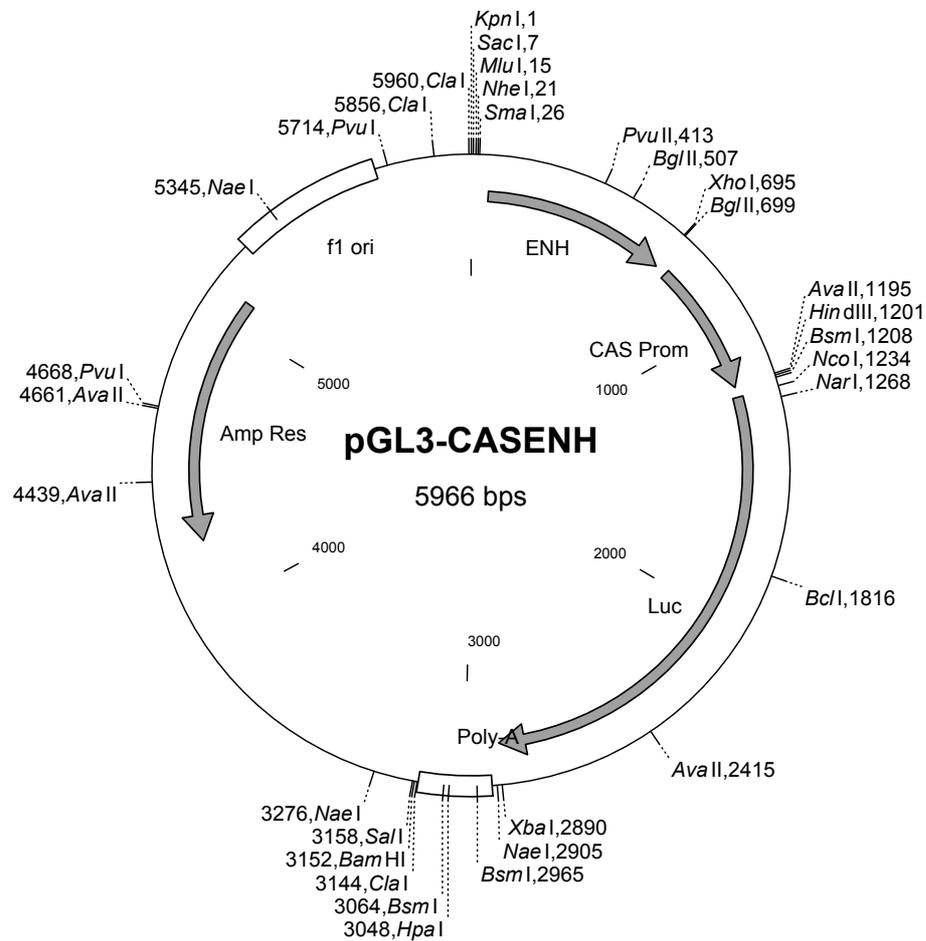
## pGL3-ALA



Funktionelle Einheiten des Plasmids:

ALA-Promotor:	37-798
Luziferase-Reportergen:	832-2484
Poly-A (aus SV40):	2516-2737
Ampicillin-Resistenzgen:	3824-4684
Replikationsursprung (f1 ori):	4817-5217

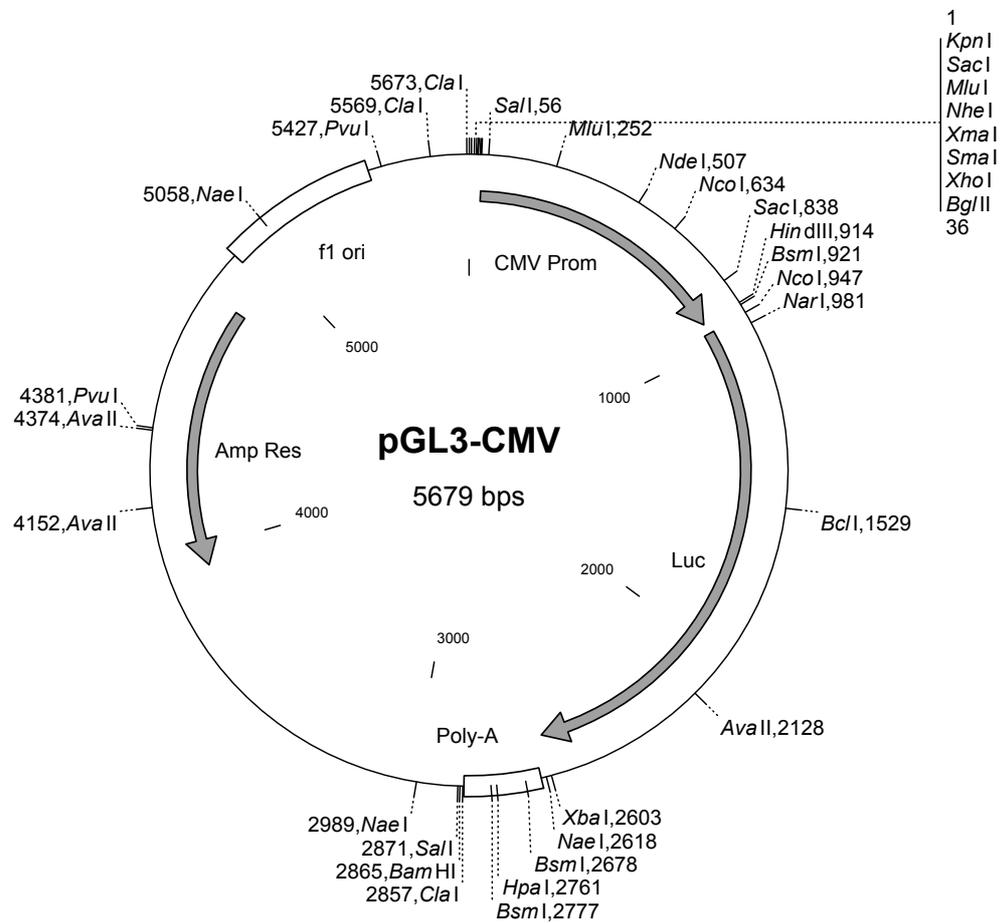
## pGL3-CASENH



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

ENH-Element:	59-695
CAS-Promotor:	736-1201
Luziferase-Reportergen:	1236-2888
Poly-A (aus SV40):	2920-3141
Ampicillin-Resistenzgen:	4228-5088
Replikationsursprung (f1 ori):	5221 5675

