

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Quantifizierung von infektiösen rAAV-2-Partikeln und deren
therapeutischer Einsatz bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-
Zelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Judith Neukirchen

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

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

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Helmut Hanenberg

Abkürzungen.....	6
A. Einleitung.....	9
A.I. Das Bronchialkarzinom.....	9
1. Epidemiologie und Prognose des Bronchialkarzinoms.....	9
2. Ätiologie.....	9
3. Pathologie.....	10
4. Stadieneinteilung.....	11
5. Klinik.....	12
6. Therapie.....	12
A.II. Molekulare Grundlagen des Bronchialkarzinoms.....	13
A.III. Neue Konzepte in der Behandlung von NSCLC.....	17
1. Proteasomen-Inhibitoren.....	18
1.a. Aufbau und Lokalisation des 26S Proteasoms.....	19
1.b. Der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib.....	19
2. Gentherapeutische Ansätze beim NSCLC.....	22
A.IV. Adeno-assoziierte Viren Typ 2 (AAV-2).....	23
1. Das Genom von AAV-2.....	24
2. Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV-2).....	25
3. AAV-2-Vektoren in der Gentherapie.....	25
4. Problem der Quantifizierung von rAAV-2-Partikeln.....	25
A.V. Ziel dieser Arbeit.....	27
B. MATERIAL UND METHODEN.....	28
B.I. Zelllinien und Zellkultur.....	28
1. Zelllinien.....	28
2. Zellkultur.....	28
3. Mykoplasmentest.....	29
B.II. Produktion von rAAV-2-Partikeln.....	29
1. Plasmide.....	29
2. Plasmid-Isolation.....	31
3. Produktion und Aufreinigung der rAAV-2-Vektoren.....	32

B.III. Quantifizierung der infektiösen rAAV-GFP-Partikel.....	33
1. Titration der Viruspartikel mittels Durchflusszytometrie.....	33
2. Quantifizierung von Viruspartikeln durch quantitative real-time PCR.....	34
2.a. Prinzip der quantitativen real-time PCR (qPCR).....	34
2.b. Quantitative Analyse.....	35
2.c. Titration der genomischen Partikel.....	36
2.d. Titration der infektiösen Partikel.....	36
B.IV. Bestimmung der Funktionalität der rAAV-2-Vektoren.....	37
B.V. Western Blot Analyse.....	38
1. Zellkultur.....	38
2. Proteinextraktion.....	38
3. Proteinbestimmung.....	39
4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
5. Blotting.....	40
6. Coomassie-Färbung.....	40
7. Nachweisreaktion.....	41
8. Quantifizierung der Proteinexpression.....	41
B.VI. Funktionelle Tests.....	42
1. Viabilitätstests.....	42
2. <i>Long term colony assay</i>	42
3. Apoptose-Test.....	43
4. Proliferations-Test.....	43
B.VII. Statistische Analysen.....	44
C. ERGEBNISSE.....	45
C.I. Real-Time PCR zur Quantifizierung von Viruspartikeln.....	45
1. S1 Nuklease Verdauung.....	45
2. Sensitivität, Effektivität und Spezifität der rAAV-qPCR.....	46
3. Reproduzierbarkeit des Assays.....	47
4. Vergleich von rAAV-qPCR und Durchflusszytometrie.....	47
5. Vergleich von rAAV-qPCR und <i>Infectious Center Assay</i>	48
C.II. Nachweis des rAAV-p53 vermittelten Gentransfers auf Proteinebene.....	49

C.III. Effekte von rAAV-p53 und Bortezomib auf NSCLC-Zelllinien.....	50
1. Dosisabhängige Effekte von rAAV-p53 und Bortezomib.....	50
2. Effekte des kombinierten Einsatzes von rAAV-p53 und Bortezomib auf die Viabilität und die Proliferation von NSCLC-Zelllinien.....	52
3. Beeinflussung des klonogenen Wachstums der NSCLC-Zelllinien.....	55
4. Intrazelluläre Stabilisierung von p53 nach Bortezomib-Behandlung in NSCLC-Zelllinien.....	57
5. rAAV-p53 und Bortezomib vermittelte Apoptoseinduktion bei NSCLC-Zelllinien.....	58
D. DISKUSSION.....	61
D.I. Quantifizierung von infektiösen rAAV-2-Partikeln.....	61
D.II. Zytotoxische Effekte von rAAV-p53 und Bortezomib.....	63
Literaturverzeichnis.....	68
Danksagung.....	83
Curriculum vitae.....	84
Zusammenfassung.....	85

ABKÜRZUNGEN

AAV-2	adeno-assoziiertes Virus Typ 2
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BC	Bronchialkarzinom
BCA	<i>bichinonic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
DMEM	<i>Dulbecco´s modified Eagles medium</i>
DNA	Desoxyribonukleotinsäure
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
E. coli	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FHIT	<i>fragile histidine triad</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GADD45	<i>growth arrest and DNA damage-inducible gene 45</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
HBS-Puffer	Puffer aus HEPES, Na ₂ HPO ₄ und NaCl
HEPES	Hydroxy-Ethylpiperazin-Ethan-Sulfonsäure

ICA	<i>infectious center assay</i>
I-κB	Inhibitor κ-B
IT	infektiöse Titer
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
kDa	Kilodalton
K-ras	<i>Kirsten rat sarcoma-2 viral oncogene homologue</i>
LB-Medium	Luria Bertoni Medium
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDa	Megadalton
MDM-2	<i>murine double minute Gen 2</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MTS	Dimethylthiazol-Carboxymethoxyphenyl-Sulfonyl-Tetrazolium
MW	<i>molecular weight</i>
MYC	<i>myelocytomatosis viral oncogene homologue</i>
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
qPCR	quantitative PCR
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rAAV-2	rekombinantes adeno-assoziiertes Virus Typ 2
rAAV-GFP	rAAV-Vektor für GFP
rAAV-p53	rAAV-Vektor für p53
Rb	Retinoblastom
rcAAV	replikations-kompetente AAV
SA	Standardabweichung
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>

ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TBE-Puffer	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Wt	Wildtyp

A. EINLEITUNG

A.I. Das Bronchialkarzinom

A.I.1. Epidemiologie und Prognose des Bronchialkarzinoms

Das Bronchialkarzinom zählt in den westlichen Industriestaaten zu den häufigsten Tumoren. Es macht 25% aller Karzinome aus und ist die häufigste Krebstodesursache bei Männern¹. Die Inzidenz beträgt gegenwärtig 50-60 pro 100.000 Einwohner und Jahr, was etwa 45.000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in Deutschland entspricht. Das Geschlechterverhältnis beträgt 1:3-6 zugunsten der Männer, wobei der Anteil der erkrankten Frauen stetig zunimmt. Die Erkrankungshäufigkeit steigt mit zunehmendem Alter und erreicht einen Gipfel zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr.

Die Prognose des Bronchialkarzinoms ist nach wie vor schlecht. Die 5-Jahresüberlebensrate aller Patienten beträgt lediglich 5%. Fast 2/3 der Patienten sind bei Klinikaufnahme bereits inoperabel, von dem restlichen Drittel erweist sich beim intraoperativen Staging ein Teil ebenfalls als nicht mehr kurativ resektabel. Daher ist die Frühdiagnose von entscheidender prognostischer Bedeutung.

Zu den weiteren prognostischen Faktoren zählen der histologische Typ, das Tumorstadium und der Allgemeinzustand des Patienten, sowie das Alter und das Geschlecht des Patienten. So zeigen Frauen eine höhere 5-Jahresüberlebensquote².

A.I.2. Ätiologie

Der wichtigste ätiologische Faktor stellt das inhalative Zigarettenrauchen dar, auf das mehr als 80% der Bronchialkarzinome zurückzuführen sein sollen³. Die Dauer und das Ausmaß des Zigarettenkonsums bestimmen das Lungenkrebsrisiko, durch die Kombination von Zigarettenkonsum und Exposition gegenüber beruflichen Kanzerogenen wird das Risiko erheblich potenziert. Durch Passivrauchen erhöht sich das Risiko um den Faktor 1,3-2,0⁴⁻⁶.

Für ca. 10% der Bronchialkarzinome werden andere pulmonale Karzinogene verantwortlich gemacht, 90% entfallen auf die Noxe Asbest. Weitere Lungenkrebs verursachende Arbeitsstoffe sind Chromverbindungen, Haloether, ionisierende Strahlen, vor allem Radon und Uran, Quarzstaub, Arsenverbindungen,

Nickelverbindungen und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) in Kokereirohgasen⁷.

Zu den umweltbedingten Kanzerogenen zählen Radon in Wohnungen, Passivrauchen und Industrie- und Verkehrsabgase^{8, 9}. Weitere Risikofaktoren sind Lungennarben („Narbenkarzinom“ und „Kavernenkarzinom“) sowie eine familiäre Disposition¹⁰⁻¹².

A.I.3. Pathologie

Makroskopisch unterteilt man das Bronchialkarzinom nach Lage und Ausbreitung:

Das zentrale (hilusnahe) Bronchialkarzinom macht ca. 70% der Karzinome aus, wobei es sich meist um kleinzellige oder Plattenepithelkarzinome handelt.

Das periphere Bronchialkarzinom (25%) tritt röntgenologisch meist als Rundherd in Erscheinung. Eine Sonderform, der Pancoast-Tumor, greift von der Pleurakuppel auf die Thoraxwand über.

Das Alveolarzellkarzinom gehört zu den diffus wachsenden Bronchialkarzinomen, die mit lediglich 3% den kleinsten Anteil ausmachen.

Histologisch unterteilt man das Bronchialkarzinom in kleinzellige (SCLC: „small cell lung cancer“) und in nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC: „non-small cell lung cancer“).

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (ca. 18% der Fälle) ist vorwiegend zentral lokalisiert und hat die schlechteste Prognose, da es in 80% der Fälle bei Diagnosestellung bereits metastasiert ist². Die Tumorverdopplungszeit beträgt nur etwa 50 Tage, woraus sich das Problem der Frühdiagnostik ergibt. Die Tumorzellen können auch parakrin aktiv sein. Je nach sezerniertem Hormon (z.B. ACTH, Calcitonin, u.a.) kann es zu paraneoplastischen Endokrinopathien führen.

Die Gruppe der NSCLC macht ca. 80% der Tumoren aus². Ca. 30% sind Plattenepithelkarzinome, welche meist zentral lokalisiert sind. Das Adenokarzinom mit einem Anteil von ca. 40% ist dagegen häufig peripher lokalisiert. Es ist die häufigste Krebsform bei Nichtrauchern; 40% aller Narbenkarzinome sind Adenokarzinome³. Eine seltene Sonderform des Adenokarzinoms ist das Alveolarzellkarzinom oder das bronchioalveoläre Karzinom. Es ist wenig sensibel gegenüber Chemotherapie und mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Das großzellige Bronchialkarzinom macht etwa 10-15% der NSCLC aus^{13, 14} und leitet sich am ehesten von entdifferenzierten Plattenepithel- oder Adenokarzinomen her.

Da bei jedem dritten Tumor verschiedene histologische Anteile in demselben Tumor kombiniert vorkommen können, findet man in der Literatur unterschiedliche Angaben über prozentuale Verteilung der einzelnen histologischen Typen.

A.I.4. Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung erfolgt beim Bronchialkarzinom nach der TNM-Klassifikation, wobei die lokale Ausbreitung des Primärtumors (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M) berücksichtigt werden. Die Stadien T1 und T2 unterscheiden sich in der Tumorgöße (kleiner oder größer 3 cm) und in der Ausdehnung bis zum Lungenhilus. T3 Tumoren infiltrieren bereits Brustwand, Zwerchfell, Perikard und mediastinale Pleura. Eine Infiltration von Mediastinum, Herz, Trachea, Ösophagus, großer Gefäße sowie maligne Ergüsse definieren das T4 Stadium. Ein Befall ipsilateraler Hiluslymphknoten und mediastinaler Lymphknoten kennzeichnen N1 und N2, während im N3 Stadium kontralaterale oder supraklavikuläre Lymphknoten befallen sind. Das Vorhandensein von Fernmetastasen oder extrathorakaler Lymphknoten definiert das M1 Stadium¹⁵. Diese einzelnen Manifestationsorte werden in einer Stadieneinteilung (St. 0 – St. IV) zusammengefasst (Abb. 1) und für die Beurteilung von Therapie und Prognose herangezogen.

