

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Quantifizierung und Einsatz rekombinanter adeno-assoziiertes Viren
als therapeutischer Vektor beim nicht–kleinzelligen Bronchialkarzinom**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Marc Andre Wulf

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Kronenwett

Korreferent: Prof. Dr. Schulze-Osthoff

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	6
1. EINLEITUNG	8
1.1 EPIDEMIOLOGIE UND PROGNOSE DES BRONCHIALKARZINOMS	8
1.2 HISTOLOGIE DES BC	8
1.3 ÄTIOLOGIE DES BC	8
1.3.1 Exogene Faktoren	8
1.3.2 Endogene Faktoren	9
1.4 MOLEKULARE PATHOGENESE BEIM NSCLC	9
1.5 FUNKTION DES P53-PROTEINS	11
1.6 CISPLATIN ALS STANDARD-THERAPEUTIKUM BEIM NSCLC	13
1.7 DAS EINSCHLEUSEN VON P53 IN TUMORZELLEN	13
1.8 VEKTORSYSTEM: ADENO-ASSOZIIERTES VIRUS TYP 2	14
1.9 TITRATIONSMETHODEN FÜR RAAV-2	16
1.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 ZELLKULTUR	18
2.1.1 Zelllinien und Nährmedien	18
2.1.2 Kultivierung der Zellen	19
2.2 PRODUKTION DER PLASMIDE	19
2.2.1 Die Plasmide	19
2.2.2 Plasmidvermehrung in <i>E. coli</i> Kulturen	22
2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	22
2.2.4 Konzentrationsmessung der Plasmid-DNA	24
2.2.5 Qualitative Prüfung der Plasmide	24
2.3 GELELEKTROPHORESE	25
2.4 PRODUKTION DER RAAV-2-VEKTOREN	27
2.4.1 Transfektion der Plasmide	27
2.4.2 Ernte und Isolierung der Viruspartikel	28
2.5 AUFREINIGUNG DER RAAV-2-VEKTOREN	29
2.6 TITRATION VON INFEKTIÖSEN RAAV-GFP-PARTIKELN	30
2.6.1 Durchflußzytometrie	30
2.6.2 Ermittlung des infektiösen Titers der Virussuspensionen	31

2.7 TITRATION VON GENOMISCHEN RAAV-2-PARTIKELN	33
2.7.1 Vorbehandlung der Virussuspensionen.....	33
2.7.2 CMV–Promotor spezifische, quantitative PCR (qPCR).....	34
2.7.3 Kontrolle der Spezifität der qPCR	36
2.7.4 Erstellung der Standardkurve	36
2.7.5 Ermittlung des genomischen Titers von rAAV-2-Präparationen	37
2.8 WESTERN BLOT–ANALYSE.....	39
2.8.1 Infektion der Zellen	39
2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellysat	39
2.8.3 Gelelektrophorese des p53-Proteins	40
2.8.4 Blotting des p53-Proteins.....	41
2.8.5 Inkubation mit dem primären Antikörper.....	42
2.8.6 Inkubation mit dem sekundären Antikörper	42
2.8.7 Detektion des p53-Proteins	42
2.9 ZELLKULTUREXPERIMENTE	43
2.9.1 Transduktion mit rAAV-2-Partikeln	43
2.9.2 Inkubation mit Cisplatin.....	44
2.10 TRYPANBLAU–VITALITÄTSTEST	45
2.11 KLONOGENER WACHSTUMSTEST	45
2.12 ANNEXIN V–APOPTOSETEST	46
2.12.1 Funktionsprinzip	46
2.12.2 Durchführung.....	47
2.12.3 Auswertung.....	48
2.13 STATISTISCHE AUSWERTUNG	48
3. ERGEBNISSE	51
3.1 TITRATION DER RAAV-2-PARTIKEL.....	51
3.1.1 Etablierung einer qPCR und Prüfung ihrer Sensitivität und Spezifität	51
3.1.2 Quantifizierung der rAAV-2-Partikel durch den infektiösen und den genomischen Titer	53
3.1.3 Reliabilität von FACS–Analyse und qPCR	56
3.1.4 Vergleich von infektiösem und genomischen Virustiter (Validitätsprüfung)	57
3.2 NACHWEIS DES RAAV-P53 VERMITTELTEN GENTRANSFERS AUF PROTEINEBENE.....	58
3.3 NACHWEIS EINER APOPTOSEINDUKTION DURCH RAAV-P53	59
3.4 ZYTOTOXISCHE EFFEKTE VON P53 AUF NSCLC ZELLINIEN.....	62
3.4.1 Inhibition Zellwachstums im einfachen Transduktionsansatz.....	63
3.4.2 Ermittlung der Cisplatinosis für die Kombinationsexperimente.....	66
3.4.3 Effekt des kombinierten Einsatzes von rAAV-p53 und Cisplatin	67
3.4.4 Verminderung des Vermehrungspotentials durch p53 mit und ohne Cisplatin	70

4. DISKUSSION:	73
4.1 QUANTIFIZIERUNG VON RAAV-2-VEKTOREN.....	73
4.2 ZYTOTOXISCHE EFFEKTE VON RAAV-P53 ALLEINE UND IN KOMBINATION MIT CISPLATIN	76
LITERATURVERZEICHNIS	81
DANKSAGUNG	85
KURZVITA	86
ZUSAMMENFASSUNG	87

Abkürzungen

7-AAD	: 7-Amino-Actinomycin D
AAV-2	: Adeno-assoziiertes Virus Typ 2 (Wildtyp)
Abb.	: Abbildung
AM	: arithmetischer Mittelwert
APS	: Ammonium Persulfat
ARF	: <i>alternative reading frame</i>
BAX	: <i>BCL2-associated X protein</i>
BC	: Bronchialkarzinom
BCL-2	: <i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BSA	: Bovines Serum Albumin
CDK	: <i>cyclin dependent kinase</i>
CDTA	: <i>cyclohexane diamine tetra acetic acid</i>
c-MET	: <i>c-methylase</i> , Synonym: <i>hepatocyte growth factor receptor</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	: Dithiothreitol
E. coli	: Escherichia coli
EDTA	: <i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>
EGF	: <i>epidermal growth factor</i>
eGFP	: <i>enhanced green fluorescence protein</i>
EGTA	: <i>ethylene glycol tetra acetic acid</i>
Fa.	: Firma
FACS	: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	: <i>fetal bovine serum</i>
FGFR-1	: <i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FHIT	: <i>fragile histidine triad</i>
FITC	: <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FRA3b-Region	: <i>fragile site 3b</i> (auf Chromosom 3)
g	: Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GADD-45	: <i>growth arrest and DNA-damage-inducible alpha</i>
GFP	: <i>green fluorescence protein</i>
GT	: genomischer Titer
HeLa	: Zervixkarzinomzelllinie der Patientin Helen Lang
HEPES	: Hydroxy-Ethylpiperazin-Ethan-Sulfonsäure
HGF	: <i>hepatocyte growth factor</i>
ITR	: <i>inverted terminal repeats</i>
Kap.	: Kapitel in dieser Arbeit
kDa	: Kilodalton
K-ras	: <i>Kirsten rat sarcoma-2 viral oncogene homologue</i>
LB-Medium	: Luria Bertoni Medium

MYC	: <i>myelocytomatosis viral oncogene homologue</i>
NSCLC	: <i>non-small cell lung carcinoma</i>
dNTP	: Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
p16/INK4a	: Protein der Größe 16 kDa, Synonym: <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 4a</i>
p21	: Protein der Größe 21 kDa, Synonym: <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1a</i>
p53	: Protein der Größe 53 kDa
PBS	: <i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	: <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PE	: Phycoerythrin
PMSF	: <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
rAAV-2	: rekombinanter Adeno-assoziiertes Virus Typ 2
rAAV-GFP	: rekombinanter Adeno-assoziiertes Virus, Vektor für GFP
rAAV-p53	: rekombinanter Adeno-assoziiertes Virus, Vektor für p53
RAR-beta	: <i>retinoic acid receptor, beta</i>
Rb	: <i>retinoblastoma</i>
qPCR	: <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
SA	: Standardabweichung
SCF	: <i>stem cell factor</i>
SCID	: <i>severe combined immunodeficiency</i>
SCLC	: <i>small cell lung carcinoma</i>
SDS	: <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SIRS	: <i>systemic inflammatory response syndrome</i>
TBE-Puffer	: Puffer aus TRIS, Borsäure und EDTA
TEMED	: Tetramethylethylendiamin
TRIS	: Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	: Enzymeinheiten
upm	: Umdrehungen pro Minute
UV	: Ultraviolettes Licht
VK	: Variationskoeffizient
Anmerkung	: aus dem Englischen übernommene Fachbegriffe und Eigennamen wurden in <i>kursiver Schrift</i> gekennzeichnet

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Prognose des Bronchialkarzinoms

Das Bronchialkarzinom (BC) ist in Europa und den USA die häufigste bösartige Tumorerkrankung. Seine Inzidenz nimmt weltweit zu. Sie betrug 1999 in den westlichen Industrienationen 60 pro 100.000 Personenjahre. In Deutschland ist das BC die häufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern und mit steigender Tendenz die dritthäufigste bei der Frau. Etwa 90% aller Patienten versterben an ihrer Erkrankung und die 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 14% hat sich im letzten Jahrzehnt nicht entscheidend verändert. Selbst bei prognostisch günstigen Formen im Stadium I liegt die 5-Jahres-Überlebensrate mit Therapie nur bei etwa 60%. In den meisten Fällen ist eine kurative Behandlung nicht möglich, die Therapie des BC ist daher meist palliativ.^{14, 43, 76}

1.2 Histologie des BC

Man differenziert histologisch kleinzellige (SCLC) von nicht-kleinzelligen (NSCLC) Bronchialkarzinomen. Diese Einteilung ist von prognostischer und therapeutischer Relevanz. Die Gruppe der NSCLC, auf die sich der folgende Text konzentriert, umfaßt im wesentlichen Adenokarzinome, großzellige Karzinome und Plattenepithelkarzinome.^{14, 90}

1.3 Ätiologie des BC

1.3.1 Exogene Faktoren

Wichtigster ätiologischer Faktor ist das Rauchen; es ist in etwa 90% der Fälle an der Tumorgenese beteiligt. Dies geschieht zum Teil über chronisch-inflammatorische Prozesse und mit ihnen verbundene Proliferationsreize, zum Teil über inhalierte Mutagene und durch sie bedingte, genetische Veränderungen der Bronchialzellen. Rauchen fördert vor allem das Auftreten von SCLC und Plattenepithelkarzinomen. Auch regelmäßiges Passivrauchen erhöht die Erkrankungswahrscheinlichkeit signifikant.³² Als Karzinogene gelten Arsen, Asbest,

Benzo(a)pyren, Beryllium, Chrom, Dioxin, Kadmium, Nickel, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Radon, Uranstaub sowie eine allgemeine, starke Luftverschmutzung.¹⁴

Einen weiteren Einflußfaktor scheint die Ernährung darzustellen. Gemüsereiche Kost halbiert in etwa die statistische Wahrscheinlichkeit an einem BC zu erkranken, während besonders fettreiche Nahrung sie verdoppelt.^{77, 78, 79, 92, 96} Möglicherweise spielen auch psychosoziale Faktoren eine Rolle. Verschiedene Studien weisen darauf hin, daß eine hohe psychosoziale Belastung mit einer gesteigerten Inzidenz von Bronchialkarzinomen einher geht.^{19, 83}

1.3.2 Endogene Faktoren

Einige genetische Dispositionen können bei der Entstehung von BC von Bedeutung sein. Zu nennen sind eine erhöhte Aktivität von Cytochrom P-450 mit vermehrter Bildung von Kanzerogenen, eine verringerte Glutathiontransferase- oder N-Acetyltransferase-Aktivität mit vermindertem Abbau von Kanzerogenen, sowie eine verringerte Aktivität der DNA-Reparaturenzyme (z. B. hMLH1).^{3, 51, 60, 70, 71, 73} Insgesamt jedoch kommt den endogenen Faktoren gegenüber den exogenen Einflüssen eine geringere Bedeutung zu.¹⁴

1.4 Molekulare Pathogenese beim NSCLC

Man schätzt, daß zwischen zehn und zwanzig molekulargenetische Ereignisse mit der Genese eines BC verbunden sind.⁴⁹ Dabei handelt es sich vor allem um Veränderungen der Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt sind, insbesondere die Tumorsuppressor- und Protoonkogene. Jedoch sind Art und Reihenfolge dieser Mutationen von Fall zu Fall selbst bei gleichem histologischen Phänotyp verschieden, so daß eine simple, lineare Pathogenese nicht angenommen werden kann.^{30, 54, 71}

Für das NSCLC wurden eine Reihe typischer genetischer Veränderungen beschrieben. Diese betreffen vor allem die Funktion der Tumorsuppressorgene p53, beta-Tubulin, p16/INK4a, RAR-beta, Rb und FHIT und der Wachstumsstimulatoren bzw. Protoonkogene

HGF/c-MET, EGF, SCF, K-ras und MYC. Von besonderer Bedeutung sind dabei Mutationen der Tumorsuppressorgene p53, p16 und FHIT.^{23, 30, 54, 67, 81}

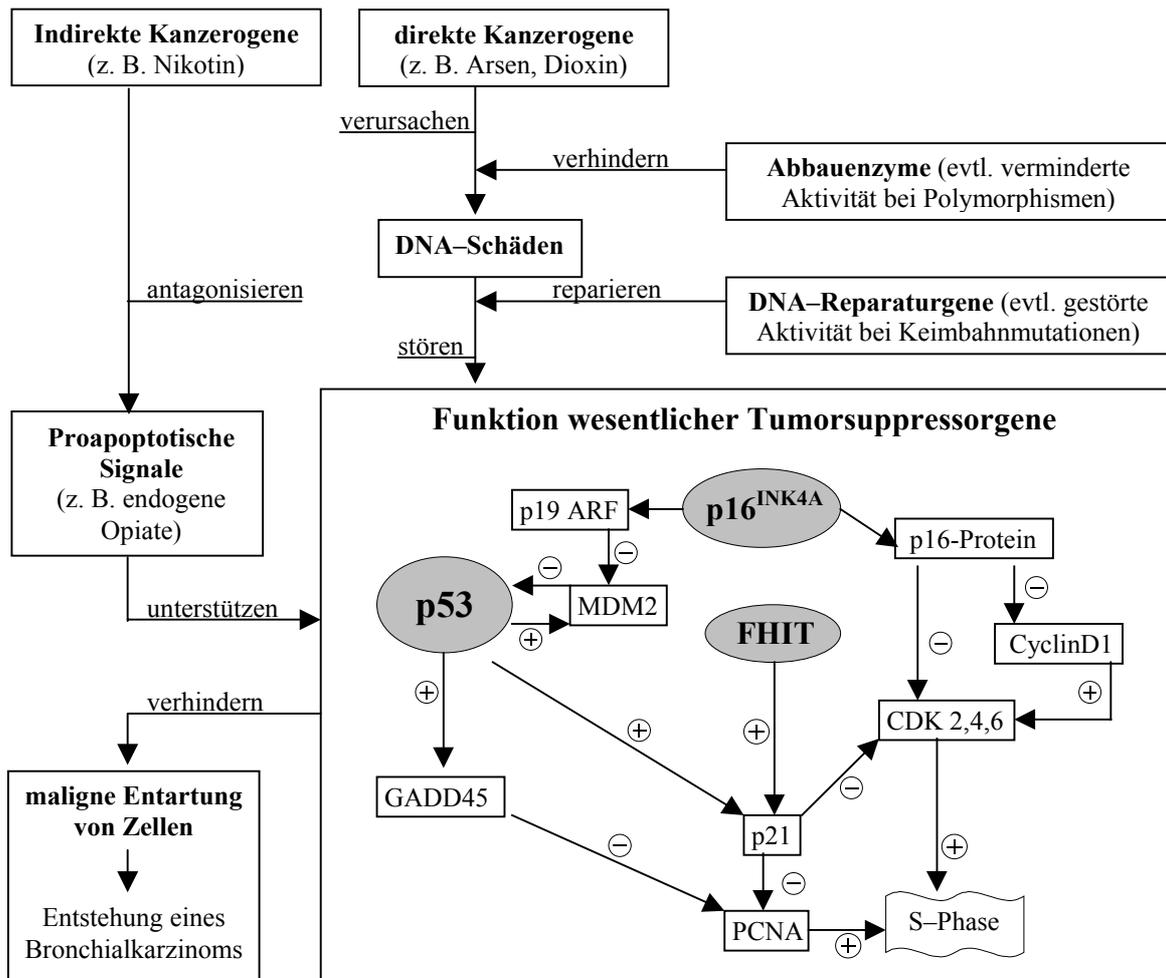
Mutationen beim BC sind meist durch exogen zugeführte und die DNA schädigende Substanzen bedingt, sogenannte Mutagene. Für die Erkrankungswahrscheinlichkeit ist die Menge an Mutagenen bedeutsam, denen die Lunge insgesamt ausgesetzt ist. Wenn die Kapazität der DNA-Reparaturenzyme überschritten wird, können DNA-Schäden nicht mehr effektiv verhindert werden und manifestieren sich als Mutationen.⁷¹

Einige wichtige Beispiele für Mutagene seien genannt: Zyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine verursachen oxidativ DNA-Schäden, bei denen Guanosin zu Thymin transvertiert. Dies betrifft häufig das p53-Gen und die FRA3b-Region, in der das FHIT-Gen lokalisiert ist. Der Genlocus von p53 ist in 50-75% der NSCLC von einer Mutation betroffen, das verbleibende Allel ist dabei in durchschnittlich 50% der Fälle deletiert. Dabei reicht die Rate heterozygoter p53-Deletionen von 35% (bei Adenokarzinomen) bis 65% (bei Plattenepithelkarzinomen).^{4, 29, 82} Eine abnormale p53-Expression wurde mit immunhistochemischen Methoden in 40-60% der NSCLC gefunden.²⁷ Der Verlust der Funktion von p53 wird insgesamt in mehr als 50% der Fälle beschrieben. Das FHIT-Gen ist in bis zu 80% der NSCLC und ebenso häufig bei präkanzerotischen Dysplasien des Bronchialsystems von Rauchern verändert.⁷¹ Der Funktionsverlust beider Gene erfolgt meist in der Frühphase der Karzinogenese und ist vermutlich von zentraler Bedeutung.^{54, 71}

Mutagene können zudem eine fehlerhafte DNA-Methylierung bewirken. Diese tritt vermehrt bei den Genen p16 und FHIT auf und führt zu deren Funktionsverlust. Die Gene p16, cyclinD1, CDK4 und Rb bilden eine funktionelle Einheit zur Steuerung des Zellzyklus, die in 70-90% der NSCLC von Mutationen betroffen ist. Auch andere genetische Veränderungen betreffen meist proliferationsregulierende Signalketten: Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, intrazelluläre Signalproteine und Transkriptionsfaktoren.^{23, 71}

Nikotin wirkt indirekt kanzerogen, indem es die lokale Wirkung von endogenen Opiaten an den Opioidrezeptoren der Lunge antagonisiert, die dort proliferationshemmende und proapoptotische Eigenschaften entfalten.²³

Abbildung 1: **Molekulare Pathogenese beim BC (Ausschnitt)**



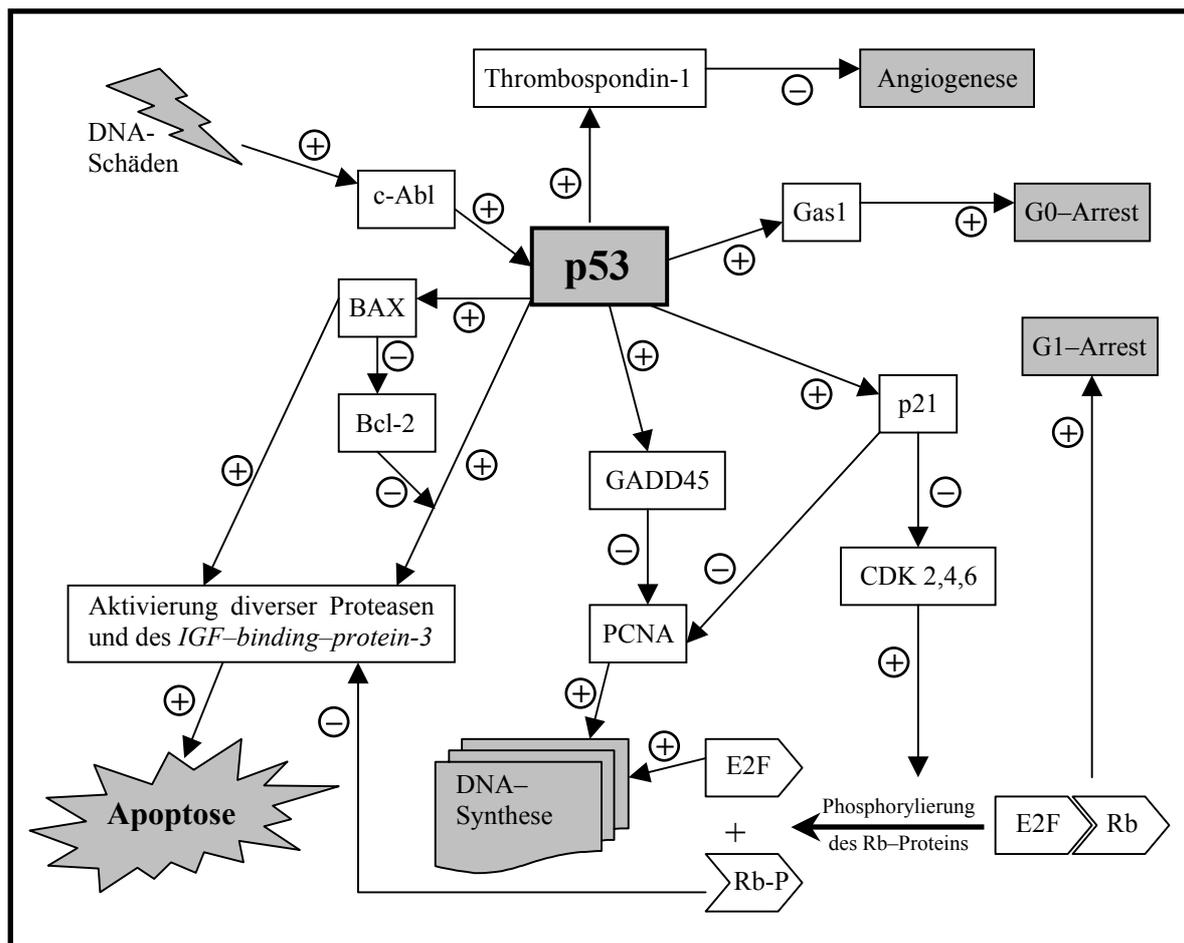
1.5 Funktion des p53-Proteins

p53 ist ein DNA bindendes, tetrameres Protein mit einer Größe von 53 kDa. Das kodierende Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17. Seine Konzentration ist in gesunden Zellen sehr gering. Die Expression von p53 wird bei zellulärem Streß (DNA-Schäden, Hypoxie, dNTP-Mangel) gesteigert. Es besitzt folgende wichtige Funktionen: ^{44, 45, 47}

p53 wird durch geschädigte DNA aktiviert und inhibiert deren Replikation über einen Arrest des Zellzyklus in der G1 und G2 Phase. Dies wird durch die Aktivierung weiterer Gene vermittelt, p53 fungiert dabei als Transkriptionsfaktor. Parallel induziert es die Reparatur der DNA über eine Expression von GADD45 und p21. Beide Proteine beeinflussen die DNA-Polymerase PCNA so, daß sie zwar DNA reparieren, nicht aber replizieren kann.

Gelingt die DNA-Reparatur nicht, wird die Apoptose eingeleitet. Dies geschieht unter anderem über eine p53 vermittelte Expression des BAX-Proteins, das mit BCL-2 Dimere bildet und dessen antiapoptotische Wirkung aufhebt, sowie über die Aktivierung verschiedener Proteasen. Das apoptotische Signal wird durch interzelluläre Kontakte und Endozytose von apoptotischem Material auf Nachbarzellen übertragen („*Bystander Effect*“).

Abbildung 2: Funktionskreis von p53 (Auswahl)



Durch DNA-Schäden, Hypoxie und dNTP-Mangel besteht bei schnell wachsenden Tumoren ein Anlaß zur gesteigerten Expression von p53, die den Untergang von Tumorzellen zur Folge hat. Daraus resultiert ein starker Selektionsdruck auf die Zellen, die p53-Funktion zu verlieren, sei es durch fehlende Expression oder veränderte Proteinstruktur. Sobald p53 dysfunktional ist, nimmt die genetische Instabilität und die effektive Mutationsrate der Zellen infolge fehlender Kontrollmechanismen weiter zu.¹⁴ Dadurch erhöht ein Verlust von p53 die Metastasierungswahrscheinlichkeit und steigert die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Ein Verlust der p53-Funktion führt somit zu einer schlechteren Prognose.^{17, 37, 46}

Einige mutierte p53-Varianten stören die Funktion des Wildtyp-p53 und sind daher phänotypisch dominant. Menschen, die generell heterozygot für Wildtyp-p53 sind, entwickeln zu 90-95% eine bösartige Erkrankung.⁴⁴

1.6 Cisplatin als Standard–Therapeutikum beim NSCLC

Bei der medikamentösen Therapie des NSCLC wird sehr häufig Cisplatin verwendet. Diese Substanz induziert in den BC-Zellen sowohl über Mechanismen, die von p53 unabhängig sind, als auch über p53 abhängige Signalwege die Apoptose.⁸⁹ Dabei ist die durch Cisplatin induzierte Expression von p53 therapeutisch bedeutsamer. Beim Ausfall der Funktion von p53 kommt es daher meist zum Versagen einer Cisplatin-basierten Chemotherapie.⁶²

1.7 Das Einschleusen von p53 in Tumorzellen

Um ein Therapieversagen von Cisplatin bei Bronchialkarzinomen ohne funktionelles p53 zu verhindern, erscheint es sinnvoll, die p53-Funktion in den Lungenkrebszellen wiederherzustellen.^{1, 24, 91} Verschiedene in-vitro Studien zeigten, daß das Einschleusen von Wildtyp p53 in BC-Zellen Apoptose auslösen konnte.^{25, 52} In einer klinischen Phase I–II Studie, bei der mit adenoviralen Vektoren ein p53 Gentransfer in Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC durchgeführt wurde, zeigte sich ein moderater positiver Effekt: Von 28 teilnehmenden Patienten wurde bei zwei Patienten eine partielle Remission und bei 16

Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung festgestellt.⁸⁰ Eine andere Studie konnte bislang keinen Vorteil einer kombinierten Chemo- und Gentherapie gegenüber einer alleinigen Chemotherapie belegen.⁶⁸ In beiden Studien kam es zu keinen wesentlichen Nebenwirkungen durch die Gentherapie, so daß die intratumorale Einschleusung von p53 für den Patienten wahrscheinlich weitgehend ungefährlich ist.