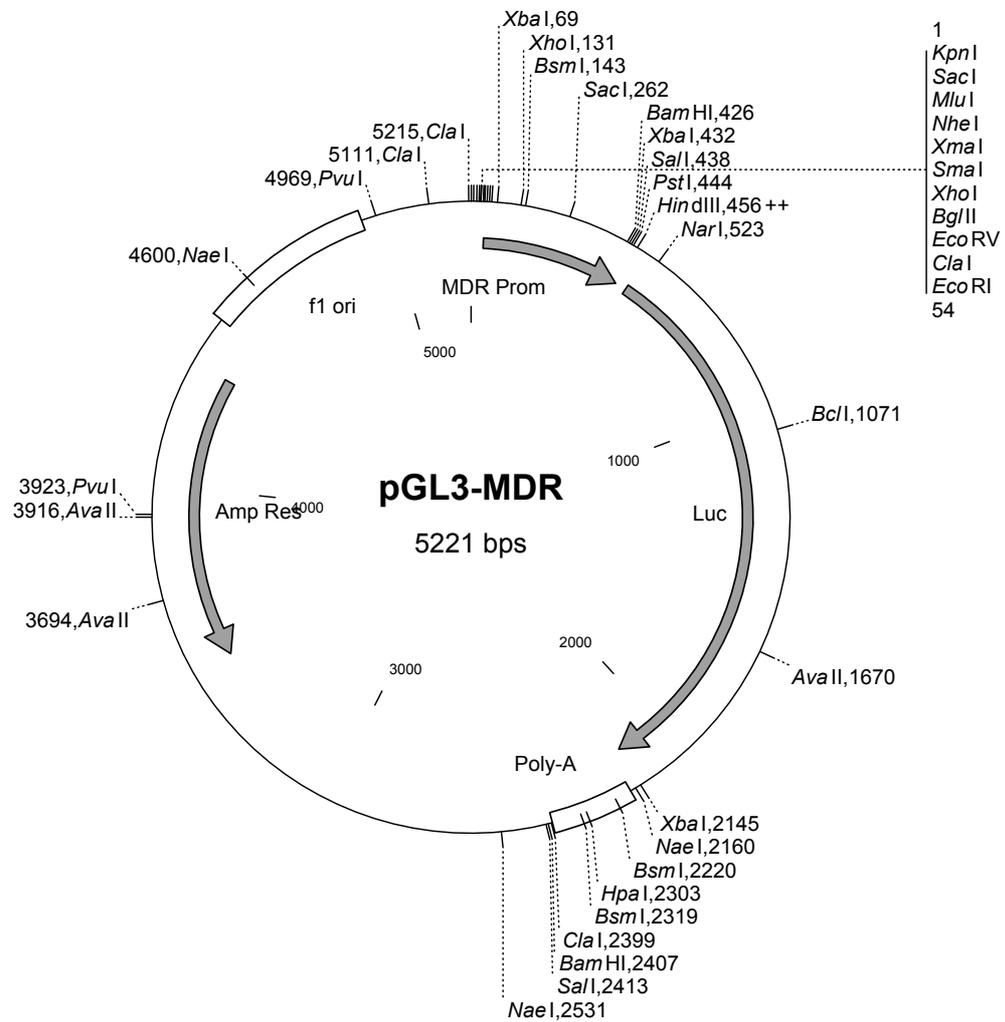
## pGL3-CMV



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

CMV-Promotor:	37-915
Luziferase-Reportergen:	949-2601
Poly-A (aus SV40):	2633-2854
Ampicillin-Resistenzgen:	3941-4801
Replikationsursprung (f1 ori):	4934-5388

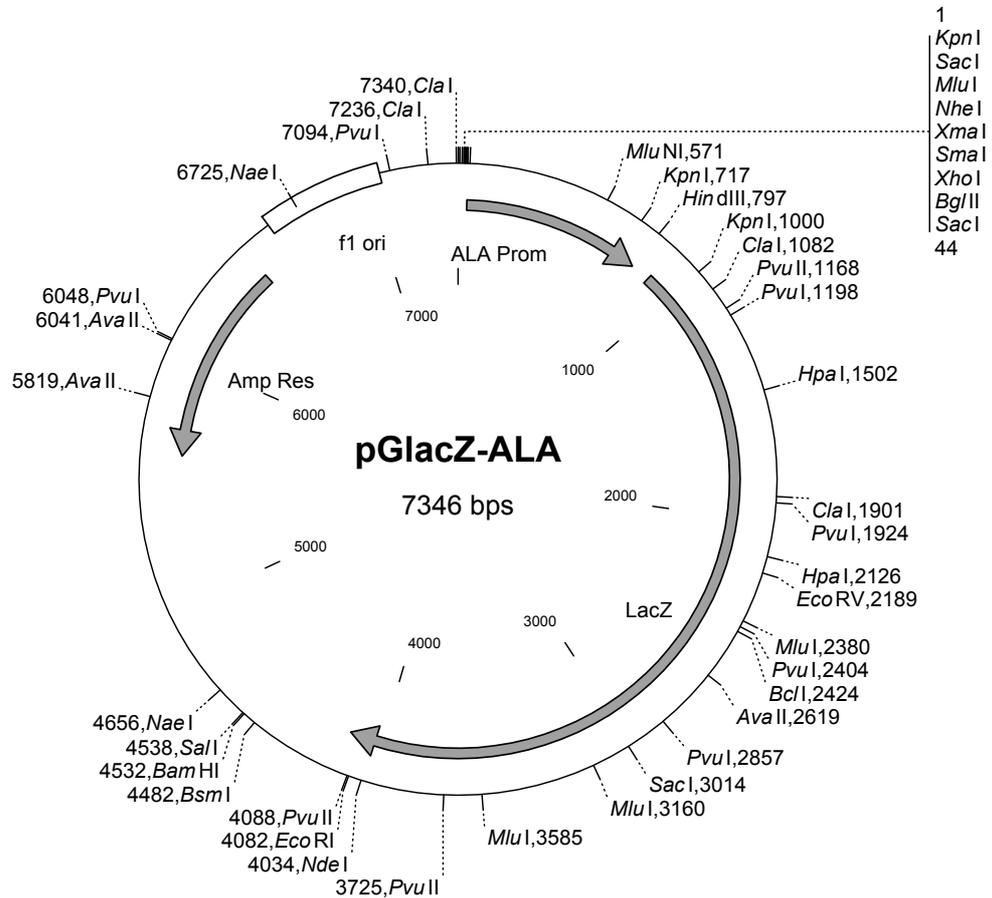
## pGL3-MDR



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

MDR-Promotor:	37-457
Luziferase-Reportergen:	491-2143
Poly-A (aus SV40):	2175-2396
Ampicillin-Resistenzgen:	3483-4343
Replikationsursprung (f1 ori):	4476-4930

## pGlacZ-ALA

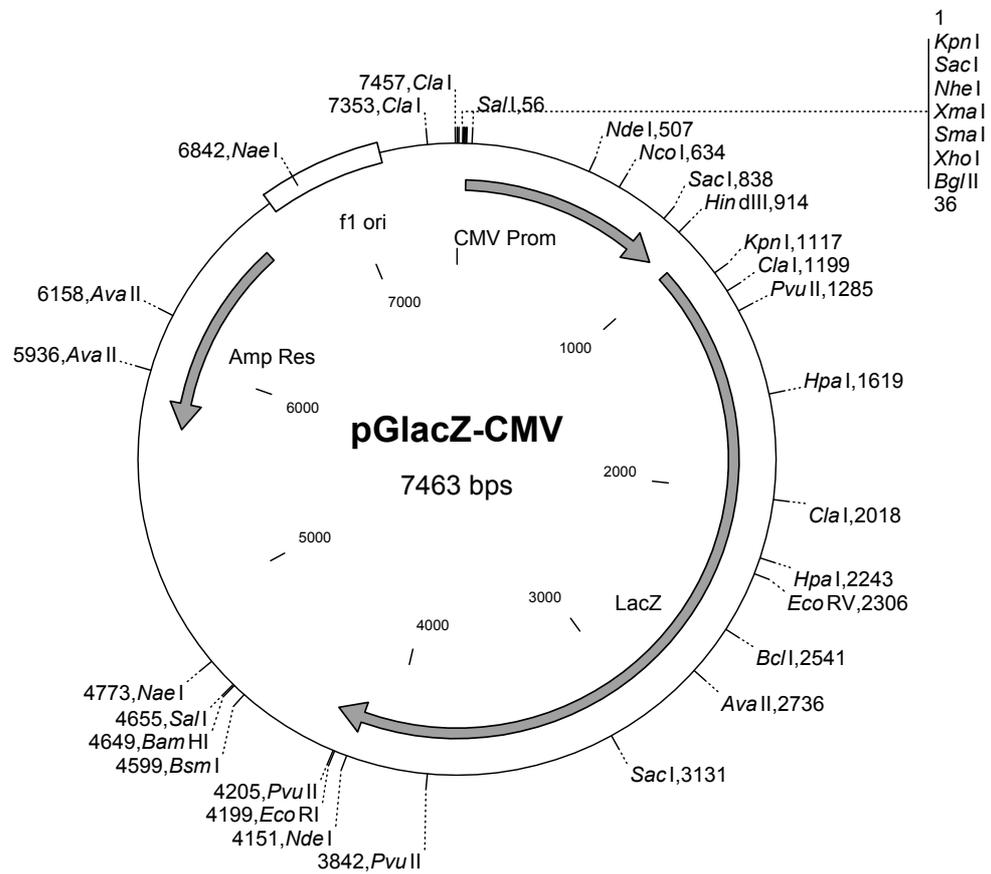


## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

ALA-Promotor:	37-797
lacZ-Reportergen:	881-4138
Ampicillin-Resistenzgen:	5608-6468
Replikationsursprung (f1 ori):	6601-7055