St. 0:	Tis	N0	M0	St. IIIa:	T1	N2	M0
					T2	N2	M0
St. Ia:	T1	N0	M0		T3	N1	M0
St. Ib:	T2	N0	M0		T3	N2	M0
St. IIa:	T1	N1	M0	St. IIIb:	Jedes T	N3	M0
St. IIb:	T2	N1	M0		T4	Jedes N	M0
	T3	N0	M0				
				St. IV	Jedes T	Jedes N	M1

Abbildung1: UICC-Stadiengruppierung des NSCLC und SCLC (2002)

Da das kleinzellige Bronchialkarzinom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon metastasiert ist, benutzt man hier eine vereinfachte Stadieneinteilung:

Limited disease (LD; UICC-Stadien I-IIIb): Begrenzung des Tumors auf den initialen Hemithorax mit oder ohne Befall hilärer, mediastinaler oder supraklavikulärer Lymphknoten.

Extensive disease (ED; UICC-Stadien IIIB-IV): ED I: Befall wie bei LD und/oder Thoraxwandinfiltration, Pleuritis carcinomatosa, sowie Einflusstauung.

EDII: Befall der kontralateralen Lunge, maligner Perikarderguss sowie hämatogene Fernmetastasen.

A.I.5. Klinik

Im Frühstadium gibt es keine typischen klinischen Symptome. Die Erkrankung wird in der Mehrzahl der Fälle erst diagnostiziert, wenn der Tumor bereits metastasiert ist. Zu den unspezifischen Symptomen gehören Husten, Dyspnoe, Thoraxschmerz und Hämoptyse. Spätsymptome und meist Zeichen der Inoperabilität sind eine Rekurrensparese, Phrenikuslähmung, Pleuraexsudat, eine obere Einflusstauung und das Pancoast-Syndrom. Dabei arrodiiert das periphere Bronchialkarzinom der Lungenspitze die Pleurakuppe und Thoraxwand und schädigt den Halssympathikus und zervikale Nervenwurzeln.

Paraneoplastische Syndrome kommen vor allem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom vor. Dazu gehören paraneoplastische Endokrinopathien, wie das Cushing-Syndrom durch ektope ATCH-Produktion, das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH) oder Tumorhyperkalzämie durch ektope Produktion parathormonverwandter Peptide (PTHrP). Des Weiteren kommen paraneoplastische Neuropathien und Myopathien wie das Lambert-Eaton-Syndrom oder Polymyositis und Dermatomyositis vor. Bei gut 1/3 der Patienten besteht eine Thrombozytose mit Thromboseneigung.

Beim SCLC sind bei Diagnosestellung häufig schon hämatogene Fernmetastasen insbesondere in Leber, Gehirn, Nieren, Nebennieren, Lunge und Skelett vorhanden^{2, 14}.

A.I.6. Therapie

Bei der Behandlung von Patienten mit NSCLC steht die Chirurgie an erster Stelle. Bis zum Stadium IIIa wird eine chirurgische Tumorsektion mit kurativer Zielsetzung angestrebt. Der Resektion folgt dann meist noch eine adjuvante, platin-basierte Chemotherapie bis Stadium IIb, während beim Stadium IIIa zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie vorgeschaltet wird^{2, 16}. Ab Stadium IIIb steht in der Regel die palliative Therapie im Vordergrund. Die Standardtherapie besteht aus einer platin-basierten Chemotherapie, in Kombination mit einem neueren Medikament

(Paclitaxel, Docetaxel, Gemcitabin oder Vinorelbin)^{16, 17}. In ausgewählten Fällen kann eine kombinierte Radio-/Chemotherapie beim NSCLC präoperativ eingesetzt werden, um durch ein „Down-Staging“ noch eine Operabilität zu erreichen.

Das SCLC muss generell systemisch therapiert werden, da es sich bereits beim Zeitpunkt der Diagnosestellung um eine disseminierte Erkrankung handelt. Auch hier bilden platinhaltige Chemotherapieprotokolle die therapeutische Grundlage¹⁸. Kombiniert wird die platinhaltige Substanz in der Regel mit Etoposid, Adriamycin oder Doxorubicin. Alternativ ist eine Therapie mit Vincristin und Cyclophosphamid möglich^{19, 20}.

Trotz der Entwicklung neuer Zytostatika mit verbesserter Wirkung und besserer Verträglichkeit bleiben die 5-Jahresüberlebensraten von 2% bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium bislang enttäuschend niedrig¹.

A.II. Molekulare Grundlagen von Bronchialkarzinomen

Der Transformation eines normalen in einen malignen Phänotyp gehen verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen voraus, wobei jeder Schritt in einer Form von Wachstums- und/oder Überlebensvorteil für die Zelle resultiert. In der Genese von Bronchialkarzinomen werden zwanzig oder mehr molekulargenetische Ereignisse angenommen²¹, wobei Art und Reihenfolge dieser Mutationen selbst bei gleichem histologischem Phänotyp unterschiedlich sein können, so dass eine simple, lineare Pathogenese nicht angenommen werden kann^{4, 6, 22}. Zu den kritischen Veränderungen in diesem Vorgang gehören: Verlust von Tumorsuppressorgenen (TSGs), Onkogen-Aktivierung, Deregulierung von Apoptose, veränderte Angiogenese und Gewebsinvasion²³. Die Aktivierung von Onkogenen geschieht meist durch Punktmutation, Genamplifikation oder Rearrangement⁵. TSGs hingegen werden klassischerweise analog zu Knudsons „2-hit Modell“ inaktiviert. Beide Allele eines Genes müssen durch z.B. Deletion oder Punktmutationen geschädigt sein, bevor eine Tumorentstehung resultiert²⁴. Der erste Schritt besteht meist aus chromosomaler Deletion oder Translokation, wohingegen die Zweite Kopie des Allels durch Punktmutation geschädigt wird^{5, 23}. Neuere Studien zeigen weiterhin, dass epigenetische Veränderungen in TSGs ebenfalls zu deren Funktionsverlust führen können. Vor allem die Hypermethylierung in den CpG-Inseln der Tumorsuppressorgene scheint ein wichtiger Mechanismus zu sein. Er führt zu einem Stillstand der mRNA-Expression, wodurch es zu einer Inaktivierung der TSGs

kommt²⁴. Betroffen von diesen Veränderungen sind beim NSCLC vor allem die Gene für FHIT und p16²¹.

Zu den frühesten molekularen Veränderungen bei der Entstehung von Bronchialkarzinomen gehört der „loss of heterozygosity“ (LOH) auf Chromosom 3p^{25, 26}. Er wird bei 70-100% der NSCLC gefunden und scheint schon auf einer sehr frühen Stufe der Karzinogenese zu entstehen. Mit zunehmenden histopathologischen Veränderungen zeigt sich eine Zunahme bei der Frequenz und Größe des 3p Allelverlustes. Dies deutet darauf hin, dass sich auf dem Chromosom 3p mehrere TSGs befinden, die in die frühen Stadien der Karzinogenese involviert sind^{23, 26}. Zu diesen potentiellen TSG-Kandidaten gehören unter anderem das von Hippel-Lindau-Gen (3p25), der Retinoin-Säure-Rezeptor- β (RAR- β ; 3p24) und das FHIT-Gen (3p14.2)²³. Sowohl bei Patienten mit NSCLC als auch SCLC ist ein Verlust des FHIT-Gens oder seiner Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert^{27, 28, 29}.

Eine der am häufigsten angetroffenen Veränderung besteht in einer Mutation im p53-Gen auf dem Chromosom 17p13. Mutationen in diesem Gen werden in über 50% aller Malignome, in 50-60% der NSCLC und in bis zu 90% aller SCLC gefunden. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und Progression und sind mit einer schlechteren Prognose korreliert^{25, 30-32}. Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine mit p53-Mutationen assoziierte Chemotherapieresistenz³³⁻³⁵.

Das p53-Tumorsuppressorgen kodiert für ein 53 kDa nukleäres Phosphoprotein, das entscheidend für die zelluläre Antwort auf Stress ist. Unter normalen Bedingungen finden sich aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit von etwa 20 Minuten kaum messbare Konzentrationen des p53-Proteins in Zellen. Kommt es jedoch zu zellulärem Stress, wie z.B. DNA-Schäden oder die Aktivierung von Onkogenen, steigt die Konzentration von p53 rasch an und es akkumuliert im Nukleus^{25, 31}. P53 wirkt als Transkriptionsfaktor und aktiviert die Expression diverser Proteine, die in die Regulation des Zellzyklus und Apoptose involviert sind, unter anderem p21/WAF1, welches Cyclin-abhängige G1 Kinasen (cdc4) und G₂/M-spezifische cdc2 Kinasen hemmt. So nimmt p53 Einfluss sowohl auf die G1 als auch auf die G₂/M Phase des Zellzyklus^{36, 37}. Die geschädigte Zelle arretiert dann zur Reparatur der geschädigten DNA im Zellzyklus. Bei irreparablen Schäden initiiert p53 über die Expression des proapoptotischen Proteins Bax eine Signalkaskade, die im programmierten Zelltod

(Apoptose) endet (Abb. 2)^{23, 38}. Bei einer Inaktivierung oder einem Verlust von p53 kann ein genomischer Schaden bestehen bleiben, was zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt.

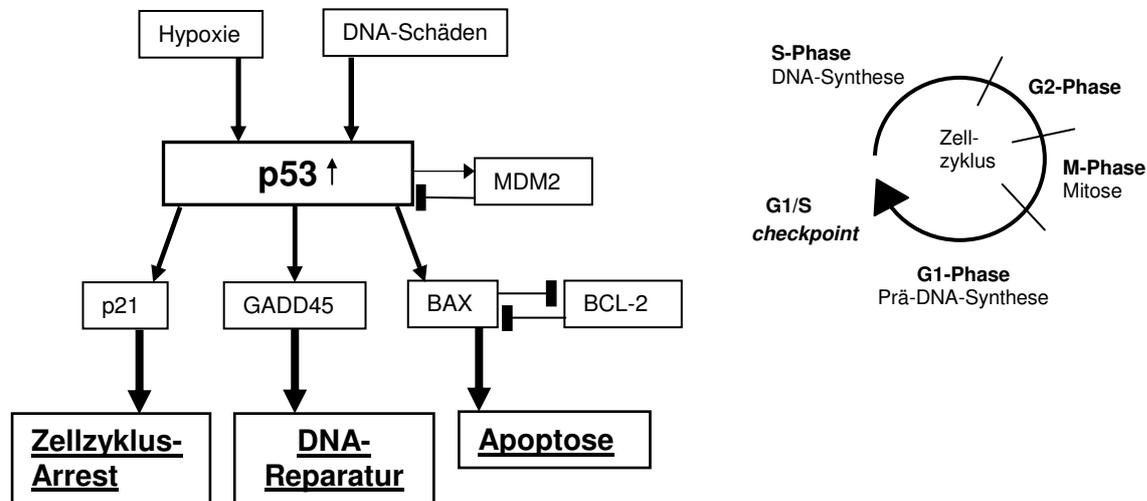


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die p53-Kaskade. Als Antwort auf zellulären Stress steigt die p53-Konzentration in der Zelle. Daraufhin induziert p53 über p21 einen Zellzyklusarrest und über GADD45 die Reparatur der geschädigten DNA. Falls der Zellzyklus schon über den G1/S Checkpoint fortgeschritten ist, oder der DNA-Schaden nicht repariert werden kann, induziert p53 BAX-vermittelt Apoptose. MDM-2, für das p53 ebenfalls als Transkriptionsfaktor wirkt, reguliert p53 über ein negatives feedback. Modifiziert nach Breuer, 2003²³.

Mutationen von p53 gehören zu den frühen Ereignissen bei der Entstehung von Bronchialkarzinomen³⁹. P53 kann einerseits durch Deletion oder Mutationen im p53-Gen, vor allem in den Exons 5 bis 8⁴⁰, andererseits auch durch Mechanismen, die die p53-Signalkaskade beeinflussen, inaktiviert werden. Die meisten dieser Missense-Mutationen betreffen die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne, wodurch die Funktion des p53-Transkriptionsfaktors beeinflusst wird³².