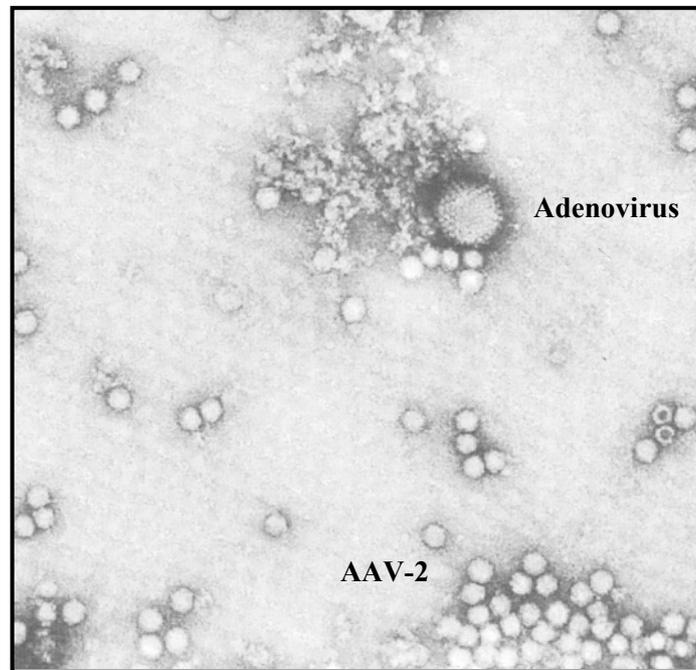
1.8 Vektorsystem: Adeno-assoziiertes Virus Typ 2

Um ein therapeutisches Gen in Tumorzellen einzuschleusen, wird ein Vektor mit bestimmten Eigenschaften benötigt. Ein vorteilhafter Kandidat ist das Adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2).^{33, 50} Sein Vorzug gegenüber anderen Vektoren besteht darin, daß AAV-2 nach derzeitigem Forschungsstand beim Menschen keine Krankheit auslöst. Zudem besitzt das sehr kleine Virus kaum immunogene Eigenschaften. Seine Bestandteile werden im Gegensatz zu denen vieler anderer Viren von den Zielzellen nicht als Antigene präsentiert.⁵

AAV-2 ist ein hüllenloses humanes Parvovirus mit einem Durchmesser von 20-30 nm. Seine Erbinformation speichert eine Einzelstrang-DNA mit einer Größe von 4,68 Kilobasen. Das Genom des AAV-2 Wildtyps enthält im Wesentlichen zwei Gene: Das Replikationsgen *rep* und das Strukturgen *cap* für das Kapsid. Beide Gene wurden beim rekombinanten rAAV-2 entfernt, um eine autonome Replikation in Zielzellen zu verhindern und um Platz im Kapsid zu sparen. Denn ein Nachteil von AAV-2 als Vektor liegt in seiner vergleichsweise geringen Verpackungskapazität für therapeutische Gene. AAV-2 kann sowohl teilende als auch ruhende Zellen befallen, ist aber bei seiner Replikation auf Helferviren (Herpes- oder Adenoviren) angewiesen. Sie tragen genetische Informationen, die für eine Replikation von AAV-2 in den Zielzellen notwendig sind. Falls kein Helfervirus die Zielzelle mitinfiziert hat, integriert der AAV-2 Wildtyp nach Doppelstrangsynthese spezifisch in den langen Arm von Chromosom 19. Dabei sensibilisiert er die Zielzelle für biochemischen und physikalischen Streß und zeigt tumorunterdrückende Eigenschaften. Diese werden vor allem über *splice*-Varianten des AAV-2-Gens *rep* vermittelt. Die Bindung und Internalisierung des Virus

erfolgt seitens der Zielzelle über Heparansulfat-Proteoglykan als Hauptrezeptor und alphaVbeta5-Integrin sowie FGFR-1 als Korezeptoren.^{34, 40, 65, 88}

Abbildung 3: Adenovirus und AAV-2



250.000fache Vergrößerung (Elektronenmikroskop)

Quelle: Prof. Stewart McNulty, Veterinary Sciences Division,
Queen's University, Belfast, GB (www.qub.ac.uk)

Mehrere Arbeitsgruppen haben erfolgreich rekombinante rAAV-2-Partikel hergestellt und in klinischen Studien zur Behandlung der Zystischen Fibrose und der Hämophilie B eingesetzt.^{39, 87} Auch in einer in-vitro Studie zur Parkinson Krankheit konnte der Nutzen von rAAV-2 gezeigt werden.⁷² Schließlich gelang anderen Arbeitsgruppen mit rAAV-2 bereits ein Gentransfer von p53 in eine Leber- und eine Lungenkarzinomzelllinie.^{10, 56}

In einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe wurde der Tropismus von rAAV-2 bei einer Reihe von BC-Zelllinien untersucht. Demnach stellen alle histologisch wichtigen NSCLC-Subtypen mögliche Ziele für einen rAAV-2 vermittelten Gentransfer dar.⁵⁸

1.9 Titrationsmethoden für rAAV-2

Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von rAAV-2-Vektoren in präklinischen und klinischen Studien ist die Quantifizierung der Viren, ohne die eine Erstellung von Dosis–Wirkungs–Kurven nicht möglich ist. Eine optimale Titrationsmethode sollte zuverlässig, schnell durchführbar und für unterschiedliche rAAV-2-Vektorsysteme verwendbar sein. Die bisher etablierten Methoden erfüllen jedoch nicht alle genannten Kriterien.

Einige Methoden basieren auf der Fähigkeit des Virus, Zellen zu transduzieren. Dabei wird entweder die intrazelluläre Replikation des Virusgenoms oder die Expression eines einfach zu detektierenden Transgens (Markergen) gemessen.^{2, 38, 95} Beispiele hierfür sind die Fluoreszenz-Mikroskopie nach Veldwijk et al. (1999) oder die FACS-Analyse nach Malik et al. (1997).^{48, 85} Das zuletzt genannte Verfahren erfaßt die erfolgreich transduzierten Zellen durchflußzytometrisch mithilfe fluoreszierender Eigenschaften des intrazellulär gebildeten Markerproteins GFP. Es wird in dieser Arbeit aufgrund seiner hohen Reliabilität als Referenz-Verfahren betrachtet. Fluoreszenz-basierte Methoden sind jedoch abhängig von der Expression des Markergens. Um unerwünschten Nebenwirkungen vorzubeugen, müssen Markergene vor der klinischen Anwendung von Vektoren entfernt werden und stehen demnach nicht mehr für eine Titration zur Verfügung.

Andere Methoden setzen virale DNA aus den Kapsiden frei, um sie direkt zu messen. Der *Dot-Blot Assay* nach Flotte et al. (1992) beispielsweise verdünnt die freigesetzte DNA seriell und vergleicht sie mit standardisierten Plasmidproben, woraus sich die Zahl der Partikel unabhängig von ihrer Infektiösität schätzen läßt.²² Dies ist jedoch ein vergleichsweise schwieriges Verfahren. Gleiches gilt für PCR-Methoden, die auf seriellen Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Virussuspension beruhen.^{15, 63} Andere Gruppen verwendeten *real-time* PCR-Methoden zur Quantifizierung von rAAV-2-Partikeln.^{7, 15, 26} Diese Methoden sind jedoch von einem bestimmten therapeutischen Gen abhängig.

Alle genannten Verfahren können durch verschiedene Faktoren in ihrer Genauigkeit beeinträchtigt werden, so daß es zu signifikanten Meßunterschieden kommt.²⁰ Dazu gehören die Art der verwendeten Helferviren, die Wahl des *Promoters*, die Magnesiumkonzentration und die Zelltypen, die für die Virusproduktion oder die Titration benutzt wurden.^{12, 21, 42, 63}

Zudem handelt es sich bei den meisten Titrationsmethoden für rAAV-2 Vektoren um vergleichsweise aufwendige Verfahren. Zur Durchführung der etablierten Methoden sind oft zwei bis drei Tage erforderlich. Eine weitere Optimierung in diesem Bereich kann daher als wünschenswert betrachtet werden.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Es ist Ziel meiner Arbeit, den Einsatz von rAAV-2 als gentherapeutischen Vektor beim Bronchialkarzinom zu untersuchen. Dazu etabliere ich eine neue quantitative PCR-Methode, die eine schnelle und zuverlässige Mengenbestimmung von rAAV-2-Partikeln ermöglicht. Sie ist unabhängig von der Expression eines Gens und erlaubt eine Standardisierung der rAAV-2-Produktion für klinische Studien.

Weiterhin transduziere ich das Tumorsuppressorgen p53 mit rAAV-2 in drei BC-Zelllinien und quantifiziere die Reduktion der Zellvermehrung mit drei Apoptose- bzw. Zellwachstumstests. Zudem prüfe ich, ob durch gleichzeitigen Einsatz von Cisplatin die proapoptotischen Eigenschaften wechselseitig verstärkt werden können. Inwieweit sich diese Ergebnisse auf einen klinischen Kontext übertragen lassen, wird abschließend diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien und Nährmedien

Die humane embryonale Nierenzelllinie *293T* diente als Wirt für die Produktion der rAAV-2-Vektoren (siehe Kap. 2.4). Sie wurde nach dem Protokoll von Pear et al. (1993) in *DMEM* (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) kultiviert.⁵³ Dem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes FBS (Fa. GibcoBRL, Paisley, Schottland), 2mM Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugefügt.

Die humane Cervixkarzinomzelllinie *HeLa* wurde für die Titration der infektiösen rAAV-GFP Partikel eingesetzt (siehe Kap. 2.6). Als Medium wurde *RPMI-1640* (Fa. Sigma) verwendet, dem 10% hitzeinaktiviertes FBS (Fa. GibcoBRL), 2mM Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt wurden.

Die p53-positive humane Mammakarzinomzelllinie *T47D* wurde als positive Kontrolle für den *Western Blot* verwendet (siehe Kap. 2.8). Sie wurde mit dem gleichen Medium kultiviert wie die Zelllinie *293T*. Die Zelllinien *293T*, *HeLa* und *T47D* entstammten der Zellkultursammlung des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg.

Die humanen Bronchialkarzinomzelllinien *H23* (Ursprung: Adenokarzinom), *H157* (Ursprung: Plattenepithelkarzinom) und *H1299* (Ursprung: großzelliges Karzinom) wurden für die Transduktionsexperimente verwendet (Kap. 2.9). Alle drei Zelllinien wurden von der *American Tissue Culture Collection* (ATCC) erworben und wiesen Störungen in der Funktion oder Expression von p53 auf. Laut ATCC-Datenbank ist die p53-Expression bei H157 signifikant vermindert, bei H1299 fehlt sie vollständig. In der Zelllinie H23 wird lediglich ein dysfunktionales p53-Protein exprimiert. Die BC-Zelllinien wurden mit dem gleichen Medium kultiviert wie die Zelllinie *HeLa*.

2.1.2 Kultivierung der Zellen

Alle oben aufgeführten Zelllinien wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Sie wurden bei 37°C und mit 5% CO₂-Gehalt der Luft im Brutschrank gehalten. Die Zellen wurden an einem *Laminar-Airflow*-Arbeitsplatz etwa zweimal in der Woche nach folgendem Verfahren passagiert: Nach Abpipettieren des alten Mediums und einfachem Waschen mit 5 ml PBS-Puffer (KCl 0,2 g/l und KH₂PO₄ 0,2 g/l und NaCl 8,0 g/l und Na₂HPO₄ 1,15 g/l in Aqua bidest), erfolgte das Ablösen der adhärenen Zellen durch sechsminütige Inkubation bei 37°C mit 1,5 ml 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA (Fa. Bio-Whittaker, Verviers, Belgien). Danach wurde das Trypsin durch Zugabe von 3 ml FBS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellen sechs Minuten lang bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Je nach Dichte der Zellen wurden davon 0,5 bis 2 ml zu einer Gesamtmenge von 8 ml verdünnt und in jeweils eine neue Kulturflasche überführt. Die restlichen Zellen wurden für die Experimente verwendet. Bei Farbumschlag des Indikators im Medium fand zusätzlich ein Austausch der 8 ml Medium in den Zellkulturflaschen statt.

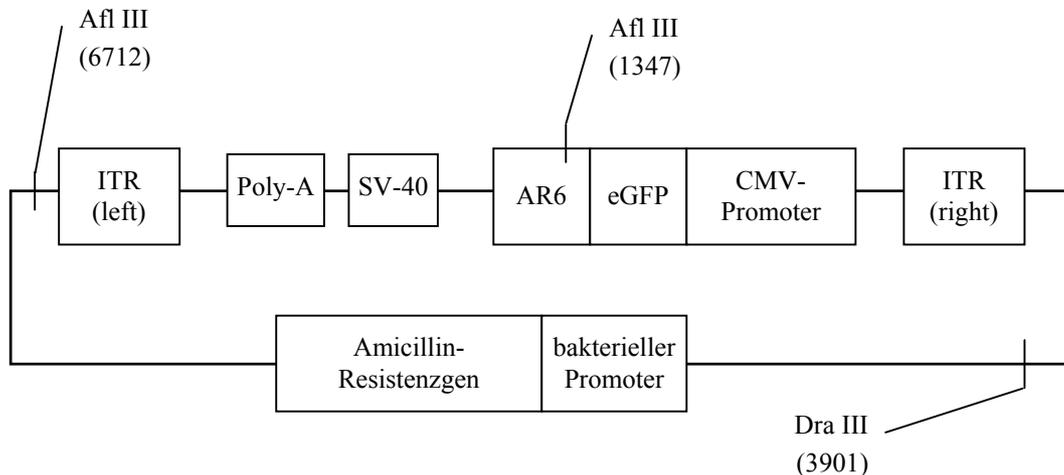
2.2 Produktion der Plasmide

2.2.1 Die Plasmide

Das *pAAV-GFP-AR6*-Vektorplasmid wurde für die Herstellung der rAAV-GFP-Vektoren verwendet (siehe Kap. 2.4). Es wurde freundlicherweise von Andrea Hörster zur Verfügung gestellt.³⁸ Dieses Plasmid mit einer Länge von 6889 Basenpaaren enthielt zwei Gene unter der Kontrolle eines *CMV-Promoters (immediate early human CMV promoter)*: Das eGFP-Gen (*enhanced green fluorescence protein*) und die gegen HIV-1 gerichtete *Antisense*-Sequenz AR6. Zur Selektion befand sich auf dem Vektorplasmid zudem ein Ampicillinresistenzgen unter der Kontrolle eines bakteriellen Promoters. Beim eGFP-Protein handelt es sich um die biotechnologisch weiterentwickelte Variante eines Fluoreszenzproteins, das ursprünglich von der Qualle *Aequorea victoria* stammt.^{8, 84, 93, 94} Weiterhin befanden sich auf dem Plasmid

DNA-Sequenzen des Affenvirus SV40 und ein Polyadenylierungs-Signal, das durch ITR-Sequenzen von AAV-2 begrenzt wurde.⁶⁴

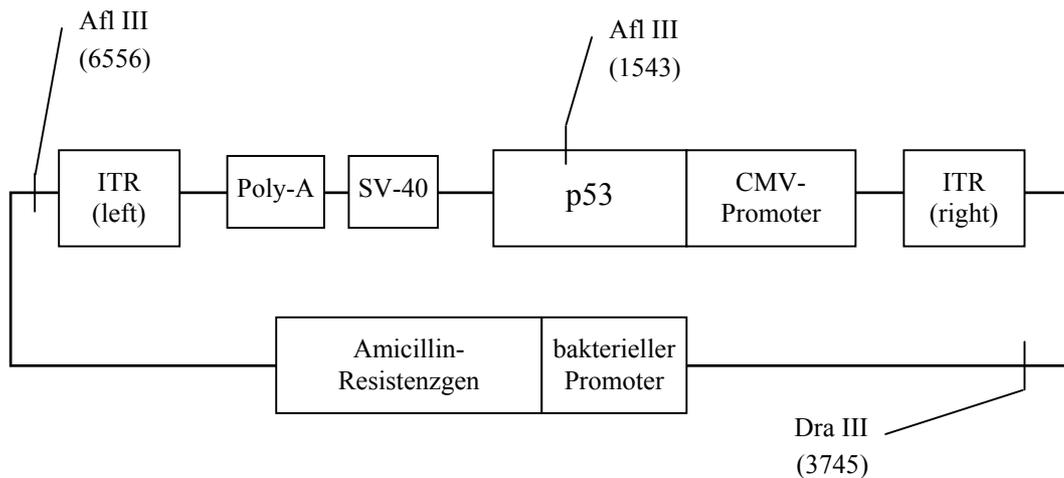
Abbildung 4: Genkarte des pAAV-GFP-AR6-Vektorplasmids



Erläuterung: Die Abbildung zeigt das Vektorplasmid pAAV-GFP-AR6 mit einer Länge von 6889 Basenpaaren. Afl III und Dra III sind Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstellen auf dem Vektorplasmid angegeben sind. Die Zahl in Klammern gibt die Nummer des Basenpaares an der enzymatischen Schnittstelle an.

Das *pAAV-p53*-Vektorplasmid wurde für die Herstellung der rAAV-p53-Vektoren verwendet (siehe Kap. 2.4). Es wurde von Susanne Stahn (Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) aus dem pAAV-GFP-AR6-Plasmid konstruiert. Die humane p53-Wildtyp-cDNA stammte aus dem *pVP22-p53*-Plasmid, das freundlicherweise von Bernd Prisack (Onkologische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde. Das *pAAV-p53*-Plasmid war 6733 Basenpaare lang und enthielt bis auf folgende Ausnahmen die gleichen Gene und Sequenzen wie das *pAAV-GFP-AR6*-Plasmid: Die Gene für eGFP und AR6 wurden entfernt und das Gen für p53 unter Kontrolle des *CMV-Promoters* hinzugefügt.

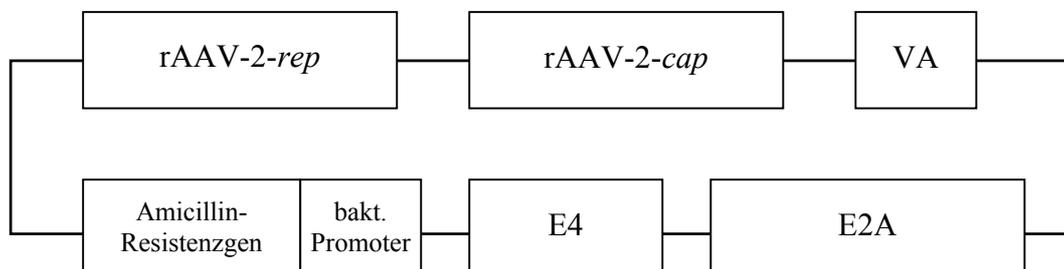
Abbildung 5: Genkarte des pAAV-p53-Vektorplasmids



Erläuterung: Die Abbildung zeigt das Vektorplasmid pAAV-p53 mit einer Länge von 6733 Basenpaaren. Afl III und Dra III sind Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstellen auf dem Vektorplasmid angegeben sind. Die Zahl in Klammern gibt die Nummer des Basenpaares an der enzymatischen Schnittstelle an.

Das Helferplasmid *pDG* mit einer Länge von 35,2 Kilobasen wurde für die Herstellung beider rAAV-Vektoren verwendet (siehe Kap. 2.4). Es enthält die Gene *rep* (Replikationsgen) und *cap* (Kapsidstrukturgen) des AAV-2-Wildtyps und drei für die Viruspartikelvermehrung und Verpackung in Wirtszellen benötigte Gene eines Adenovirus (*E2A*, *E4* und *VA*). Auch auf diesem Plasmid befand sich ein Ampicillinresistenzgen.³¹

Abbildung 6: Genkarte des pDG-Helferplasmids



Die Abbildung zeigt schematisch das Vektorplasmid pDG mit einer Länge von ca. 35.200 Basenpaaren.

2.2.2 Plasmidvermehrung in *E. coli* Kulturen

Die Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli* Kulturen überführt. Daraufhin wurden die Bakterien in einem modifizierten LB-Medium vermehrt. Zur Herstellung des Mediums wurden 10 g Trypton / Pepton, 10 g NaCl und 5 g Hefeextrakt in einem Liter Aqua bidest aufgelöst. Zusätzlich enthielt dieses LB-Medium als Selektionsantibiotikum 200 µg/l Ampicillin, um ein Wachstum von Bakterien ohne Ampicillinresistenz zu unterdrücken. Da sich auf den drei Plasmiden ein Resistenzgen gegen Ampicillin befand, konnten sich die Bakterien vermehren, die das zu vervielfältigende Plasmid besaßen. Zur Lagerung wurden die gewonnenen Kulturen bei -20°C tief gefroren.

Für die Plasmidproduktion wurde eine Nadelspitze tief gefrorener Bakterien in eine Vorkultur mit 5 ml modifiziertem LB-Medium überführt und 24 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurden je 2,5 ml der Vorkultur in eine Hauptkultur mit 500 ml modifiziertem LB-Medium überführt und weitere 24 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden sie dem Arbeitsschritt 2.2.3 unterzogen.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den *E. coli* Kulturen erfolgten mit dem *Hi Speed Plasmid Maxi Kit* (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) und wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Mit dem Verfahren konnten Plasmide mit einer Größe von bis zu 50 Kilobasen gewonnen werden. Es beruht auf einem modifizierten alkalischen Lyseprozeß der Bakterien und einer temporären, selektiven Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionenaustauscherharz. Dadurch können die Plasmide von der größeren genomischen DNA der Bakterien getrennt werden.

Die 500 ml Bakterienkulturen wurden zunächst in Mengen zu je 250 ml geteilt und für 15 Minuten bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun folgte der Auflösungsprozeß der Bakterien. Dazu wurde das Zellpellet durch Vortexen in 10 ml des Lysepuffers *P1* aufgelöst und anschließend langsam 10 ml des Lysepuffers *P2* hinzugefügt.

Die Zellsuspension wurde vorsichtig geschwenkt und dann fünf Minuten stehen gelassen. Danach wurde der Auflösungsprozeß durch Zugabe des Puffers *P3* inaktiviert.

Als nächstes folgte ein Aufreinigungsschritt, bei dem das Lysat mit einem Filter von groben Teilchen (Bestandteile der Zellwand, ausgefällte Proteine) befreit wurde. Dazu wurde das Lysat auf eine Filtersäule gegeben, zehn Minuten stehen gelassen und dann mit einem Spritzenstempel durch den Filter gepreßt. Der Filter mit den Rückständen wurde verworfen.

Das nun klare Lysat wurde dem zweiten Aufreinigungsschritt zugeführt. Die dabei verwendete Säule besaß einen Filter mit einem Anionenaustauscherharz. Sie wurde zuvor mit 10 ml des im Set enthaltenen Puffers *QBT* äquilibriert, wodurch an dem Harz ein bestimmtes pH-Milieu und eine niedrige Salzkonzentration eingestellt wurden, die eine Bindung von Plasmid-DNA an dem Harz ermöglichen. Das Lysat wurde daraufhin auf die Säule gegeben und lief langsam unter Schwerkraft durch den Harzfilter. Dabei wurde die Plasmid-DNA an dem Anionenaustauscherharz gebunden; das durchgelaufene Lysat wurde verworfen. Es folgten zwei Waschdurchgänge mit je 30 ml des Puffers *QC* mit einem mittleren Salzgehalt. Dadurch wurden die Rückstände an bakterieller DNA, RNA, Proteinen, Lysereagenzien und anderen niedermolekularen Verunreinigungen von dem Harz entfernt; die 60 ml Waschpuffer wurden verworfen. Danach wurden 15 ml des Elutionspuffer *QF* auf die Säule gegeben. Dieser Puffer besaß einen hohen Salzgehalt, wodurch die Bindung der Plasmid-DNA an dem Anionenaustauscherharz gelöst und die Plasmide ausgewaschen wurden. Die 15 ml Puffer mit der gelösten Plasmid-DNA wurden in einem Ultrazentrifugationsröhrchen aufgefangen.

Es folgte die Konzentration und Entsalzung der gewonnenen Plasmid-DNA mithilfe einer Isopropanolpräzipitation und Zentrifugation. Dazu wurden 10,5 ml Isopropanol zu dem Elutionspuffer gegeben und gründlich gemischt, wodurch die Plasmid-DNA ausgefällt wurde. Danach wurde das Röhrchen mit 15.000 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und die DNA zum Waschen mit 5 ml Ethanol überschichtet. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsdurchgang mit 15.000 g für zehn Minuten

bei 4°C. Das Ethanol wurde ebenfalls vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet etwa eine Stunde an der Luft getrocknet. Dann wurde die Plasmid-DNA in 100 µl des EDTA-haltigen Lagerungspuffers *TE* gelöst und für 12 Stunden bei 4°C gelagert. Danach wurden die 100 µl Puffer mit den Plasmiden in ein *Eppendorf*-Röhrchen überführt und bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Konzentrationsmessung der Plasmid-DNA

Die Konzentration der Plasmid-DNA im Lagerungspuffer *TE* wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden drei Proben á 3 µl vom Puffer entnommen und mit je 597 µl Wasser verdünnt. Bei jeder Probe wurde eine dreifache Messung der Lichtextinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Dazu wurde ein *BioPhotometer* der Firma Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) verwendet. Aus den drei Meßwerten jeder Probe wurde der Mittelwert gebildet und die DNA-Konzentration in Nanogramm pro Milliliter durch das Gerät berechnet. Aus den Mittelwerten der drei Proben wurde ebenfalls ein Durchschnittswert errechnet und diese Zahl für die weitere Verwendung des plasmidhaltigen Lagerungspuffers (siehe Kap. 2.4 und 2.7) zugrunde gelegt.

2.2.5 Qualitative Prüfung der Plasmide

Zur Kontrolle, ob die *E. coli* Kulturen das gewünschte Plasmid vermehrten, wurde eine spezifische enzymatische Spaltung der Plasmide mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die DNA-Sequenzen der Vektorplasmide bzw. des Helferplasmids und damit die jeweiligen Spaltstellen der Restriktionsenzyme waren bekannt. Die Plasmide konnten durch eine gelelektrophoretische Bestimmung der Größe ihrer Spaltstücke identifiziert werden.

Für die Spaltung des Helferplasmids *pDG* wurden die Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* jeweils getrennt voneinander verwendet. Dabei ergaben sich für das Enzym *XhoI* folgende Größen der Spaltstücke (Angabe in Kilobasen, gerundet): 11,41; 9,39; 5,05; 4,60; 2,50; 1,40; 0,70 und 0,18. Mit dem Enzym *BamHI* wurden Spaltstücke mit folgenden Größen erzeugt: 16,60; 16,40; 1,60; 0,48 und 0,18 Kilobasen.

Zur Spaltung der kleineren Vektorplasmide wurden die Enzyme *AflIII* und *DraIII* kombiniert eingesetzt. Dadurch wurde das *pAAV-GFP-AR6*-Vektorplasmid in Stücke mit folgenden Größen gespalten: 1,42; 2,66 und 2,81 Kilobasen. Das *pAAV-p53*-Vektorplasmid wurde durch die beiden Enzyme in diese Stücke mit folgenden Größen geteilt: 1,72; 2,20 und 2,81 Kilobasen. Alle Restriktionsenzyme wurden bei der Firma New England BioLabs (UK) erworben. Jede Produktionscharge eines Plasmids wurde mindestens zweifach untersucht.

Die enzymatische Reaktion fand unter den folgenden Bedingungen statt: Jeweils 20 U einer Restriktionsendonuklease wurden mit 5 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers und 0,5 µl BSA sowie 1 µg Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß gebracht und mit sterilem H₂O verdünnt, bis das Gesamtreaktionsvolumen 50 µl betrug. Dabei wurde das Wasser zuerst und das Enzym zuletzt in das Reaktionsgefäß pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert und danach auf Eis gelagert, bis die Spaltstücke gelelektrophoretisch analysiert wurden (siehe Kap. 2.3).

2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde zur Analyse von Plasmidspaltstücken (siehe Kap. 2.2.5) und zur Längenbestimmung der qPCR-Produkte (siehe Kap. 2.7) verwendet.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Plasmidspaltstücke wurde ein 0,8%iges Gel verwendet, für die qPCR-Produkte ein 1,5%iges Gel. Für die Grundsubstanz der Gele wurden 800 mg (0,8 %) bzw. 1500 mg (1,5 %) trockene Agarose (Fa. GibcoBRL, Paisley, Schottland) in TBE-Puffer (10,8 g TRIS-Puffer, 5 g Borsäure und 0,93 g EDTA pro Liter Aqua bidest) auf 100 g Gesamtgewicht gelöst. Die Grundsubstanz wurde über vier Minuten mit 300 Watt in einem Mikrowellengerät erhitzt und kurz zum Kochen gebracht. Zeigten sich danach noch Schlieren in dem Gel, wurde es geschüttelt und erneut kurz aufgekocht, bis es vollständig klar war. Dann wurde das dünnflüssige Gel langsam und gleichmäßig in eine Gelkammer (Fa. Owl Separation Systems, Portsmouth, USA) gegossen, in die zuvor ein Kamm eingesetzt worden war, der in dem Gel Taschen mit einem Fassungsvermögen von 60 µl formte. Beim

Gießen des Gels wurde die Bildung von Blasen vermieden und auf eine waagerechte Position der Gelkammer geachtet. Das Gel erkaltete über 30 bis 45 Minuten, bevor es so weit gehärtet war, daß der Kamm entfernt werden konnte. Danach wurde die Gelkammer mit 300 ml TBE-Puffer gefüllt (Laufpuffer) und die Proben in die Taschen pipettiert.