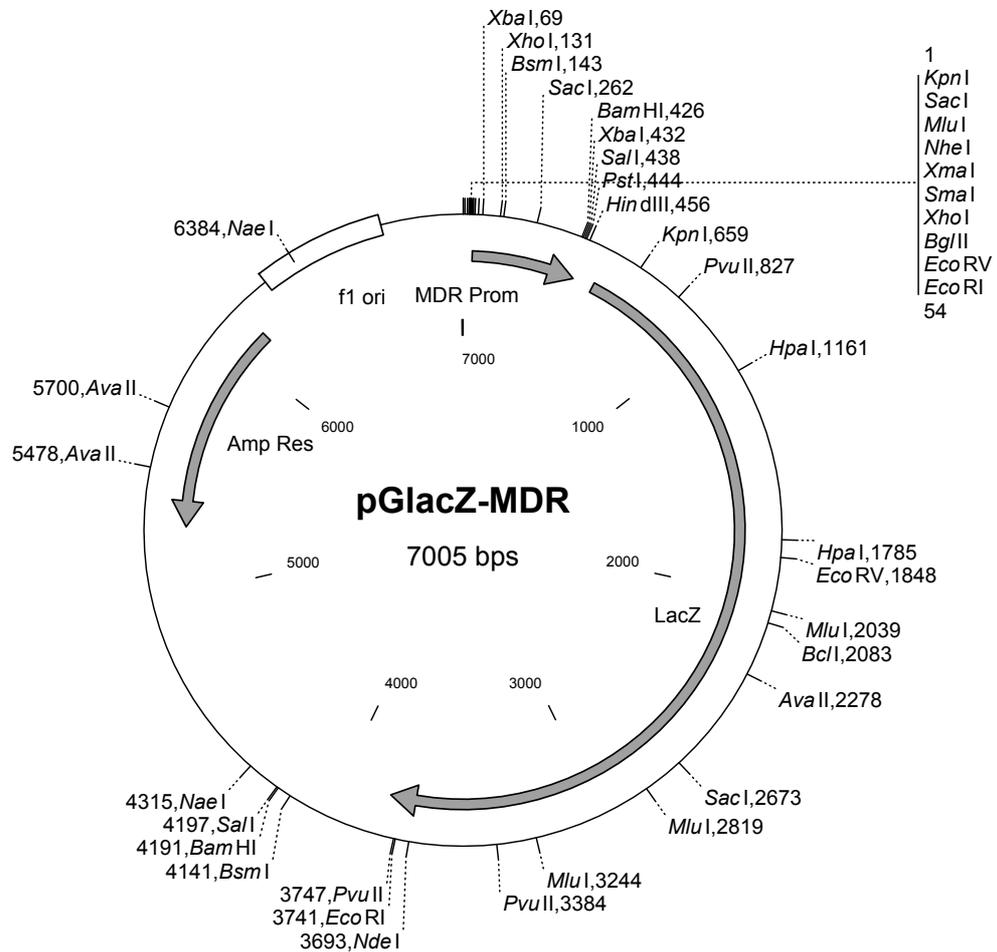
## pGlacZ-CMV



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

CMV-Promotor:	37-914
lacZ-Reportergen:	998-4255
Ampicillin-Resistenzgen:	5725-6585
Replikationsursprung (f1 ori):	6718-7172

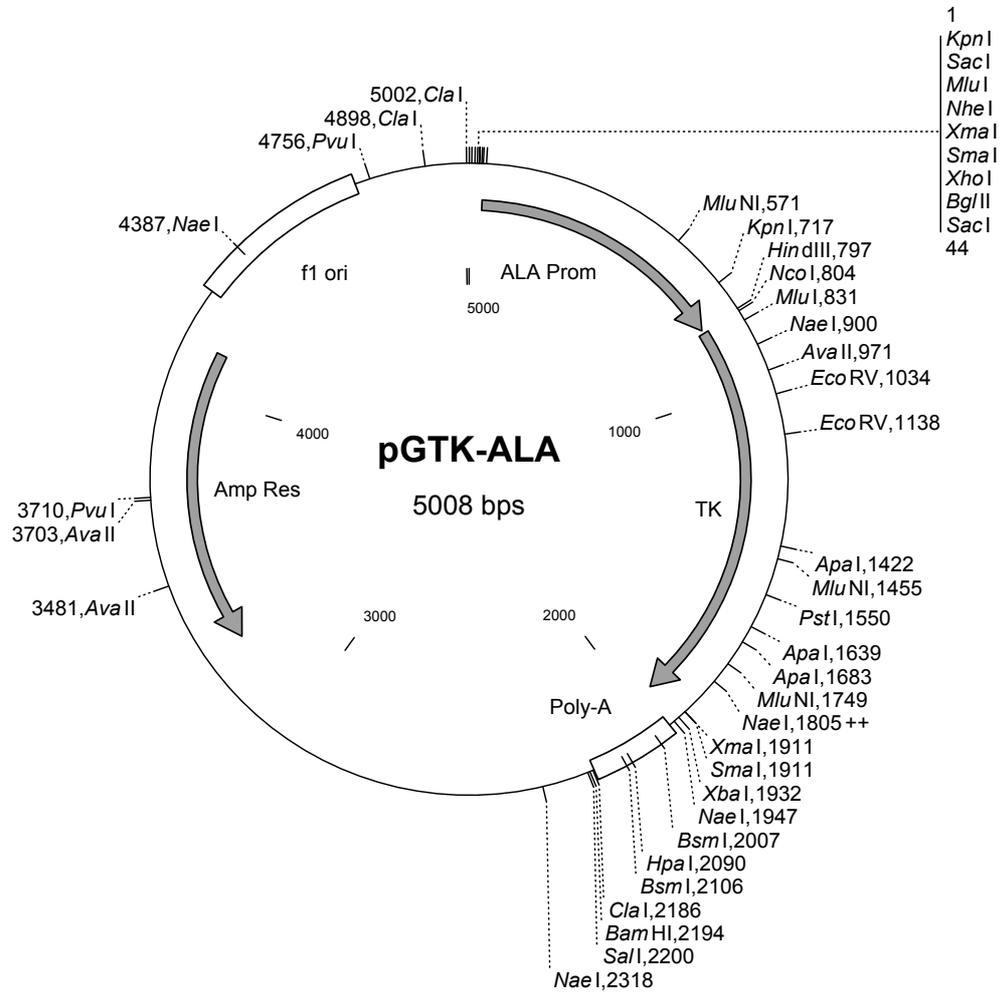
## pGlacZ-MDR



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

MDR-Promotor:	37-456
lacZ-Reportergen:	540-3797
Ampicillin-Resistenzgen:	5267-6127
Replikationsursprung (f1 ori):	6260-6714

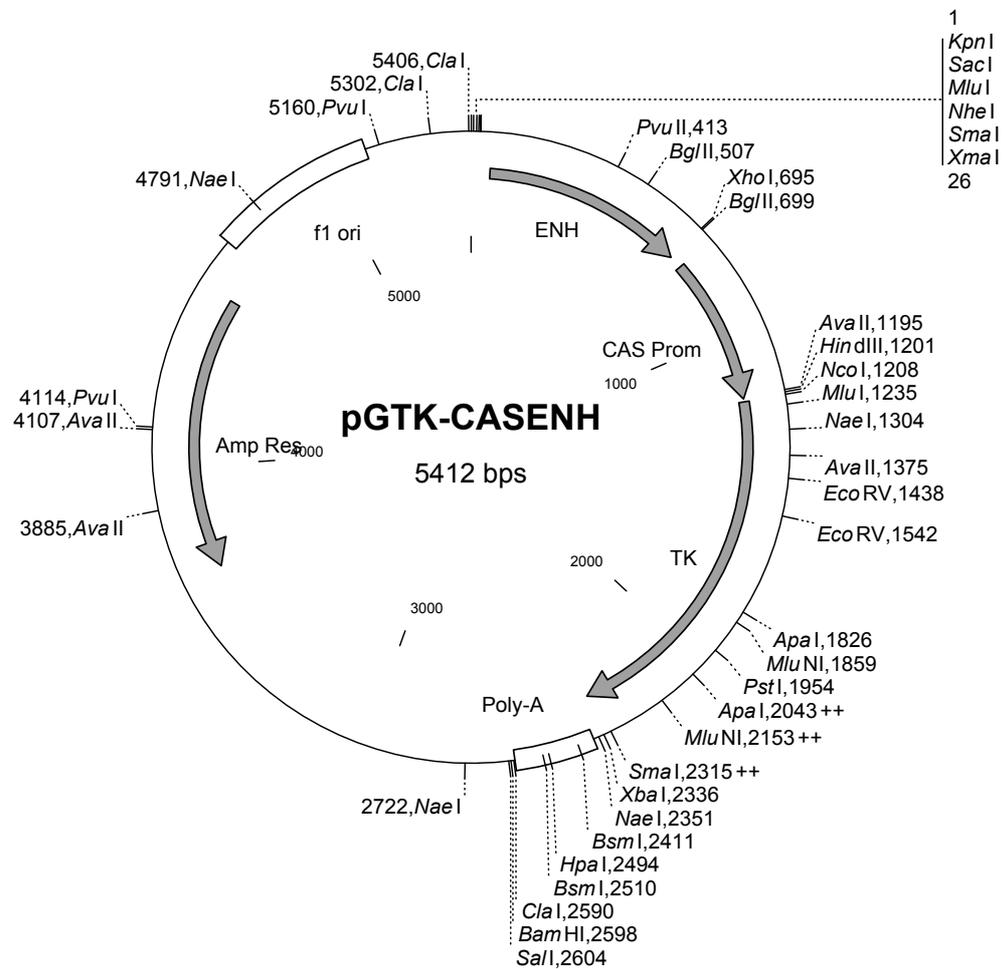
## pGTK-ALA



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

ALA-Promotor:	37-797
HSV-TK-Reportergen:	806-1936
Poly-A (aus SV40):	1962-2183
Ampicillin-Resistenzgen:	3270-4130
Replikationsursprung (f1 ori):	4263-4717