Die Mehrheit der Mutationen im p53-Gen wird durch Karzinogene im Zigarettenrauch, den BPDE (Benzo[a]pyren Diol Epoxid) Addukten, ausgelöst. Diese führen zu einer Veränderung der p53-DNA, wobei es zu einem Basenaustausch von Guanin (G) durch Thymin (T) kommt^{26, 31, 41}. Einige Studien haben bei Bronchialkarzinomen eine dosis-abhängige Beziehung zwischen p53-Mutationen und Rauchen gefunden, wobei die Tumoren von Patienten mit einer hohen Tabakexposition die meisten p53-Mutationen aufwiesen. Die Bronchialkarzinome von Patienten, die nie geraucht haben, weisen eine wesentlich niedrigere Frequenz von p53-Mutationen (8-26%) auf und die charakteristischen Basenaustausche von G durch T kommen praktisch nicht vor²⁵.

Die Expansion eines Zellklones innerhalb einer präinvasiven Läsion, der sich in Richtung Invasion und Metastasierung entwickelt, hängt von diversen zellulären Mechanismen ab. Potentielle Tumorzellen benötigen die Fähigkeit, den physiologischen Signalkaskaden der Apoptose zu entgehen. Normale Zellen unterliegen unter bestimmten Bedingungen wie z.B. DNA-Schäden, Aktivierung von Onkogenen oder Hypoxie der Apoptose. Die Inaktivierung von p53 und der Verlust mancher TSGs bieten sonst einen Schutz vor Apoptose. Weitere entscheidende Proteine in der apoptotischen Signalkaskade sind Bcl-2 und BAX. Unter normalen Bedingungen bilden sie ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Zelltod und Überleben. Eine Überexpression des Bcl-2 Proteins findet sich in ca. 35% der NSCLC. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis in Richtung Überleben, und die Zellen sind weniger empfindlich für apoptotische Stimuli²³. Weitere Mutationen, die regelmäßig bei NSCLC gefunden werden, betreffen den p16-cyclin D1-CDK4-RB *pathway* (50-80% der Bronchialkarzinome), der bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielt²⁴. Mutationen in der erbB-Familie und den Ras-Genen (beide zu etwa 30% vorhanden) sind ebenso wie p53-Mutationen mit einer schlechteren Prognose assoziiert^{23, 32, 42}.

Neben den Mutationen in TSGs und Onkogenen finden sich bei ca. 80% der NSCLC hohe intrazelluläre Konzentrationen von VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Dabei handelt es sich um einen Angiogenesefaktor mit einem selektiven Effekt auf vaskuläre Endothelzellen. Die Expression von VEGF wird unter anderem durch Hypoxie und durch Aktivierung von Ras-Onkogenen erhöht. Seine Überexpression ist mit einer ungünstigeren Prognose für den Patienten und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen assoziiert⁴³.

Die Überexpression des PTTG-1 (*pituitary tumor-transformation gene*) Onkogens in NSCLC stellt ebenfalls einen ungünstigen prognostischen Marker dar⁴⁴. Eine Überexpression dieses 1997 entdeckten Gens wurde neben NSCLC auch in Tumoren des Gastrointestinaltraktes, beim Mammakarzinom sowie in Leukämien und Lymphomen gefunden. Die Funktion von PTTG-1 in diesen Tumoren ist bis dato nicht vollständig verstanden⁴⁵⁻⁴⁸.

Die Identifikation dieser molekularen Veränderungen bildet die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze, wie z.B. neue Medikamente, Vakzine oder die Gentherapie, welche in die bisherigen Standardtherapien integriert werden müssen,

um die Prognose dieser bisher sehr schlecht kurativ behandelbaren Krankheit zu verbessern.

A.III. Neue Konzepte in der Behandlung von Patienten mit NSCLC

Die Erfahrungen und Ergebnisse von großen Studien, in denen Patienten mit neuen chemotherapeutischen Substanzkombinationen wie z.B. Cis- oder Carboplatin plus Paclitaxel, Docetaxel, Vinorelbin oder Gemcitabin behandelt wurden, waren enttäuschend. Keine dieser Kombinationen konnte das Gesamtüberleben der Patienten signifikant verbessern^{2, 49}. In den letzten Jahren wurden dagegen bedeutende Fortschritte in der Erforschung der Tumorbiologie erzielt und neue Substanzen entwickelt, die gezielt in molekulare Prozesse eingreifen, um so das Verhalten von Tumorzellen zu beeinflussen. Unter dem Begriff „*targeted therapy*“ versteht man Medikamente, die über einen bestimmten Mechanismus spezifisch in eine biologische Signalkaskade eingreifen und so das Tumorwachstum hemmen⁵⁰⁻⁵². Das ideale molekulare Ziel ist als eine Struktur definiert, die charakteristisch und spezifisch für den malignen Phenotyp ist und in gesundem Gewebe bestenfalls nicht vorhanden ist. Im Falle der Hemmung dieser Struktur sollte es zu einer Unterbrechung des Tumorwachstums kommen und somit zu einer Verbesserung des Überlebens für den Patienten⁵².

Zu diesen neuen therapeutischen Ansätzen gehören **Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren** wie z.B. Erlotinib (Tarceva), der selektiv die Tyrosinkinase-Aktivität des *epidermal growth factor receptors* (EGFR) hemmt. Durch kompetitive Inhibition von ATP wird eine intrazelluläre Signalübertragung unterbrochen und die Tumorzellproliferation, Angiogenese-Induktion und Metastasierung induziert⁵³⁻⁵⁶. In einer Phase-III-Studie mit 731 Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC zeigte Erlotinib eine Ansprechrate von 8,9% und ein Überleben von 6,7 Monaten, im Gegensatz zu 4,7 Monaten in der Placebo-Kontrollierten Vergleichsgruppe⁵⁷.

Ab einer Größe von etwa 2 mm sind Tumoren auf die Neubildung von Gefäßen angewiesen, um eine optimale Blutversorgung zu gewährleisten⁵⁸. Diese Neovaskularisation stimuliert Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung. In prospektiven und retrospektiven Studien scheint der Umfang der Angiogenese bei Bronchialkarzinomen eine wichtige Rolle für die Prognose und das Überleben zu spielen⁵⁹. Ein wichtiger Stimulator der Angiogenese als Antwort auf Hypoxie ist VEGF. Er ist einer der am häufigsten hochregulierten Angiogenesefaktoren in vielen

Tumoren, weshalb er ein geeignetes Ziel für eine **antivaskuläre Therapie** durch VEGF-Antikörper darstellt. Bevacizumab (Avastin) ist ein solcher anti-VEGF-Antikörper, der in einer Phase-II/III-Studie positive Resultate in Kombination mit einer Chemotherapie bestehend aus Carboplatin und Paclitaxel zeigte. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die nur mit Carboplatin und Paclitaxel behandelt wurde, führte die zusätzliche Behandlung mit Bevacizumab zu einem signifikant verlängerten medianen Überleben (12,5 Monate gegenüber 10,2 Monate), einer erhöhten Ansprechrquote von 27% gegenüber 10% in der Kontrollgruppe, und zu einem längeren progressions-freien Überleben (6,4 gegenüber 4,5 Monate)⁶⁰.

Ein weiteres viel versprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Krebstherapien stellt die ras/MAPK Signalkaskade dar. Ras ist ein Membranprotein, das bei der Zellproliferation, Differenzierung, Zellzyklus-Regulation und Angiogenese involviert ist. Es wird als pro-ras Protein synthetisiert und unterliegt einigen posttranslationalen Modifikationen, deren Schlüsselenzym die Farnesyl-Transferase darstellt⁵⁵. Die **Farnesyl-Transferase-Inhibitoren** Tipifarnib (Zarnestra) und Lonafarnib (Sarasar) sind Gegenstand aktueller Studien, wobei Lonafarnib Vorteile in der Kombination mit Taxanen bei Patienten mit taxanrefraktären NSCLC zeigte^{55, 59}.

A.III.1. Proteasomen-Inhibitoren

Die Tumorentstehung ist durch abnorme Antworten auf zelluläre Signale, die das Zellwachstum, Differenzierung, Funktion und programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren, charakterisiert. Diese Prozesse werden durch Transkription, Translation und Degradation von Proteinen reguliert, so dass eine Dysregulation in einer dieser Signalkaskaden zur Tumorentstehung führen kann^{61, 62}.

Bisher wurden zwei wesentliche Mechanismen für die Degradation von Proteinen charakterisiert: Lysosomen und Proteasomen. Lysosomen sind membrangebundene zelluläre Organellen, die für die Degradation von extrazellulären und transmembranösen Proteinen zuständig sind. Proteasomen hingegen bauen intrazelluläre Proteine ab. Diese Degradation von Proteinen ist entscheidend für die Integrität der normalen Zellfunktionen^{61, 63}. Zu den typischen Substraten der Proteasomen gehören Tumorsuppressoren, Zell-Zyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren und anti-apoptische Moleküle, die in vielen Tumoren dysreguliert sind⁶³⁻⁶⁶. Eine Hemmung der Proteasomen kann zu einer Änderung der

Balance zwischen pro- und antiapoptischen Signalen führen und so Apoptose induzieren oder die Sensitivität von Zellen für Apoptose erhöhen^{63, 67}.

a. Aufbau und Lokalisation des 26S Proteasoms

Das funktionell aktive 26S Proteasom ist ein 2,4 MDa großer, ATP-abhängiger proteolytischer Komplex im Zytoplasma und Nukleus von eukaryotischen Zellen^{61, 66}.

Es besteht aus einem katalytischen 20S Kernkomplex mit jeweils einer regulierenden 19S Untereinheit an beiden Enden (Abb. 3)^{63, 65, 67}. Das Proteasom identifiziert Proteine, die durch Polyubiquitinierung für die Degradation markiert sind^{61, 68, 69}.

Der 20S Kernkomplex besteht aus 28 Proteinuntereinheiten, die aus 4 übereinander liegenden Ringen das zylindrische proteolytische Zentrum bilden. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus 7 α -Untereinheiten. Die zwei inneren Ringe bestehen aus 7 β -Untereinheiten und beinhalten die drei enzymatisch aktiven Anteile des Proteasoms, welche nach ihrer „Trypsin-artigen“, „Chymotrypsin-artigen“ und „Post-Glutamyl Peptid Hydrolase-artigen“ Aktivität benannt sind^{64, 65, 70}.

Der regulatorische 19S Komplex ist ein 700 kDa Komplex aus 20 Polypeptid-Untereinheiten, die an beiden Enden des 20S Komplexes binden und so das 26S Proteasom bilden^{61, 65}.

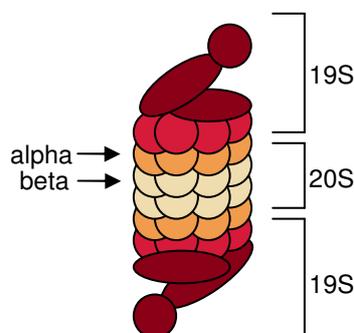


Abbildung 3: Aufbau des 26S Proteasoms: der 20S-Komplex besteht aus zwei alpha- und zwei beta-Untereinheiten; an beiden Enden befindet sich die 19S Untereinheit. Modifiziert nach Adams, 2004⁶¹.

b. Der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib

Aufgrund der bedeutenden Rolle von Proteasomen in der Regulation von Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung und Wachstum von Zellen wurden sie zu einem interessanten Ziel für neue Strategien in der Tumorthherapie⁷¹. Es wurden verschiedene Proteasomen-Inhibitoren entwickelt, von denen sich Bortezomib (PS-341, Velcade) in der Tumorthherapie als am effektivsten herauskristallisierte⁶⁸. Bei Bortezomib handelt es sich um ein Borsäure-haltiges Dipeptid, welches die Aktivität des Proteasoms selektiv und reversibel mit einer Halbwertszeit von 24 h inhibiert,

indem es an der chymotrypsin-artigen Stelle der 20S Untereinheit des Proteasoms bindet (Abb. 4). Nach 72-96 h ist die Aktivität des Proteasoms weitgehend wieder hergestellt^{61, 62, 67}.