In die seitlichen und in eine mittlere Tasche wurden je 1 µg (5-10 µl) Marker-DNA mit standardisierten Fragmentgrößen gegeben. Für die Analyse der Plasmidspaltstücke wurden *BstEII* verdaute *Lambda-Phagen-DNA* (Fa. GeneCraft, Münster, Deutschland) und eine DNA-Leiter verwendet, die aus zehn DNA-Fragmenten mit einer Größe von einer bis zehn Kilobasen bestand (Fa. GeneCraft). Für die Analyse der qPCR-Produkte wurde eine DNA-Leiter verwendet, die aus zehn DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100 bis 1000 Basenpaaren bestand (Fa. GeneCraft). Zu den 50 µl Volumen mit gespaltenen Plasmiden aus Arbeitsschritt 2.2.5 wurden jeweils 10 µl sechsfach konzentrierter Auftragungspuffer (*6x Loading Dye BlueOrange*, Fa. Promega, Mannheim, Deutschland) gegeben. Zu den 20 µl Reaktionsvolumen aus der qPCR (siehe 2.7.2) wurden jeweils 4 µl dieses Auftragungspuffers gegeben. Die resultierenden 60 µl bzw. 24 µl wurden in die verbliebenen Tasche pipettiert.

An das Gel wurde über mindestens eine Stunde mithilfe der Gelkammer ein Gleichstrom mit einer Spannung von 120 Volt angelegt. Dadurch wanderte die in wäßriger Lösung negativ geladene DNA vom negativen zum positiven Pol, wobei kleine DNA-Fragmente sich schneller durch das Gel bewegen konnten als größere, so daß die Auftrennung der Fragmente logarithmisch zu ihrer Größe erfolgte. Eine optische Kontrolle der Elektrophorese war durch Farbstoffe im Auftragungspuffer möglich, wobei die orange Farbbande in einem Gel mit 0,8% Agarose einer DNA mit 50 Basenpaaren und die hellblaue Bande einer DNA mit 4000 Basenpaaren entsprach.

Danach folgte eine mindestens einstündige Anfärbung des Gels in einem Wasserbad mit Ethidiumbromid (Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 1 µg/ml Aqua bidest. Die Färbeintensität wurde unter UV-Licht kontrolliert und anschließend

das Gel fotografiert und ausgewertet. Ob die korrekten Plasmide in den E. coli Kulturen vermehrt wurden, ließ sich anhand von Zahl und Lage der gefärbten DNA-Banden einzelner Proben im Verhältnis zu den Banden der Marker ermitteln (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.4 Produktion der rAAV-2-Vektoren

Die Plasmide für die Herstellung der rAAV-2 Vektoren wurden so konstruiert, daß bei der Zusammensetzung der Viruspartikel die Gene *rep* und *cap* des AAV-2-Wildtyps durch die Gene p53 bzw. eGFP ersetzt wurden. Entscheidend dafür war, daß nur Gene in das AAV-2-Viruskapsid verpackt werden, die zwischen den ITR-Sequenzen liegen (siehe Kap. 2.2.1). Die rAAV-2-Partikel enthalten demnach nicht die für eine Replikation notwendigen Gene *rep* und *cap*, wodurch eine unkontrollierte Vermehrung des Vektors verhindert werden kann.

Für die Herstellung der rAAV-2-Partikel wurde jeweils eines der Vektorplasmide (*pAAV-GFP-AR6* oder *pAAV-p53*) zusammen mit dem Helferplasmid *pDG* in die Produktionszelllinie 293T transfiziert. Das Helferplasmid transportierte dabei die notwendigen Informationen für die Vermehrung und Verpackung der Viruspartikel (siehe Kap. 2.2.1), das Vektorplasmid das gewünschte Gen. Nach der Produktion der Viren wurden die 293T-Zellen aufgeschlossen und die gelösten Viruskapside vom Zelldetritus isoliert. Alle Arbeiten an den rekombinanten AAV-2-Vektoren wurden an einem *Laminar-Airflow*-Arbeitsplatz in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 (S2) nach Biostoffverordnung bzw. TRBA 100 und DIN 12128 durchgeführt.

2.4.1 Transfektion der Plasmide

Zunächst wurden jeweils 10^7 Zellen der Linie 293T mit 30 ml Nährmedium (siehe Kap. 2.1.1) in Kulturschalen von 15 cm Durchmesser ausgesät und 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Dann erfolgte die Transfektion mithilfe einer Kalziumphosphat-Präzipitation.²⁸ Der hierfür benötigte HBS-Puffer setzte sich folgendermaßen zusammen: 4 g NaCl; 0,19 g KCl;

2,4 g HEPES (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland) und 0,06 g Na₂HPO₄ auf 250 ml Aqua bidest. Der HBS-Puffer wurde durch Titration mit 1 M NaOH auf einen pH von 6,9 bis 7,1 eingestellt. Jeweils 20 µg der im Lagerungspuffer gelösten Vektor- und Helferplasmide (siehe Kap. 2.2.3) wurden kurz vor ihrer Transfektion mit 1000 µl HBS-Puffer vermischt und mit sterilem H₂O verdünnt, bis sich im *Eppendorf*-Röhrchen ein Gesamtvolumen von 1900 µl ergab. Anschließend wurden vorsichtig und tröpfchenweise 100 µl 2,5 M CaCl₂ hinzu pipettiert und eine Minute gewartet. Nun wurden mit der gleichen Pipettenspitze 100 µl Flüssigkeit langsam vom Boden des *Eppendorf*-Röhrchens aufgenommen und erneut tröpfchenweise hinzu gegeben. Dieser Prozeß wurde noch ein drittes Mal wiederholt. Das CaCl₂ bildete dabei instabile membrangängige Komplexe mit der Plasmid-DNA. Die 2 ml Inhalt des *Eppendorf*-Röhrchens wurden dann über einen Zeitraum von zwei Minuten tröpfchenweise über die Zellen einer Kulturschale verteilt. Danach standen die Zellen zehn Minuten ruhig, bevor sie wieder in den Brutschrank transportiert wurden. Dieser Vorgang wurde mit den anderen Kulturschalen wiederholt.

Die 293T-Zellen wurden weitere 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in der Umgebungsluft inkubiert. Dabei erfolgte nach 24 Stunden ein Wechsel der 30 ml Medium pro Kulturschale, um das Präzipitat von den Zellen zu entfernen.

2.4.2 Ernte und Isolierung der Viruspartikel

Zur Ernte der Viruspartikel wurde das Medium der 293T-Zellen bis auf 1 ml pro Kulturschale verworfen. Dieses Restmedium wurde mit 15 µl HEPES pro ml vermischt. Die Zellen wurden daraufhin mit einem sterilen Schaber abgekratzt und mit einer Pipette in ein *Falcon*-Röhrchen mit 50 ml Fassungsvermögen überführt. Jede Kulturschale wurde mit 1 ml HEPES-angereichertem Medium befeuchtet. Noch einmal wurden mit dem Schaber die restlichen Zellen gesammelt und in das gleiche *Falcon*-Röhrchen transferiert. Insgesamt wurde ein Volumen von knapp 2 ml pro Kulturschale gesammelt.

Die Zellen in dem *Falcon*-Röhrchen wurden dem folgenden Zyklus dreimal unterzogen: Abwechselnd wurden sie bei -76°C in einer Mischung aus Trockeneis (CO_2) und 100 ml Ethanol eingefroren und in einem Wasserbad von 37°C wieder aufgetaut. Dabei wurden die 293T-Zellen aufgeschlossen und die Viruspartikel in die Suspension freigesetzt. Zur Vervollständigung des Zellaufschlusses wurde die Suspension mit einem *Sonifier Cell Disrupter B-15* (Fa. Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) mit zehn Impulsen zu je zwei Sekunden bei 200 Watt sonifiziert.

Das Zellysate wurde danach für 30 Minuten bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, so daß sich der Zelldetritus von dem HEPES-angereicherten Medium mit den Viruspartikeln absetzte. Das Medium mit den Viren wurde weiter aufgereinigt (siehe 2.5) und der Bodensatz mit dem Zelldetritus verworfen.

2.5 Aufreinigung der rAAV-2-Vektoren

Die rAAV-2-Partikel im HEPES-angereicherten Medium aus Arbeitsschritt 2.4.2 wurden nach der Methode von Zolotukhin et al. (1999) durch Ultrazentrifugation in einem Iodixanol-Gradienten aufgereinigt und konzentriert.⁹⁷ Anschließend erfolgte eine Dialyse der Viruspräparation.

Vorbereitend wurde eine Stammlösung des Puffers angesetzt (KCl 0,29 g/l und MgCl_2 0,046 g/l und NaCl 8,0 g/l und KH_2PO_4 0,2 g/l und Na_2HPO_4 1,15 g/l in Aqua bidest). In der verwendeten Iodixanol-Stammlösung (Fa. Axif-Shield Proc. AF, Oslo, Norwegen) betrug die Konzentration des Iodixanols 60%.

In jeweils einem *Quick-Seal-Tube* (Fa. Beckmann, München, Deutschland) wurden 5 ml der Virussuspension mit den folgenden Lösungen unterschichtet: Die oberste Schicht bildeten 3 ml einer 15%igen Iodixanol-Mischung (= 12,5 Volumenanteile der Stammlösung und 37,5 Volumenanteile des Puffers), die zusätzlich mit 84 mg NaCl angereichert wurde. Die nächste Schicht enthielt 2 ml einer 25%igen Iodixanol-Mischung (= 20,83 Volumenanteile der Stammlösung und 29,17 Volumenanteile des Puffers). Sie wurde mit 4 μl einer 0,5%igen

Stammlösung Phenolrot gefärbt. In der dritten Schicht befanden sich 2 ml einer 40%igen Iodixanol-Mischung (= 33,33 Volumenanteile der Stammlösung und 16,67 Volumenanteile des Puffers). Die unterste Schicht schließlich bildeten 2 ml der 60%igen Iodixanol-Stammlösung. Dieser Schicht wurden ebenfalls 4 µl des 0,5%igen Phenolrot hinzugefügt.

Die *Quick-Seal-Tubes* wurden verschlossen und für 5 Stunden in einem Ti-75-Rotor (Fa. Beckmann) bei 60.000 upm und 18°C zentrifugiert. Danach wurde der Inhalt jedes *Quick-Seal-Tube* in 24 Fraktionen zu je 500 bis 600 µl Volumen durch Austropfen in *Eppendorf*-Röhrchen überführt, beginnend mit der untersten Fraktion. Es folgten die Dialyse aller Fraktionen über 6 Stunden gegen PBS und eine weitere Dialyse gegen das Medium der BC-Zelllinien (siehe 2.1.1) über 24 Stunden. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit den unter 2.6 bzw. 2.7 beschriebenen Methoden analysiert. Die Viruspartikel konzentrierten sich auf die Fraktionen, die 30 – 50 % Iodixanol enthielten.

2.6 Titration von infektiösen rAAV-GFP-Partikeln

Zur Quantifizierung der rAAV-GFP-Partikel in den aufgereinigten Viruspräparationen wurde die Einheit des infektiösen Titors (IT) eingeführt. Dabei entsprach einem IT von 1 Partikel pro Volumeneinheit die Menge infektiöser Viruspartikel, die in einer durchflußzytometrischen Untersuchung eine infizierte Zelle zum Fluoreszieren brachte. Demnach wäre 1 µl einer Virussuspension mit einem IT von 1000 Partikeln/µl in der Lage, das eGFP-Gen erfolgreich in 1000 Zellen zu transduzieren und dort eine Expression des eGFP-Proteins zu induzieren, die in der Durchflußzytometrie nachgewiesen werden kann. Die Durchflußzytometrie zur Titration der infektiösen rAAV-2-Partikel wurde mit der Methode von Hörster et al. (1999), modifiziert nach Rohr et al. (2002), durchgeführt.^{38, 58}

2.6.1 Durchflußzytometrie

Alle 24 Fraktionen einer rAAV-GFP-Präparation (siehe Kap. 2.5) wurden in einem dreifachen Ansatz untersucht. Für jeden Ansatz wurden auf fünf 24-Well-Platten pro Well 10⁵ HeLa-

Zellen mit 500 µl Medium ausgesät. Dann wurden von jeder Virusfraktion 5 µl, 2 µl, 1 µl und 0,5 µl, sowie 1 µl der 1:10 mit PBS verdünnten Fraktion in jeweils ein *Well* pipettiert und die Zellen damit infiziert. Es folgte eine Inkubation über 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂.

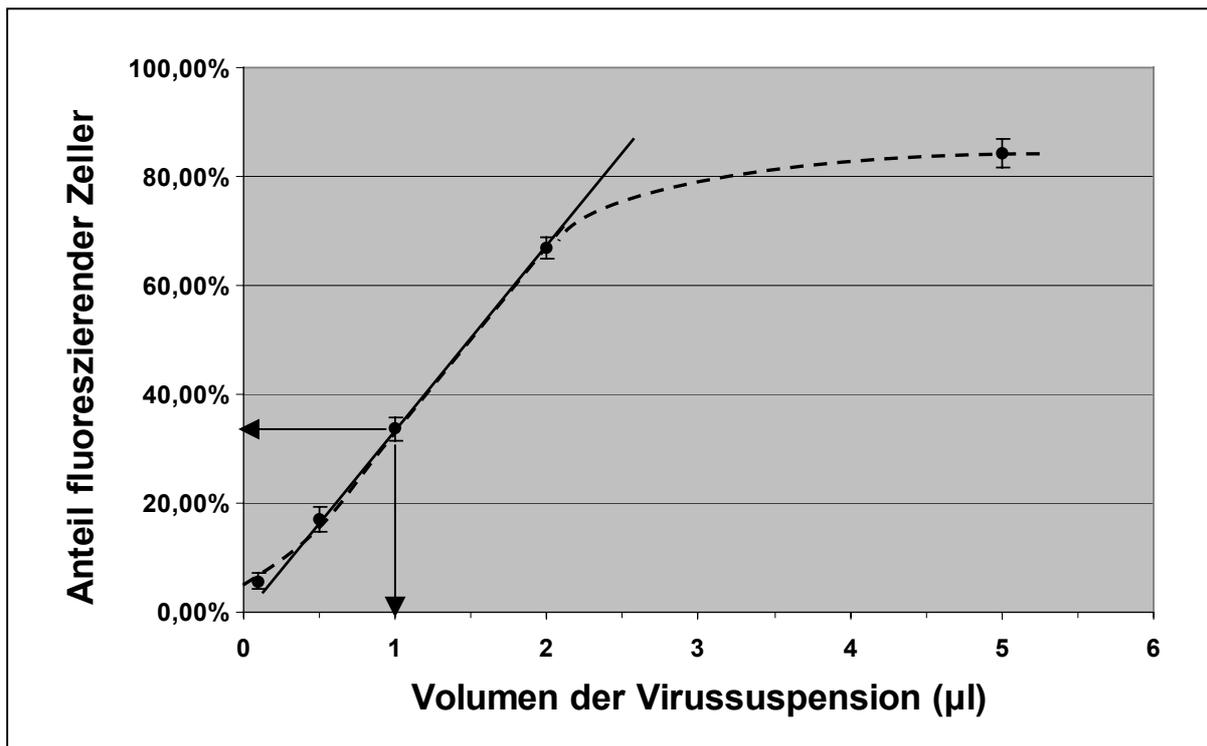
Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Inkubation mit 50 µl 0,05%igem Trypsin und 0,02%igem EDTA (Fa. Bio-Whittaker, Verviers, Belgien) über 6 Minuten bei 37°C von den *Wells* abgelöst und in *Eppendorf*-Röhrchen überführt. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 500 µl 10%igem FBS in PBS inaktiviert und anschließend die Zellen gewaschen. Dazu wurden sie für 6 Minuten bei 300g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert. Die Gesamtzellzahl in jedem *Eppendorf*-Röhrchen wurde mit einer Neubauer-Kammer ausgezählt (siehe Kap. 2.10).

Danach wurde eine FACS-Analyse mit dem Durchflußzytometer *FACSCalibur* (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Das Gerät sendete einen Argon Laserstrahl (Wellenlänge 488 nm, Leistung 2 W) durch die Zellen und berechnete aus dessen Extinktion und Ablenkung die Größe und Granularität der Zellen. Gleichzeitig wurden die eGFP-Proteine der Zellen zum Fluoreszieren gebracht und deren Licht über den FITC-Kanal des Gerätes (FL-1) detektiert. Dem Detektor war ein Filter vorgeschaltet, der Streulicht des Lasers absorbierte. Der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen wurde durch das Gerät berechnet.

2.6.2 Ermittlung des infektiösen Titers der Virussuspensionen

Der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen jedes *Eppendorf*-Röhrchens wurde mit dessen Gesamtzellzahl multipliziert. Die Ergebnisse aus drei gleichen Ansätzen wurden gemittelt. Aus den Mittelwerten wurde eine Graphik erstellt, welche die verwendete Menge der Virussuspension (0,1 bis 5 µl) zur Zahl der fluoreszierenden Zellen in Beziehung setzte.

Abbildung 7: Ermittlung des infektiösen Titers von Virusproben in der FACS-Analyse



Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse einer einzelnen Virusprobe. Alle vermessenen Volumina entstammen jeweils der gleichen Virussuspension. Der infektiöse Titer dieser Virusprobe wird ablesbar, indem ein Wert im linearen Bereich der Steigung (gerader Strich) für die Berechnung zugrunde gelegt wird (hier 1 µl und 33,7% fluoreszierende Zellen). Auf der Ordinate ist der Anteil fluoreszierender Zellen in der FACS-Analyse dargestellt, auf der Abszisse die Menge der Virussuspension, die auf die HeLa Zellen gegeben wurde.

Das Meßergebnis einer Suspensionsmenge, die möglichst mittig auf den linearen Bereich der Ergebniskurve projizierte, wurde zur Berechnung des infektiösen Titers herangezogen. Unter der Annahme, daß jede fluoreszierende Zelle von einem infektiösen rAAV-2-Partikel infiziert wurde, konnte der Virustiter der Ausgangslösung folgendermaßen berechnet werden: Die Zahl fluoreszierender Zellen bei der gewählten Suspensionsmenge wurde durch das Volumen der eingesetzten Suspensionsmenge geteilt und ergab den IT in Partikeln pro µl Volumen. Bei dieser Berechnung wurde die tatsächliche Zahl infektiöser Viruspartikel in einer Präparation eher zu niedrig als zu hoch geschätzt, da prinzipiell auch mehrere infektiöse Partikel eine Zelle befallen können, mit dieser Methode aber nur einfach gezählt wurden.

2.7 Titration von genomischen rAAV-2-Partikeln

In dieser Arbeit stelle ich eine Methode vor, die eine schnelle und sichere Quantifizierung von rAAV-2-Vektoren mit CMV-Promotor ermöglicht. Sie beruht auf einer quantitativen *Real-Time-PCR* (qPCR) und bestimmt den genomischen Titer (GT) von Virussuspensionen. Die Einheit des GT wird in genomischen Viruspartikeln pro Volumeneinheit angegeben.

2.7.1 Vorbehandlung der Virussuspensionen

Die aufgereinigten rAAV-2-Fraktionen (siehe Kap. 2.5) wurden entweder direkt als Vorlage in der qPCR eingesetzt, oder mit einem der folgenden Verfahren vorbehandelt. Ziel der drei unterschiedlichen Formen von Vorbehandlung war es, den Quantifizierungsprozeß zu optimieren. Dabei entstammten sowohl die vorbehandelten als auch die belassenen PCR-Vorlagen jeweils den gleichen Fraktionen einer rAAV-2-Präparation.

Beim ersten Verfahren wurde die rAAV-2-Präparation mit einer DNase vorbehandelt. Dazu wurden 5 µl der Virussuspension mit 1 µl DNase I (7500 U/ml, Fa. Amersham Pharmacia Biotechnics, Hamburg, Deutschland) und 44 µl sterilem H₂O in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die DNase wurde danach durch 10 Minuten Inkubation bei 65°C inaktiviert.

Für die zweite Methode wurde zusätzlich eine Behandlung mit Proteinase K nach Clark et al. (1999) durchgeführt, die sich an das erste Verfahren anschloß.¹¹ Dabei wurden 0,5 µl Pufferlösung mit 10 µg Proteinase K (Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland) zu den 50 µl Reaktionsvolumen des ersten Verfahrens gegeben und 60 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die Proteinase wurde durch 10 Minuten Inkubation bei 95°C inaktiviert. Die Vorbehandlungen wurden unmittelbar vor der qPCR durchgeführt und die Proben anschließend auf Eis gelagert, bis sie als Vorlage eingesetzt wurden.

2.7.2 CMV–Promotor spezifische, quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR wurde mithilfe des *LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green Kit* etabliert (Fa. Roche Molecular Biochemical's, Mannheim, Deutschland). Die qPCR wurde in gläsernen Kapillarröhrchen (Fa. Roche) durchgeführt, das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Hierin enthalten waren 0,8 µl jedes *Primers* (Endkonzentration 0,4 µM), 2 µl *SYBR Green* Enzymgemisch, 3,2 µl MgCl₂ (Endkonzentration 25 mM), 11,2 µl H₂O und 2 µl der Amplifikationsvorlage.

Das Enzymgemisch enthielt einen Reaktionspuffer, ein dNTP–Gemisch, die *Fast-Start Taq DNA Polymerase* und den Farbstoff *SYBR Green I*. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagerte sich spezifisch und reversibel an Doppelstrang–DNA an. Dabei werden seine fluoreszierenden Eigenschaften stark gesteigert, so daß die qPCR–Produkte indirekt durch die Fluoreszenz des Farbstoffes vom *LightCycler* detektiert werden können. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur DNA–Konzentration im Reaktionsgemisch und ermöglicht damit eine DNA–Mengenbestimmung.

Die Primer wurden so gewählt, daß sie spezifisch für den *immediate early human* CMV–Promotor waren. Dadurch konnte die qPCR zur Mengenbestimmung bei verschiedenen rAAV-2–Präparationen verwendet werden. Die erwartete Länge des PCR–Produktes betrug 201 Basenpaare. Die Primer wurden von der Firma *Thermo Hybaid, Interactiva Division* (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Ihre Sequenz lautete:

CMV forward: 5'–GGC–GGA–GTT–GTT–ACG–ACA–T–3'

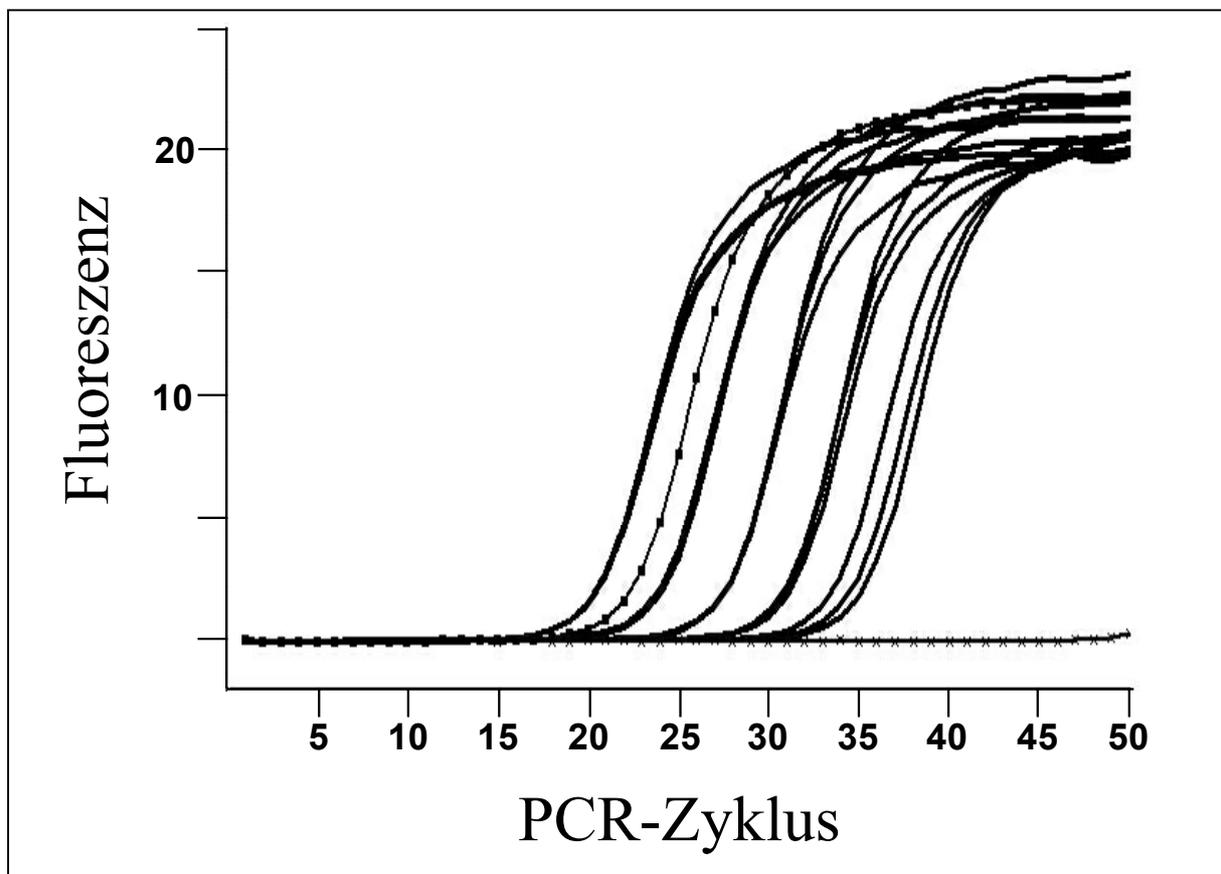
CMV reverse: 5'–GGG–ACT–TTC–CTA–CTT–GGC–A–3'

Die qPCR wurde in einem *LightCycler* (Fa. Roche) durchgeführt. Der erste Schritt war eine Präinkubation bei 95°C über 10 Minuten, danach folgten 50 Zyklen mit jeweils drei Phasen:

- 15 Sekunden bei 95°C (*denaturation*)
- 5 Sekunden bei 67°C (*annealing*)
- 10 Sekunden bei 72°C (*amplification*)

Am Ende jeder Amplifikationsphase wurde die Fluoreszenz in den Kapillarröhrchen durch den *LightCycler* gemessen und die ermittelten Werte gespeichert. Aus diesen Werten wurde mithilfe der *LightCycler*-Software *LC-Run* (Version 5.32, Fa. Roche) eine Fluoreszenzkurve erstellt, welche die Zahl der bereits durchlaufenen PCR-Zyklen zur jeweils gemessenen Fluoreszenz in Beziehung setzte. Zum Vergleich verschiedener Proben untereinander wurde anhand dieser Kurve der sogenannte *crossing point* ermittelt. Er ergab sich rechnerisch aus dem PCR-Zyklus, bei dem das Maximum der zweiten Ableitung der jeweiligen Fluoreszenzkurve lag. Der *crossing point* kann als relatives Maß für die DNA-Menge in der Ausgangsprobe betrachtet werden.

Abbildung 8: Beispiel einer qPCR-Messung



Erläuterung: Die Abbildung zeigt den Anstieg der *SYBR-Green*-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom PCR-Verlauf. Mit den dicken, durchgezogenen Linien wurden die Proben der Plasmid-Verdünnungsreihe (Standard) dargestellt. Die Linie mit den Kreuzen zeigt die Negativkontrolle (Wasser als *template*). Die Linie mit den schwarzen Punkten gibt als Beispiel die Messung einer unbekannt Probe (Viruspräparation) wieder. In Abbildung 10 sind die gleichen Daten in anderer Darstellungsweise wiedergegeben.

2.7.3 Kontrolle der Spezifität der qPCR

Die qPCR-Produkte wurden mithilfe des *LightCycler* Systems einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen, um eine unspezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten auszuschließen. Dazu heizte der *LightCycler* die Proben nach Durchlaufen der 50 qPCR-Zyklen langsam auf. Bei einer bestimmten Temperatur erfolgte die Auftrennung der als Doppelstrang vorliegenden qPCR-Produkte zu Einzelsträngen (Schmelzpunkt). Damit verbunden war eine plötzliche Abnahme der Fluoreszenz des Farbstoffes *SYBR Green*, die vom *LightCycler* detektiert und der aktuellen Temperatur der Probe zugeordnet wurde. Der Schmelzpunkt ist für einzelne qPCR-Produkte weitgehend spezifisch. Der Schmelzpunkt der erwarteten qPCR-Produkte lag bei 86,0°C (SA +/- 0,1°C).

Zusätzlich wurde die Länge der der PCR-Produkte gelelektrophoretisch bestimmt. Die Durchführung dieses Verfahrens wurde im Kap. 2.3 beschrieben. Die erwartete Länge der PCR-Produkte betrug aufgrund der verwendeten *Primer* 201 Basenpaare.