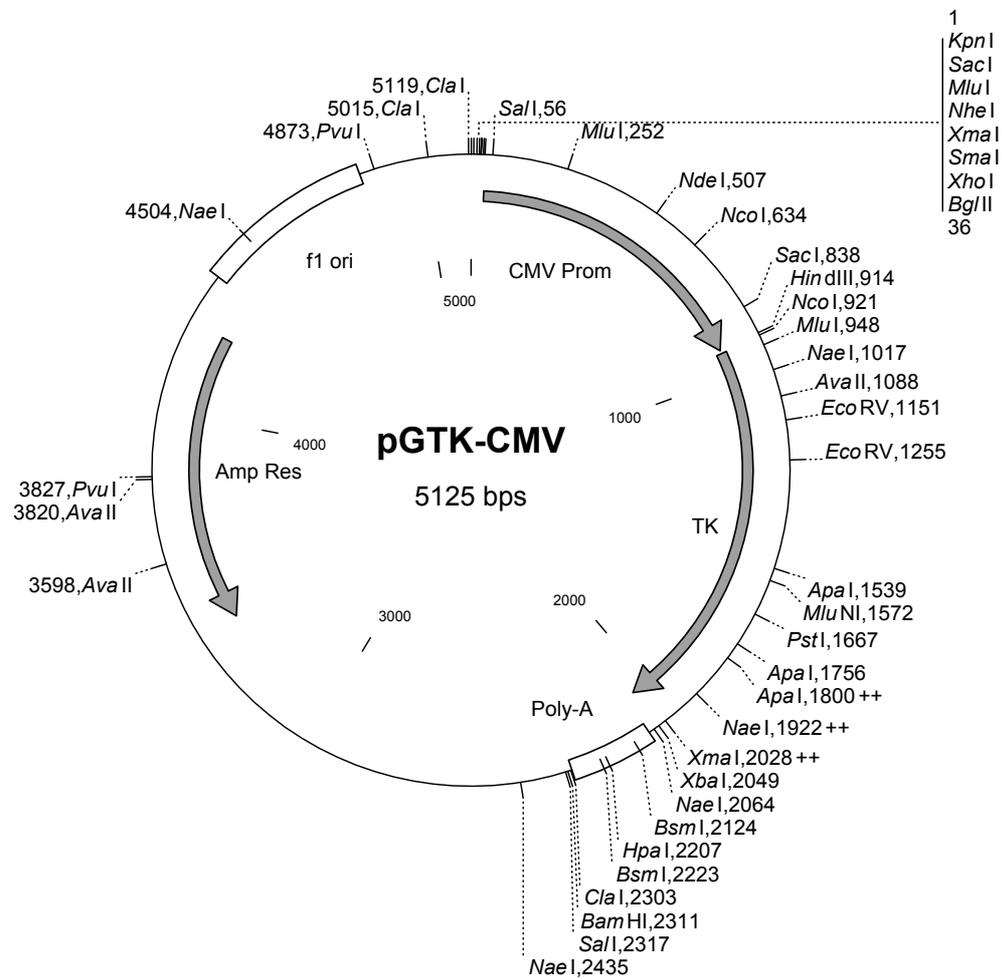
## pGTK-CASENH



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

ENH-Element:	59-695
CAS-Promotor:	736-1201
HSV-TK-Reportergen:	1210-2334
Poly-A (aus SV40):	2366-2587
Ampicillin-Resistenzgen:	3674-4534
Replikationsursprung (f1 ori):	4667-5121

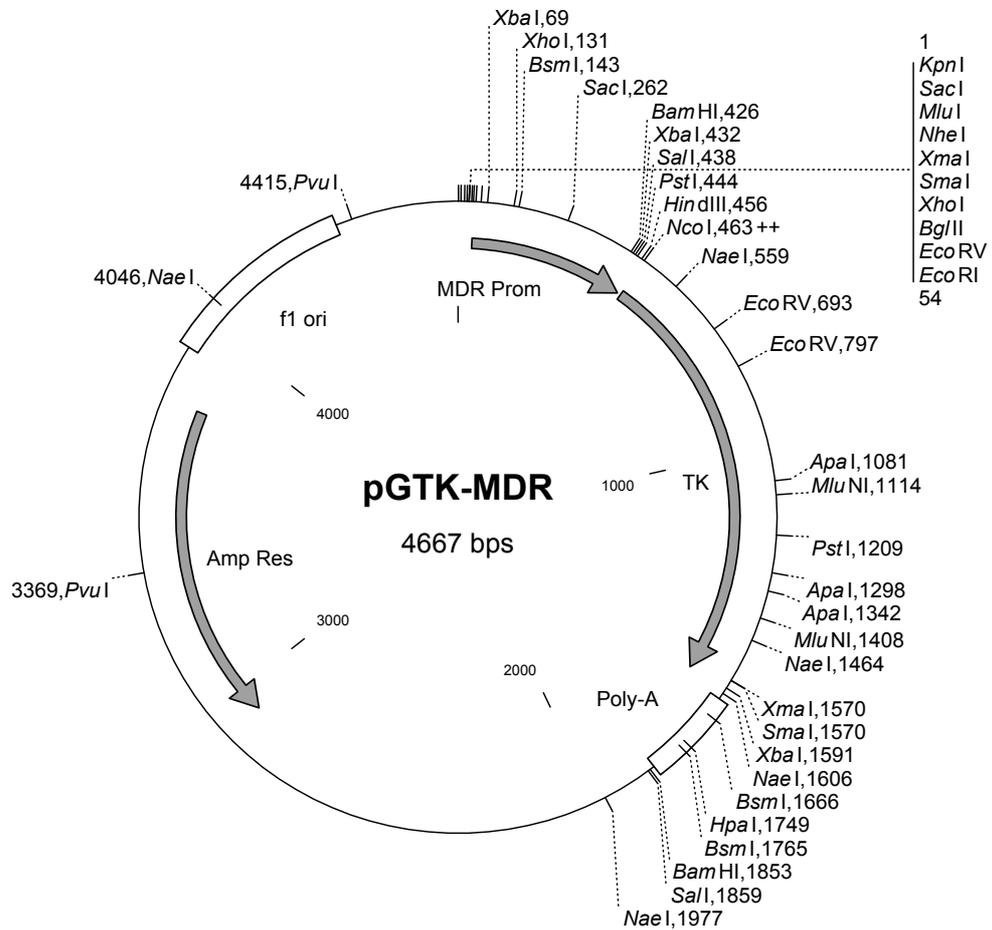
## pGTK-CMV



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

CMV-Promotor:	37-914
HSV-TK-Reportergen:	923-2053
Poly-A (aus SV40):	2079-2300
Ampicillin-Resistenzgen:	3387-4247
Replikationsursprung (f1 ori):	4380-4834