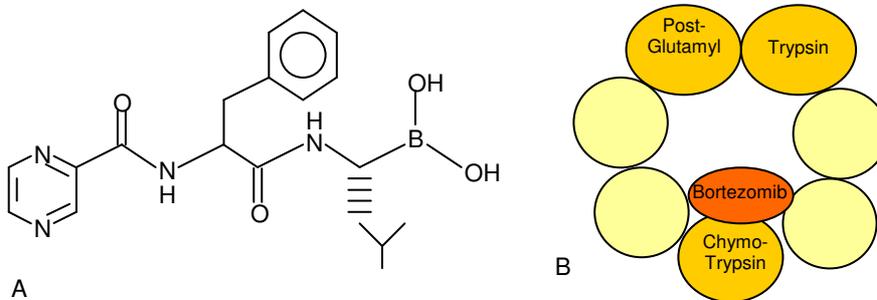


Abbildung 4: A. Strukturformel von Bortezomib. B. Schematischer Querschnitt durch das 26S Proteasom: Bortezomib bindet reversibel an der chymotrypsinartigen Aktivität des Proteasoms. Modifiziert nach Adams 2003a⁶³.

Die Inaktivierung von Bortezomib erfolgt über die Abspaltung eines Boratoms mittels Enzymen des Zytochrom-P450 Systems (insbesondere CYP3A4 und -2C19)⁶⁵. Die inaktiven Metabolite werden anschließend hepatisch und renal eliminiert. In Zellkulturversuchen zeigte Bortezomib eine Steigerung der Apoptoserate bei hämatologischen und soliden Malignomen, wie z. B. Multiples Myelom, Lymphom, NSCLC, Ovar-, Pankreas-, Prostata-, Kolon-, Mamma- und Kopf- und Halstumoren sowie beim malignen Melanom^{61, 66, 67}. Da die unterschiedlichen Malignome verschiedene Mutationen und Störungen der normalen Zellfunktion aufweisen und trotzdem Proteasomen-Inhibitoren überall wirken, sind die genauen Wirkmechanismen der Proteasomen-Inhibitoren immer noch unklar⁶⁵. Die Abb. 5 gibt einen Überblick über die wichtigsten Effekte, die sich durch die Proteasomen-Hemmung mit Bortezomib ergeben.

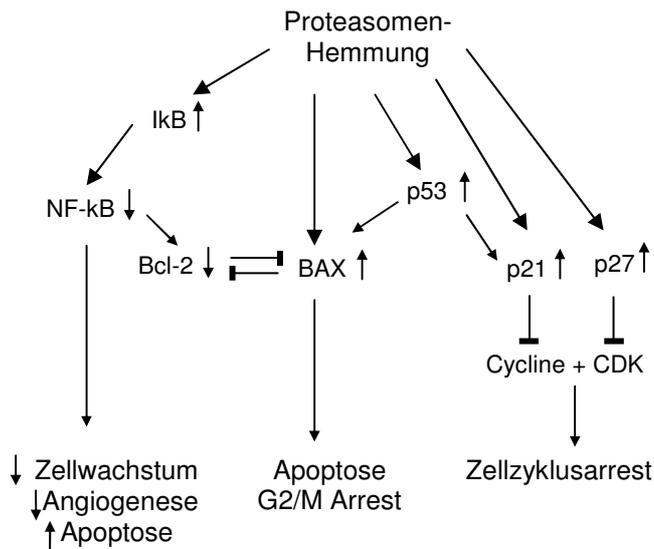


Abbildung 5: Effekte von Bortezomib auf den Zellstoffwechsel. Über eine Hemmung des NF-κB und eine erhöhte p53-Konzentration kommt es zu einem Anstieg der Apoptoserate. Einerseits wird der Abbau von p21 und p27 direkt gehemmt, andererseits induziert p53 die Expression dieser Proteine. Sie hemmen Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen, wodurch es zu einem Arrest des Zellzyklus kommt^{62, 63, 66}.

Die NF-κB Familie repräsentiert eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die an ihr Inhibitorprotein IκB gebunden sind, wodurch sie inaktiv sind⁷². Stimulation von Zellen durch Chemotherapie, Bestrahlung, Viren, Cytokine, Antigene oder Oxydantien initiiert eine Kaskade, die zur Degradation von IκB durch das 26S Proteasom führt^{64, 68}. Das nun freie und somit aktive NF-κB transloziert in den Nukleus, wo es die Transkription von Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle, Angiogenesefaktoren und anti-apoptotische Faktoren (z. B. BCL2) aktiviert^{67, 69}. Dies führt zum Zellwachstum, Differenzierung und Hemmung von Apoptose. In vielen Malignomen besteht eine dysregulierte NF-κB-Aktivität, die mit einer herabgesetzten Effektivität antitumorale Therapie und Bestrahlung oder sogar Resistenz gegenüber diesen korreliert ist^{73, 74}. Durch die Hemmung der Proteasomen kommt es zur Stabilisierung von IκB, wodurch die NF-κB-Aktivität gehemmt wird. Dies führt zu einer verringerten Expression verschiedener Wachstums-, Überlebens- und Angiogenesefaktoren und so zur Apoptoseinduktion^{61, 65}. Die mit NF-κB assoziierte Resistenz von Tumorzellen auf Chemotherapeutika kann durch die Proteasomen-Hemmung und der somit herabgesetzten NF-κB-Aktivität umgangen werden^{69, 70}. Durch das somit verbesserte Ansprechen von Tumoren auf Chemotherapeutika ist es möglich, die einzelnen Substanzen in niedrigerer, weniger toxischer Dosis einzusetzen⁶⁶.

Im Vergleich zu normalen Zellen zeigen maligne Zellen eine erhöhte Sensitivität für die Proteasomen-Blockade^{69, 70}. Die meisten malignen Zellen proliferieren schneller und haben einen oder mehrere aberrante Zellzyklus-„Checkpoints“. Dadurch können defekte Proteine in einer viel höheren Konzentration als in normalen Zellen

akkumulieren, was in einer zellulären Dysfunktion und einer Triggerung von Apoptose resultiert⁶¹. Eine weitere Erklärung ist die Tatsache, dass eine Hemmung der Proteasomen-Aktivität eine Umkehrung oder Umgehung einiger Mutationseffekte in Zellzyklus- oder Apoptose-„Checkpoints“, die zur Tumorgenese führen, verursacht⁶⁸.

Neben den zytotoxischen Effekten auf die verschiedenen Tumortypen zeigte sich eine erhöhte Empfindlichkeit von Tumorzellen auf die Kombination von Bortezomib mit anderen Chemotherapeutika oder Bestrahlung^{63, 75}. Viele Tumoren werden durch die Expression des MDR1 (*multi drug resistance*) Gens resistent gegen die konventionellen Chemotherapeutika. Dieses Gen kodiert ein Transporterprotein, P-Glykoprotein (P-Gp), welches intrazelluläre Toxine aus der Zelle pumpt. Die Bildung von funktionstüchtigem, reifen P-Gp durch posttranslationale Modifikation ist Proteasomen-abhängig, so dass eine Hemmung der Proteasomen-Funktion zu einer Akkumulation von nicht funktionstüchtigem P-Gp führt⁷⁶.

In der klinischen Anwendung zeigte sich eine gute Verträglichkeit von Bortezomib. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Übelkeit und Erbrechen, Diarrhö, Fatigue, Thrombozytopenie, periphere Neuropathie, Anämie und Fieber. Das Auftreten von Grad 4 Nebenwirkungen war relativ gering und konnte mit den Standardtherapien behandelt werden⁷⁷. Es zeigten sich keine pharmakologischen Interaktionen mit anderen Chemotherapeutika und keine additiven toxischen Effekte, so dass die Dosis der Einzelsubstanzen nicht vermindert werden musste⁶⁹.

Basierend auf den viel versprechenden Ergebnissen von Phase-I und –II-Studien wurde Bortezomib 2003 in den USA für die Behandlung des nach zumindest zwei Regimen Vortherapie rezidivierten Multiplen Myeloms zugelassen⁶¹. 2004 erfolgte die Zulassung für diese Indikation dann in Europa. Aktuell wird die Wirksamkeit von Bortezomib als Monotherapie sowie in verschiedenen Kombinationen bei diversen soliden Tumoren wie z.B. SCLC, NSCLC, Lymphomen, Sarkomen, Kolon-, Mamma- und Prostatatumoren untersucht^{61, 62 77-81}.

A.III.2. Gentherapeutische Ansätze beim NSCLC

Eine weitere Behandlungsmodalität bei Tumorerkrankungen stellt die Gentherapie dar. Dabei wird versucht, eine Krankheit durch das Einschleusen eines Gens zu behandeln. Die Wirksamkeit der Gentherapie basiert auf folgenden Elementen: das Gen muss das Zielgewebe erreichen, es muss in adäquaten Konzentrationen

exprimiert werden, die Toxizität soll gering sein und der Patient muss von der Anwendung profitieren⁸². Neben dem Gen und dem Zielgewebe wird noch ein Vektorsystem benötigt, mit dessen Hilfe das genetische Material in die Zielzelle gelangt. Bei den meisten Vektorsystemen handelt es sich um Viren, meist Retro- oder Adenoviren.

Auch wenn die Entstehung von Tumoren häufig nicht nur auf einem einzigen genetischen Fehler beruht und es unwahrscheinlich erscheint, dass der Ersatz eines Gendefektes das Tumorstadium vollständig hemmt, stieg die Zahl von Studien, die einen gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren verfolgen. Ende 2002 waren 25 Studien, in denen Tumorsuppressorgene ersetzt werden sollten, offen für einen Rekrutierungsbeginn, davon 9 Studien in Phase II oder III⁸². Diese Studien zeigten eine gute Verträglichkeit und Anzeichen einer Tumorregression oder Stabilisierung. Zusätzlich konnte der Ersatz einiger Gene die Sensibilität für konventionelle Therapien erhöhen⁵⁹.

Ein besonders interessanter Kandidat stellt das bereits dargestellte p53-Gen dar, welches in NSCLC und in vielen anderen Tumoren Mutationen aufweist. Es wurden verschiedene Studien initiiert, in denen das wt-p53 mit Hilfe viraler Vektoren in Bronchialkarzinomen reexprimiert wurde, einige davon in Kombination mit Bestrahlung oder Chemotherapie⁸²⁻⁸⁴. Weitere Studien untersuchten die Wirkung der p53-Expression nach Gentransfer bei Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses, wo ebenfalls eine sehr geringe Toxizität beobachtet wurde. 10% der Patienten zeigten eine komplette oder partielle Remission und bei 60% ergaben sich Hinweise für eine antitumorale Aktivität⁸².

A.IV. Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviren. Sie sind mit 20-26 nm Durchmesser einer der kleinsten Viren (Abb. 6). Sie haben einen ikosaedrischen Aufbau, keine Hülle und besitzen eine einzelsträngige DNA (ssDNA) als Genom, welches 4,7-6 kb groß ist. Parvoviren wurden von vielen Spezies isoliert, angefangen bei Insekten über Vögel bis hin zu Menschen⁸⁵.

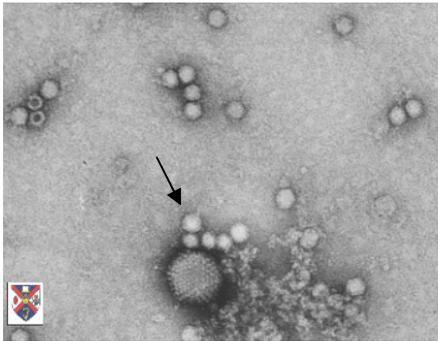


Abbildung 6: Elektronenmikroskopisches Bild von adeno-assoziierten Viren (Pfeil). Bei dem größeren Virus in der unteren Bildmitte handelt es sich um eine Adenovirus.

Quelle: Queen's University of Belfast, Homepage der Veterinary Sciences, freundlicherweise von Prof. Stewart McNulty zur Verfügung gestellt. (www.qub.ac.uk/afs/vs/vsd6e.html)

Das AAV wurde der Gattung der Dependoviren zugeordnet, da es für eine produktive Infektion von Zellen die Anwesenheit eines Helfer-Virus benötigt, wobei es sich meist um ein Adeno- oder Herpesvirus handelt. Bisher wurden 6 Serotypen des humanen AAV identifiziert, von denen der Serotyp 2 (AAV-2) den am besten untersuchten darstellt. Etwa 80% der erwachsenen Bevölkerung sind seropositiv für AAV, bisher wurde das Virus jedoch noch nie mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht, weder beim Menschen noch bei irgendeiner anderen Spezies^{85, 86}.