2.7.4 Erstellung der Standardkurve

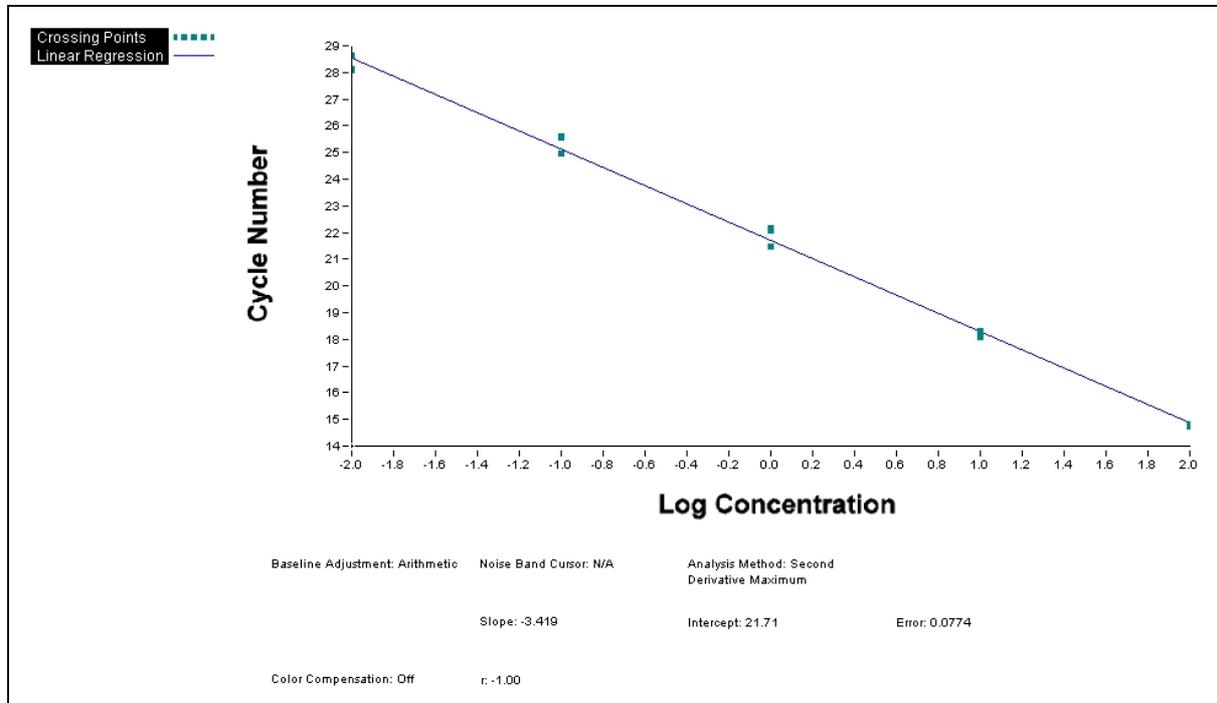
In jedem qPCR Lauf wurde mithilfe einer fünf Logstufen umfassenden Verdünnungsreihe des Vektorplasmids pAAV-GFP-AR6 eine Standardkurve erstellt. Die Standardkurve war Voraussetzung für die Berechnung des GT von Viruspräparationen.

Die erste Verdünnungsstufe dieser Reihe wurde in drei Schritten hergestellt, in denen der pAAV-GFP-AR6-haltige Lagerungspuffer (siehe Kap. 2.2.3) so stark mit sterilem H₂O verdünnt wurde, daß sich in 1 ml Gesamtvolumen eine Konzentration von 50 pg Plasmid-DNA pro µl ergab. Für die weiteren Stufen wurden jeweils 100 µl der vorangegangenen Stufe mit 900 µl sterilem H₂O verdünnt. Die serielle Verdünnungsreihe reichte somit von 0,01 pg bis 100 pg Vektorplasmid pro 2 µl qPCR-Vorlagen-Volumen.

Jede Plasmid-Verdünnungsstufe wurde bei jedem *LightCycler*-Lauf im dreifachen Ansatz amplifiziert und mithilfe der Fluoreszenz von *SYBR Green* vermessen. Aus diesen Messungen wurden mit der *LightCycler*-Software *LC-Run* (Version 5.32, Fa. Roche) die

crossing points berechnet (siehe 2.7.2) und eine Standardkurve erstellt, welche die Plasmid-Konzentrationen der einzelnen Verdünnungsstufen logarithmisch darstellt.

Abbildung 9: Repräsentative Standardkurve der qPCR



Erläuterung: Die eckigen Punkte geben auf der Y-Achse die *crossing points* der PCR-Kurven der korrespondierenden, logarithmisch dargestellten Plasmidverdünnungsstufe auf der X-Achse wieder. Die Abbildung wurde mithilfe der *LightCycler Software LC-Run* (Version 5.32, Fa. Roche) erstellt.

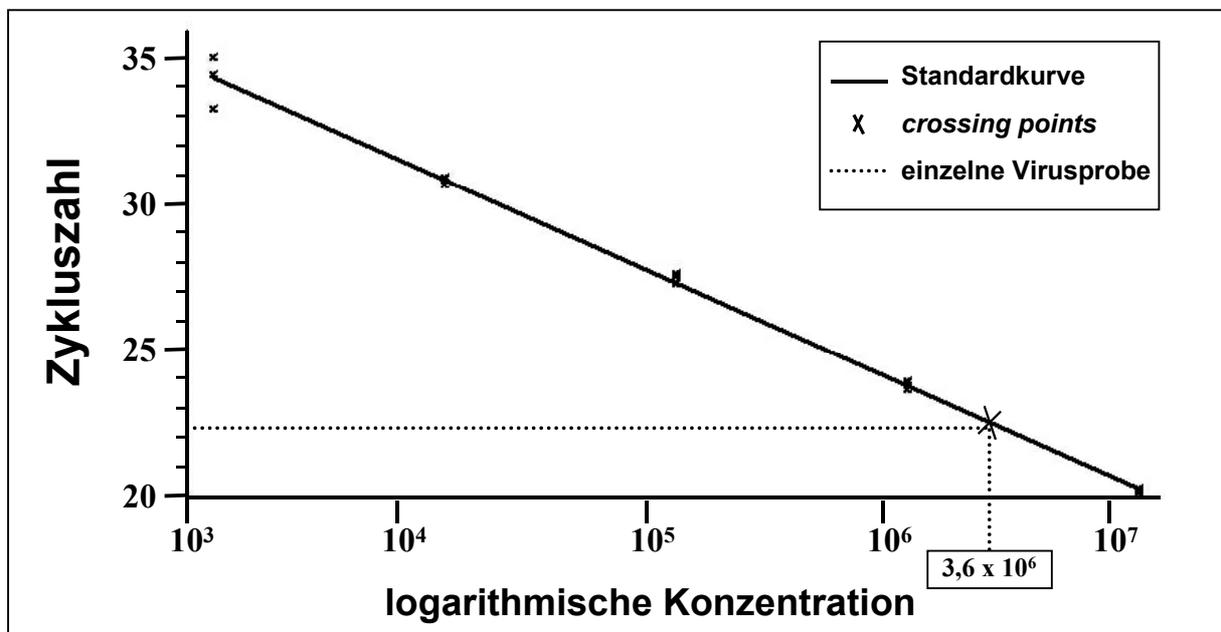
Die absolute Zahl an genomischen Kopien des CMV-Promotors der jeweiligen Verdünnungsstufe berechnete sich wie folgt: Die *pAAV-GFP-AR6*-Vektorplasmide enthielten einen CMV-Promotor pro Molekül. Einem Pikogramm DNA des 6889 Basenpaare langen Plasmids entsprachen $1,3 \times 10^5$ Plasmidmoleküle und damit auch die gleiche Zahl an CMV-Promotor-Kopien. Demnach enthielten 2 μ l der jeweiligen Verdünnungsstufe $1,3 \times 10^3$ bis $1,3 \times 10^7$ genomische Kopien. Mit diesen Zahlen wurde der GT berechnet (siehe 2.7.5).

2.7.5 Ermittlung des genomischen Titors von rAAV-2-Präparationen

Zur Berechnung des GT unbekannter rAAV-2-Präparationen wurde vorausgesetzt, daß jeder DNA-enthaltende Viruspartikel genau eine genetische Kopie des *immediate early human*

CMV-Promoters trägt. Dieser konnte mithilfe der beschriebenen qPCR detektiert werden. Zur Quantifizierung setzte die *LC-Software* die *crossing points* unbekannter Proben in Beziehung zur Standardkurve, die mithilfe der Plasmid-Verdünnungsreihe erstellt worden war (siehe 2.7.4). Durch die Projektion von qPCR-Ergebnissen auf die Standardkurve konnte ermittelt werden, wie viele genomische Kopien die eingesetzten 2 µl Vorlage der unbekanntenen Proben enthielten. Beispielsweise erlaubte ein GT von 1000 Viruspartikeln/µl die Aussage, daß 2 µl dieser Virussuspension 2000 genomtragende Viruskapside enthielten.

Abbildung 10: Ermittlung des genomischen Titers von Virusproben in der qPCR



Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Projektion des qPCR-Ergebnis einer einzelnen, vorher nicht quantifizierten Virusprobe auf die Standardkurve, die mit der Plasmidverdünnungsreihe erstellt wurde. Der genomische Titer dieser Virusprobe wird dadurch praktisch ablesbar. Auf der Abszisse ist die logarithmische Konzentration der genomischen Kopien des CMV-Promotors dargestellt, auf der Ordinate die Zykluszahl der PCR.

Um den GT pro Milliliter zu berechnen, wurden die Ergebnisse jeder Probe mit 500 multipliziert (2 µl x 500 = 1 ml). Bei Proben, die mit DNase oder Proteinase vorbehandelt waren, wurde das Ergebnis aufgrund der zusätzlichen Verdünnung bei diesem Vorgang mit dem Faktor 10 multipliziert.

2.8 Western Blot–Analyse

Der *Western Blot* diente zur Detektion des p53-Proteins in Zellkulturen und wurde in abgewandelter Form nach der Methode von Horio et al. (2000) durchgeführt.³⁶

2.8.1 Infektion der Zellen

Auf zwei 12-Well-Platten wurden pro *Well* 2×10^5 H1299-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden im dreifachen Ansatz mit rAAV-p53-Partikeln in einer Konzentration von 600 genomischen Viruspartikeln pro Zelle infiziert. Auf der anderen Platte wurden die H1299-Zellen mit der gleichen Menge rAAV-GFP-Partikeln infiziert (negative Kontrolle). Auf einer dritten Platte wurden pro *Well* 2×10^5 Zellen der p53-positiven Linie *T47D* ausgesät (positive Kontrolle).

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen zweifach mit eiskaltem PBS gewaschen und geerntet. Mit einem sterilen Schaber wurden sie von den 12-Well-Platten entfernt und in *Eppendorf*–Reaktionsgefäße mit je 500 μ l eiskalten Lysepuffer überführt (20 mM TRIS-HCL, 1 mM CDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 und 0,1 M DTT sowie 0,5 M Leupeptin und 0,1 M PMSF; Reagenzien der Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die Zellen wurden danach für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 12.000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Proteine und wurde auf Eis gelagert oder bei –80°C eingefroren und später dem nächsten Arbeitsschritt zugeführt. Der Bodensatz wurde verworfen.

2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellysat

Um die Proteinmengen im Zellysat zu bestimmen, wurde der *BCA Protein Assay* (Fa. Pierce, Rockford, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Biuret Reaktion (Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Medium) und mißt die Veränderung der Lichtextinktion durch die entstehenden Kupfer-Protein-Komplexe.

Vorab wurde ein Reaktionspuffer vorbereitet, indem 50 Anteile von Reagenz A mit einem Anteil von Reagenz B gemischt wurden. Von jedem Lysat, dessen Proteingehalt

bestimmt werden sollte, wurden 0,1 ml in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß pipettiert. Von den mitgelieferten Standards, deren Proteinkonzentration bekannt war, wurden ebenfalls je 0,1 ml in *Eppendorf*-Reaktionsgefäße überführt. Zu allen Proben und Standards wurden danach jeweils 2 ml Reaktionspuffer hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend über 30 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde in allen Proben die Lichtextinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem *BioPhotometer* der Firma Eppendorf (siehe Kap. 2.2.4) gemessen. Die Ergebnisse aus jeweils drei Messungen wurden gemittelt. Aus den Extinktionswerten der Standardproben wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Zellysate in µg/ml ermittelt werden konnte.

2.8.3 Gelelektrophorese des p53-Proteins

Die Proteinproben wurden elektrophoretisch mit eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Vor der Auftrennung wurden die Proben 1:1 mit einem 2x-Auftragungspuffer (0,2 M TRIS-Essigsäure, 5% Glycerol, 4% SDS, 0,1% Bromphenol Blau und 2% beta-Mercaptoethanol in Aqua bidest) versetzt und 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Danach wurden sie bis zum Transfer auf das Gel eisgekühlt.

Die Grundsubstanz für ein Trenngel bestand aus je 3,3 ml H₂O, 4 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (Verhältnis 30 zu 0,8), 2,5 ml 1,5 M TRIS-HCL (pH 8,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml APS und 4 µl TEMED (abschließend zugefügt). Die Mischung wurde in einer Gußform mit Isobutyl-Alkohol dünn überschichtet und polymerisierte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Dann wurde der Alkohol entfernt und das Gel dreifach mit H₂O gewaschen.

Die Grundsubstanz für ein Sammelgel enthielt 6,8 ml H₂O, 1,7 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (Verhältnis 30 zu 0,8), 1,25 ml 1 M TRIS-HCL (pH 8,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10%iges APS und 10 µl TEMED (abschließend zugefügt). Die Mischung wurde unter Vermeidung von Luftblasen mit einem 1,5 mm dicken Kamm in eine Gußform gegeben

und polymerisierte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Nach dem Entfernen des Kamms wurden die Taschen des Gels einfach mit Elektrophoresepuffer (s. u.) ausgewaschen.

Die Gele wurden in eine vertikale Gelkammer (Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) eingesetzt, danach wurde die Kammer mit dem Elektrophoresepuffer gefüllt (0,1% SDS, 25 mM TRIS-HCL und 192 mM Glyzin in Aqua bidest, pH bei 8,3). Von jeder vorbereiteten Proteinprobe wurden 15 µl Volumen mit einem Proteingehalt von 80-90 µg in die Taschen des Gels transferiert. Als Meßstandard wurde in die beiden Taschen am Rand des Gels jeweils 15 µl des *High-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) pipettiert. An das Gel wurde so lange eine Spannung von 30 Volt angelegt, bis der Farbstoff des Auftragungspuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte (etwa 3-4 Stunden).

2.8.4 Blotting des p53-Proteins

Die Proteine wurden mit einer *Mini Trans-Blot Cell* Transferkammer (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) vom Gel auf eine Polyvinyl-Difluorid (PVDF)-Membran (Fa. Milipore, Schwalbach, Deutschland) überführt. Dazu wurden die Membran und geeignetes Filterpapier vorab auf die Größe des Gels zugeschnitten und im Transferpuffer getränkt (39 mM Glyzin, 48 mM TRIS-HCL, 0,037% SDS und 20% Methanol in Aqua bidest, pH bei 8,3). PVDF-Membran und Gel wurden unter Vermeidung von Luftblasen übereinander in die Transferkammer gelegt und von Filterpapier umschlossen. Mit einer Spannung von 15 Volt und einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ wurden die Proteine über eine Stunde auf die Matrix der Membran transferiert.

Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der PVDF-Membran. Dazu wurde sie eine Stunde lang bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 5% Magermilchpulver und PBS-T (PBS siehe Kap. 2.1.2, +0,1% *Tween 20*, Fa. Amersham Biosciences) auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran zweifach mit je 250 ml PBS-T kurz gespült.

2.8.5 Inkubation mit dem primären Antikörper

Zur Detektion der p53-Proteine wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C mit einem monoklonalen p53-Antikörper auf einem Schüttler inkubiert. Der murine Primärantikörper (Fa. Zymed, San Francisco, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-T eingesetzt. Am nächsten Tag folgten zwei kurze Spülungen mit je 250 ml PBS-T, dann wurde die Membran zuerst über 15 Minuten in 500 ml PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen und danach noch einmal für 5 Minuten in weiteren 500 ml PBS-T.

2.8.6 Inkubation mit dem sekundären Antikörper

Zur Markierung der p53-Antikörper wurde ein gegen murine Immunglobuline gerichteter Sekundärantikörper verwendet. Der vom Hasen stammende und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper (Fa. Amersham Biosciences) wurde vorab 1:1000 in PBS-T gelöst. Die PVDF-Membran inkubierte eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in dieser Lösung. Es folgten zwei kurze Spüldurchgänge mit je 250 ml PBS-T, danach wurde die Membran für 15 Minuten in 500 ml PBS-T und für 5 Minuten in weiteren 500 ml PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen.

2.8.7 Detektion des p53-Proteins

Die auf der PVDF-Membran fixierten Immunkomplexe wurden mit dem *enhanced chemiluminescence (ECL) Kit* der Firma Amersham Biosciences sichtbar gemacht. Zunächst wurde das im Set enthaltene Konjugat aus Streptavidin und Meerrettich-Peroxidase in einem Verhältnis von 1:1000 in PBS-T gelöst. Die Membran wurde eine Stunde lang in dieser Lösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgten zwei kurze Spülungen mit je 250 ml PBS-T, dann wurde die Membran für 15 Minuten in 500 ml PBS-T und für 5 Minuten in weiteren 500 ml PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen.

Aus den Lösungen A und B des *ECL-Kit* wurde das Reagenz zur Detektion gemischt, dabei wurden 6 ml der Lösung A und 150 µl der Lösung B verwendet. Das Reagenz wurde

auf die Membran pipettiert, gleichmäßig verteilt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Reagenz abgetropft und seine Reste durch ein Tuch aufgesaugt, auf das die Membran vorsichtig mit ihrer Unterkante gestellt wurde. Anschließend wurde die Membran unter Vermeidung von Luftblasen in einer geeigneten, dünnen Plastikfolie verpackt.

Die Membran wurde mit den Proteinen nach oben in eine Röntgenfilmkassette gelegt und eine Folie „Röntgenfilm für biochemische Zwecke“ darüber plaziert. Nach einer Exposition von 15 Sekunden wurde der erste Film entfernt und eine zweite Folie aufgelegt. Die erste Folie wurde sofort entwickelt und anhand ihrer Belichtungsintensität abgeschätzt, wie lange der zweite Film auf der Membran exponiert werden sollte. Die Dauer der zweiten Exposition variierte von 2 bis 10 Minuten.

2.9 Zellkulturexperimente

2.9.1 Transduktion mit rAAV-2-Partikeln

Die BC-Zelllinien H23, H157 und H1299 wurden in 24-Well-Platten ausgesät. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden mit 600 μl modifiziertem RPMI-Medium (siehe Kap. 2.1.2) in ein *Well* transferiert. Alle drei Zelllinien wurden mit rAAV-GFP und rAAV-p53-Partikeln in drei verschiedenen Dosierungen transduziert. Für die Dosierung wurde der genomische Titer (GT) der Viruspräparationen zugrunde gelegt (siehe Kap.2.7.5). Die Dosierungsstufen betragen 30, 150 und 600 genomische Viruspartikel pro Zelle, entsprechend $1,5 \times 10^6$, $7,5 \times 10^6$ bzw. 3×10^7 Partikel pro *Well*. Diese Dosierungsstufen wurden definiert als einfache (1x), fünffache (5x) und zwanzigfache (20x) Konzentration.

Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurde das Medium entfernt und in *Eppendorf*-Röhrchen gesammelt, um auch tote und schwimmende Zellen zu erfassen. Die adhärennten Tumorzellen wurden durch sechsminütige Inkubation mit 200 μl 0,05%igem Trypsin und 0,02%igem EDTA (Fa. Bio-Whittaker, Verviers, Belgien) bei 37°C von den *Wells* abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 200 μl FBS-haltigem Medium inaktiviert und die 400 μl Zellsuspension in das gleiche *Eppendorf*-Röhrchen überführt, in

dem bereits das Medium gesammelt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 6 Minuten bei 300g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift unter den gleichen Bedingungen, der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in 1000 µl PBS resuspendiert. Danach wurden Zellwachstum und Vitalität einzelner Versuchsansätze mit den Methoden untersucht, die in den Kapiteln 2.10, 2.11 und 2.12 beschrieben sind.

2.9.2 Inkubation mit Cisplatin

Als repräsentatives Standard-Therapeutikum für die Kombinationsexperimente mit AAV-2-Vektoren und einem Chemotherapeutikum wurde die DNA-schädigende Substanz Cisplatin ($\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$) gewählt. Das für klinische Zwecke zugelassene Cisplatin (Fa. Medac, Wedel, Deutschland) war mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Bei einem Molekulargewicht von 300,06 g pro Mol entsprach dies 1,67 µmol/ml. Die Verwendung und Lagerung des Cisplatins erfolgte unter sorgfältigem Schutz vor Licht, da die photoinstabile Substanz bei Lichteinfall ihre Wirkung verliert.

Die Cisplatin-Stammlösung wurde unmittelbar vor der Verwendung 1:10 mit Aqua bidest verdünnt (resultierende Konzentration der Gebrauchslösung: 0,05 mg Cisplatin/ml). Zu Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden den *Wells* mit den NSCLC-Zellen 1 bis 10 µl der verdünnten Cisplatin-Stammlösung hinzugefügt, so daß sich zehn Dosierungsstufen mit einer Cisplatin-Menge von 0,05 µg bis 0,5 µg auf 600 µl Medium ergaben. Für die Kombinationsexperimente mit rAAV-2-Vektoren und Cisplatin wurde eine Cisplatin-Menge von 3 µl der Gebrauchslösung auf 600 µl Medium verwendet (Endkonzentration: 0,25 µg/ml). Das Aussäen, die dreitägige Inkubation und das Ablösen der Zellen erfolgte hierbei wie unter 2.9.1 beschrieben.

2.10 Trypanblau–Vitalitätstest

Um Menge und Vitalität der Zellen in einzelnen Versuchsansätzen zu bestimmen, wurde eine Trypanblau–Färbung durchgeführt und die Zellen mithilfe einer Neubauer–Zählkammer unter einem Lichtmikroskop gezählt. Zu diesem Zweck wurden von jeder Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 10 µl 0,5%igem Trypanblau (in physiologischer Kochsalzlösung; Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland) gemischt.

Nach wenigen Sekunden drang das Trypanblau in tote und spätapoptotische Zellen mit durchlässiger Membran ein und färbte sie blau an. Nur vitale Zellen, die bei lichtmikroskopischer Betrachtung nicht blau leuchteten, wurden gezählt. Diese Zählung wurde viermal wiederholt und die Ergebnisse gemittelt. Der errechnete Mittelwert wurde verdoppelt, um den Verdünnungsfaktor durch das Trypanblau zu berücksichtigen. Durch Multiplikation dieses Zahlenwertes mit 10^4 ergab sich die Zellkonzentration pro Milliliter.

Nachdem die Anzahl vitaler Zellen bestimmt worden war, wurde die Überlebensrate einzelner Versuchsansätze in Prozent berechnet. Dazu wurde die Zahl vitaler behandelte Zellen durch die Zahl vitaler Kontrollzellen geteilt und das Ergebnis mit 100 multipliziert. Die prozentuale Inhibition des Zellwachstums beim entsprechenden Versuchsansatz ergab sich, indem von der Zahl 100 die prozentuale Überlebensrate abgezogen wurde.

2.11 Klonogener Wachstumstest

Der klonogene Wachstumstest diente dazu, die Vermehrungsfähigkeit behandelte Zellen mit der von unbehandelten Zellen zu vergleichen und den Unterschied zu quantifizieren. Die Zellen wurden, wie unter 2.9 beschrieben, drei Tage lang inkubiert, dann abgelöst, zweifach gewaschen und in 1 ml Medium resuspendiert. Mit dem Trypanblau–Vitalitätstest (Kap. 2.10) wurde die Konzentration lebender Zellen in einzelnen Ansätzen bestimmt.

Anschließend wurden jeweils 500 lebende Zellen in eine Kulturflaschen mit 25 cm² Bodenfläche und 8 ml neuem Medium (siehe 2.1.1) überführt. Die Flaschen wurden über weitere sieben Tage bei 37°C und 5% CO₂–Gehalt der Luft im Brutschrank inkubiert. Danach

wurden die Zellkolonien, die sich auf den Böden der Kulturflaschen gebildet hatten, mit einem Lichtmikroskop untersucht. Die Kolonien mit mindestens 50 Zellen wurden gezählt. Das Vermehrungspotential in Prozent wurde bei einzelnen Versuchsansätzen bestimmt, indem die Zahl der Kolonien aus behandelten Zellen durch die Zahl der Kolonien aus Kontrollzellen geteilt und mit 100 multipliziert wurde.

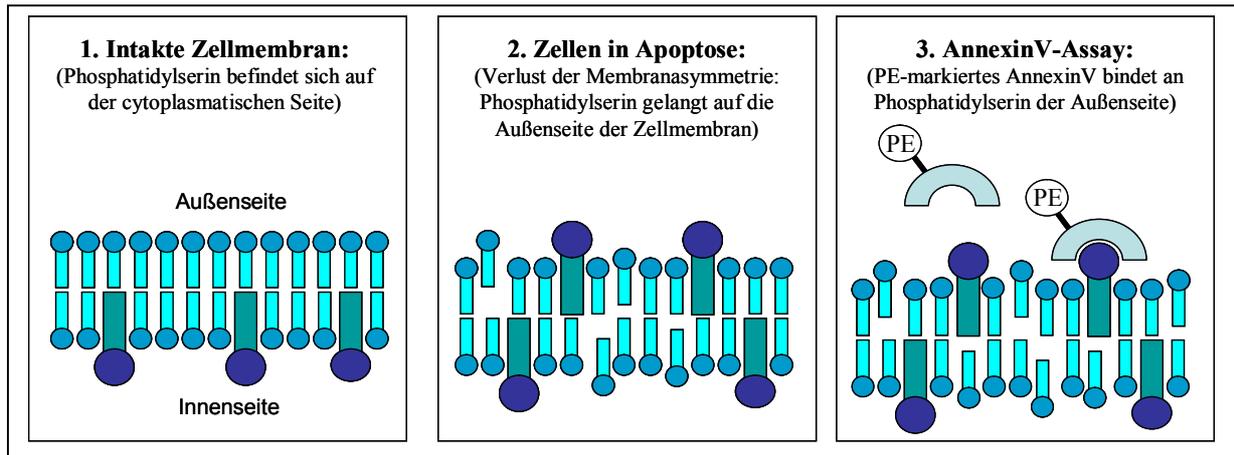
2.12 AnnexinV–Apoptosetest

Mit dem AnnexinV–Test wurde die Apoptoserate von Zellkulturen bestimmt, die mit Cisplatin oder rAAV-2-Vektoren behandelt wurden. Der Test wurde modifiziert nach dem Verfahren von Vermes et al. (1995) durchgeführt.⁸⁶

2.12.1 Funktionsprinzip

Bei frühapoptotischen Zellen geht die Integrität der Membran verloren. Dadurch gelangen Phospholipide, die bei vitalen Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran liegen, auf die Außenseite der apoptotischen Zellen. AnnexinV ist ein Molekül, das spezifisch an eines dieser Phospholipide, das Phosphatidylserin, bindet.⁵⁷ Intakte Zellmembranen werden von AnnexinV nicht passiert. Daher bindet extrazelluläres AnnexinV nur an die Oberflächen apoptotischer Zellen oder nekrotischer Zellreste. Diese Bindung kann durchflußzytometrisch sichtbar gemacht werden, indem das extrazelluläre AnnexinV mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird. Um gleichzeitig auch apoptotische von nekrotischen Zellen differenzieren zu können, wird ein Farbstoff eingesetzt, der die Zellmembranen vitaler und apoptotischer Zellen nicht durchdringt und somit spezifisch nekrotische Zellen färbt. In dieser Arbeit wurde die Substanz 7-AAD eingesetzt, die lediglich Teile des Zellkerns, die bei nekrotischen Prozessen exponiert werden, färbt.⁶⁶

Abbildung 11: Prinzip des AnnexinV–Apoptose–Tests



2.12.2 Durchführung

Die Zellen wurden, wie unter 2.9 beschrieben, mit Cisplatin oder den rAAV-2-Vektoren inkubiert. Als positive Kontrolle wurde Cisplatin mit zehnfacher Konzentration eingesetzt (2,5 µg/ml). Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen wie unter 2.9.1 beschrieben von den *Wells* abgelöst, zweifach gewaschen und in 200 µl *AnnexinV Binding buffer* (Fa. BD PharMingen, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert.