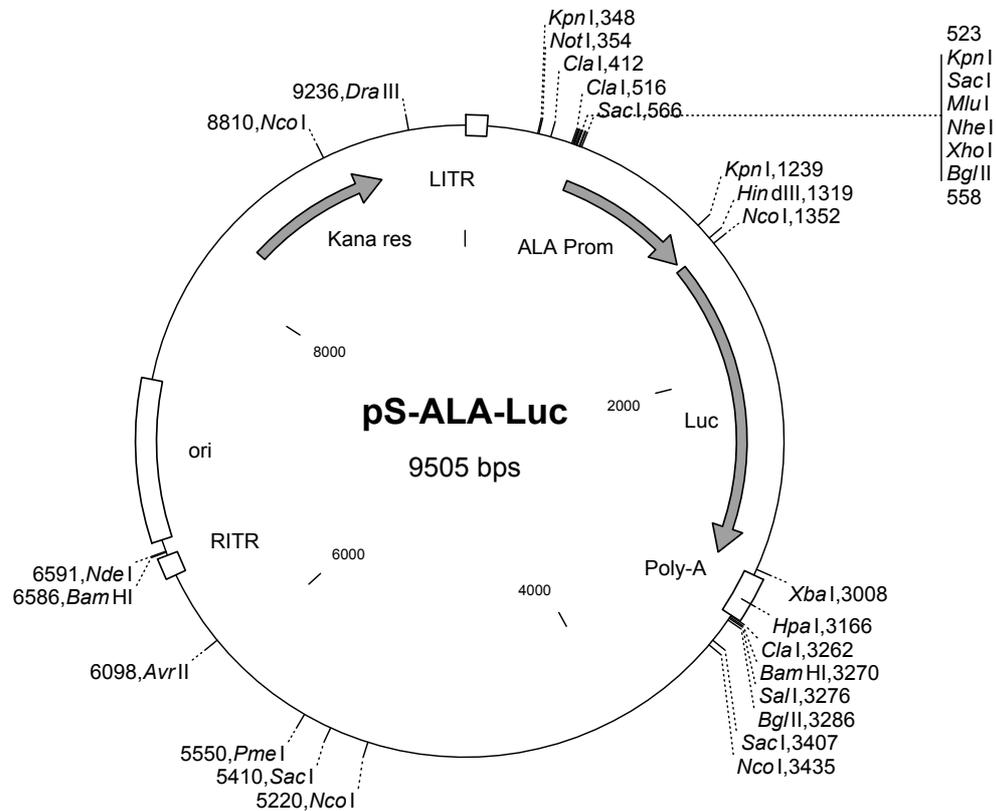
## pGTK-MDR



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

MDR-Promotor:	37-456
HSV-TK-Reportergen:	465-1595
Poly-A (aus SV40):	1621-1842
Ampicillin-Resistenzgen:	2929-3789
Replikationsursprung (f1 ori):	3922-4376

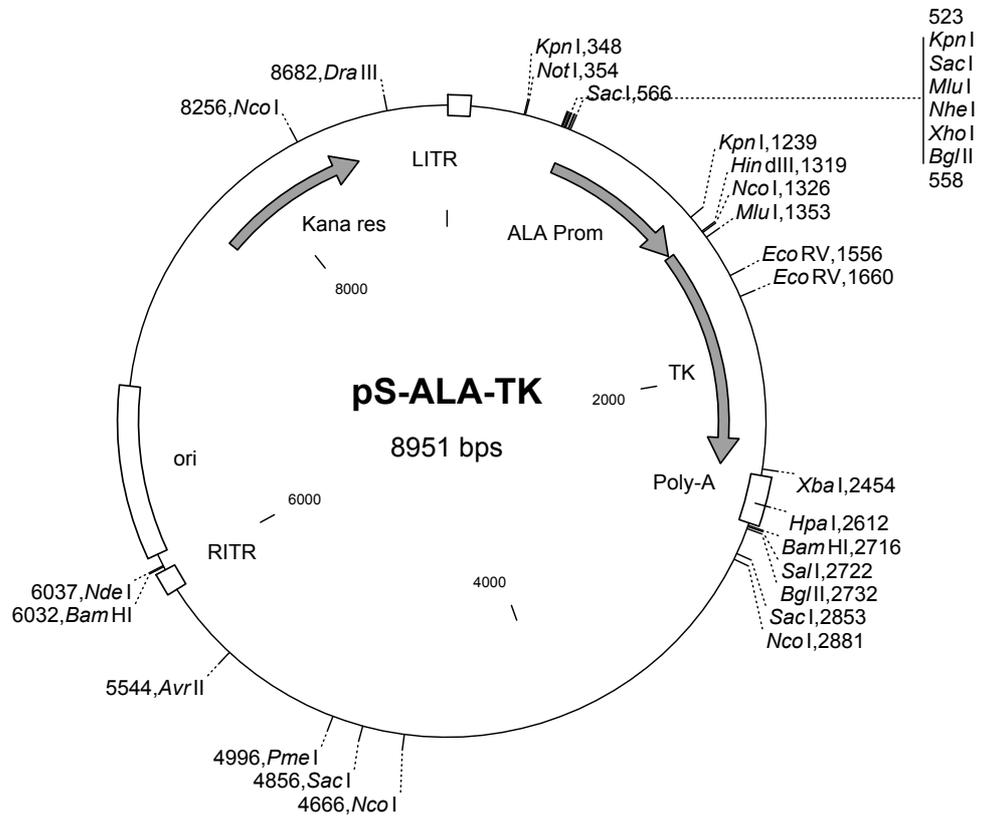
## pShuttle-ALA-Luc



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

left inverted terminal repeat (LITR):	4-106
ALA-Promotor:	559-1320
Luziferase-Reportergen:	1354-3006
Poly-A (aus SV40):	3038-3259
right inverted terminal repeat (RITR):	6468-6570
Replikationsursprung (pBR322 ori):	6648-7426
Kanamycin-Resistenzgen:	8250-9044

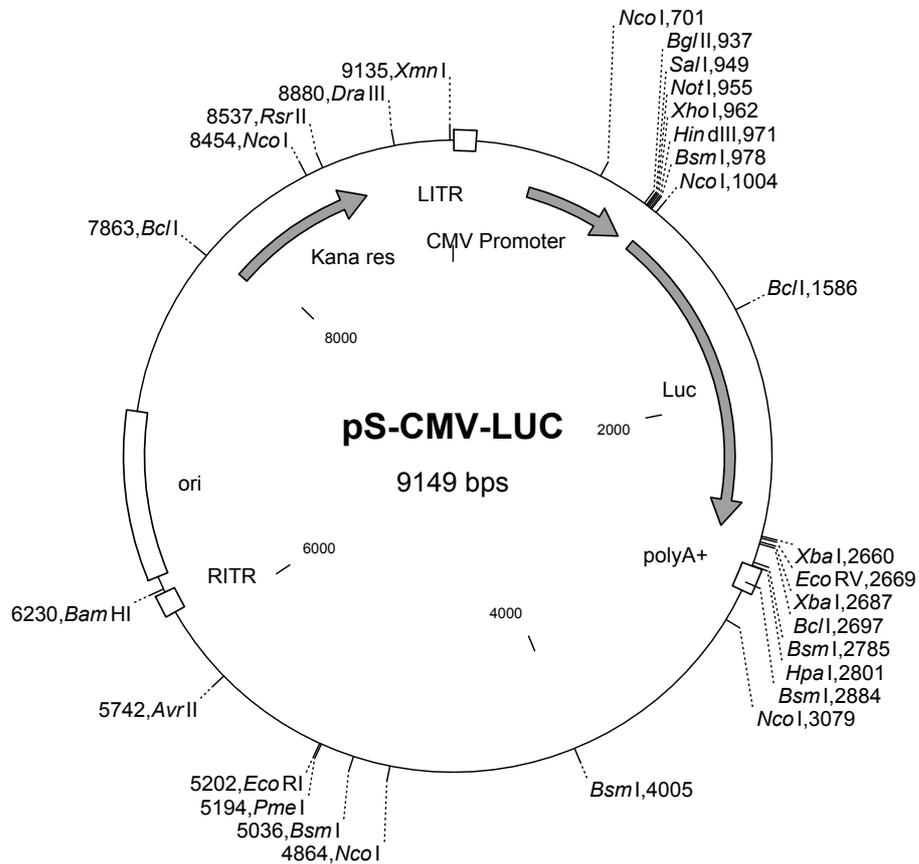
## pShuttle-ALA-TK



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

left inverted terminal repeat (LITR):	4-106
ALA-Promotor:	559-1319
HSV-TK-Reportergen:	1328-2458
Poly-A (aus SV40):	2484-2705
right inverted terminal repeat (RITR):	5914-6016
Replikationsursprung (pBR322 ori):	6094-6872
Kanamycin-Resistenzgen:	7696-8490