Es existieren zwei verschiedene Phasen des AAV-Lebenszyklus. Ohne Koinfektion mit einem Helfervirus wird das virale Genom in das Genom der Wirtszelle integriert, beim Menschen bevorzugt in den langen Arm von Chromosom 19, woraus eine latente Infektion resultiert. In der lytischen Phase ist die zeitgleiche oder im Intervall erfolgte Koinfektion mit einem Adeno- oder Herpesvirus nötig, damit es zu einer Replikation der AAV kommt. Bei einer Koinfektion mit einem Helfervirus werden auch diejenigen Proteine exprimiert, die eine notwendig zur Produktion von AAV-Virionen sind⁸⁵.

A.IV.1. Das Genom von AAV-2

Das Genom des AAV-2 ist ein einzelsträngiges lineares Molekül, das 4680 Nukleotide lang ist und zwei identische Repeat-Sequenzen an beiden Enden hat, die als sog. *inverted terminal repeats* (ITR) bezeichnet werden⁸⁷. Des Weiteren enthält das Genom von AAV-2 zwei sog. *open reading frames* (ORFs), welche die *rep* und *cap* Gene enthalten. Das *cap* Gen kodiert drei Kapsidproteine (VP1, 2 und 3), die für den Transport des Virus in den Nukleus verantwortlich sind⁸⁸. Das *rep* Gen kodiert für vier nicht-strukturelle Proteine (Rep 78, 68, 52 und 40), die eine wichtige Rolle in der Replikation der Virus-DNA und bei der Regulation der Genexpression spielen. Von der Anwesenheit der Rep 78/68 Proteine hängt die spezifische Integration der AAV-DNA in Chromosom 19 ab^{86, 87}.

A.IV.2. Rekombinante adeno-assoziierte Viren

Ein geeigneter Kandidat für die Anwendung in der Gentherapie stellen rekombinante AAV-2 (rAAV-2) dar. Im Gegensatz zu den AAV-2-Vektoren haben sie die Fähigkeit verloren, sich spezifisch in das Wirtsgenom zu integrieren, da ihnen die dafür notwendigen *rep* und *cap* Gene fehlen. Aus den fehlenden *rep* und *cap* Genen ergibt sich ein weiterer Vorteil: die bisher recht kleine Kapazität für therapeutische Gene hat sich im Vergleich zu dem Wildtyp-Genom um bis zu 119% vergrößert⁸⁹. rAAV-2 sind in der Lage, sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen zu infizieren^{85, 86}. Da in einem Tumor von den ruhenden Zellen, die oftmals von Chemotherapeutika nicht erreicht werden, stets die Gefahr eines Rezidivs ausgeht, stellen diese einen wichtigen Angriffspunkt der viralen Gentherapie dar. Des Weiteren können sie eine breite Palette an Wirtszellen infizieren und der rAAV-2-vermittelte Gentransfer führt zu einer lang dauernden Transgenexpression^{90, 91}.

A.IV.3. AAV-2-Vektoren in der Gentherapie

Die Einsatzmöglichkeiten von AAV-2-Vektoren in der Gentherapie wurden bei vielen Tumorerkrankungen^{82, 92-95}, bei Stoffwechselerkrankungen wie z. B. Typ-1 Diabetes^{96, 97}, M. Pompe⁹⁸, M. Gaucher⁹⁹ und Zeroidlipofuszinose¹⁰⁰, bei degenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer¹⁰¹, M. Parkinson¹⁰² und degenerativen Retinaerkrankungen¹⁰³ untersucht. In der Therapie der zystischen Fibrose^{104, 105} und der Hämophilie B¹⁰⁶ haben sie schon Einzug in klinische Phase-II-Studien gehalten. Diese Studien lieferten ermutigende Ergebnisse, da die Vektoren gut vertragen wurden und es durch eine nachweisbare Genexpression zu einer klinischen Verbesserung der Patienten kam.

A.IV.4. Problem der Quantifizierung von rAAV-2-Partikeln

Für die Quantifizierung von genomischen rAAV-2-Partikeln sind diverse Methoden beschrieben worden, wie z.B. Capsid ELISA oder qPCR¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Da aber bei der Herstellung von rAAV-2-Vektoren infektiöse zu genomischen Partikeln, die lediglich die rAAV-DNA enthalten und nicht infektiös sind, in einem Verhältnis von 1:56 bis 1:1000 entstehen^{108, 111}, ist die Kalkulation von infektiösen Partikeln für den klinischen Einsatz und der Vergleich von Ergebnissen zwischen verschiedenen Laboratorien nur begrenzt möglich. Daher ist die Quantifizierung von *infektiösen*

Partikeln nötig. Diese Methoden basieren auf Verdünnungs-Replikations-Assays inklusive der Superinfektion mit einem Adenovirus oder Wildtyp-AAV-2, oder verwenden transfizierte Helferzelllinien, gefolgt von Dot-Blot oder PCR-Analysen. Dabei werden zuerst Zellen mit der zu bestimmenden Viruspräparation und einem Helfervirus infiziert. Alternativ können Helferzelllinien, meistens HeLa, die die *rep-cap* Sequenzen des AAV-2-Genoms stabil integriert enthalten, verwendet werden, damit auf den Einsatz eines Helfervirus verzichtet werden kann. Anschließend wird die Virus-DNA bei einer Dot-Blot-Analyse auf einer Membran fixiert („geblotted“) und mit transgenspezifischen, fluoreszierenden Proben hybridisiert, die dann als sog. Spots auf einem Film sichtbar gemacht werden können¹¹³. Im Falle einer *real-time* PCR-Analyse wird das rAAV-2-Genom mit transgenspezifischen Primern amplifiziert. Die Intensität der erhaltenen Signale lässt dann auf die Anzahl der rAAV-2-Genome in den Zellen und somit auf die Anzahl an infektiösen Partikeln schließen¹¹⁴. Obwohl sich diese Methoden vielfach bewährt haben, können sie durch den verwendeten Helfervirus, die Zelllinie, die für die Infektion verwendet wurde und die Wahl des Promotors oder des Transgens beeinflusst werden, was zu signifikanten Unterschieden in den gemessenen rAAV-2-Titern führt¹⁰⁷. Fluoreszenzbasierte Methoden können zwar auch für die Messung von infektiösen Partikeln verwendet werden, eignen sich aber nur für solche rAAV-2, die ein fluoreszierendes Markerprotein besitzen⁸⁹.

A.V. Ziel dieser Arbeit

Aufgrund des viel versprechenden Einsatzes von rekombinanten adeno-assoziierten Viren in der somatischen Gentherapie und den bisher unbefriedigenden Methoden zur Quantifizierung der viralen Partikel ergab sich die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit. Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Titration von infektiösen rekombinanten AAV-2-Partikeln auf der Basis einer qPCR. Zur Validierung dieser Methode wurden die Ergebnisse mit anderen Standardmethoden verglichen. Das Ziel des zweiten Teils bestand in der Verwendung des etablierten Assays zur Titration von rAAV-p53-Partikeln, die für funktionelle Tests eingesetzt werden sollten. Dabei beschäftigte ich mich mit den Effekten einer kombinierten Behandlung von NSCLC Zelllinien mit rAAV-2 vermitteltem p53-Gentransfer und dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib. Mittels Viabilitäts-Test, *Colony long-term assay*, Apoptose-ELISA und Western Blot wurden die Effekte auf NSCLC Zelllinien nach verschiedenen Behandlungsschemata mit rAAV-p53 und Bortezomib untersucht. Das ultimative Ziel meiner Arbeit war es, die wissenschaftliche Grundlage für eine effizientere Gentherapie des Bronchialkarzinoms durch eine viral bedingte Erhöhung der wt p53 Expression in Kombination mit einer Hemmung des Abbaus durch Proteasomen-Inhibitoren in den Tumorzellen zu erreichen. Inwieweit sich die dadurch erzielte höhere Apoptoserate auch in einen klinischen Kontext übertragen lässt, wird abschließend diskutiert werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

Sämtliche Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, über die Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland, bezogen.

B.I. Zelllinien und Zellkultur

B.I.1. Zellen

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet: HEK 293T (humane embryonale Nierenzellen), HeLa-Zellen (epitheliales Zervixcarzinom), T47D (duktales Mammakarzinom) und H1299 sowie H460 (beides Zelllinien eines großzelligen Bronchialkarzinoms). Sämtliche Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Opalka, Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt.

B.I.2. Zellkultur

Die kryokonservierten Zellen wurden, sobald sie aufgetaut waren, in 10 ml Medium aufgenommen und bei 1200 U für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 7 ml frischem Medium resuspendiert und mit dem Medium in eine 75 ml Kulturflasche (Greiner, Solingen, Deutschland) überführt. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel des Mediums. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Hera Cell, Heraeus) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Die HeLa-, T47D- und die H1299-Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit folgenden Zusätzen kultiviert: 10% hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories, Linz, Österreich), 2mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für die 293T-Zellen wurde DMEM mit denselben Zusätzen verwendet. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90% erreicht hatten, wurden sie nach Trypsinierung passagiert. Dazu musste das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Trypsin-EDTA Solution überschichtet im Brutschrank bei 37 °C inkubiert werden. Die Zugabe von 3,5 ml Medium inaktivierte das Trypsin. Die Zellen wurden durch sorgfältiges Mischen in Suspension gebracht und bei 1200 U für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 1,5 ml wieder in eine 75 ml Kulturflasche mit 6 ml frischem Medium überführt und weiter kultiviert.

B.I.3. Mykoplasmen-Test

Vor Verwendung der Zellen wurde ein PCR-Test auf Mykoplasmen durchgeführt (Mycoplasma PCR ELISA, Roche, Penzberg, Deutschland). Die nach Herstellerangaben gewonnenen PCR-Produkte wurden mittels einer 1,5%igen Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Hierzu mussten 1,6 g Agarose (Gibco BRL, Paisley, Schottland) zu einem Endvolumen von 100 ml in 1x TBE Puffer (5x Ansatz: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA auf 2 Liter destilliertes Wasser) durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät gelöst und in eine Gelkammer gefüllt werden. 20 µl PCR-Produkt wurden mit 4 µl 6x Auftragspuffer (Blue/Orange Loading Dye 6x, Fa. Promega, Madison, USA) versetzt und auf das verfestigte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit TBE-Puffer bei 120 V etwa 1,5 Stunden lang.

Anschließend wurde das Agarosegel für eine Stunde in ein Wasserbad aus 600 ml destilliertem Wasser und 60 µl Ethidiumbromid gelegt, um die PCR-Produkte zu färben. Um den Kontrast der Banden zu erhöhen, wurde das Gel für 30 Minuten in Wasser entfärbt und danach unter UV-Licht betrachtet und abgelichtet.

Dieser Test wurde jedes Mal nach dem Auftauen neuer Zellen und in monatlichen Abständen bei den in Kultur befindlichen Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden nur bei negativem Ergebnis für die weiteren Versuche verwendet.

B.II. Produktion von rAAV-2-Partikeln

B.II.1. Die Plasmide

Für die Produktion von rAAV-2 wurden drei verschiedene Plasmide verwendet, das pAAV-gfp-AR6-Plasmid⁸⁹, das Vektorplasmid pAAV-p53⁹⁰ sowie das Helferplasmid pDG¹¹⁵.

Das pAAV-GFP-AR6-Plasmid wurde freundlicherweise von Andrea Hörster (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Das 6889 Basenpaare lange pAAV-GFP-AR6 enthält das Gen für das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) und die gegen HIV-1 gerichtete Antisense Sequenz AR6 unter der Kontrolle eines CMV-Promoters (*immediate early human CMV promoter*). Zur Selektion befindet sich auf dem Plasmid ein Ampicillinresistenzgen unter der Kontrolle eines bakteriellen Promoters. Des Weiteren befinden sich auf dem Plasmid DNA-Sequenzen des Affenvirus SV40 und ein Polyadenylations-Signal, das von den *inverted terminal repeats* (ITRs) des AAV-Klons psub201 begrenzt wird (Abb. 7)¹¹⁶.