Die Zellsuspensionen wurden gleichmäßig auf je zwei *Eppendorf*–Röhrchen verteilt. Zum ersten wurden 10 µl eines PE–gekoppelten Kontrollantikörpers (Fa. BD PharMingen) gegeben, zum zweiten 10 µl des PE–gekoppelten AnnexinV (Fa. BD PharMingen). Zu allen Proben wurden zusätzlich 10 µl des Kernfarbstoffs 7-AAD (Fa. BD PharMingen) gegeben. Danach wurden die Inhalte der *Eppendorf*–Röhrchen vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Es folgte eine Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Zellen wurden gewaschen, indem 200 µl *AnnexinV Binding buffer* hinzugefügt und die Suspension für 6 Minuten bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut in 200 µl *AnnexinV Binding buffer* resuspendiert.

2.12.3 Auswertung

Die Zellen wurden anschließend mit einem *FACSCalibur* Durchflußzytometer (Fa. Becton Dickinson, siehe Kap. 2.6.1) analysiert. Die AnnexinV-positiven Zellen wurden im *FL-2*-Kanal des Gerätes detektiert, die mit 7-AAD gefärbten Zellen im *FL-3*-Kanal. Der jeweilige Anteil Farbstoff-positiver Zellen wurde durch die *Cell Quest Software* (Fa. Becton Dickinson) berechnet. Parallel wurden die mit Kontrollantikörpern inkubierten Zellen untersucht, um unspezifische Färbungen auszuschließen. Zellen, die auf beiden Kanälen keine signifikante Fluoreszenz zeigten, galten als vital. Die 7-AAD-positiven Zellen galten als nekrotisch, unabhängig von ihrem PE-Fluoreszenzstatus. Zellen, die AnnexinV-positiv und 7-AAD-negativ waren, wurden als apoptotisch gewertet. Die Apoptoserate in Prozent entsprach dem prozentualen Anteil dieser Zellen an der gesamten Zellpopulation.

2.13 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt und mindestens einmal wiederholt. Die Ergebnisse mehrerer Versuche wurden als arithmetischer Mittelwert (AM) angegeben. Die Meßergebnisse der Kontrollen bei Zellkulturexperimenten wurden auf 100% gesetzt und die Meßwerte der übrigen Versuchsansätze auf die Kontrollen bezogen. Der arithmetische Mittelwert wurde folgendermaßen bestimmt:

Arithmetischer Mittelwert:	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$
----------------------------	--

n = Anzahl der Einzelmessungen

x_i = Meßwert einer Einzelmessung

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert (MW)

Bei arithmetischen Mittelwerten wurde zusätzlich die Standardabweichung (SA) berechnet:

$$\text{Standardabweichung (SA): } s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

- n = Anzahl der Einzelmessungen
- x_i = Meßwert einer Einzelmessung
- \bar{x} = arithmetischer Mittelwert (MW) aller Messungen
- s = Standardabweichung (SA) der Meßergebnisse

Um ein Maß für die Variabilität von qPCR (siehe Kap. 2.7) und Durchflußzytometrie (siehe Kap. 2.6) zu erhalten, wurde aus den Meßergebnissen der qPCR und der Durchflußzytometrie jeweils der Variationskoeffizient (VK) berechnet. Dazu wurde die Standardabweichung der Meßergebnisse durch ihren arithmetischen Mittelwert geteilt:

$$\text{VK} = \text{SA} / \text{AM}$$

Um ein Maß für die Vergleichbarkeit der Meßergebnisse von qPCR und Durchflußzytometrie zu erhalten, wurden die Meßwerte der qPCR und die entsprechenden Werte der Durchflußzytometrie über den Korrelationskoeffizienten nach Pearson miteinander in Beziehung gesetzt. Diese Korrelation berechnet sich aus der Kovarianz, geteilt durch das Produkt der Standardabweichung der beiden Meßreihen:

$$r = \frac{\text{COV}_{xy}}{s_x \times s_y} = r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}}$$

- r = Korrelationskoeffizient nach Pearson
- N = Menge aller Messungen dieser Reihe
- x_i, y_i = Meßwert einer Einzelmessung
- \bar{x}, \bar{y} = arithmetischer Mittelwert (MW) aller Messungen
- s = Standardabweichung (SA) der Meßreihen x bzw. y
- cov_{xy} = Kovarianz der Meßreihen x und y

Die Signifikanz von Meßunterschieden wurde unter Verwendung des t-Testes (nach Student) für ungepaarte bzw. gepaarte Werte ermittelt. Hierbei wurden die Mittelwerte \bar{x}_1 und \bar{x}_2 zweier Vergleichsgruppen mit der Stichprobengröße n_1 und n_2 unter Berücksichtigung der Varianzen der Meßergebnisse $(SD)^2$ miteinander verglichen. Die errechneten t-Werte wurden mit den Werten aus einer Tabelle für die t-Verteilung verglichen. Waren die berechneten t-Werte größer als die für eine statistische Sicherheit von $P = 95\%$ angegebenen t-Werte, wurde von signifikanten Ergebnissen ausgegangen. Als Signifikanzniveau wurde $p = 1-P$ angegeben. p entsprach dabei der Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Aussage nicht zutreffend war. Entsprechend galt ein Ergebnis bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant. Bei der Darstellung statistisch signifikanter Ergebnisse wurde das Signifikanzniveau angegeben.

$$SD^2 = \frac{SD_1^2 (n_1 - 1) + SD_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2} \quad t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{SD} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

n_1, n_2 = Stichprobengrößen der zwei Vergleichsgruppen
 SD^2 = Varianz der Meßergebnisse
 \bar{x}_1, \bar{x}_2 = Mittelwerte der zwei Vergleichsgruppen

3. Ergebnisse

3.1 Titration der rAAV-2-Partikel

Die Quantifizierung von rAAV-GFP-Präparationen erfolgte in dieser Arbeit durch zwei Methoden: Erstens mit einem erprobten Verfahren als Referenzmethode, der Bestimmung des infektiösen Titers mit einer Durchflußzytometrie. Zweitens wurde eine neue Methode etabliert, die Bestimmung des genomischen Titers mit einer quantitativen PCR. Die Referenzmethode wurde benötigt, um die Validität der qPCR zu bewerten. Es wurde geprüft, in wie weit die mit beiden Verfahren ermittelten Titer der rAAV-GFP-Präparationen miteinander korrelieren. Da die Durchflußzytometrie von der Expression des Markergens eGFP abhängig ist, eignet sie sich nur zur Quantifizierung von rAAV-GFP-Proben, nicht aber für rAAV-p53-Proben. Daher wurde die vorgestellte qPCR-Methode zur Quantifizierung der rAAV-p53-Präparationen eingesetzt und der genomische Titer für das weitere experimentelle Vorgehen zugrunde gelegt.

3.1.1 Etablierung einer qPCR und Prüfung ihrer Sensitivität und Spezifität

Eine PCR zur Quantifizierung von Viren erfordert die Auswahl einer bestimmten Zielregion im Genom des untersuchten Virus. Beide in dieser Arbeit verwendeten Viren tragen als funktionell wichtigen Bestandteil den *immediate early human CMV promoter*. Daher wurde ein Teil seiner Sequenz als Zielregion für die qPCR gewählt.

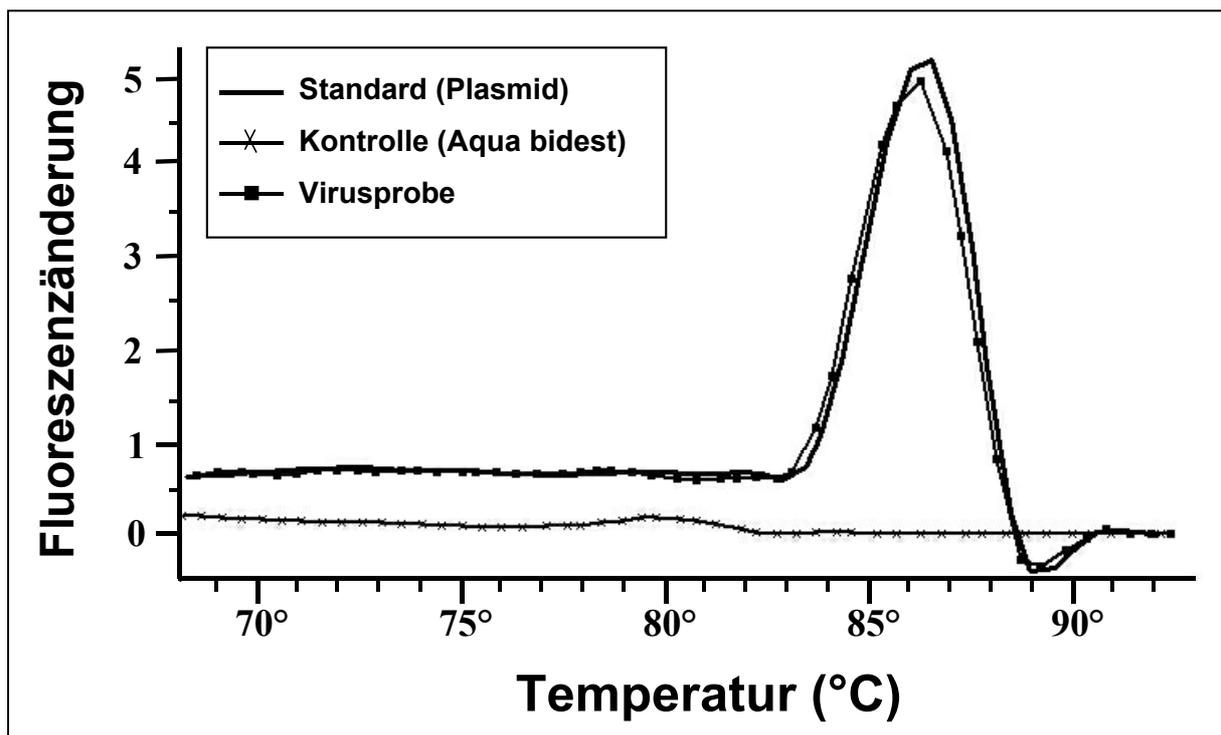
Zur Etablierung der qPCR wurde eine Standardkurve benötigt, mit der die qPCR-Ergebnisse unbekannter Virusproben verglichen werden konnten. Die pAAV-GFP-AR6-Standardkurve wurde mithilfe der *LightCycler* PCR-Maschine aus einer fünf Logstufen umfassenden Verdünnungsreihe des Vektorplasmids *pAAV-GFP-AR6* erstellt. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe reichten von 100 bis 0,01 pg Plasmid-DNA pro 2 µl Vorlage (siehe Abb. 4, Kap. 2.7.3). Insgesamt wurde bei zwölf unabhängigen Experimenten

eine Standardkurve erstellt. Deren durchschnittlicher Regressionskoeffizient betrug 0,993 (SA +/- 0,01). Die durchschnittliche Steigung lag bei -3,34 (SA +/- 0,3).

Die hohe Sensitivität der qPCR-Methode wurde durch die Analyse weitergehender Verdünnungsstufen des Vektorplasmids *pAAV-GFP-AR6* festgestellt. Es zeigte sich, daß eine spezifische Detektion des CMV-Promotors bis zu einer Verdünnung von 0,1 fg Plasmid-DNA pro 2 µl Vorlage möglich war.

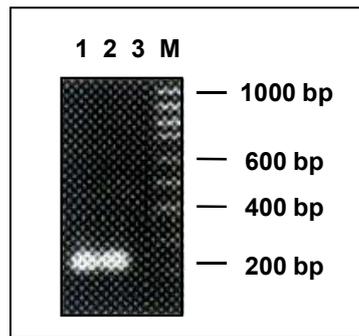
Die hohe Spezifität der qPCR-Methode wurde durch zwei Verfahren belegt, eine Schmelzkurvenanalyse und eine Gelelektrophorese der qPCR-Produkte. Beide Methoden zeigten, daß ausschließlich die gewünschten DNA-Sequenzen amplifiziert worden waren.

Abbildung 12: Schmelzkurvenanalyse der qPCR



Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Veränderung der SYBR-Green-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Kurven entsprechen der ersten Ableitung einer Funktion, die Temperatur und Fluoreszenz in Beziehung setzt.

Abbildung 13: Gelelektrophorese der qPCR-Produkte

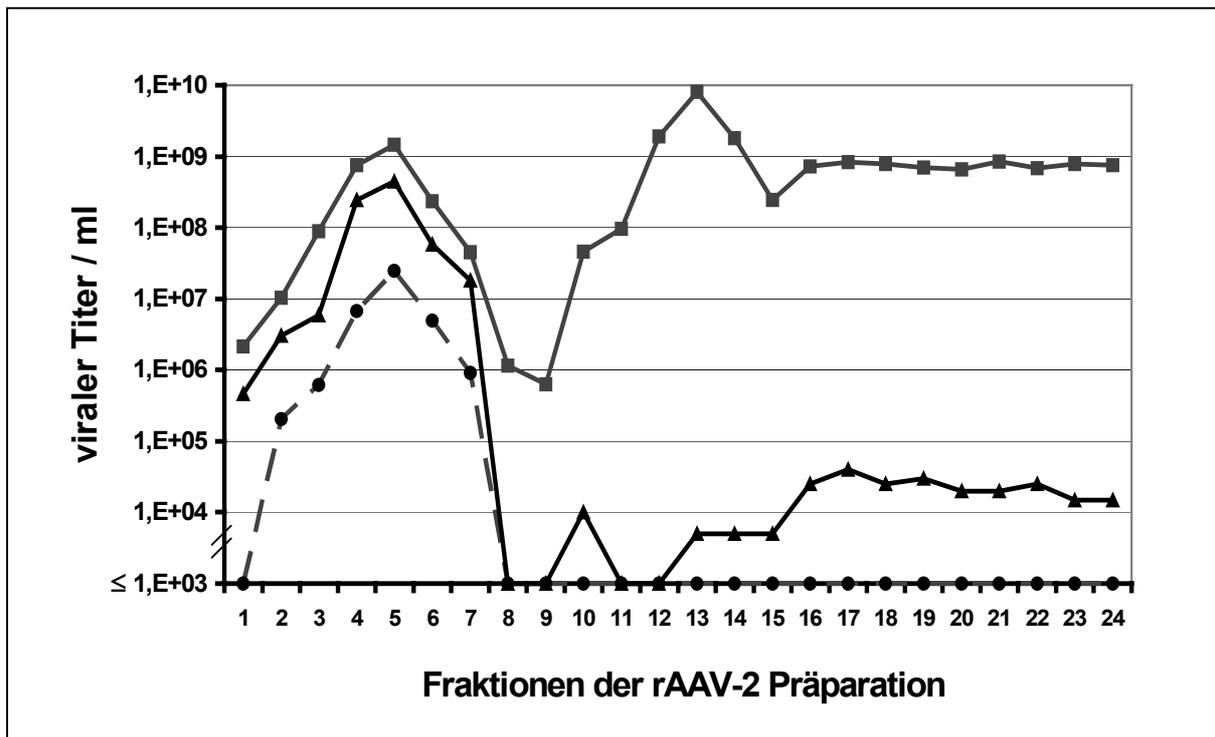


Erläuterung: Die Abbildung zeigt einen Fotoausschnitt von einem Agarosegel. Die Aufnahme wurde unter UV-Licht nach einer Färbung mit Ethidiumbromid gemacht. Auf der Bahn **M** sind die Banden eines Markers (*1 kb-Ladder*) zu sehen, die Größe der Banden sind angegeben. Die breite, helle Bande auf Bahn **1** zeigt das qPCR Produkt einer Probe der Plasmidverdünnungsreihe (Positivkontrolle). Die ähnliche Bande auf Bahn **2** wurde durch das qPCR Produkt einer unbekannt AAV-2-Probe gebildet, wodurch die Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion gezeigt werden konnte. Auf Bahn **3** war eine Negativkontrolle (Aqua bidest) aufgetragen.

3.1.2 Quantifizierung der rAAV-2-Partikel durch den infektiösen und den genomischen Titer

Bei einer kompletten rAAV-2-Präparation, bestehend aus 24 Fraktionen (siehe 2.5), wurde mit der durchflußzytometrischen FACS-Analyse der infektiöse Titer und mit der qPCR der genomische Titer bestimmt. Durch die FACS-Analyse wurde festgestellt, daß sich die rAAV-2-Partikel in den Fraktionen 2 bis 7 konzentrierten. Der infektiöse Titer dieser Fraktionen betrug $2,1 \times 10^5$ bis $2,5 \times 10^7$ Partikel pro ml. Die höchste Konzentration wurde in der Fraktion 5 gemessen.

Abbildung 14: qPCR und FACS-Analyse einer kompletten rAAV-2-Präparation



Erläuterung: Die Abbildung zeigt den Vergleich der viralen Titer einer kompletten rAAV-2-Präparation, die mit drei Methoden analysiert wurde. Die Linie mit schwarzen Kästchen (■) gibt das Ergebnis der qPCR wieder, bei der die Proben vorab nicht mit DNase behandelt worden waren. Die Linie mit Dreiecken (▲) zeigt den genomischen Titer der qPCR mit DNase-Vorbehandlung. Die gestrichelte Linie mit Kreisen (●) schließlich stellt den infektiösen Titer dar, der mithilfe einer FACS-Analyse berechnet worden war.

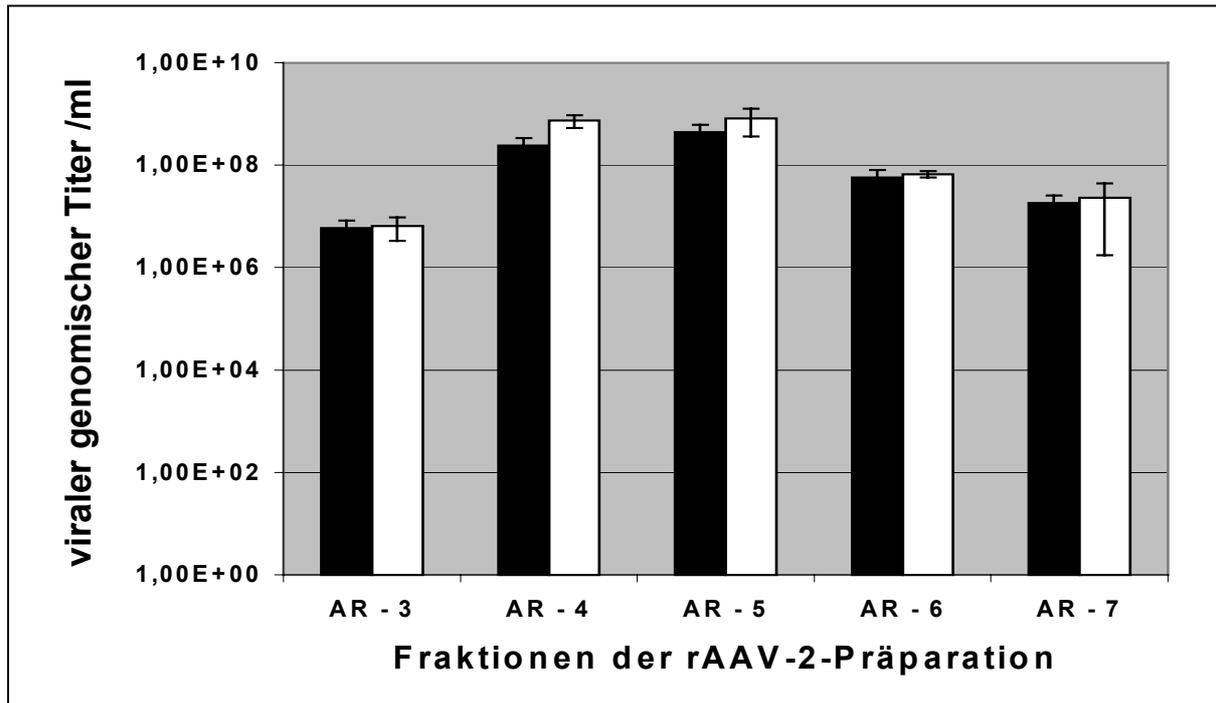
Im Gegensatz dazu fanden sich bei der qPCR, die ohne Vorbehandlung der Proben durchgeführt wurde, zwei relative Konzentrationsmaxima. Das erste relative Maximum mit einem genomischen Titer von $1,45 \times 10^9$ Partikeln pro ml wurde in der Fraktion 5 detektiert, das zweite relative Maximum mit einem genomischen Titer von $8,1 \times 10^9$ Partikeln pro ml in der Fraktion 13. Der niedrigste genomische Titer, der in diesem Versuch gemessen wurde, betrug $6,25 \times 10^5$ Partikel pro ml und fand sich in Fraktion 9. Nach diesen Meßergebnissen konnten alle Fraktionen der Präparation eine hohe Konzentration an viralen Partikeln enthalten. Das war jedoch höchst unwahrscheinlich, da die Viruspartikel durch eine Ultrazentrifugation in bestimmten Fraktionen konzentriert wurden. Zudem korrelierte dieses Ergebnis nicht mit dem Ergebnis der durchflußzytometrischen FACS-Analyse.

Statt dessen wurde als Erklärungsmodell für die Meßergebnisse angenommen, daß die *pAAV-GFP-AR6*-Vektorplasmide, die bei der Herstellung der rAAV-2-Partikel verwendet wurden, die Viruspräparationen auch nach dem Aufreinigungsprozeß kontaminierten. Um diese freien Vektorplasmide zu beseitigen, wurde eine Vorbehandlung mit DNase I durchgeführt. Danach wurden die gleichen Fraktionen erneut mit der qPCR vermessen.

Als Ergebnis der Vorbehandlung mit DNase I wurde das zweite relative Konzentrationsmaximum nicht mehr detektiert. Auch ein durchweg hoher genomischer Titer wurde bei den Fraktionen 8 bis 24 nicht mehr gemessen. Das verbliebene Maximum bei Fraktion 5 wies jetzt einen genomischen Titer von $4,5 \times 10^8$ Partikel pro ml auf. Die genomischen Titer der Fraktionen 2 bis 7 wichen mit und ohne DNase-Behandlung nicht signifikant voneinander ab ($p = 0,26$). Dies weist darauf hin, daß die qPCR durch die DNase-Behandlung nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Zudem kann davon ausgegangen werden, daß die Kontamination mit Vektorplasmiden in diesen Fraktionen gering war. Aus diesen Ergebnissen wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß eine Vorbehandlung mit DNase ein notwendiges Element der qPCR-basierte Titration von rAAV-2-Partikeln ist.

Zudem wurde der Einfluß einer Proteinase K-Vorbehandlung auf die qPCR-basierte Titration untersucht. Dies geschah, um die Möglichkeit einer falsch-niedrigen Messung durch eine unvollständige Freisetzung von viraler DNA aus den Viruskapsiden zu kontrollieren. Dazu wurden die Fraktionen 3 bis 7 nacheinander mit DNase I und mit Proteinase K behandelt. Anschließend wurden die Proben durch die qPCR gemessen und die Ergebnisse mit den entsprechenden Meßwerten der alleinigen DNase-Behandlung verglichen. Die mit oder ohne Proteinase K-Behandlung gemessenen genomischen Titer waren sehr ähnlich.

Abbildung 15: Vorbehandlung mit und ohne Proteinase K



Erläuterung: Die Abbildung zeigt die vergleichende Bestimmung des GT von rAAV-2-Präparationen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung mit und ohne Proteinase K. Die schwarzen Balken geben den GT wieder, der bei alleiniger Verwendung von DNase I resultierte. Die weißen Balken repräsentieren das qPCR-Ergebnis von Proben, die mit DNase I und Proteinase K vorbehandelt wurden.

Da der Unterschied durch die Proteinase K-Behandlung statistisch nicht signifikant war ($p = 0,42$), wurde bei den weiteren qPCR-Analysen von rAAV-2-Präparationen auf eine Proteinase K-Vorbehandlung verzichtet.

3.1.3 Reliabilität von FACS-Analyse und qPCR

Um eine Aussage über die Reliabilität der neu etablierten qPCR treffen zu können, wurde das Ausmaß der intra- und interexperimentellen Variabilität der qPCR bestimmt und mit den entsprechenden Werten der Standardmethode (FACS-Analyse) verglichen. Dazu wurden fünf Fraktionen einer Viruspräparation sowohl mit der qPCR als auch mit der FACS-Analyse dreifach gemessen. Das Experiment wurde mit beiden Verfahren an einem anderen Tag wiederholt. Anhand der Versuchsergebnisse wurden Variationskoeffizienten für den intraexperimentellen Vergleich (Abweichung gleicher Proben im selben Experiment) und den

interexperimentellen Vergleich (Abweichung gleicher Proben zwischen zwei Experimenten) berechnet. Die Variationskoeffizienten (VK) wurden wie im Kap. 2.13 angegeben errechnet.

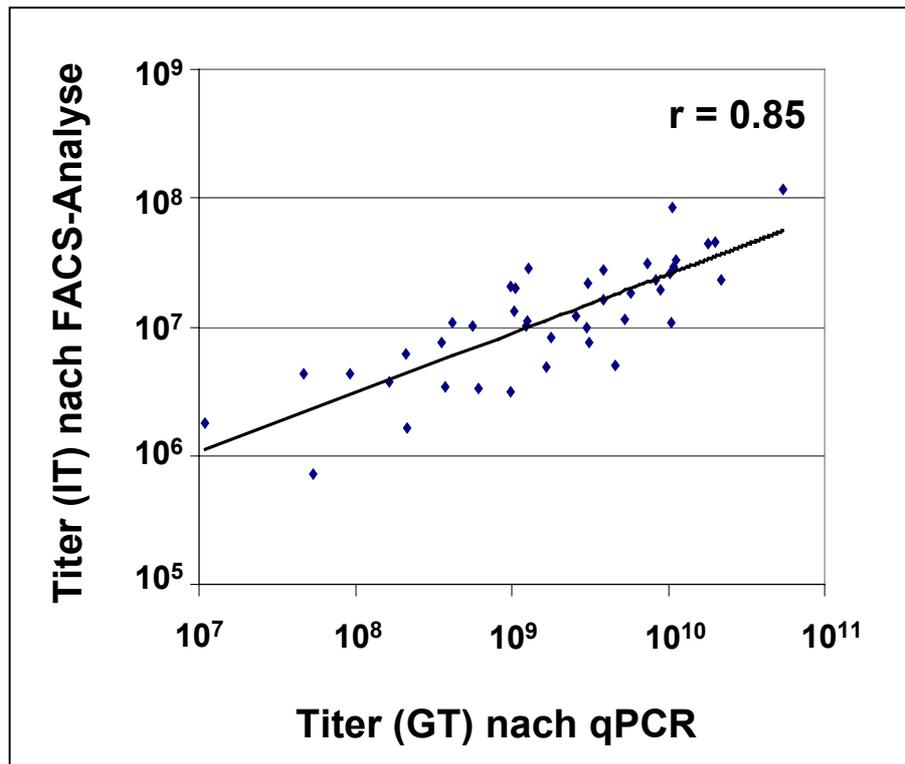
Die quantitative Untersuchung von 15 Proben ergab im intraexperimentellen Vergleich einen VK von 0,02 bis 0,07 (AM = 0,04) bei der qPCR und einen VK von 0,03 bis 0,11 (AM = 0,06) bei der FACS-Analyse. Beim interexperimentellen Vergleich betrug der VK der Titration mittels qPCR 0,31 bis 0,56 (AM = 0,48) und der VK der FACS-Analyse 0,08 bis 0,13 (AM = 0,1). Der VK bei der qPCR im interexperimentellen Vergleich erscheint mit 0,48 relativ hoch. Dies weist auf eine etwas geringere Reliabilität und damit auf eine etwas geringere Meßgenauigkeit der qPCR im Vergleich zur FACS-Analyse hin.

3.1.4 Vergleich von infektiösem und genomischen Virustiter (Validitätsprüfung)

Um die Meßergebnisse der neuen, genomischen Titrationsmethode auf ihre Validität hin zu prüfen, wurde davon ausgegangen, daß die durchflußzytometrische FACS-Analyse als Gold-Standard-Verfahren zur Titration von Virussuspensionen galt. Daher wurden die Ergebnisse, die mit der qPCR ermittelt wurden, mit den Meßergebnissen der FACS-Analyse verglichen.

Zum Vergleich wurden 42 Proben aus 17 verschiedenen rAAV-GFP-Präparationen jeweils mit der qPCR und der etablierten FACS-Analyse untersucht. Dabei umfaßte der Meßbereich der verschiedenen Proben Unterschiede in Höhe von fünf Zehnerpotenzen. Die mit beiden Methoden gemessenen rAAV-2-Titer korrelierten miteinander. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug 0,85 und war statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Der durch die qPCR gemessene genomische Titer war um einen mittleren Faktor von 253 (SA +/- 241) höher als der per FACS-Analyse gemessene infektiöse Titer.