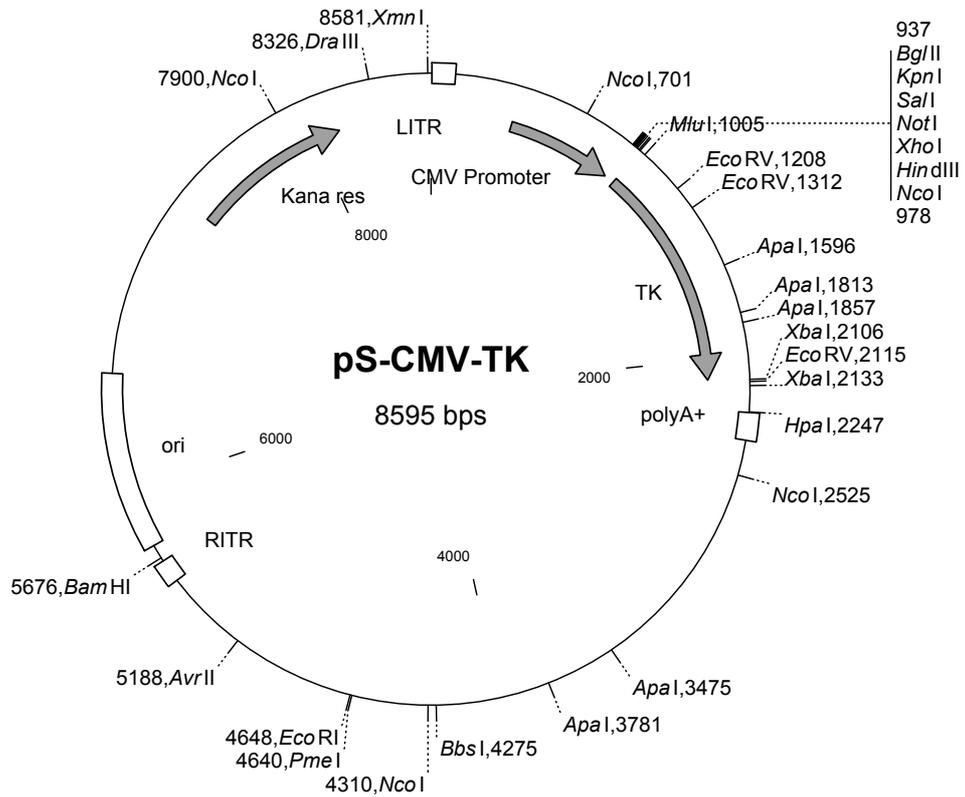
## pShuttle-CMV-Luc



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

left inverted terminal repeat (LITR):	4-106
CMV-Promotor:	400-930
Luziferase-Reportergen:	1006-2658
Poly-A (aus SV40):	2804-2925
right inverted terminal repeat (RITR):	6112-6214
Replikationsursprung (pBR322 ori):	6292-7069
Kanamycin-Resistenzgen:	7894-8688

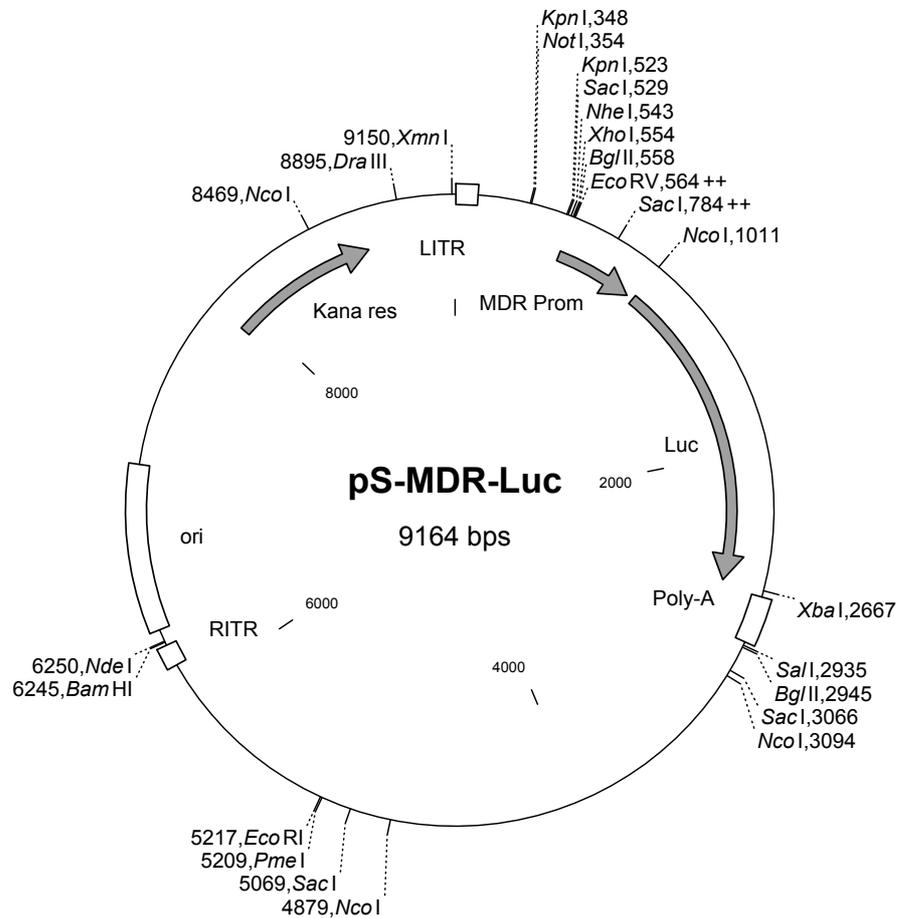
## pShuttle-CMV-TK



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

left inverted terminal repeat (LITR):	4-106
CMV-Promotor:	400-930
HSV-TK-Reportergen:	980-2104
Poly-A (aus SV40):	2250-2371
right inverted terminal repeat (RITR):	5558-5660
Replikationsursprung (pBR322 ori):	5738-6515
Kanamycin-Resistenzgen:	7340-8134

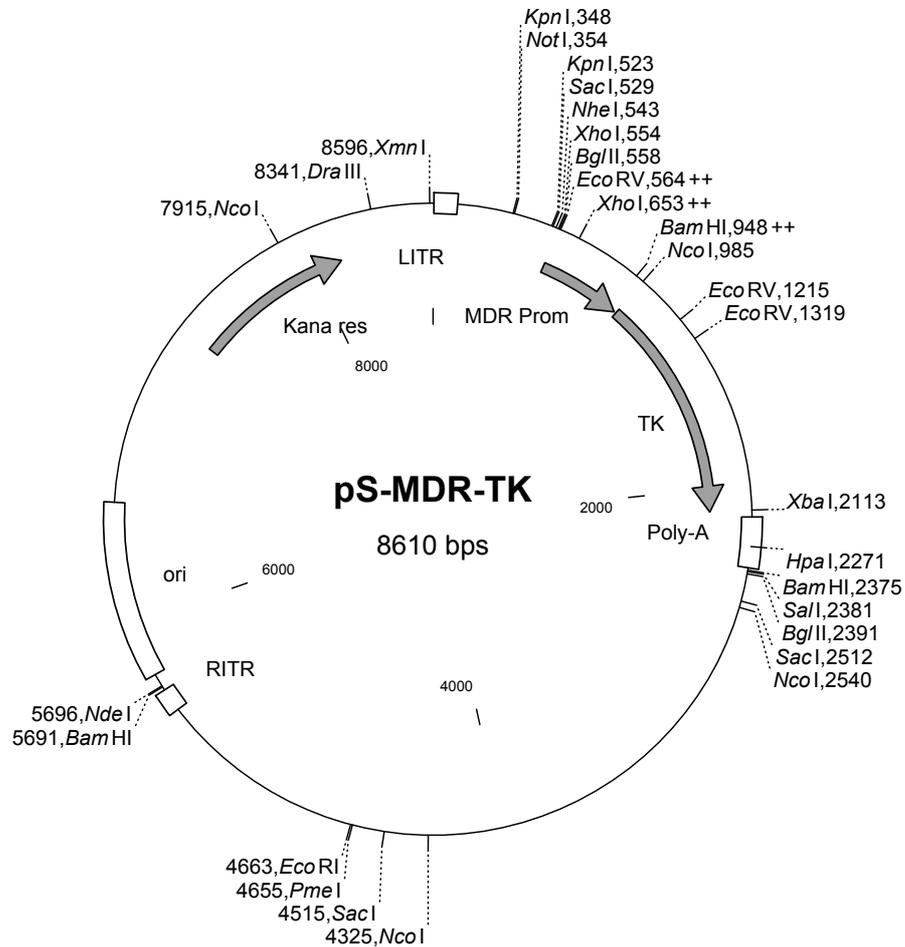
## pShuttle-MDR-Luc



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

left inverted terminal repeat (LITR):	4-106
MDR-Promotor:	559-978
Luziferase-Reportergen:	1013-2665
Poly-A (aus SV40):	5697-2918
right inverted terminal repeat (RITR):	6127-6229
Replikationsursprung (pBR322 ori):	6307-7085
Kanamycin-Resistenzgen:	7909-8703