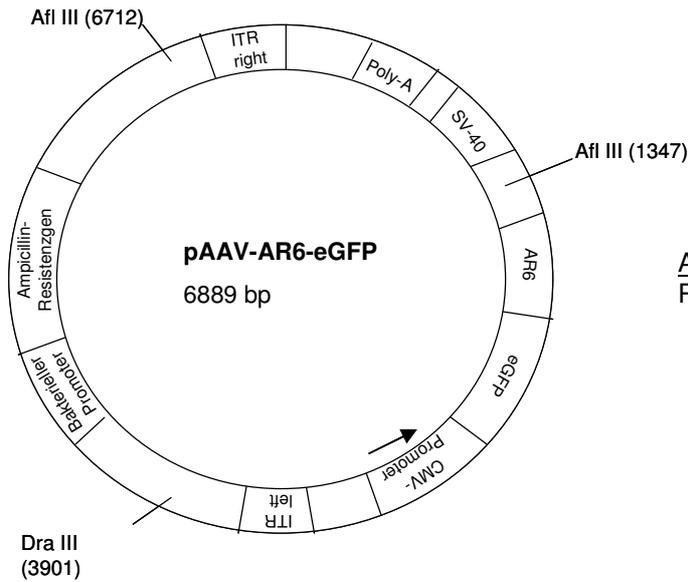


Abbildung 7: Schematische Darstellung des eGFP-Plasmids

Das pAAV-p53-Vektorplasmid für die Herstellung der rAAV-p53-Vektoren wurde von Susanne Stahn (Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) aus dem pAAV-gfp-AR6-Plasmid konstruiert⁹⁰. Das neue 6733 Basenpaare lange Vektor Plasmid pAAV-p53 enthält die Gene für wt-p53 unter der Kontrolle des CMV-Promoters, DNA-Sequenzen des Affenvirus SV40 und ein Polyadenylations-Signal, umgeben von den ITR-Sequenzen von AAV-2 (Abb. 8).

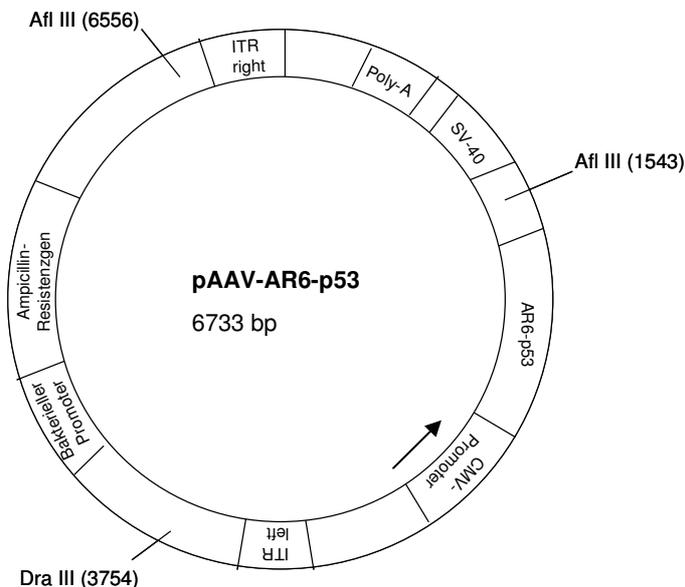


Abbildung 8: Schematische Darstellung des p53-Plasmids

Das pDG Helferplasmid mit einer Länge von 35,2 Kilobasen enthält die AAV-2-Wildtyp Gene *rep* (Replikationsgen) und *cap* (Kapsidstrukturgen) sowie alle

adenoviralen Gene (E2A, E4, AV), die nötig sind, um rAAV-2-Partikel zu produzieren⁹⁰. Auch auf diesem Plasmid befindet sich ein Ampicillinresistenzgen (Abb. 9).

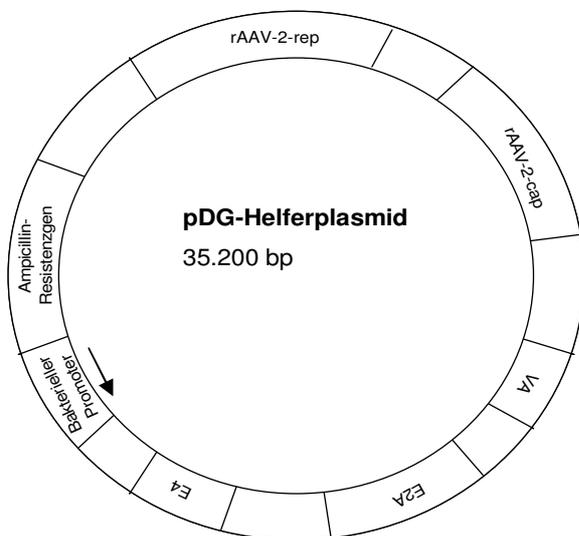


Abbildung 9: Schematische Abbildung des pDG-Helferplasmids

B.II.2. Plasmid-Isolation

Die Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli* Bakterien überführt¹¹⁷ und diese anschließend bei -80 °C gelagert. Um die Plasmide zu isolieren, wurde eine Nadelspritze tief gefrorener Bakterien für 24 h bei 37 °C in 5 ml modifizierten LB-Medium (10 g Trypton Pepton, 5 g Yeast Extract, beides DIFCO, BD, USA, 5 g NaCl und 50 mg Ampicillin als Selektionsantibiotikum in 1 l A. dest.) kultiviert. Durch das Selektionsantibiotikum konnten nur die Bakterien wachsen, die über das Ampicillinresistenzgen verfügen. Nach 24 h wurde die Bakterien-Lösung in zwei Erlenmeyer-Kolben mit jeweils 500 ml LB-Medium überführt und wiederum für 24 h bei 37 °C inkubiert. 24 h später konnten die Plasmide aus den Bakterien mit dem Qiafilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert werden. Die Konzentration der so gewonnenen Plasmide wurde photometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Deutschland) gemessen und mit A. dest. auf 1000 ng/µl eingestellt. Zur Kontrolle, ob die Plasmid-Isolation erfolgreich war, erfolgte eine enzymatische Spaltung der Plasmide mit Restriktionsendonukleasen (New England BioLabs, UK). Für einen Ansatz mit 50 µl wurden 5 µl 10 x Puffer (BioLabs), 0,5 µl BSA, 0,5 µg Plasmid-DNA und jeweils 1 µl Enzym verwendet und der Ansatz anschließend auf 50 µl mit A. dest. aufgefüllt. Die Plasmide wurden bei 37 °C für eine Stunde mit den Enzymen inkubiert und die Fragmente danach mittels

einer 1%igen Agarosegel-Elektrophorese, die wie unter 1.3 beschrieben durchgeführt wurde, aufgetrennt. Da die Schnittstellen der Restriktionsenzyme bekannt waren, konnten die Plasmide durch die Bestimmung der Größe ihrer Restriktionsfragmente identifiziert werden. Für das Helferplasmid pDG wurden die Enzyme *Xho1* und *BamHI* jeweils getrennt voneinander verwendet. Dabei ergaben sich für *Xho1* folgende Größen der Spaltstücke: 11,41; 0,39; 5,05; 4,60; 2,50; 1,40; 0,70 und 0,18 kb. Die Spaltstücke des Enzyms *BamHI* waren 16,60; 16,40; 1,60; 0,48 und 0,18 kb groß. Für die Spaltung der rAAV-GFP-AR6- und rAAV-p53-Plasmide wurden die Enzyme *Dra3* und *Afl3* gemeinsam verwendet. Durch die Schneiden des rAAV-GFP-AR6-Plasids erhielt man folgende Restriktionsfragmente: 2,81; 2,66 und 1,41 kb. Für das rAAV-p53-Plasmid ergaben sich Fragmente von 2,81; 2,20 und 1,72 kb Größe.

B.II.3. Produktion und Aufreinigung der rekombinanten AAV-2-Vektoren

Für die Herstellung eines rAAV-2-Vektor-Vorrates wurden 1×10^7 293T-Zellen in 25 ml DMEM in einer Zellkulturschale (Greiner) ausgesetzt und am nächsten Tag mit 20 µg Vektorplasmid rAAV-GFP-AR6- bzw. rAAV-p53 und 20 µg pDG-Helferplasmid mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation cotransfiziert. Pro Kulturschale wurden 2 ml Transfektionspuffer mit folgenden Zusätzen verwendet: 860 µl A. dest., 1000 µl HBS-Puffer (50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 und 380 mM NaCl), jeweils 20 µg pDG-Helferplasmid und entsprechendes rAAV-Plasmid sowie 100 µl CaCl_2 . Der Transfektionspuffer wurde tropfenweise auf der Kulturschale verteilt und die Schale für 10 Minuten nicht bewegt, um die instabilen, membrangängigen CaCl_2 -DNA-Komplexe nicht zu zerstören. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgten ein Mediumwechsel sowie eine Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop. Bei GFP-transfizierten Zellen konnte nach 24 Stunden der Erfolg der Transfektion gesehen werden, da die Zellen sich im Fluoreszenzmikroskop grün darstellten. Nach weiteren 48 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen geerntet. Dazu musste das Medium abgenommen und mit 400 µl HEPES versetzt werden. Die Ablösung der Zellen aus der Schale erfolgte mit einem sterilen Schaber (BD, USA), verbliebene Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml der HEPES-Medium-Lösung ebenfalls abgeschabt. Nach der Ernte wurden die Zellen dreimal schock-gefroren und wieder aufgetaut, um die Viren freizusetzen. Zur Vervollständigung des Zellaufschlusses wurde das Zelllysat mit zehn Impulsen zu je zwei Sekunden bei 200 W mit einem *Sonifier cell disrupter B-15*

(Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) sonifiziert. Die Suspension wurde anschließend für 30 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert, um den Zelldetritus von dem Medium mit den Viruspartikeln zu trennen¹⁰⁹. Die Aufreinigung und Konzentration des virushaltigen Überstandes erfolgte mittels der Iodixanol-Methode¹¹². In einem *Quick-Seal* Röhrchen (Beckmann, München, Deutschland) wurden 5 ml Virussuspension mit folgenden Lösungen unterlegt: 3 ml mit 15% Iodixanol (Axis Shield Proc AS, Oslo) und 1 M NaCl in PBS-MK-Puffer (1x PBS, 1 mM MgCl₂ und 2,5 mM KCl), 2 ml 25% Iodixanol in PBS-MK-Puffer mit Phenol-Rot (0,5% Solution, ICN Biomedicals, Ohio), 2 ml 40% Iodixanol in PBS-MK-Puffer und zum Schluss 2 ml 60% Iodixanol in PBS-MK-Puffer mit 0,01 µg/ml Phenol Rot. Die Röhrchen wurden mit einem LötKolben verschlossen und in einem *Ti 75 Rotor* (Beckmann) bei 60.000 rpm für 5 Stunden bei 18°C zentrifugiert. Danach wurden 20 Fraktionen mit jeweils 500-600 µl in 2 ml *Eppendorf*-Röhrchen gesammelt. Dazu musste der Boden der *Quick-Seal* Röhrchen mit einer Nadel aufgestochen und die iodixanolhaltige Lösung tropfenweise aufgefangen werden. Alle gesammelten 20 Fraktionen wurden über Nacht gegen 1 Liter DMEM im Kühlschrank dialysiert.

Nach der Dialyse erfolgte die Messung der Viruskonzentrationen in den einzelnen Fraktionen, wobei sich die Viren hauptsächlich in der 40% Iodixanol/PBS-MK-Puffer-Lösung sammeln.