Abbildung 16: Vergleich der viralen Titer nach qPCR und FACS-Analyse



Erläuterung: In der Abbildung werden der infektiöse Titer und der genomische Titer miteinander verglichen. Als Punkte dargestellt wurden die Ergebnisse von 42 unterschiedlichen rAAV-2-Proben, deren Titer jeweils mit beiden Verfahren untersucht wurde. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) betrug 0,85.

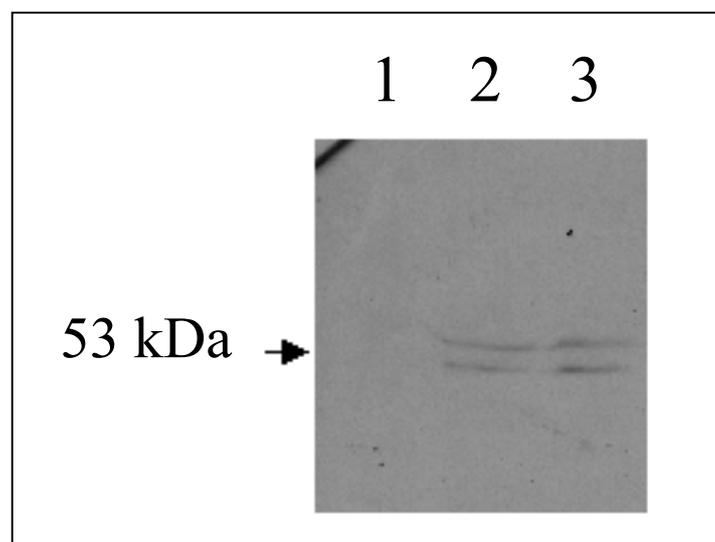
Eine Validierung der neuen Methode konnte somit durch den Nachweis einer Korrelation zwischen genomischen und infektiösen Titern erreicht werden. Der genomische Titer gab dabei keine Auskunft über Infektiosität und Funktionalität der Viruspartikel. Es war zu erwarten, daß ein Teil der durch die qPCR detektierten Viruspartikel defekt war und damit keinen Gentransfer ermöglichte.

3.2 Nachweis des rAAV-p53 vermittelten Gentransfers auf Proteinebene

Die Empfänglichkeit der NSCLC-Zelllinien H23, H157 und H1299 für eine Infektion mit rAAV-GFP konnte lichtmikroskopisch belegt werden. Um die Funktion des rAAV-p53-Vektors zusätzlich auf Proteinebene nachzuweisen, wurde exemplarisch mit Zellen der p53-negativen Zelllinie H1299 ein *Western Blot* durchgeführt. In diesen Zellen war ursprünglich keine Expression des p53-Proteins nachweisbar. Mit diesem Verfahren sollte nun spezifisch

eine Expression des p53-Proteins in rAAV-p53-infizierten *H1299*-Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zellen einen Tag lang mit 600 genomischen rAAV-p53-Partikeln pro Zelle inkubiert. Die Wiederherstellung der p53-Expression in den *H1299*-Zellen wurde mit dem *Western Blot* Verfahren detektiert und fotodokumentiert. Im *Western Blot* zeigte sich eine Proteinbande mit einer molekularen Größe von 53 kDa. Dadurch konnte ein erfolgreicher Gentransfer mithilfe des rAAV-p53-Vektors belegt werden.

Abbildung 17: Ergebnis des *Western Blot*



Erläuterung: Die Abbildung zeigt den Fotoausschnitt einer *Western Blot*-Membran. Die Aufnahme wurde mit einem Röntgenfilm für biochemische Zwecke gemacht. Ziel der Aufnahme war es, eine rAAV-2-vermittelte Expression des Proteins p53 nachzuweisen. Auf Bahn 1 wurden als negative Kontrolle rAAV-GFP-transduzierte Zellen untersucht. Auf Bahn 2 wurde das p53-Protein der p53-positiven Zelllinie *T47D* detektiert (Positivkontrolle). Die ähnliche Bande auf Bahn 3 weist das p53-Protein in ursprünglich p53-negativen *H1299*-Zellen nach, die mit 600 genomischen rAAV-p53-Partikeln pro Zelle transduziert wurden.

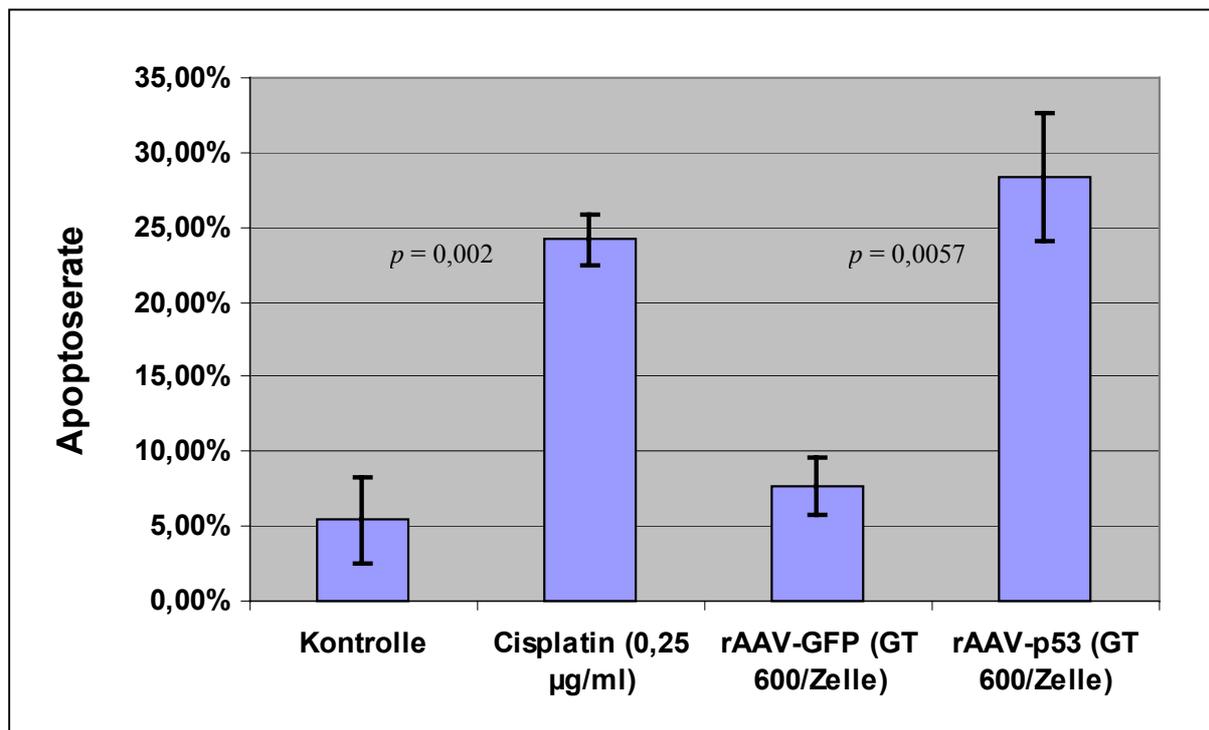
3.3 Nachweis einer Apoptoseinduktion durch rAAV-p53

Funktionelles p53 ist ein proapoptotisches Protein und führt in entarteten Zellen zur Induktion einer Apoptose. Daher sollte ein erfolgreicher Gentransfer von p53 zu einer gesteigerten Apoptoserate der transduzierten NSCLC-Zellen führen. Diese Hypothese wurde anhand der Zelllinie *H1299* mit zwei Versuchsreihen überprüft. Der Anteil apoptotischer Zellen in den einzelnen Testansätzen (Apoptoserate) wurde mit dem AnnexinV-Test untersucht. Eine

Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde durch die Verwendung des Kernfarbstoffs 7-AAD ermöglicht.

Im ersten Versuch wurden die H1299-Zellen über 24 Stunden mit rAAV-p53 oder rAAV-GFP Partikeln inkubiert. Cisplatin in einer Konzentration von 0,25 µg/ml wurde dabei als positive Kontrolle zur Induktion einer Apoptose verwendet. Die unbehandelten Zellen wiesen eine spontane Apoptoserate von 5,4 % (SA +/- 2,9 %) auf. Die Apoptoserate lag nach einer Behandlung mit Cisplatin (0,25 µg/ml) bei 24,2 % (SA +/- 1,7 %). Die mit dem Kontrollvektor rAAV-GFP transduzierten Zellen zeigten eine Apoptoserate von 7,7 % (SA +/- 1,9 %). Zellen, die mit dem rAAV-p53-Vektor behandelt worden waren, erreichten mit 28,3 % (SA +/- 4,3 %) die höchste Apoptoserate.

Abbildung 18: Apoptoseraten bei H1299 nach 24 Stunden

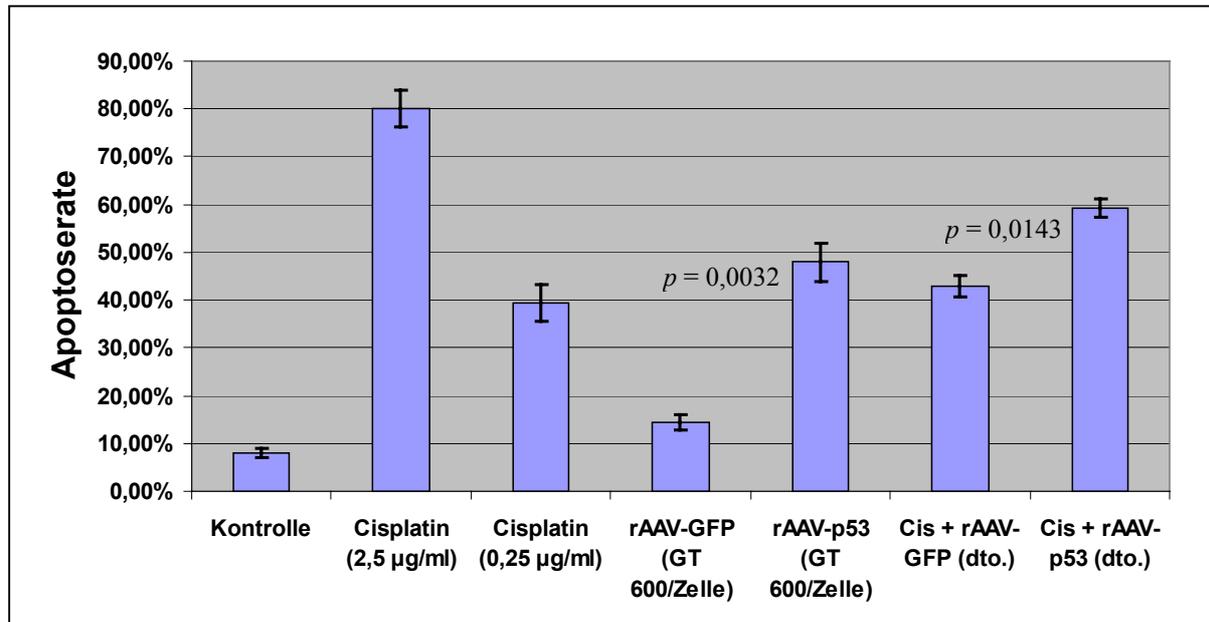


Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Apoptoserate von H1299-Zellen nach 24 Stunden Inkubation als Anteil der Gesamtzellzahl. Angegeben sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte der unterschiedlichen Versuchsansätze. Das Signifikanzniveau (p) zwischen den Kontrollen und dem Ansatz mit Cisplatin betrug 0,002 und war damit statistisch signifikant. Ebenfalls hinreichend war das Signifikanzniveau zwischen den beiden Ansätzen mit rAAV-2-Vektoren bei $p = 0,0057$. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt wurden.

Im zweiten Versuch wurden die Zellen 48 Stunden lang nach der Behandlung mit den rAAV-2-Vektoren bzw. mit Cisplatin inkubiert. Bei diesem Ansatz wurde Cisplatin in zehnfacher Konzentration (2,5 µg/ml) als positive Kontrolle zur Induktion einer Apoptose verwendet. Durch die längere Inkubationsdauer zeigten sich deutlichere Ergebnisse: Die unbehandelten Zellen zeigten eine spontane Apoptoserate von 8,13 % (SA +/- 0,93 %). Die positive Kontrolle (Cisplatin; 2,5 µg/ml) wies mit 79,92 % (SA +/- 3,84 %) die maximale Apoptoserate auf. Mit einfacher Cisplatinosis (0,25 µg/ml) betrug die Apoptoserate jetzt 39,38 % (SA +/- 3,73 %). Bei den mit rAAV-GFP transduzierten Zellen fand sich eine Apoptoserate von 14,52 % (SA +/- 1,56 %). Die Apoptoserate der Zellen, die alleine mit rAAV-p53 behandelt wurden, lag bei 47,99 % (SA +/- 3,98 %).

Die Testansätze, bei denen rAAV-GFP und Cisplatin (0,25 µg/ml) in Kombination eingesetzt wurden, wiesen mit 42,97 % (SA +/- 2,30 %) eine Apoptoserate auf, die kaum über derjenigen lag, die durch Cisplatin (0,25 µg/ml) alleine erzielt worden war. Ein signifikanter Unterschied bestand hier nicht ($p = 0,146$). Zellen, die kombiniert mit rAAV-p53 und Cisplatin (0,25µg/ml) behandelt wurden, zeigt mit 59,26 % (SA +/- 2,02 %) eine signifikant erhöhte Apoptoserate gegenüber dem alleinigen Einsatz von 0,25 µg/ml Cisplatin ($p = 0,005$).

Abbildung 19: Apoptoseraten bei H1299 nach 48 Stunden



Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Apoptoserate von H1299-Zellen nach 48 Stunden Inkubation als Anteil der Gesamtzellzahl. Angegeben sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte der unterschiedlichen Versuchsansätze. Das Signifikanzniveau (p) zwischen den Ansätzen mit rAAV-GFP und denen mit rAAV-p53 betrug 0,0032 und war damit statistisch signifikant. Ebenfalls hinreichend war das Signifikanzniveau zwischen den Ansätzen mit gleichzeitiger Anwendung von rAAV-GFP bzw. rAAV-p53 und 0,25µg/ml Cisplatin ($p = 0,0143$). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt wurden.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse dieser Versuchsreihen eine drei bis fünf mal höhere Apoptoserate der Zelllinie H1299 nach Inkubation mit rAAV-p53 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dies legt nahe, daß die p53-Funktion durch eine Transduktion mit rAAV-p53 zumindest partiell wiederhergestellt werden konnte.

3.4 Zytotoxische Effekte von p53 auf NSCLC Zelllinien

Die Infektion mit dem rAAV-p53-Vektor hatte bei der Zelllinie H1299 zur Expression des p53-Proteins und zu einer gesteigerten Apoptoserate geführt. Als nächstes wurde geprüft, ob der rAAV-p53-Vektor die Vermehrung von NSCLC-Zellen beeinflussen kann. Dazu wurden mit den Zelllinien H23, H157 und H1299 Zellwachstumsversuche durchgeführt. Dabei wurden zunächst verschiedene Konzentrationen der rAAV-2-Vektoren getestet. Danach wurde

untersucht, ob durch gleichzeitigen Einsatz von rAAV-p53-Vektor und Cisplatin ein überadditiver Effekt auf die Zellvermehrung erzielt werden kann.

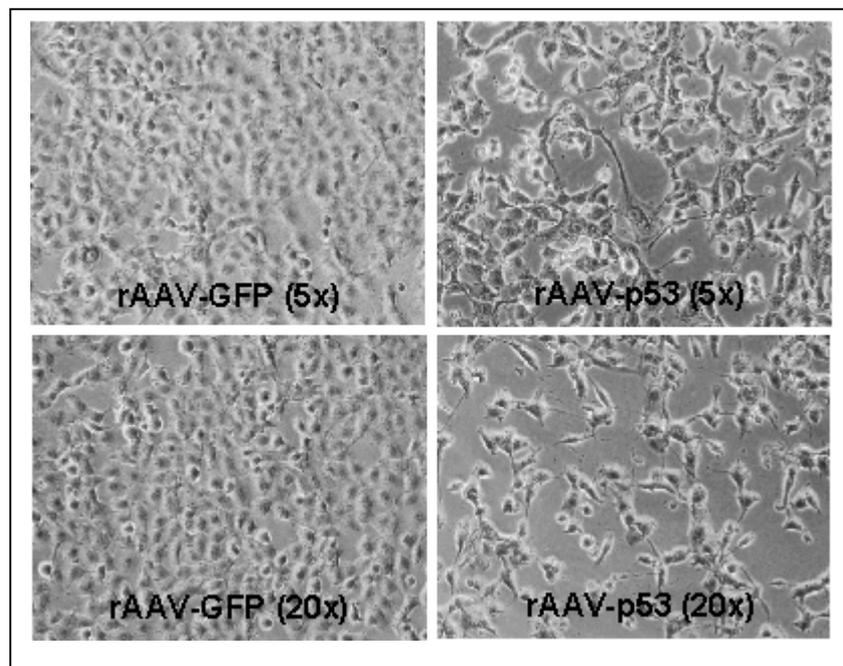
Theoretisch bestand die Möglichkeit, daß ein wachstumshemmender Effekt nicht auf die Wiederherstellung der p53-Funktion, sondern auf die Anwesenheit des rAAV-2-Vektors in den Zellen zurückging. Um dies zu kontrollieren, wurde das Fluoreszenzgen eGFP unter gleichen Bedingungen in die Zellen eingeschleust.^{8, 84} In den folgenden experimentellen Ansätzen konnte ein spezifischer Effekt des rAAV-p53-Vektors gezeigt werden. Die Wirkung ließ sich durch einen kombinierten Einsatz mit Cisplatin zum Teil überproportional verstärkt.

3.4.1 Inhibition Zellwachstums im einfachen Transduktionsansatz

In mehreren Versuchsansätzen wurden drei BC-Zelllinien mit gestörter p53-Funktion und unterschiedlichen histologischen Typs mit beiden rAAV-2-Vektoren infiziert und drei Tage lang inkubiert. Die Zelllinie H1299 war ursprünglich ein großzelliges Karzinom, H157 ein Plattenepithelkarzinom und H23 ein Adenokarzinom. Zur Untersuchung des Effektes wurden drei verschiedene Dosierungen der Vektoren gewählt. Die Dosierungsstufen betragen 30, 150 und 600 genomische Viruspartikel pro Zelle (1x, 5x und 20x). Nach der Inkubation wurde die Zahl lebender Zellen mithilfe des Trypanblau-Vitalitätstests bestimmt.

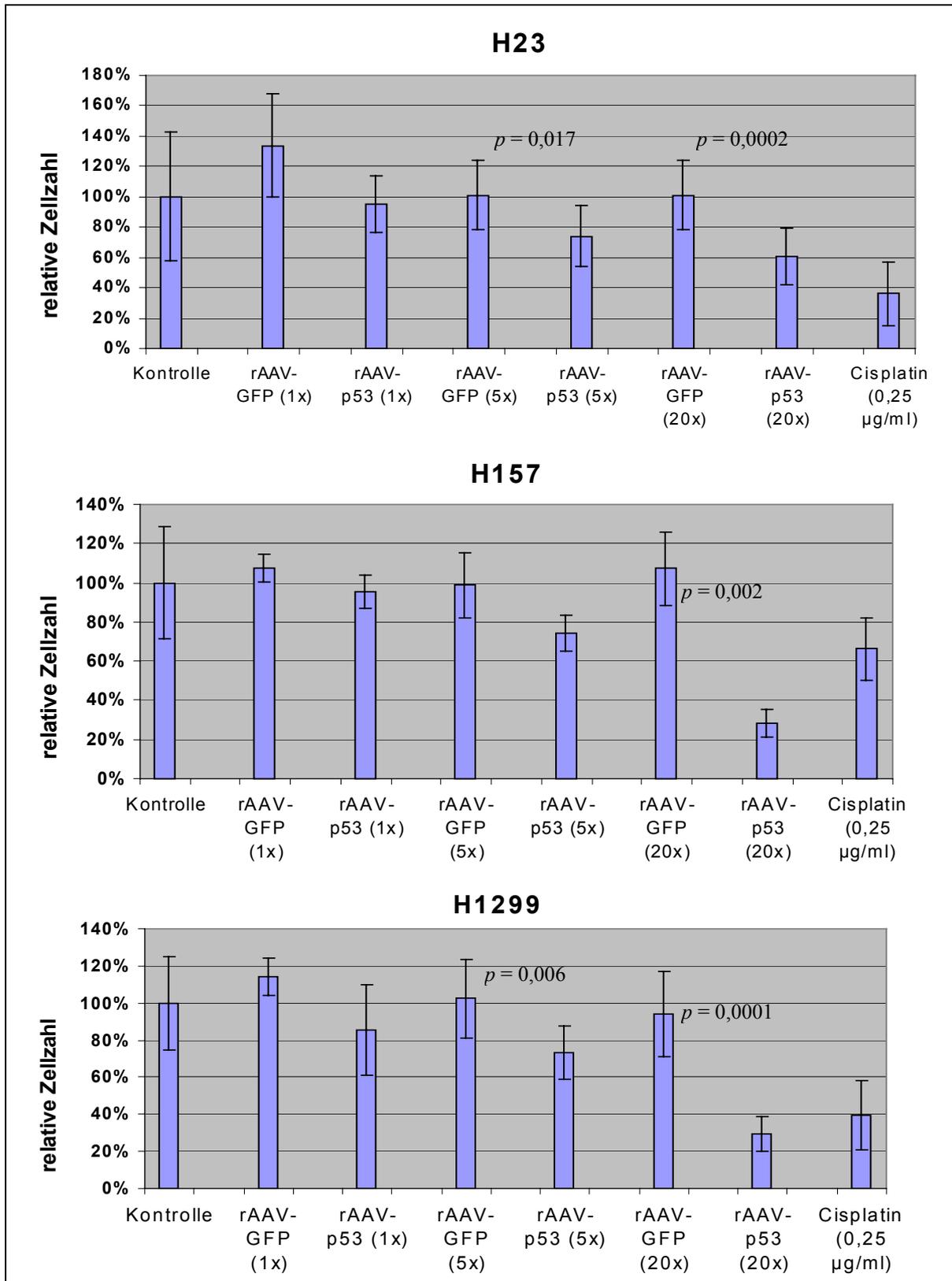
Als Ergebnis wiesen alle drei Zelllinien nach der Infektion mit rAAV-p53 eine dosisabhängige Verminderung des Wachstums auf. Bei der Zelllinie H23 betrug die Wachstumshemmung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen 4,9 % bis 39,4 %, bei H157 lag sie zwischen 4,5 % und 71,7 % und bei H1299 zwischen 14,8 % und 70,3 %. Die Ergebnisse waren bei alle Zelllinien in der höchsten Dosierung (20x), sowie bei H23 und H1299 zusätzlich in der mittleren Dosierung (5x) signifikant. Die Wachstum der Zellen wurde durch die Infektion mit rAAV-GFP nicht vermindert. Im Falle der niedrigen Dosierung von rAAV-GFP (1x) zeigte sich sogar ein leichter Anstieg des Wachstums um 7,6 % bis 33,8 %, der für die Zelllinien H23 und H1299 signifikant war ($p = 0,026$ bzw. $0,022$).

Abbildung 20: H23 Zellen nach Infektion mit rAAV-2



Erläuterung: Die Fotos zeigen H23 Zellen, die mit rAAV-GFP bzw. rAAV-p53 (ohne Cisplatin) infiziert wurden. Dabei wurden die Konzentrationen 600 Viren (GT) pro Zelle (= 20x) bzw. 150 Viren (GT) pro Zelle (= 5x) verwendet. Zellen, die mit rAAV-p53 infiziert wurden, wuchsen sichtbar spärlicher als die Kontrollzellen mit rAAV-GFP. Dieser Effekt nahm mit der Konzentration der rAAV-p53-Vektoren zu.

Abbildung 21: Zellwachstum der BC-Zellen nach Infektion mit rAAV-2

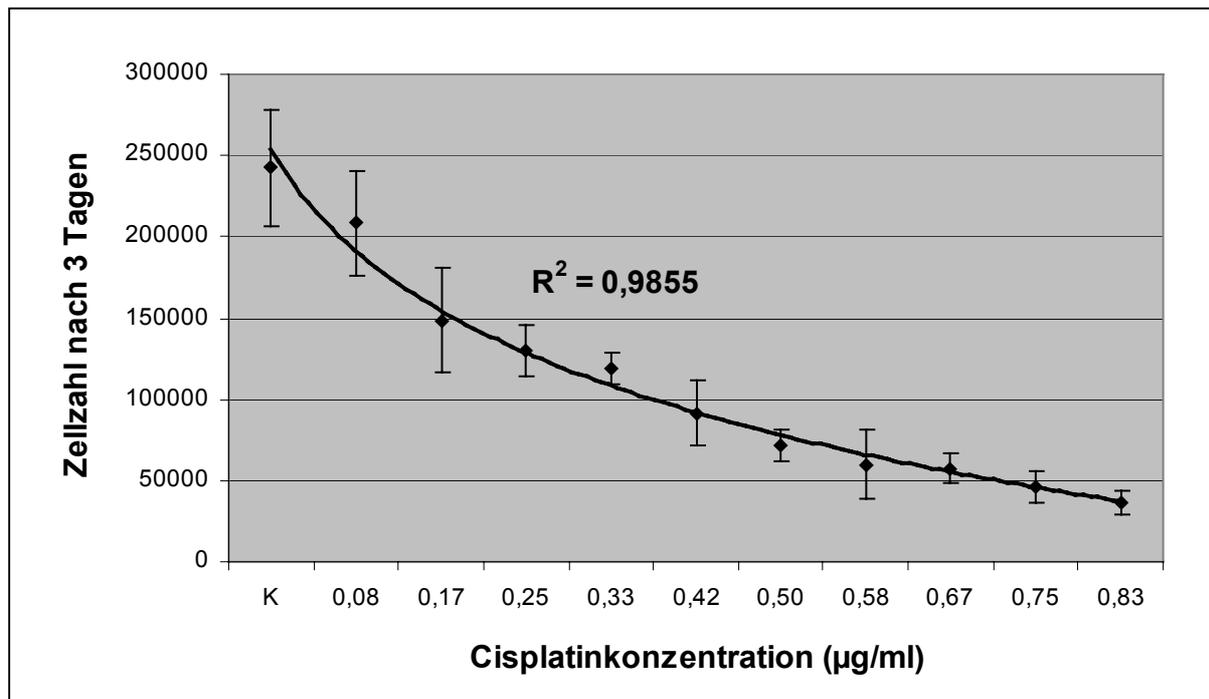


Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Wachstumsraten der Zelllinien H23, H157 und H1299 drei Tage nach der Infektion mit rAAV-2-Vektoren. Die Wachstumsraten wurden bestimmt, indem die Zahl der Zellen im jeweiligen Testansatz durch die mittlere Zahl der Kontrollzellen geteilt und mit 100 multipliziert wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Das Signifikanzniveau (p) zwischen den Ansätzen mit rAAV-GFP und denen mit rAAV-p53 wurde angegeben, wenn es statistisch signifikant war. Die rAAV-p53-Vektoren zeigten demnach einen dosisabhängigen wachstumshemmenden Effekt, nicht aber die rAAV-GFP-Vektoren.

3.4.2 Ermittlung der Cisplatindosis für die Kombinationsexperimente

Vor Durchführung der Kombinationsexperimente wurde eine Dosis–Wirkungskurve von Cisplatin erstellt, um dessen Effekt auf NSCLC-Zellen zu ermitteln.

Abbildung 22: Dosis–Wirkungskurve von Cisplatin bei H1299



Erläuterung: Die Grafik zeigt das Wachstum von H1299-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Cisplatin-Konzentration im Nährmedium. Mit der bei Kombinationsexperimenten verwendeten Cisplatin-Konzentration von 0,25 µg/ml konnte das Wachstum der Zelllinie H1299 im Durchschnitt um 46,39% vermindert werden.

Eine Cisplatin-Konzentration von 0,15 µg pro 600 µl Medium (= 0,25 µg/ml) führte bei den Zelllinien H23, H157 und H1299 zu einer durchschnittlichen Verringerung des Zellwachstums um 53,3% (SA +/- 22,5%). Es wurde angenommen, daß sowohl additive als auch unter- oder überadditive Effekte eines kombinierten Einsatzes von Cisplatin und rAAV-2-Vektoren bei einer Cisplatin-bedingten Wachstumsinhibition von etwa 50% am sichersten zu identifizieren sind. Daher wurde die Cisplatin-Konzentration von 0,25 µg/ml für Kombinationsexperimente verwendet.