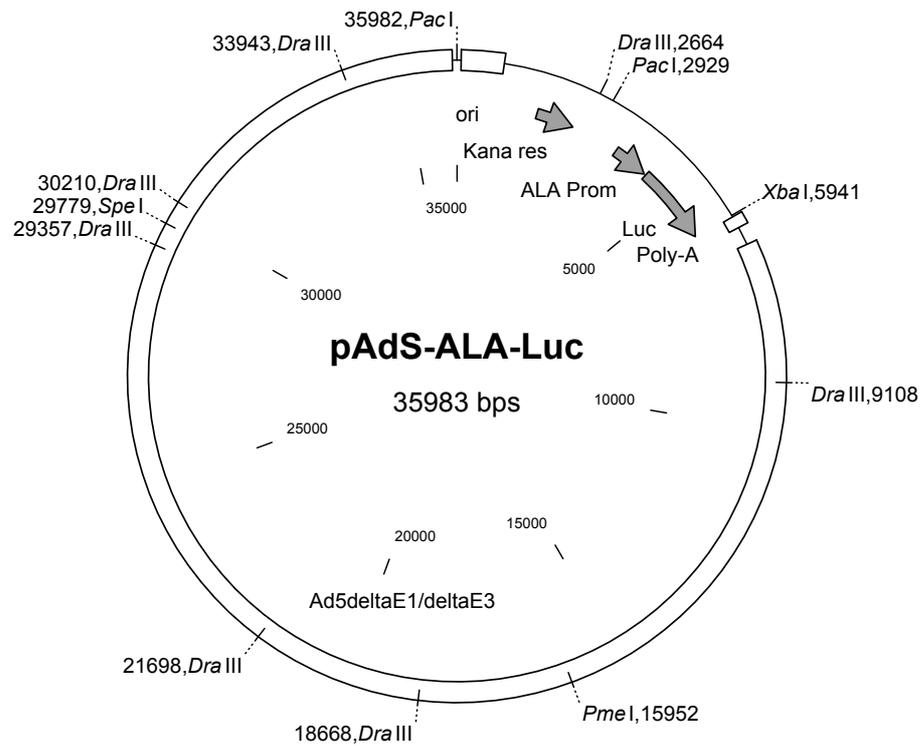
## pShuttle-MDR-TK



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

left inverted terminal repeat (LITR):	4-106
MDR-Promotor:	559-978
HSV-TK-Reportergen:	987-2117
Poly-A (aus SV40):	2143-2364
right inverted terminal repeat (RITR):	5573-5675
Replikationsursprung (pBR322 ori):	5753-6531
Kanamycin-Resistenzgen:	7355-8149

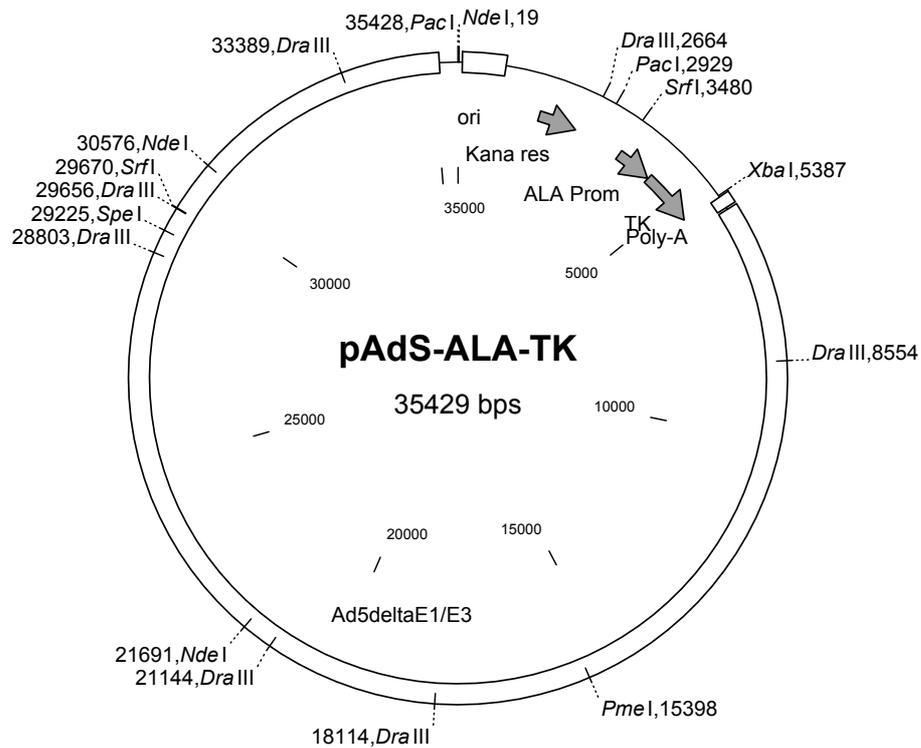
## pAd-Shuttle-ALA-Luc



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

Replikationsursprung (pBR322 ori):	76-854
Kanamycin-Resistenzgen:	1678-2472
ALA-Promotor:	3492-4253
Luziferase-Reportergen:	4287-5939
Poly-A (aus SV40):	5971-6192

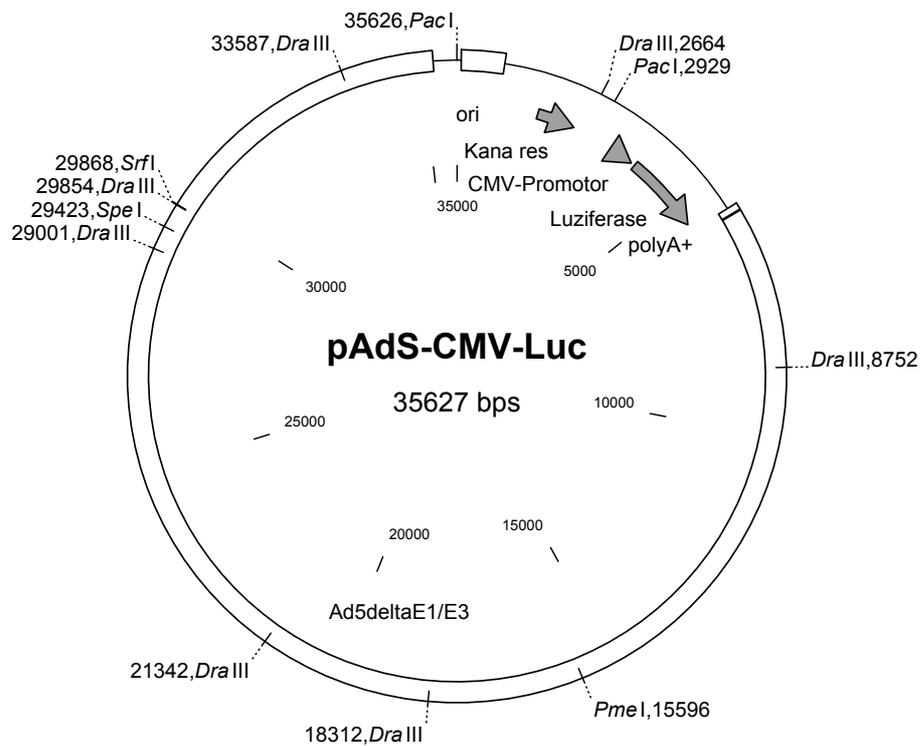
## pAd-Shuttle-ALA-TK



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

Replikationsursprung (pBR322 ori):	76-854
Kanamycin-Resistenzgen:	1678-2472
ALA-Promotor:	3492-4252
HSV-TK-Reportergen:	4261-5391
Poly-A (aus SV40):	5417-5638