B.III. Quantifizierung der rAAV-2-Partikel

B.III.1. Titration der Virus-Partikel mittels Durchflusszytometrie

Die Konzentration der infektiösen rAAV-GFP-Partikel wurde durchflusszytometrisch mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) in HeLa-Zellen bestimmt⁸⁹. Da GFP-transfizierte Zellen die Eigenschaft haben, im Fluoreszenzlicht grün zu leuchten, stellt dies eine geeignete Methode dar, um die Konzentration der infektiösen rekombinanten Viren zu bestimmen. Dazu wurden 5 x 10⁴ HeLa-Zellen in einer 24-Well-Platte in 600 µl RPMI-1460 Medium ausgesetzt und jeweils 1, 2 und 5 µl rAAV-GFP-Virussuspension zu den Zellen gegeben. Nach 48 Stunden Inkubationszeit konnte die Expression von GFP qualitativ mit Fluoreszenzmikroskopie direkt in den Zellkulturplatten betrachtet werden. Für die Quantifikation wurden die Zellen mit 150 µl Trypsin abgelöst und das Trypsin mit PBS/FCS im Verhältnis 9:1 inaktiviert. Nachdem die absolute Zellzahl bestimmt war (Neubauer Zählkammer), erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit einem

Becton Dickinson FACSCalibur (Heidelberg, Deutschland) mit einem 15 mW Argon Laser (Wellenlänge 488 nm). Der Laserstrahl wird durch die Zellen gesendet und regt das eGFP an. Aus der Ablenkung des Laserlichtes berechnet das Gerät die Granularität und Größe der Zellen. Die Fluoreszenzlichtemission der Zellen mit dem eGFP-Protein wurde über den FITC-Kanal des Gerätes mit dem Standardfilter von 530/15 nm detektiert. Das Gate der FACS-Analyse war so eingestellt, dass weniger als 0,1% GFP-negative Zellen als Hintergrund definiert wurden. Die Prozentzahl der grün fluoreszierenden Zellen wurde gemessen und mit der Gesamtzellzahl der Zellen in der jeweiligen Probe multipliziert. Vorausgesetzt, dass jede eGFP-positive HeLa-Zelle von einem rAAV-2-Partikel infiziert wurde, konnte der Virustiter der Ausgangslösung folgendermaßen berechnet werden: die absolute Zahl der fluoreszierenden Zellen wird durch das Volumen der eingesetzten Suspensionsmenge geteilt und ergibt den infektiösen Titer (IT) pro μl Volumen. Mit dieser Berechnung wird der infektiöse Titer einer Probe aber eher zu niedrig als zu hoch gewertet, da prinzipiell auch mehrere Viren in eine Zelle eindringen können, aber nur einfach gezählt werden und zum anderen nicht alle Viren auf eine Zelle treffen.

B.III.2. Quantifizierung von Viruspartikeln durch quantitative real-time PCR

a. Prinzip der quantitativen real-time PCR (qPCR)

Das Prinzip der CMV-Promotor-spezifischen qPCR basiert auf dem Nachweis des CMV-Promotors mit Primern, die spezifisch an einen DNA-Abschnitt dieses *immediate early human* CMV-Promotors binden. Der CMV-Promotor wird in verschiedenen rekombinanten Viruspartikeln verwendet, so dass mit dieser PCR verschiedene rAAV-2-Partikel gemessen werden können, unabhängig von den Genen, die sie enthalten. Sowohl genomische als auch infektiöse Titer wurden mit der quantitativen *real-time* PCR mit einem *LightCycler* (Roche Mannheim, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde das *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* lagert sich an Doppelstrang-DNA an, wodurch seine fluoreszierenden Eigenschaften stark gesteigert werden. Dadurch können die qPCR-Produkte indirekt durch die Fluoreszenz des Farbstoffes vom *LightCycler* detektiert werden. Diese Fluoreszenz ist proportional zu der Menge gebundener DNA im Reaktionsgemisch und ermöglicht

damit eine DNA-Mengenbestimmung. Pro Ansatz wurden 0,8 µl des jeweiligen Primers (0,4 µM), 3,2 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl des SYBR Green Enzym Mix, 11,2 µl steriles H₂O als Mastermix (18 µl pro Ansatz) angesetzt und mit jeweils 2 µl der Probe versetzt, so dass sich ein Endvolumen von 20 µl ergab. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 10 Minuten Prä-Inkubation bei 95 °C
- 50 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung)
- 5 Sekunden bei 67 °C (Annealing Phase)
- 10 Sekunden bei 72 °C (Amplifikation).

Folgende Primer wurden verwendet (Thermo Hybrid GmbH, Interaktiva Devison, Ulm, Deutschland):

CMV forward: 5´-GGC-GGA-GTT-GTT-ACG-ACA-T-3´

CMV reverse: 5´-GGG-ACT-TTC-CTA-CTT-GGC-A-3´

Um die Amplifikation unspezifischer Produkte auszuschließen, wurde mit Hilfe der *LightCycler* Software (LC-Run Version 5.32, Roche) eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Proben nach dem fertigen Lauf erneut erhitzt und die Temperatur bestimmt, bei der eine Auftrennung in die Einzelstränge erfolgt (Schmelzpunkt). Bei dieser Temperatur nimmt das Fluoreszenzsignal des *SYBR Green* ab, was vom *LightCycler* detektiert wurde und somit der aktuellen Temperatur der Probe zugeordnet werden konnte. Der Schmelzpunkt ist für einzelne qPCR-Produkte weitgehend spezifisch, hier lag er bei 86,0 °C.

b. Quantitative Analyse

In jedem PCR-Lauf wurde eine Standardkurve über 5 log Stufen Verdünnungsreihe des Vektorplasmids pAAV-GFP-AR6- mit einem CMV-Promoter pro Plasmidmolekül erstellt. Die Verdünnungsreihe erstreckt sich über einen Bereich von 0,01 bis 100 pg des Vektorplasmids. Die Standardkurve wurde von der *Light Cycler 5.32* Software (LC-Run Version 5.32, Roche) durch Berechnung der so genannten „*Crossing points*“ der Verdünnungsreihe der Vektorplasmide ermittelt. Dieser *crossing point* ergibt sich rechnerisch aus dem PCR-Zyklus, bei dem das Maximum der zweiten

Ableitung der Fluoreszenzkurve des jeweiligen PCR-Ansatzes lag. Er kann als relatives Maß für die DNA-Menge in der Ausgangsprobe betrachtet werden.

Für die Quantifikation der unbekanntes rAAV-2 Proben bezog die LC Software das PCR-Ergebnis auf die Standardkurve der Plasmid-Verdünnungsreihe, wobei die Einzelstrangnatur des rAAV-2-Genoms sowie der Doppelstrangcharakter der Plasmid-Standardkurvenwerte berücksichtigt wurden.

c. Titration der genomischen Partikel

Die genomischen Titer wurden nach der bei Rohr et al. beschriebenen Methode bestimmt¹⁰⁹. Dazu wurden 5 µl einer rAAV-2-haltigen Fraktion mit 1 µl DNase1 (7500 U/ml, Amersham Pharmacia Biotec., Hamburg, Deutschland) und 44 µl sterilem H₂O in einem Endvolumen von 50 µl bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um möglicherweise in der Virusprobe vorhandene Plasmide zu eliminieren. Die DNase1 wurde danach für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert, die Proben wurden anschließend bis zur Bestimmung der genomischen Titer bei -20°C gelagert werden. Die qPCR wurde nach dem unter III.2.a angegebenen Schema durchgeführt.

Das Ergebnis jeder Probe wurde mit dem Verdünnungsfaktor (1:10) und mit 500 multipliziert, um den Titer pro ml zu erhalten (2 µl x 500 = 1 ml). Die 2 µl ergeben sich daraus, dass für die PCR ein Template von 2 µl Volumen eingesetzt wurde. Vorausgesetzt, dass ein rAAV-2-Partikel eine Einzelstrang DNA Kopie enthält und dass 1 pg des 6889bp Vektorplasmids $1,3 \times 10^5$ Plasmidmolekülen entsprechen, wurde der genomische rAAV-2-Titer berechnet.

d. Titration der infektiösen Partikel

In einer 24 Well-Platte wurden 5×10^4 HeLa-Zellen pro Well in 600 µl RPMI 1640-Medium ausgesetzt und eine Stunde später mit 20 µl Virussuspension infiziert, wobei uninfizierte HeLa-Zellen als Negativkontrolle dienten. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl Trypsin abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde nach 5 Minuten mit 300 µl Medium blockiert. Diese Zellsuspension wurde in ein *Eppendorf*-Röhrchen überführt, für 5 Minuten bei 6000 g zentrifugiert und das Zellpellet in 49 µl PBS und 1 µl Proteinase K (entsprechen 10 µg) resuspendiert. Nach gründlichem Vortexen erfolgte eine Inkubation der Zellen für eine Stunde bei 50°C, und die anschließende Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten.

Danach musste das Lysat 10 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues *Eppendorf*-Röhrchen überführt werden. Von dem Überstand wurden 10 µl mit 1 µl S1-Nuklease 10 x Puffer und 10 U S1-Nuklease (beides Promega) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um in der Probe eventuell vorhandene Einzelstrang-DNA von nicht-infektiösen rAAV-2 zu eliminieren. Nach der Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei 95°C für 10 Minuten wurde die Probe 1:100 mit sterilem A. dest. verdünnt, um einer Hemmung der anschließenden PCR durch den S1-Nuklease Puffer vorzubeugen. Die Durchführung der PCR erfolgte wie unter III.2.a beschrieben mit denselben Primern.

Die PCR Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese, wie unter I.3 dargestellt, analysiert, die erwartete DNA Länge betrug 200 bp.

Die folgende Formel ergibt die Anzahl der infektiösen Partikel pro ml:

Infektiöse Partikel pro ml = ((PCR Ergebnis) x a x b x c) / (d x e)

a: Verdünnung des Zelllysats = 100

b: Endvolumen des Zelllysats = 55

c: Faktor, um die Anzahl infektiöser Partikel pro ml zu erhalten = 50/ml, da 20 µl Virussuspension für die Infektion der HeLa Zellen eingesetzt wurden.

d: Probenvolumen für die PCR = 2 µl

e: die Einzelstrang DNA der infektiösen viralen Partikel wurde in den infizierten Zellen in dsDNA umgeschrieben, weshalb in der PCR zwei Kopien pro infektiösen Partikel detektiert wurden, also = 2

B.IV. Viabilitätstests zur Bestimmung der Funktionalität der rAAV-2-Vektoren

Um die Funktionalität der hergestellten Viren zu testen, wurden 5×10^4 H1299-Zellen in einer 24-well Platte mit 600 µl RPMI-Medium ausgesetzt und mit folgenden Konzentrationen rAAV-p53 infiziert: MOI 10, MOI 50, MOI 100, MOI 150, MOI 500, MOI 1000. Nach einer 72 Stunden dauernden Inkubationsperiode wurde das Medium abgenommen und in 1,5 ml *Eppendorf*-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden mit 200 µl Trypsin-EDTA abgelöst und die Zellsuspension zu dem gesammelten Medium in die *Eppendorf*-Röhrchen überführt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 1ml ergab.

Für die Analyse der rAAV-GFP-Partikel wurden 5×10^4 HeLa-Zellen mit den oben angegebenen Virusmengen nach demselben Modus inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, um die Infektiosität der Vektoren zu beurteilen. Es wurden für die weiteren Experimente nur rAAV-GFP-Vektoren verwendet, die zu einer grünen Fluoreszenz bei der Mehrzahl der HeLa-Zellen führten und gleichzeitig keinen toxischen Effekt auf die Zellpopulation hatten. Die Zellen wurden wie oben beschrieben ebenfalls in ein *Eppendorf*-Röhrchen überführt.

Die Beurteilung der Toxizität der Viren erfolgte durch eine Zellzählung mit Trypan-Blau (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in einer Neubauerkammer. Dazu wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypan-Blau gemischt. Es wurden nur lebende Zellen gezählt, die sich mit Trypan-Blau nicht anfärben lassen. Zur Berechnung der Wachstumshemmung der Zellen durch die Viren diente folgende Formel: Hemmung in % = $100\% - \text{Überlebensrate in \%}$ ($100\% = \text{Zellzahl der Kontrolle}$). Alle Experimente wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt.

B.V. Western Blot Analyse

Mit Hilfe des Western Blots wurde die p53-Expression der Zellen nach rAAV-2 vermitteltem Gentransfer bestimmt. Des Weiteren konnten mit dieser Methode eine zeitabhängige p53-Expression und die Effekte auf die p53-Expression durch die Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 untersucht werden.

B.V.1. Zellkultur

Als Positiv-Kontrolle diente die Zelllinie T47D, die p53 exprimiert und als Negativ-Kontrolle nicht-infizierte H1299-Zellen, die p53-negativ sind. Dazu wurden 10^5 H1299-, H460- und T47D-Zellen in einer 24-Well-Platte mit 600 μl RPMI-1640 Medium ausgesetzt und für 24 h mit einer MOI 100 rAAV-p53 im Brutschrank inkubiert.