3.4.3 Effekt des kombinierten Einsatzes von rAAV-p53 und Cisplatin

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob die Chemosensitivität von NSCLC-Zellen durch die Transduktion mit rAAV-p53 erhöht werden kann. Dazu wurden die Zelllinien drei Tage lang kombiniert mit den drei Dosierungsstufen von rAAV-2-Vektoren (1x, 5x und 20x) und dem Chemotherapeutikum Cisplatin inkubiert. Danach wurde die Zahl lebender Zellen ebenfalls mithilfe des Trypanblau-Vitalitätstests bestimmt.

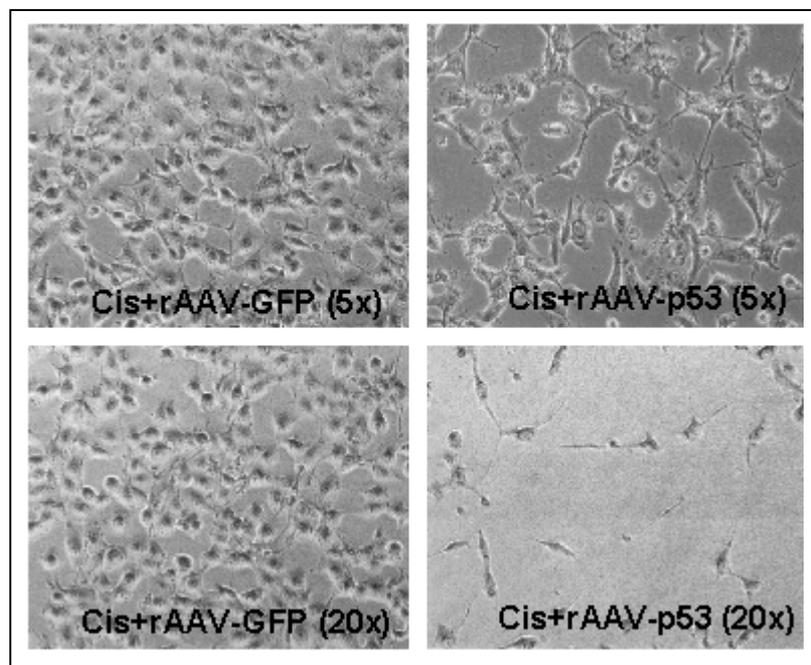
Der Vitalitätstest zeigte, daß die Zellvermehrung alleine durch Cisplatin (0,25 µg/ml) bei der Zelllinie H1299 im Mittel um 60,3 % gesenkt wurde (SA +/- 18,6 %), bei H157 um 33,6 % (SA +/- 15,9 %) und bei H23 um 64,0 % (SA +/- 20,8 %). Durch die Kombination von rAAV-p53 und Cisplatin konnte eine weitergehende Hemmung der Zellvermehrung erreicht werden. Dabei war die Stärke der Inhibition abhängig von der Dosierung der rAAV-p53-Partikel. Die mittlere Wachstumshemmung lag bei der Zelllinie H1299 zwischen 66,3 % und 90,7 %, bei H157 zwischen 41,9 % und 81,0 % und bei H23 zwischen 71,7 % und 83,5 %. Im mittleren und hohen Dosisbereich (5x und 20x) der rAAV-p53-Partikel war die Reduktion des Zellwachstums durch die kombinierte Behandlung mit Cisplatin bei allen Zelllinien statistisch signifikant im Vergleich zu den rAAV-GFP-Kontrollvektoren.

Um festzustellen, ob sich die wachstumshemmenden Effekte von Cisplatin und rAAV-p53 im kombinierten Einsatz unter- oder überadditiv verhalten, wurden zunächst die Versuche mit den einzelnen Substanzen herangezogen. Der erwartete Kombinationseffekt wurde berechnet, indem die Überlebensraten der Versuchsansätze mit den Einzelsubstanzen (0,25 µg/ml Cisplatin bzw. 20x rAAV-p53) miteinander multipliziert wurden (siehe 2.10). Die erhaltene hypothetische Überlebensrate wurde mit der tatsächlich gemessenen Überlebensrate der Kombinationsexperimente verglichen.

Bei der Zelllinie H157 zeigte sich ein additiver Effekt. Die gemessene Überlebensrate von 19,0 % entsprach weitgehend der hypothetischen Überlebensrate von 18,8 %. Im Gegensatz dazu fand sich bei den Zelllinien H23 und H1299 eine leichte, überadditive

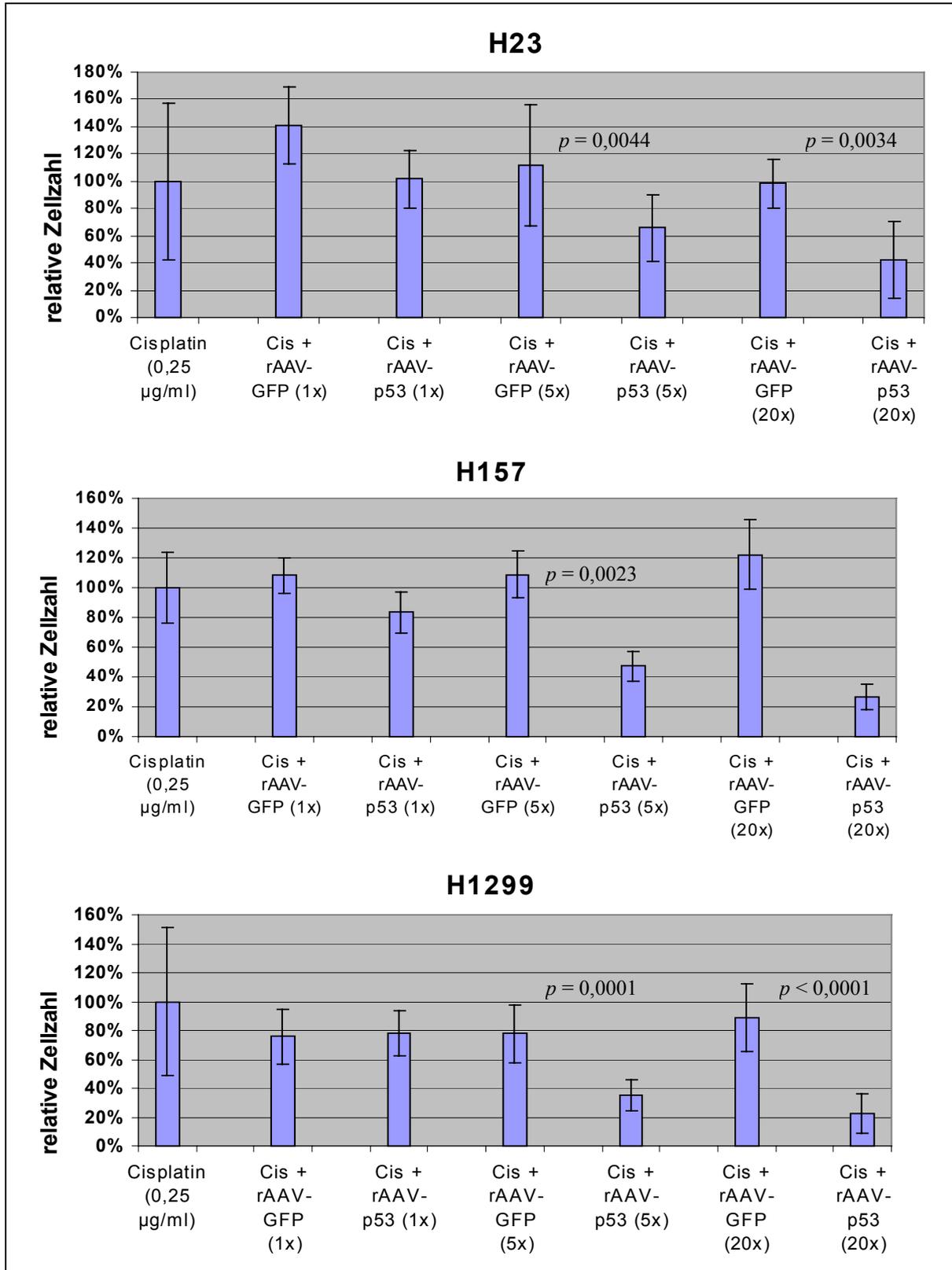
Wachstumshemmung. Die gemessenen Überlebensraten betragen 16,5 % bzw. 9,3 % (SA +/- 10,9 % bzw. +/- 5,7 %) und lagen damit etwas niedriger als die erwarteten Überlebensraten von 21,8 % bzw. 11,8 %. Da die Differenz zwischen erwarteter und gemessener Überlebensrate jedoch in beiden Fällen gering war, kann bei der durchgeführten Anzahl von Kombinationsversuchen (n = 19 bzw. 7) nicht von signifikanten überadditiven Effekten gesprochen werden.

Abbildung 23: H23 Zellen nach Inkubation mit Cisplatin und rAAV-2



Erläuterung: Die Fotos zeigen H23 Zellen, die über drei Tage mit rAAV-GFP bzw. rAAV-p53 in Kombination mit Cisplatin inkubiert wurden. Dabei wurden die Konzentrationen 600 Viren (GT) pro Zelle (= 20x) bzw. 150 Viren (GT) pro Zelle (= 5x) verwendet. Zellen, die mit rAAV-p53 infiziert wurden, wuchsen sichtbar spärlicher als die Kontrollzellen mit rAAV-GFP. Dieser Effekt nahm mit der Konzentration der rAAV-p53-Vektoren zu. Der Effekt wurde deutlicher durch die Kombination mit Cisplatin (vgl. Abbildung 20).

Abbildung 24: Zellwachstum der BC-Zellen nach Inkubation mit Cisplatin und rAAV-2



Erläuterung: Die Abbildung zeigt die Wachstumsraten von BC-Zelllinien H23, H157 und H1299, die über drei Tage mit rAAV-GFP bzw. rAAV-p53 in Kombination mit Cisplatin inkubiert wurden. Die Wachstumsraten wurden bestimmt, indem die Zellzahl der kombinierten Testansätze nach drei Tagen durch die mittlere Zahl der alleine mit Cisplatin inkubierten Zellen geteilt und mit 100 multipliziert wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Das Signifikanzniveau (*p*) zwischen den Ansätzen mit rAAV-GFP und denen mit rAAV-p53 wurde angegeben, wenn es statistisch signifikant war.

3.4.4 Verminderung des Vermehrungspotentials durch p53 mit und ohne Cisplatin

Nach einem dreitägigen, kombinierten Einsatz von Cisplatin und rAAV-p53 (20x) überlebten weiterhin zwischen 9,3 % und 19,0 % der NSCLC-Zellen. Nun wollten wir herauszufinden, wie viele der überlebenden Tumorzellen die Fähigkeit behalten hatten, sich durch Teilung zu vermehren. Dazu wurde das Vermehrungspotential einer jeweils gleichgroßen Menge überlebender Tumorzellen aus verschiedenen Testansätzen mithilfe des klonogenen Wachstumstests bestimmt.

In der ersten Phase dieses Tests wurden Zellen der Linien H157 und H1299 drei Tage lang mit rAAV-2-Vektoren (20x) bzw. Cisplatin (0,25 µg/ml) oder kombiniert mit beiden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend nach mehreren Waschschritten erneut in regulärem Medium ohne Testsubstanzen ausgesät. In der zweiten Phase konnten sich die Zellen sieben Tage lang ohne Anwesenheit von Vektoren oder Cisplatin vermehren. Danach wurde bestimmt, wie viele Zellen des jeweiligen Ansatzes ihr Vermehrungspotential behalten hatten, indem die entstandenen Zellkolonien gezählt wurden.

Insgesamt bildeten Zellen, die gleichzeitig mit Cisplatin und rAAV-p53 behandelt wurden, deutlich weniger Kolonien als Zellen, die alleine mit rAAV-p53 oder Cisplatin inkubiert wurden. Dies war am deutlichsten bei der Zelllinie H157 zu sehen. Hier hatte die Einzelbehandlung mit Cisplatin mit einem Koloniewachstum von 93,4 % (SA +/- 12,6 %) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen keinen signifikant hemmenden Effekt auf das Vermehrungspotential der Tumorzellen ($p = 0,211$). Auch eine alleinige Behandlung mit rAAV-p53 (20x) zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen mit 84,1 % (SA +/- 9,4 %) nur einen leichten hemmenden Effekt auf das Vermehrungspotential ($p = 0,033$). Im Gegensatz dazu reduzierte die kombinierte Behandlung die Zahl der Kolonien auf 59,0 % (SA +/- 10,5%), was statistisch hoch signifikant war ($p = 0,0005$).

Vergleichbare Effekte wurden bei der Zelllinie H1299 beobachtet. Hier betrug das Vermehrungspotential im klonogenen Wachstumstest nach alleiniger Anwendung von

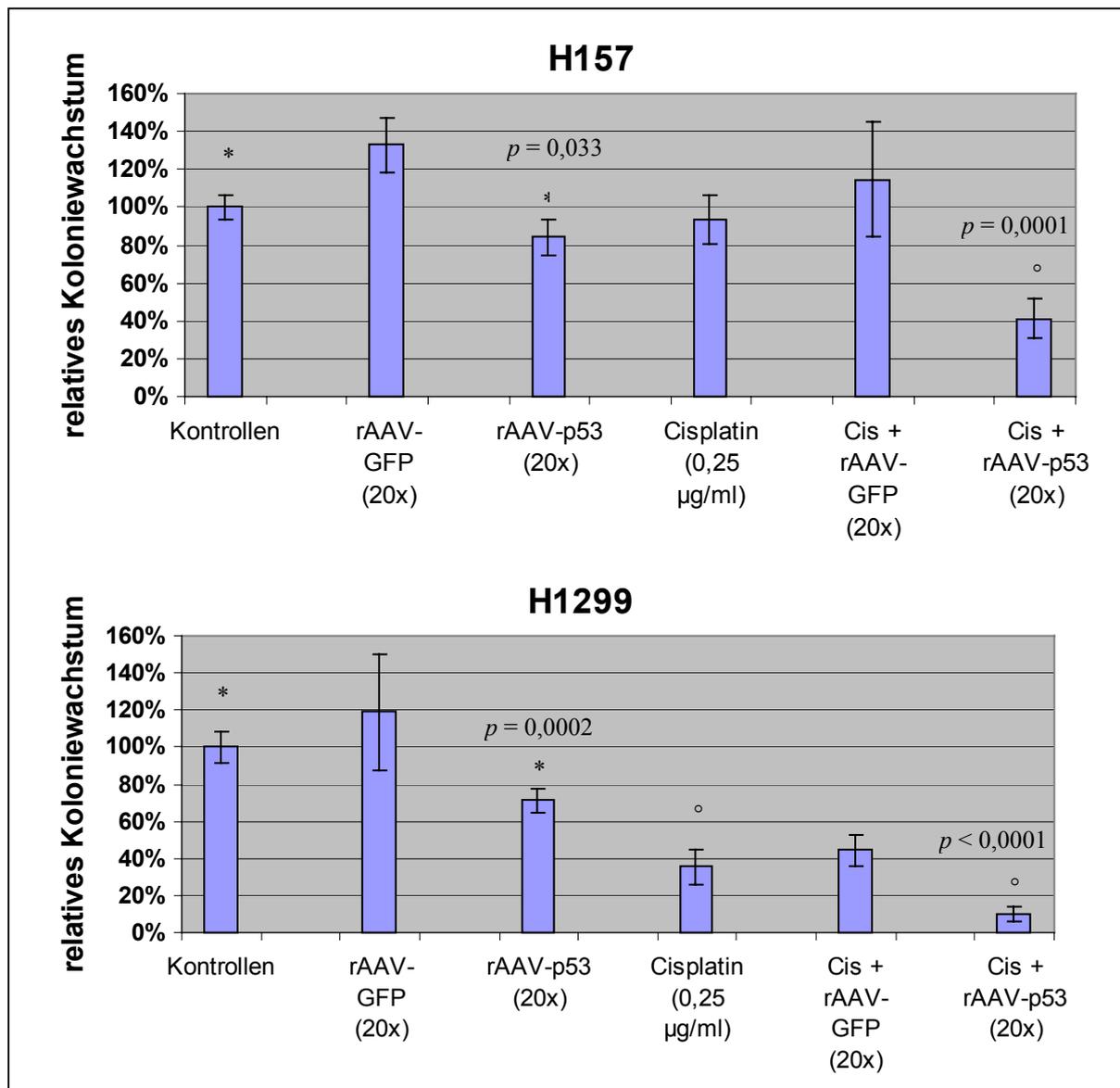
Cisplatin 35,6 % (SA +/- 9,6 %), nach Behandlung mit rAAV-p53 waren es 71,2 % (SA +/- 6,3 %) und bei gleichzeitiger Anwendung 9,6 % (SA +/- 4,0 %). Das Ergebnis der kombinierten Behandlung war bei H1299 im Vergleich zu den Kontrollen statistisch hoch signifikant ($p < 0,00001$).

Beim klonogenen Wachstumstest zeigte sich ähnlich wie bei den dreitägigen Zellwachstumsversuchen, daß rAAV-GFP möglicherweise in der Lage war, daß Wachstum der Tumorzellen zu verstärken. Das Vermehrungspotential von H157 wurde durch die Anwendung von rAAV-GFP (20x) auf 132,7 % (SA +/- 14,1 %) gesteigert, bei H1299 lag die Steigerung bei 118,9 % (SA +/- 31,1 %). Diese Ergebnisse waren jedoch bei H1299 statistisch nicht signifikant ($p = 0,313$) und bei H157 nur schwach signifikant ($p = 0,015$).

Ähnlich wie im Abschnitt 3.4.2 für die Zellwachstumsversuche beschrieben, wurde auch bei den Ergebnissen des klonogenen Wachstumstests untersucht, ob eine unter- oder überadditive Hemmung des Vermehrungspotentials nach dem kombinierten Einsatz von rAAV-p53 und Cisplatin vorliegt. Der erwartete Kombinationseffekt wurde berechnet, indem die Vermehrungspotentiale der Versuchsansätze mit den Einzelsubstanzen (0,25 µg/ml Cisplatin bzw. 20x rAAV-p53) miteinander multipliziert wurden. Das errechnete hypothetische Vermehrungspotential wurde mit dem tatsächlich gemessenen Vermehrungspotential der Kombinationsversuche verglichen.

Bei beiden Zelllinien zeigte sich durch den gleichzeitigen Einsatz von Cisplatin und rAAV-p53 ein überadditiver, hemmender Effekt auf das Koloniewachstum. Das gemessene Vermehrungspotential betrug 41,0 % bei H157 und 9,6 % bei H1299. Beide Ergebnisse lagen damit deutlich niedriger als die erwarteten Vermehrungspotentiale von 78,6 % bzw. 25,4 %. Die Ergebnisse des klonogenen Wachstumstests unterstützen damit die Ergebnisse des dreitägigen Zellwachstumsversuchs (siehe Abschnitt 3.4.2).

Abbildung 25: Hemmung des Vermehrungspotentials vorbehandelter Zellen



Erläuterung: Die Abbildung stellt das Vermehrungspotential der Zelllinien H157 und H1299 nach dreitägiger Inkubation mit rAAV-2-Vektoren bzw. Cisplatin im Clonogenic Assay dar. Dieser Test wurde über sieben Tage in Abwesenheit von rAAV-2-Vektoren und Cisplatin durchgeführt. Als Maß für das Vermehrungspotential verwendete der Test das relative Koloniewachstum. Das relative Koloniewachstum einzelner Versuchsansätze wurde bestimmt, indem die Zahl der Zellen im jeweiligen Testansatz durch die mittlere Zahl der Kontrollzellen geteilt und mit 100 multipliziert wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Das Signifikanzniveau (p) wurde bei beiden Zelllinien einerseits für einen Vergleich von Kontrollkolonien mit rAAV-p53-vorbehandelten Kolonien berechnet (*). Andererseits wurde p für den Vergleich von Cisplatin-vorbehandelten Kolonien mit Kolonien, die sowohl mit Cisplatin als auch mit rAAV-p53 inkubiert worden waren, berechnet ($^{\circ}$). In allen vier Fällen waren die Unterschiede statistisch signifikant. Der hemmende Effekt auf das Vermehrungspotential wurde durch einen kombinierten Einsatz von Cisplatin und rAAV-p53 bei beiden Zelllinien deutlicher.

4. Diskussion:

4.1 Quantifizierung von rAAV-2-Vektoren

In einer klinischen Studie zur Behandlung der Hämophilie B konnte bei einer kleinen Patientenzahl gezeigt werden, daß der rekombinante adeno-assoziierte Virus ein geeigneter Vektor für therapeutische Gene ist.³⁹ AAV-2 wurde auch in zahlreichen anderen Zusammenhängen als vielversprechender therapeutischer Vektor bezeichnet.⁵⁰

Um therapeutische rAAV-2-Vektoren in größeren klinischen Studien einsetzen zu können, beispielsweise im Rahmen der zweiten und dritten Phase von Arzneimittelprüfungen, werden Methoden benötigt, mit denen die rAAV-2-Vektoren in großen Mengen produziert, aufgereinigt und konzentriert werden können. Zudem ist ein standardisiertes Meßverfahren erforderlich, um größere Virusmengen zuverlässig zu quantifizieren. Auch für experimentelle Arbeiten werden entsprechende Methoden benötigt, wobei hier der Zeitaspekt eine größere Rolle spielt und die Meßverfahren auch schnell durchführbar sein sollten.

In der oben genannten Studie zur Hämophilie wurde ein *Dot-Blot Assay* zur Mengenbestimmung der rAAV-2-Vektoren verwendet, ein vergleichsweise langwieriges und schwieriges Verfahren, dessen Zuverlässigkeit stark von der Erfahrung des Anwenders abhängig ist. Ähnliches gilt für andere etablierte rAAV-2-Titrationsmethoden. Verfahren, die auf der biologischen Funktion des Virus basieren, sind auf längere Inkubationszeiten angewiesen und störanfällig gegenüber äußeren Einflüssen.¹² Eine direkte Messung der in den Viruskapsiden enthaltenen DNA erfordert meist die aufwendige Erstellung serieller Verdünnungsreihen der untersuchten Virussuspensionen, wodurch die Genauigkeit der Methode beeinträchtigt werden kann.^{22, 42}

Von der Expression eines Markergens abhängige Verfahren sind aufgrund potentieller Nebenwirkungen des Markergens in-vivo für einen therapeutischen Vektor ungeeignet. Dies gilt zum Beispiel für die durchflußzytometrische *FACS*-Analyse nach Malik et al. (1997). Für experimentelle Vektoren, die Fluoreszenz-Gene transportieren, kann dieses Verfahren

hingegen als „goldener Standard“ betrachtet werden, da es über eine hohe Zuverlässigkeit und Validität verfügt und in verschiedenen Laboratorien zuverlässig etabliert wurde.^{38, 48}

Eine weitere Methode zur Quantifizierung von rAAV-Vektoren stellt die PCR da. Die bisher publizierten PCR-Methoden zur Bestimmung von rAAV-2-Titern sind jedoch entweder sehr aufwendig, da sie serielle Verdünnungsreihen der untersuchten Virusproben benötigen, oder sie sind auf spezielle Gene gerichtet und daher nicht für die Quantifizierung von Vektoren mit anderen Genen verwendbar.^{7, 15, 26, 63}

Eine Optimierung der Titration von rAAV-2-Vektoren erscheint daher sinnvoll. In dieser Arbeit konnten wir eine neue *real-time* PCR-Methode entwickeln, die eine Quantifizierung von rAAV-2-Präparationen unabhängig von ihrer biologischen Funktion oder der Anwesenheit eines bestimmten Gens ermöglicht. Die *Primer* dieser qPCR waren spezifisch für den häufig verwendeten *immediate early human* CMV-Promotor. Es besteht somit die Möglichkeit, diese Quantifizierungsmethode für eine Vielzahl von rAAV-2-Vektoren einzusetzen. Die Methode ist in ihrer Anwendung einfach und besitzt im Vergleich zu anderen PCR-Methoden eine hohe Zuverlässigkeit (intraexperimenteller VK = 0,04 und interexperimenteller VK = 0,48). Sensitivität und Spezifität unserer Methode sind ausreichend hoch, um 10 bis 20 Kopien des CMV-Promotors in zwei µl Volumen sicher zu identifizieren. Ein entscheidender Vorteil unserer qPCR ist jedoch ihre schnelle Durchführbarkeit. Während einige Titrationsverfahren bis zu drei Tage benötigen, um unbekannte Virussuspensionen zu quantifizieren, erfordert dieses Verfahren lediglich einen Zeitaufwand von zwei bis drei Stunden. Dies ist insbesondere für experimentelle Studien ein entscheidender Vorteil. Hingegen kann diese qPCR ebenso wie andere PCR-Methoden aufgrund der eingeschränkten interexperimentellen Reliabilität nur bedingt für klinische Studien eingesetzt werden.

Bei der Etablierung von Meßverfahren sollte ein Referenzverfahren definiert werden, mit dem die Validität eines neuen Verfahrens geprüft werden kann. In dieser Arbeit wurde die durchflußzytometrische *FACS*-Analyse nach Malik et al. (1997) als Referenzverfahren für die

Quantifizierung von rAAV-GFP-Präparationen eingesetzt. Um die neu etablierte qPCR mit dem Referenzverfahren zu vergleichen, wurden die Titer verschiedener rAAV-GFP-Präparationen mit beiden Methoden parallel untersucht.

Die Korrelation der Meßergebnisse zwischen den beiden Methoden betrug 0,85 (nach Pearson) und war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Das Verhältnis der Meßwerte beider Methoden zueinander lag im Durchschnitt bei 1:256. Ein Grund für dieses Verhältnis besteht wahrscheinlich darin, daß mit der qPCR genomische Partikel, also virale Genome in Kapsiden, und nicht infektiöse Partikel, wie bei der *FACS*-Analyse, gemessen werden. Bei der qPCR werden daher alle genomhaltigen Partikel der Virussuspension in die Messung des Titers einbezogen, auch solche, die defekt und nicht infektiös sind. Die *FACS*-Analyse hingegen mißt nur infektiöse und somit funktionell intakte Viruspartikel. Vermutlich resultierte daraus der höhere genomische Titer im Vergleich zum infektiösen Titer. Gestützt wird diese Erklärung dadurch, daß auch andere Studien zwischen der Zahl gemessener Viruspartikel in AAV-2-Präparationen und der Zahl durch sie verursachter Infektionen ein Verhältnis von 1:56 bis 1:1000 fanden.^{22, 61, 97}

Eine weitere Erklärung für den Unterschied zwischen genomischen und infektiösen Titern liegt in der theoretischen Annahme, daß jede fluoreszierende Zelle, die in der *FACS*-Analyse detektiert wird, von genau einem infektiösen Partikel infiziert wurde. Falls jedoch in einigen Fällen mehrere infektiöse rAAV-GFP-Partikel in eine Zelle eingedrungen wären, würde der reale infektiöse Titer der Virussuspension zu niedrig geschätzt werden, da jede fluoreszierende Zelle nur einfach gezählt wird. Zusätzliche rAAV-GFP-Partikel, die nach dem ersten Partikel eine Zelle infizieren, bleiben somit unerkant.

Zusammenfassend kann eine qPCR, die zur Detektion des *immediate early human CMV promoters* etabliert wurde, als nützliches Instrument für die schnelle Quantifizierung unbekannter rAAV-2-Präparationen betrachtet werden. Im Vergleich zu anderen Methoden ist sie unabhängig vom verwendeten Transgen und erlaubt eine einfache und standardisierte

Titration von rAAV-2-Vektoren. In Verbindung mit geeigneten Verfahren zur Isolierung viraler DNA aus menschlichen Geweben könnte diese qPCR auch zur Überwachung des rAAV-2-Status von Geweben, die mit rAAV-2-Vektoren behandelt wurden, eingesetzt werden. Die neue qPCR wurde im weiteren experimentellen Verlauf dieser Arbeit zur Quantifizierung der rAAV-p53-Vektoren verwendet.

4.2 Zytotoxische Effekte von rAAV-p53 alleine und in Kombination mit Cisplatin

Rekombinante adeno-assoziierte Viren vom Typ 2 besitzen eine hohe Transduktionskapazität für primäre, menschliche Zellen.⁵⁸ In der Studie von Rohr et al. (2003) konnte gezeigt werden, daß auch NSCLC-Zellen geeignete Ziele für einen Gentransfer mit rAAV-2-Vektoren darstellen.⁵⁹ Der AAV-2-Wildtyp weist zudem einige besondere Eigenschaften auf: Zum einen scheint er in-vivo einen direkten, tumorhemmenden Effekt zu besitzen.^{13, 74} Zum anderen konnte gezeigt werden, daß eine Infektion mit dem AAV-2-Wildtyp einige Nebenwirkungen von Chemotherapien vermindern und die Sensitivität von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika steigern kann.^{16, 18, 69} Weiterhin sind Infektion und Transduktion mit rAAV-2-Vektoren sowohl bei sich-teilenden als auch bei ruhenden Zellen möglich. Diese Eigenschaften stützen die These, daß rAAV-2 ein geeigneter Vektor zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist.