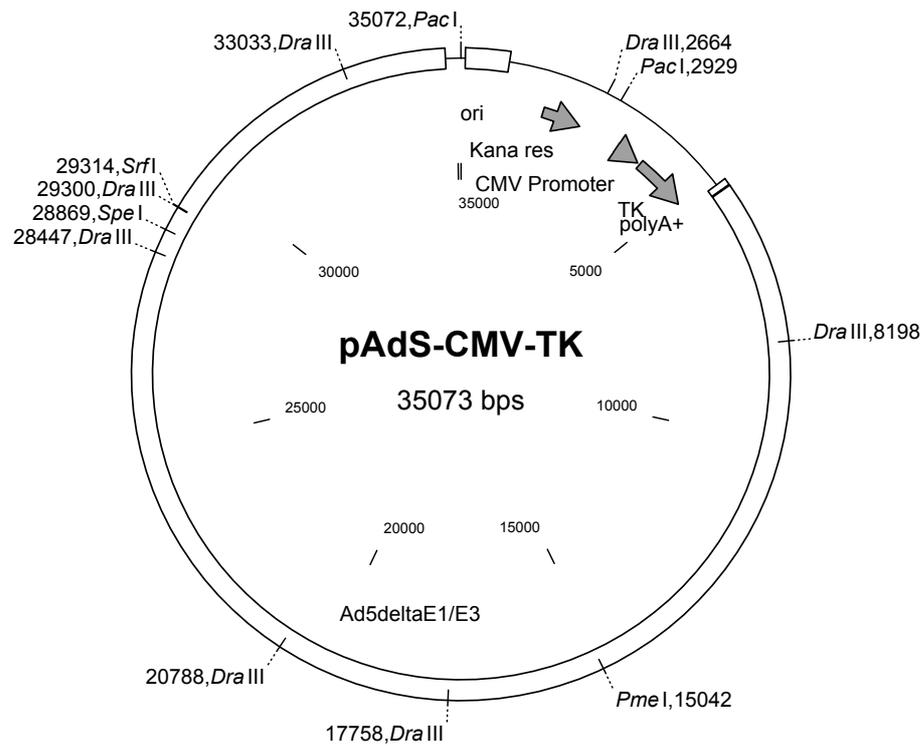
## pAd-Shuttle-CMV-Luc



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

Replikationsursprung (pBR322 ori):	76-853
Kanamycin-Resistenzgen:	1678-2472
CMV-Promotor:	3333-3863
Luziferase-Reportergen:	3939-5591
Poly-A (aus SV40):	5737-5858

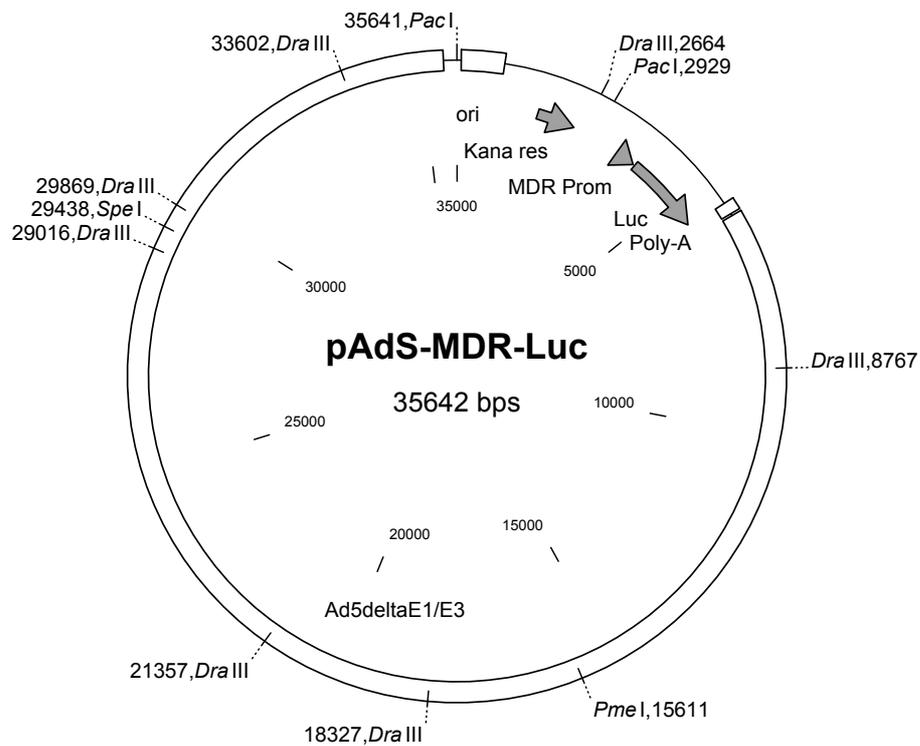
## pAd-Shuttle-CMV-TK



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

Replikationsursprung (pBR322 ori):	76-853
Kanamycin-Resistenzgen:	1678-2472
CMV-Promotor:	3333-3863
HSV-TK-Reportergen:	3913-5037
Poly-A (aus SV40):	5183-5304

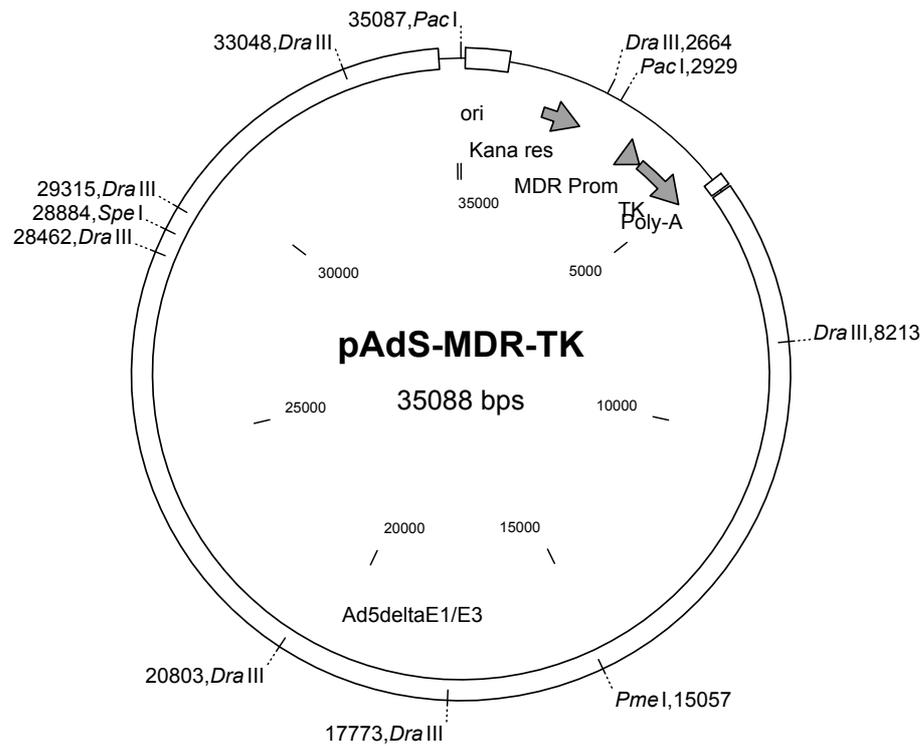
## pAd-Shuttle-MDR-Luc



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

Replikationsursprung (pBR322 ori):	76-854
Kanamycin-Resistenzgen:	1678-2472
MDR-Promotor:	3492-3911
Luziferase-Reportergen:	3946-5598
Poly-A (aus SV40):	5630-5851

## pAd-Shuttle-MDR-TK



## Funktionelle Einheiten des Plasmids:

Replikationsursprung (pBR322 ori):	76-854
Kanamycin-Resistenzgen:	1678-2472
MDR-Promotor:	3492-3911
HSV-TK-Reportergen:	3920-5050
Poly-A (aus SV40):	5076-5297

## 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.G. Bender danke ich für die Möglichkeit, im molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu können und für die Übernahme des Referates dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Riesner danke ich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Dall danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die engagierte Förderung meines beruflichen Werdegangs, das kollegiale Arbeitsverhältnis, sowie das faire und nette Arbeitsklima.

Herrn Dr. Dieter Niederacher danke ich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Ich danke Prof. D. Curiel und Dr. A. Hemminki für die Bereitstellung der RGD-modifizierten Adenoviren und der Adenoviren mit COX2- bzw. MK-Promotor, Prof. Dr. Walther und Dr. Stein für die Bereitstellung des MDR-Promotors, Dr. H.B. Prisack und Dr. D. Makri für die Bereitstellung der Reportergene lacZ und HSV-TK.

Besonders danke ich Frau B. Hanzen und Frau I. Herrmann für die hervorragende Teamarbeit und die Freundschaft, die sich im Laufe unserer Zusammenarbeit entwickelt hat.

Ich danke meinen Laborkolleginnen und -kollegen für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke allen Mitarbeitern des BMFZ und der Onkologischen Chemie, vor allem Dr. H.B. Prisack, für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke auch der Düsseldorf Entrepreneurs Foundation und dem Verein für Freunde und Förderer der Heinrich-Heine-Universität, die mit einem Promotionsstipendium einen wesentlichen Anteil am Entstehen dieser Arbeit übernommen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Iris, meinen Kindern Laurin und Ariane, meinen Eltern und Freunden für ihre Unterstützung, ihre Geduld und Nachsicht, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

**10. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht habe.

Düsseldorf, Dezember 2002

Gernot Röder