Die bislang gebräuchlicheren Vektoren für gentherapeutische Ansätze bei malignen Tumorerkrankungen sind rekombinante Adenoviren und Retroviren. Bei einer Behandlung mit diesen Vektorsystemen können jedoch schwere Nebenwirkungen auftreten, die durch biologische Eigenschaften der zugrundeliegenden Wildtypen verursacht werden. So waren die ersten adenoviralen Vektoren hoch immunogen und konnten das schwerwiegende *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) hervorrufen, welches zum Multiorganversagen führen kann.³⁵ Demgegenüber wurde bei Menschen bislang keine Krankheit entdeckt, die mit AAV-2 vergesellschaftet ist. Zudem ermöglicht die vergleichsweise geringe Immunogenität von rAAV-2 eine mehrfache sichere Anwendung des Vektors bei einem gezielten Transfer

von Genen in ein menschliches Gewebe. Dies konnte in der Studie von Kay et al. (2000) zur Behandlung der Hämophilie B gezeigt werden.³⁹

Ein Nachteil von retroviralen Vektorsystemen besteht darin, daß die von ihnen transportierten Gene an einer bislang nicht vorhersehbaren Stelle in das Genom der Zielzelle integriert werden. Dieser Mechanismus kann theoretisch zur Insertions-Mutation wichtiger Gene und damit zu malignen Erkrankungen führen. So wurden beispielsweise zwei Fälle von T-Zell-Lymphomen beschrieben, die bei einer Gruppe von elf Patienten etwa zwei Jahre nach der retroviralen Gentherapie einer schweren kombinierten Immundefizienz (SCID) auftraten. Es wurde diskutiert, ob diese Fälle mit der retroviralen Gentherapie im Zusammenhang stehen.^{9, 55} Anders als retrovirale Vektoren und als der AAV-2-Wildtyp hat der rekombinante AAV-2 die Fähigkeit zur spezifischen Integration im menschlichen Genom durch die Entfernung des *rep*-Gens verloren. Das Genom von rAAV-2 liegt intrazellulär meist in extrachromosomaler Form vor, wodurch das Risiko einer vektorbedingten Mutation erheblich verringert wird.

Aufgrund des geeigneten Tropismus von rAAV-2 und seinen aufgeführten Vorteilen gegenüber anderen Vektoren lag es nahe, experimentell zu untersuchen, ob rAAV-2-Vektoren zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen geeignet sind. Zu diesem Zweck wurde ein rekombinanter AAV-2-Vektor konstruiert, der das humane Wildtyp-p53-Gen transportieren konnte. Das Tumorsuppressorgen p53 wurde ausgewählt, da seine Funktion relativ gut erforscht und sein proliferationshemmender Effekt auf BC-Zellen bereits mehrfach dokumentiert wurde.^{41, 44} So konnte bei Zelllinien, die aus Bronchialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen bzw. Pankreaskarzinomen gewonnen wurden, ein vermindertes Zellwachstum nach adenoviraler Einschleusung des p53-Gens beobachtet werden.^{6, 56, 75} In dieser Arbeit wurden die NSCLC-Zelllinien H23, H157 und H1299 mit unserem rAAV-p53-Vektor infiziert. Dadurch konnte die p53-Funktion dieser Tumorzellen wiederhergestellt und ihre Vermehrung um 39–72 %, verglichen mit unbehandelten Zellen, gesenkt werden. Der

Kontrollvektor rAAV-GFP zeigte hingegen keinen wachstumshemmenden Effekt, so daß von einer spezifischen Wirkung des rAAV-2-vermittelten p53-Gentransfers ausgegangen werden kann. Wie erwartet war der wachstumshemmende Effekt von rAAV-p53 mit einer gesteigerten Apoptoserate bei den transduzierten NSCLC-Zellen verbunden.

Da sowohl eine Infektion mit Wildtyp-AAV-2, als auch eine Transduktion des p53-Gens in Tumorzellen deren Sensibilität gegenüber dem Chemotherapeutikum Cisplatin erhöhen kann, wurde als nächstes untersucht, ob rAAV-2-Vektoren ebenfalls diese Eigenschaften besitzen. Die kombinierte Behandlung der drei NSCLC-Zelllinien mit Cisplatin und rAAV-p53 führte zu einer additiven oder überadditiven Wachstumsinhibition der Tumorzellen. Die Wachstumshemmung betrug je nach Zelllinie maximal 81 bis 91 %, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Zusätzlich waren die überlebenden Tumorzellen auch ohne Fortsetzung der Behandlung signifikant in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt, im klonogenen Wachstumstest Kolonien zu bilden. Dies weist auf Langzeiteffekte hin, die selbst nach dem Absetzen der zytotoxischen Substanzen das Vermehrungspotential der NSCLC-Zellen vermindern konnten. Demgegenüber wurde bei einer kombinierten Behandlung mit Cisplatin und dem Kontrollvektor rAAV-GFP keine zusätzliche Wachstumshemmung im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit Cisplatin beobachtet.

Diese Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß rekombinante AAV-2-Vektoren nicht mehr generell die Fähigkeit des AAV-2-Wildtyps besitzen, Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu sensibilisieren. Die wahrscheinliche Ursache hierfür ist das Entfernen der Gene *rep* und *cap* beim rAAV-2-Vektor. Die spezifische, chemosensibilisierende und wachstumshemmende Wirkung des Vektors rAAV-p53 war daher am ehesten Folge einer Transduktion des p53-Gens in die NSCLC-Zellen. Auch der synergistische Effekt im klonogenen Wachstumstest bei der kombinierten Behandlung mit Cisplatin und rAAV-p53 läßt sich durch DNA-Schäden, die mit der Cisplatin-Vorbehandlung verursacht wurden, und durch eine aufrechterhaltene Expression des proapoptischen Proteins p53 erklären. Die

größere Wachstumshemmung des kombinierten Ansatzes im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Cisplatin konnte wahrscheinlich durch die Wiederherstellung von apoptotischen Signalwegen in den NSCLC-Zelllinien erreicht werden.

Die Kombination einer Cisplatin-Chemotherapie mit einem gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome erscheint aus theoretischer Sicht sinnvoll. In diesem Kontext wurde der Einsatz eines rekombinanten AAV-2-Vektors, der das p53-Gen transportiert, bei NSCLC-Zellen untersucht. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit ist die Anwendung des rAAV-p53-Vektors zur Behandlung von Bronchialkarzinomen in-vivo problematisch. Der Tropismus von rAAV-2-Vektoren ist bislang für eine venöse Applikation zu weit gestreut, was vermutlich zur Folge hat, daß keine ausreichende Dosis von rAAV-p53 den Tumor nach intravenöser Gabe erreichen würde.⁵⁸ Ein Großteil der Viruspartikel wäre zuvor an entsprechende Rezeptoren von Endothelzellen des venösen Gefäßsystems gebunden. Zudem sind die meisten Menschen bereits mit dem AAV-2-Wildtyp in Kontakt gekommen und besitzen dem zur Folge eine Teilimmunisierung gegen dieses Virus. Somit wäre die Wirksamkeit des rAAV-p53-Vektors, aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Wildtyp, bei intravenöser Applikation wahrscheinlich vermindert. Es gilt daher, Wege zur direkten Applikation von rAAV-p53 in Tumorgewebe zu finden. Neben einer CT-gesteuerten, intratumoralen Injektion besteht prinzipiell auch die Möglichkeit einer lokalen Verabreichung mittels Aerosol. Alternativ könnten rAAV-2-Mutanten entwickelt werden, die einen spezifischen Tropismus für NSCLC-Zellen besitzen und daher eine intravenöse Applikation erlauben.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß NSCLC-Zelllinien unterschiedlichen histologischen Typs geeignete Ziele für einen gentherapeutischen Ansatz mit rekombinanten AAV-2-Vektoren darstellen. Der zu diesem Zweck konstruierte rAAV-p53-Vektor, der das humane Wildtyp-p53-Gen transportierte, konnte bei den NSCLC-Zellen eine signifikante Wachstumsinhibition vermitteln und die Chemosensibilität dieser Zellen

steigern. Die beobachteten synergistischen Effekte zwischen rAAV-p53 und dem Chemotherapeutikum Cisplatin weisen auf ein großes Potential von rAAV-2-Vektoren für die genetische Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms hin. Dies kann dazu ermutigen, in weiteren Forschungsarbeiten die Transduktionsspezifität von rAAV-2-Vektoren für NSCLC-Zellen zu erhöhen. Zudem ist die Entwicklung weiterer rAAV-2-basierter Vektoren vorstellbar, die Tumorsuppressorgene wie p16 oder FHIT transportieren.

Literaturverzeichnis

1. Antonia SJ, Sotomayor E (2000) Gene therapy für lung cancer. *Cur Op Oncol* 12: 138-42
2. Atkinson EM, Debelak DJ, Hart LA, Reynolds TC (1998) A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors. *Nucleic Acids Res* 26: 2821-3
3. Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR (1984) Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 312: 169-70
4. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, Khan MA, Shields PG, Harris CC (1999) Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol.* 187: 8-18
5. Berns KI, Giraud C (1996) Biology of Adeno-associated virus, in: Berns KI, Giraud C (Hrsg.) *Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Gene Therapy*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York 1996
6. Bouvet M, Bold RJ, Lee J et al. (1998) Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 5: 681-8
7. Cao L, Liu Y, During MJ, Xiao W (2000) High-titer, wild-type free recombinant adeno-associated virus vector production using intron-containing helper plasmids. *J Virol* 74: 11456-63
8. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 (5148): 802-5
9. Check E (2003) Harmful Potential of Viral Vectors Fuels Doubts Over Gene Therapy. *Nature* 423:573-4
10. Cheng J, Leng X, Peng J. (2000) Construction of a hepatoma-targeting vector of adeno-associated virus containing human alpha-fetoprotein promoter and wild p53 gene in gene therapy of liver cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 80(6): 461-3
11. Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR (1999) Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Gene Ther* 10: 1031-9
12. Clark KR, Voulgaropoulou F, Johnson PR (1996) A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 3: 1124-32
13. Coker AL, Russel RB, Bond SM et al. (2001) Adeno-associated virus is associated with a lower risk of high-grade cervical neoplasia. *Exp Mol Pathol* 70: 83-9
14. Drings P, Dienemann H, Wannemacher M: *Management des Lungenkarzinoms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2003
15. Drittanti L, Rivet C, Manceau P, Danos O, Vega M (2000) High throughput production, screening and analysis of adeno-associated viral vectors. *Gen Ther* 7: 924-9
16. Duverger V, Sartorius U, Klein-Bauernschmitt P, Krammer PH, Schlehofer JR (2002) Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2. *Int J Cancer* 97: 706-12
17. Dziadziszko R, Jassem E, Jassem J (1998) Clinical implications of molecular abnormalities in lung cancer. *Cancer Treat Rev* 24: 317-30
18. Eisold S, Dihlmann S, Linnebacher M et al. (2002) Prevention of chemotherapy-related toxic side effects by infection with adeno-associated virus type 2. *Int J Cancer* 100: 606-14
19. Eysenck HJ, Grossarth-Maticsek R, Everitt B (1991) Personality, stress, smoking, and genetic predisposition as synergistic risk factors for cancer and coronary heart disease. *Integr Physiol Behav Sci* 26(4): 309-22
20. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ (1996) Second-strand synthesis is a rate-limiting step of efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70: 3227-34
21. Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM (1996) Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 70: 520-32
22. Flotte TR, Solow R, Owens RA, Afione S, Zeitlin PL, Carter BJ (1992) Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 349-56
23. Fong KM, Sekido Y, Minna JD (1999) Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118: 1136-52
24. Frederiksen KS, Petri A, Abrahamsen N, Poulsen HS (1999) Gene therapy for lung cancer. *Lung Canc* 23: 191-207
25. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Schaub LB, Roth JA (1993) A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res.* 53: 4129-33
26. Gao G, Qu G, Burnham MS, Huang J, Chirmule N, Joshi B, Yu QC, Marsh JA, Conceicao CM, Wilson JM (2000) Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum Gene Ther* 11: 2079-91
27. Geradts J, Fong KM, Zimmermann PV, Maynard R, Minna JD (1999) Correlation of abnormal Rb, p16ink4a and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 5: 791-800

28. Graham FL, van der Eb AJ (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54: 536-9
29. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-78
30. Greenblatt MS, Harris CC (1995) Molecular Genetics of Lung Cancer. *Cancer Survey* 25: 293-313
31. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA (1998) Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gen Ther* 9: 2745-60
32. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ (1997) The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 315: 980-8
33. High KA (2001) Gene therapy: a 2001 perspective. *Haemophilia* 7 Suppl. 1, 23-7
34. Hillgenberg M, Schlehofer JR, von Knebel Doeberitz M, Klein-Bauernschmitt P (1999) Enhanced sensitivity of small cell lung cancer cell lines to cisplatin and etoposide after infection with adeno-associated virus type 2. *Eur J Cancer* 59: 3333-9
35. Hollon T (2000) Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. *Nat Med* 6:6
36. Horio Y, Hasegawa Y, Sekido Y, Takahashi M, Roth JA, Shimokata K (2000) Synergistic effects of adenovirus expressing wild-type p53 on chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 7: 537-44
37. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T et al. (1993) Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 53: 1-4
38. Hörster A, Teichmann B, Hormes R, Grimm D, Kleinschmidt J, Sczakiel G (1999) Recombinant AAV-2 harboring gfp-antisense/ribozyme fusion sequences monitor transduction, gene expression, and show anti-HIV-1 efficacy. *Gene Ther* 6: 1231-8
39. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 24: 257-61
40. Klein-Bauernschmitt P, von Knebel Doeberitz M, Ehrbar M, Geletneky K, Kleinschmidt J, Schlehofer JR (1996) Improved efficacy of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitisation of human tumour cells. *Eur J Cancer* 32A: 1774-80
41. Koty PP, Zhang H, Franklin WA, Yousem SA, Landreneau R, Levitt ML (2002) In vivo expression of p53 and Bcl-2 and their role in programmed cell death in premalignant and malignant lung lesions. *Lung Cancer* 35: 155-63
42. Kube DM, Srivastava A (1997) Quantitative DNA slot blot analysis: inhibition of DNA binding to membranes by magnesium ions. *Nucleic Acids Res* 25: 3375-6
43. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999) Cancer statistics 1999. *CA Cancer J Clin* 49: 8-31
44. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-31
45. Lowe SW, Lin AW (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3): 485-95
46. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-67
47. Lundberg AS, Weinberg RA (1999) Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 35(4): 531-9
48. Malik P, McQuiston SA, Yu XJ, Pepper KA, Krall WJ, Podsakoff GM, Kurtzman GJ, Kohn DB (1997) Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line. *J Virol* 71: 1776-83
49. Minna JD (1989) Genetic Events in the pathogenesis of lung cancer. *Chest* 96: 17S-23S
50. Monahan PE, Samulski RJ (2000) AAV vectors: Is clinical success in horizon? *Gene Ther* 7: 24-30
51. Nakachi K et al. (1991) Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.* 51: 5177-80
52. Nguyen DM, Wiehle SA, Koch PE, Branch C, Yen N, Roth JA, Cristiano RJ (1997) Delivery of the p53 tumor suppressor gene into lung cancer cells by an adenovirus/DNA complex. *Cancer gene Ther.* 4: 191-8
53. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retrovirus by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392-6
54. Pitterle DM, Jolicoeur EMC, G Bepler (1998) Hot Spots for Molecular Genetic Alterations in Lung Cancer. *In vivo* 12: 643-58
55. Pressemeldungen der *European Society of Gene Therapy* vom 08.10.2002 und vom 18.01.2004 (Internetquelle: www.esgt.org)
56. Qazilbash MH, Xiao X, Seth P, Cowan KH, Walsh CE (1997) Cancer gene therapy using a novel adeno-associated virus vector expressing human wild-type p53. *Gene Ther* 4(7): 675-82
57. Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochem et Biophys Acta* 1197: 63-93
58. Rohr UP, Kronenwett R, Grimm D, Kleinschmidt J, Haas R (2002) Primary human cells differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression. *J Virol Methods* 105: 265-75

59. Rohr UP, Wulf MA, Stahn S, Heyd F, Steidl U, Fenk R, Opalka B, Pitschke G, Prissack HB, Bojar H, Haas R, Kronenwett R (2003) Non-small lung cancer cells are prime targets for p53 gene transfer mediated by recombinant adeno-associated virus type-2 vector. *Cancer Gene Ther* 10: 898-906
60. Rudiger HW, Schwartz U, Serrand E, Stief M, Krause T, Nowak D, Doerjer G, Lehnert G (1989) Reduced O6-methylguanine repair in fibroblast cultures from patients with lung cancer. *Cancer Res.* 49: 5623-6
61. Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA (1992) Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* 66: 6922-30
62. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, et al. (1995) Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 55: 5038-42
63. Salvetti A, Oreve S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, Champion-Arnaud P, David-Ameline J, Moullier P (1998) Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther* 9: 695-706
64. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T (1989) Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63: 3822-8
65. Schlehofer (1994) The tumor suppressive properties of adeno-associated viruses. *Mutat Res.* 305: 303-13
66. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV (1992) Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 3: 204-8
67. Schreiber G, Pitterle D, Kim YC, Bepler G (1999) Molecular Genetic Alterations of Primary Lung Cancer and Cancer Metastatic to the Lung. *Anticancer Res* 19: 1109-16
68. Schuler M, Herrmann R, De Greve JL, Stewart AK, Gatzemeier U, Stewart DJ, Laufman L, Gralla R, Kuball J, Buhl R, Heussel CP, Kommos F, Perruchoud AP, Shepherd FA, Fritz MA, Horowitz JA, Huber C, Rochlitz C (2001) Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 19(6):1750-8
69. Schwarzbach MH, Eisold S, Burguete T et al. (2002) Sensitization of sarcoma cells to doxorubicin treatment by concomitant wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV-2) infection. *Int J Cancer* 20: 1211-8
70. Seidegard J, Pero RW, Miller DG, Beattie EJ (1986) A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 7: 751-3
71. Sekido Y, Fong KM, Minna JD (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochem Biophys Acta* 1378: F21-F59
72. Shen Y, Muramatsu SI, Ikeguchi K, Fujimoto KI, Fan DS, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, Ozawa K (2000) Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11: 1509-19
73. Shields PG (1999) Molecular Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Oncol* 10 (Suppl. 5): S7-S11
74. Smith J, Herrero R, Erles K et al. (2001) Adeno-associated virus seropositivity and HPV-induced cervical cancer in Spain and Columbia. *Int J Cancer* 94: 520-6
75. Spitz FR, Nguyen D, Skibber JM, Cusack J, Roth JA, Cristiano RJ (1996) In vivo adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for colorectal cancer. *Anticancer Res* 16: 3415-22
76. Statistisches Bundesamt Deutschland (2003) Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2001, www-Seiten des Statistisches Bundesamt Deutschland („www.destatis.de“), aktualisiert am 11. März 2003
77. Steinmetz KA, Potter JD (1991) Vegetables, fruit and cancer: I. Epidemiology. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2: 325-57 and 427-42
78. Steinmetz KA, Potter JD (1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96: 1027-39
79. Steinmetz KA, Potter JD, Folsom AR (1993) Vegetables, fruit, and lung cancer in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Res* 53: 536-43
80. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB Jr, Richli WR, Savin M, Waugh MK (1999) Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 91(9):763-71
81. Takahashi K, Yokota, J (1999) How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis* 20 (8): 1403-10
82. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD (1989) p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246(4929):491-4
83. Tenkanen L, Teppo L. (1987) Migration, marital status and smoking as risk determinants of cancer. *Scand J Soc Med.* 15(2): 67-72
84. Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-44
85. Veldwijk MR, Schiedlmeier B, Kleinschmidt JA, Zeller WJ, Fruehauf S (1999) Superior gene transfer into solid tumour cells than into human mobilised peripheral blood progenitor cells using helpervirus-free adeno-associated viral vector stocks. *Eur J Cancer* 35: 1136-42

86. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Meth* 184: 39-51
87. Wagner JA, Reynolds T, Moran ML, Moss RB, Wine JJ, Flotte TR, Gardner P (1998) Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* 351: 1702-3
88. Walz C, Schlehofer JR, Flentje M, Rudat V, zur Hausen H (1992) Adeno-Associated Virus sensitizes HeLa Cell Tumor to Gamma Rays. *J Virol* 66(9): 5651-7
89. Wang X, Liu Y, Chow LS, et al. (1999) Cisplatin-induced p53-independent growth arrest and cell death in cancer cells. *Int J Oncol* 15: 1097-102
90. Wiethage T, Junker K, Johnen G, Krismann M, Muller KM (2000) Pathologie und Molekularbiologie des Lungenkrebs. *Pathologie* 21(6): 404-23
91. Wiewrodt R, Schuler M, Huber C, Buhl R (1999) Genterapie bei Malignomen der Lunge. *Pneumologie* 53: 176-84
92. Wynder EL, Hebert JR, Kabat GC (1987) Association of dietary fat and lung cancer. *JNCI* 79: 631-7
93. Yang TT, Cheng L, Kain SR (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucl Acids Res* 24: 4592-3
94. Zhang G, Gurtu V, Kain SR (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 707-11
95. Zhang Y, Leng X, Peng J, He X, Lu J, Weng S, Wang S, Du J (2002) Construction, packaging and titration of recombinant adeno-associated virus vectors containing antitumor genes. *Zhonghua YiXueZaZhi* 82(8): 564-7
96. Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA (1996) Nutrition and lung cancer. *Cancer Causes Control* 17: 157-77
97. Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N (1999) Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and Yield. *Gene Ther* 6: 973-85

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei meinem Betreuer Dr. med. Ulrich Rohr für die warmherzige, offene Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seine besondere Fähigkeit mich auch in schwierigen Phasen der Arbeit zu motivieren, für sein Vertrauen und für seine sehr persönliche und zugewandte Betreuung bedanken. Ich bin sehr glücklich darüber, daß über unsere erfolgreiche, berufliche Zusammenarbeit hinaus eine Freundschaft erwachsen ist.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Referenten PD Dr. med. Ralf Kronenwett, der sich viel Zeit und Energie nahm, um mich bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Arbeit zu unterstützen und sie schließlich zu begutachten. Seine offene, humorvolle Kritik und seine Aufmerksamkeit haben mir sehr geholfen. Ich freue mich ebenfalls darüber, daß aus unserer Zusammenarbeit ein freundschaftliches Verhältnis entstanden ist.

Prof. Dr. med. Rainer Haas danke ich für die freundliche Vermittlung und die Möglichkeit, in seiner Klinik eine Promotion anzustreben.

Bei Prof. Dr. med. Klaus Schulze-Osthoff bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Prof. Dr. med. Bojar danke ich mich für die Möglichkeit, die S2 und S1 Laboratorien seines Institutes für klinische Chemie benutzen zu dürfen.

Mein großer Dank gilt auch Dipl. Biol. Susanne Stahn, Dr. med. Uli Steidl und Dr. rer. nat. Hans-Bernd Prisack für die konkrete und hilfreiche Vermittlung von Labortechniken und die vielseitige Unterstützung. Für die angenehme und gelungene Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei meinen Mitstreitern Judith Neukirchen und Thorsten Gräf bedanken.

Und schließlich gilt mein persönlicher Dank Andrea Dahmen und Sandra Orb für das orthographische Korrekturlesen meiner Manuskripte.

Kurzvita

Marc-André Wulf

- 02.11.1976** : Geburt in Rheda-Wiedenbrück, NRW
- 1983 – 1996** : Schulausbildung
- 1996** : Allgemeine Hochschulreife
- 1996 – 1997** : Zivildienst bei der Johanniter-Unfallhilfe als Rettungssanitäter
- 1997 – 2005** : Studium der Medizin (Examen) und der Philosophie (Magister) an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- 1998 – 2002** : Studentische Gremientätigkeit an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (Fachschaftsvertretung, Unterrichtskommission, Fakultätsrat und Berufungskommissionen)
- 1999 – 2003** : Studentische Hilfskraft an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (Nabelschnurblutbank, sowie Forschungslabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie)
- 2000 – 2005** : Arbeit an der Dissertation „Quantifizierung und Einsatz rekombinanter adeno-assoziiierter Viren als therapeutischer Vektor beim nicht–kleinzelligen Bronchialkarzinom“ (Betreuer: PD Dr. med. Ralf Kronenwett)
- 2003 – 2004** : Praktisches Jahr an den medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (Wahlfach: psychosomatische Medizin und Psychotherapie, Direktor: Prof. Dr. Dr. med. W. Tress)
- Dezember 2004** : Medizinisches Staatsexamen und Approbation
- Juli 2005** : Medizinische Promotion, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- September 2005** : Abschluß des Philosophiestudiums (Magister Artium)

Quantifizierung und Einsatz rekombinanter adeno-assoziiertes Viren als therapeutischer Vektor beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

Zusammenfassung der medizinischen Dissertation von Marc-André Wulf

Rekombinante adeno-assoziierte Viren vom Typ 2 (rAAV-2) gelten aufgrund ihrer Eigenschaften als vielversprechende Vektoren für gentherapeutische Ansätze. Meine Arbeit umfaßt inhaltlich zwei Themenbereiche, die sich mit der experimentellen und medizinischen Anwendung von rAAV-2 auseinandersetzen. Zum einen beschäftigte ich mich mit der Quantifizierung von rAAV-2-Vektoren. Zum anderen untersuchte ich den Einsatz von rAAV-2 beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom.

Obwohl rAAV-2 bereits erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt wurde, gab es bislang kein standardisiertes Titrationsverfahren für rAAV-2-Vektoren, was den Vergleich verschiedener experimenteller und klinischer Studien erschwerte. Titrationsmethoden, die auf der biologischen Funktion von rAAV-2 basierten, waren in ihrer Durchführung schwierig und zeitaufwendig. Andere Methoden waren auf bestimmte Gene angewiesen und damit nicht universell anwendbar oder für therapeutische Vektoren ungeeignet. Ich etablierte eine quantitative PCR-Methode (qPCR), die eine schnelle und zuverlässige Mengenbestimmung von rAAV-2-Partikeln ermöglicht, und verglich die neue Methode mit einem Standard-Titrationsverfahren, das auf der biologischen Funktion des *green fluorescent protein* (GFP) beruht. Der Korrelationskoeffizient der Meßergebnisse beider Methoden (nach Pearson) betrug 0,85 und war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Diese qPCR ist im Gegensatz zum Standard-Titrationsverfahren unabhängig von der Expression eines bestimmten Markergens und erlaubt eine Standardisierung der rAAV-2-Titration.

Danach transduzierte ich das Tumorsuppressorgen p53 mit rAAV-2 (rAAV-p53) in drei nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien und untersuchte den Effekt auf die Zellvermehrung mithilfe von drei Apoptose- bzw. Zellwachstumstests. p53 wurde gewählt, da es bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen häufig funktionell verändert ist. Zudem konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, daß durch eine Transduktion von Wildtyp-p53 die Vermehrung von Tumorzellen mit gestörter p53-Funktion gehemmt werden kann. Die Hemmung der Zellvermehrung betrug bei meinen Experimenten je nach Zelllinie 39-72 %, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Weiterhin konnte ich zeigen, daß durch einen gleichzeitigen Einsatz von Cisplatin und rAAV-p53 deren proapoptische Eigenschaften wechselseitig verstärkt werden können. Die Hemmung der Zellvermehrung lag in diesem Ansatz in Abhängigkeit von der Zelllinie bei 81-91 %, wobei mit Cisplatin alleine in gleicher Dosierung eine Hemmung von 34-64 % erreicht wurde. Im klonogenen Wachstumstest zeigte sich, daß kombiniert behandelte Zellen im Vergleich zu einfach behandelten Zellen (Cisplatin oder rAAV-p53) überproportional stark in ihrer langfristigen Vermehrungsfähigkeit gestört waren. Diese Experimente weisen darauf hin, daß ein multimodaler Therapieansatz mit einer Kombination aus Chemotherapie und gentherapeutischen Vektoren die therapeutischen Optionen bei der Behandlung von Bronchialkarzinomen eventuell erweitern kann.