B.V.2. Proteinextraktion

Nach 24 h wurden die Zellen mit 150 μl RIPA-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM NaEDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS und den Proteinase-Inhibitoren PMSF, 100 $\mu\text{g/ml}$ und Aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$) lysiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, danach für 15

Minuten auf Eis auf einem langsam rotierenden Schüttler mit dem Lyse-Puffer inkubiert. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 ml *Eppendorf*-Röhrchen überführt und die RIPA-löslichen und –unlöslichen Fraktionen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 6000 rpm getrennt und der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, in eine neues steriles *Eppendorf*-Röhrchen überführt.

B.V.3. Proteinbestimmung

Die Konzentration der in den Proben enthaltenen Proteine wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, Illinois, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

Diese Methode verbindet die Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) mit der colorimetrischen Detektion des Cu^{+1} Kations mittels *bichinonic acid* (BCA). Das lilafarbene Reaktionsprodukt dieses Assays wird durch einen Chelatkomplex mit zwei Molekülen BCA mit einem Kupferion gebildet. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche linear mit der Proteinkonzentration in einem Bereich von 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ ansteigt.

In der Regel werden Proteinkonzentrationen mit Hilfe einer bekannten Standardverdünnung eines Proteins, z. B. Bovines Serum Albumin (BSA) gemessen. Jede unbekannte Proteinkonzentration wird anhand der Standardkurve der Verdünnungsreihe bestimmt.

Die Verdünnungsreihe wurde nach Herstellerangaben hergestellt, ebenso das so genannte Arbeitsreagenz. Zu diesem wurden dann jeweils 0,1 ml der zu messenden Proteinprobe sowie die Standards pipettiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Absorption in einem Photometer bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve bestimmt werden.

B.V.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die extrahierten Proteine in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufzutrennen, wurde eine *Mini Protean II* Gelkammer (BioRad, Kalifornien, USA) verwendet. Die Trennung fand in einem diskontinuierlichen Puffer-System statt. Das Sammel- und Trenngel wurde nach Angaben aus Sambrook, Russel „Molecular cloning“, 3. Edition, hergestellt. Der Laufpuffer bestand aus 0,1 % SDS, 25 mM Tris-HCl und 192 mM Glycin in 1 Liter A. dest, pH 8,3. Für die Elektrophorese wurden pro Probe etwa 30 μg Gesamtprotein eingesetzt, was einem Volumen von 20 μl

entsprach. Das Probenvolumen wurde mit halb soviel Volumen an 2x Probenpuffer versetzt und das Gemisch für ca. 20 Minuten bei 70°C denaturiert. Der Probenpuffer bestand aus 0,2 M Tris-HCL, 5% Glycerol, 4% SDS, 0,1% Bromphenolblau und 2% β -Mercapto-Ethanol in 1 Liter aqua destillata (A. dest.) und wurde als Stammlösung in 6x Konzentration hergestellt. Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem *Full Range Rainbow Marker* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) mit einem MW von 10.000 bis 250.000 auf das Gel aufgetragen und für ca. 2 Stunden bei 80 V aufgetrennt, bis der Probenpuffer am unteren Ende des Gels angekommen war.

B.V.5. Blotting

Nach der Elektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine in dem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland). Dazu wurden die Membran, das Gel und Filterpapier („Gel Blotting Paper“, Schleicher & Schüll, Deutschland) für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Bei dem Transferpuffer handelte es sich um Bjerrum-Puffer bestehend aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS und 20% Methanol in 1l A. dest. mit einem pH von 9,2. Die Membran, das Gel und das Filterpapier wurden folgendermaßen von unten nach oben geschichtet: 2 Blatt Filterpapier, die Membran, das Gel und anschließend noch einmal 2 Blatt Filterpapier, wobei möglichst keine Luftblasen dazwischen sein sollten, um den Stromfluss nicht abzulenken. Dieses Sandwich wurde dann in einer *Trans-Blot SD Semi-Dry transfer Cell* (BioRad) für 45 Minuten bei 15 V geblotted.

B.V.6. Coomassie-Färbung

Zur Kontrolle, ob der Blot erfolgreich war, diente die Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliantblau, wobei im Idealfall keine Proteinbanden sichtbar sein sollten. Vor der Färbung wurden die Proteine mit Essigsäure und Methanol (50% Methanol, 10% Essigsäure, 40% A. dest.) im Gel fixiert, um während der Färb- und Entfärbeschritte eine Bandenverbreiterung durch Diffusion zu vermeiden.

Bei dem organischen Farbstoff Coomassie-Brilliantblau handelt es sich um einen blauen Säurefarbstoff (Triphenylmethanfarbstoff), der in seiner unprotonierten anionischen Sulfatform Komplexe mit den Proteinen bildet, wobei er auch unspezifisch an kationische und nicht-polare hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Dazu wurde das Gel nach dem Blot in der Fixierlösung für 30 Minuten

inkubiert und danach in ein Färbebad überführt, welches aus 250 ml Methanol, 50 ml Essigsäure, 0,5 g Coomassie R250 in 200 ml A. dest (Endkonzentration: 0,1 % Coomassie R250) bestand. Nach weiteren 30 Minuten erfolgte die Entfärbung des Gels für ca. 1 Stunde in 20% Methanol, 10% Essigsäure und 70% A. dest..

B.V.7. Nachweisreaktion

Die Membran mit den Proteinbanden wurde nach dem Blot für 10 Minuten in TBS (20 mM Tris und 150 mM NaCl in 1 Liter A. dest, pH 7,2-7,6) gewaschen, anschließend für 60 Minuten in Blocking-Solution (5 % Trockenmilchpulver, Lavita, Kempen, Deutschland in PBS) inkubiert, um mögliche unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren und so das so genannte Hintergrundrauschen zu minimieren. Nach drei Waschschrritten mit TBS wurde die Membran mit den beiden primären Antikörpern gegen das p53-Protein (Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) und als Markerprotein gegen GAPDH (Monoclonal Mouse Anti-Rabbit GAPDH, Clone 6C5, Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland) 1:500 (p53-Antikörper) und 1:20000 (GAPDH-Antikörper) verdünnt für 3h inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten mit TBS wurde der sekundäre Antikörper (Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin, Dako Cytomation) 1:1000 verdünnt inkubiert. Durch die Konjugation an Peroxidase war es anschließend möglich, die Proteinbanden auf einem Filmpapier sichtbar zu machen. Nach wiederum drei weiteren Waschschrritten erfolgte Inkubation der Membran mit ECL-Detection-Lösung (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham) für eine Minute, um dann die Banden auf einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham) zu entwickeln.

B.V.8. Quantifizierung der Proteinexpression

Zur Quantifizierung der einzelnen Banden konnte der entwickelte Film mit dem Alpha Imager Imaging System (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) digitalisiert und die einzelnen Banden mit Hilfe der Alpha Ease FC Software (Biozym Scientific GmbH) ausgewertet werden. Nach Hintergrundkorrektur wurden die Pixel jeder p53- und der dazu gehörigen GAPDH-Bande berechnet und der jeweilige Quotient gebildet. Somit konnte man zwar nicht die Proteinmenge bestimmen, aber die einzelnen Banden miteinander vergleichen und so relative Änderungen der Proteinkonzentration angeben.

B.VI. Funktionelle Tests

B.VI.1. Viabilitätstests

Für die Zellkulturversuche mit Bortezomib und dem p53-Vektor wurden die Konzentrationen ermittelt, die zu einer Wachstumshemmung von 50% der Zellen führt (IC₅₀), respektive die Bortezomibkonzentration, aus der eine 25%ige Hemmung resultiert (IC₂₅). Sämtliche Versuche wurden an den Zelllinien H1299 und H460 durchgeführt. Das Bortezomib lag in gelöster Form (1 mg/ml) vor, was bei einem Molekulargewicht von 400 g/mol einer 2,5 mM Lösung entspricht. Diese Lösung wurde dann entsprechend mit RPMI-1640 Medium verdünnt. In 600 µl dieser Medium-Bortezomib-Mischung wurden 5×10^4 adherente Zellen kultiviert, die ca. 3 Stunden vorher in 24-Well-Platten ausgesetzt worden waren. Nach 72 Stunden erfolgte die Zellzählung mit Trypan-Blau.

Folgende Bortezomib-Konzentrationen wurden verwendet:

10 µM, 1 µM, 0,1 µM, 0,06 µM, 0,005 µM, 0,03 µM und 0,01 µM.

Um die IC₅₀ der rAAV-p53 Vektoren zu bestimmen, wurden die Zellen mit verschiedenen MOIs (MOI 10, 100, 150, 200, 400, 500, 700 und 1000) für 72 Stunden inkubiert und ebenfalls anschließend gezählt.

Für die Kombinationsexperimente wurden jeweils 5×10^4 H1299- und H460-Zellen mit der IC₂₅ und IC₅₀ von Bortezomib und der IC₅₀ von rAAV-p53 alleine und in Kombination für 72 Stunden inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gezählt. Um Effekte auf die Proliferation durch die Viruspräparation an sich auszuschließen, diente der rAAV-GFP-Vektor in äquivalenter Konzentration als Kontrolle. Der prozentuale Anteil an lebenden Zellen wurde mit folgender Formel berechnet: Lebende Zellen / Kontrollzellen x 100. Um mögliche additive oder überadditive Effekte auf die Wachstumshemmung zu evaluieren, wurden hypothetische Wachstumsraten durch die Multiplikation der Effekte durch die Einzelsubstanzen berechnet. Diese berechneten Überlebensraten wurden dann mit den tatsächlich beobachteten Überlebensraten verglichen.

B.VI.2. Long term colony assay

Mit dem *long term colony assay* wurde die Proliferationsfähigkeit der vorbehandelten Zellen getestet, nachdem sie nicht mehr den Noxen Bortezomib und rAAV-p53 ausgesetzt waren. 5×10^2 Zellen, die über drei Tage mit Bortezomib, rAAV-p53 oder rAAV-GFP alleine und in Kombination behandelt worden waren, wurden in eine 25

cm² großen Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt und nach 7 Tagen Fähigkeit der Zellen, Kolonien zu bilden, untersucht. So konnte bestimmt werden, ob die vorbehandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in ihrer Fähigkeit sich zu teilen und Kolonien zu bilden, gehemmt sind. Es wurden die Kolonien unter einem Lichtmikroskop gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden. Die Prozentzahl der Kolonien wurde berechnet, indem die Anzahl an Kolonien der behandelten Zellen durch die Anzahl an Kolonien in der unbehandelten Kontrolle geteilt und mit 100 multipliziert wurde.

B.VI.3. Apoptose-Test

Um zu untersuchen, ob aus der Behandlung der NSCLC-Zellen mit Bortezomib und dem rAAV-p53 eine erhöhte Apoptoserate resultiert, wurde der *Cell Death Detection* ELISA (Roche) verwendet. Das Prinzip dieses Tests basiert auf der Detektion von Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma von apoptotischen Zellen mittels Antikörpern gegen DNA und Histone. Die Menge an gebundenen Antikörpern wird photometrisch gemessen und der Anstieg der Absorptionsrate bei behandelten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bestimmt. Dazu wurden die Zellen wie oben angegeben für 3 Tage mit rAAV-p53 und Bortezomib inkubiert. Der ELISA wurde mit 10⁴ Zellen nach Angaben des Herstellers in einer 96-Well-Platte (Greiner) durchgeführt und bei 405 nm in einem 1420 Multilabel Counter (EG&G Wallac, Turku, Finland) ausgewertet. Auch bei diesem Test diente der rAAV-GFP-Vektor neben den unbehandelten Zellen als Kontrolle.

B.VI.4. Proliferations-Assay

Der CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) wurde verwendet, um die Anzahl an proliferierenden Zellen nach der dreitägigen Inkubation mit Bortezomib, rAAV-p53 und rAAV-GFP alleine und in Kombination zu bestimmen. Hierbei wird MTS von den Zellen zu dem farbigen Formazan reduziert. Diese Reaktion ist von NADH oder NADPH abhängig, welche von metabolisch aktiven Zellen durch Dehydrogenasen produziert werden. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl Medium mit 20 µl des MTS-Reagenz in einer 96-Well-Platte für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Menge an entstandenem Formazan wurde photometrisch bei 490 nm gemessen und ist direkt proportional zu der Anzahl an proliferationsfähigen Zellen in einer Zellkultur.

B.VII. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte mit *Microsoft Excel XP*. Alle Experimente wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Aus den Ergebnissen der Versuche wurde der Mittelwert gebildet und mit der Standardabweichung angegeben.

Für die Bestimmung des statistischen Signifikanzniveaus wurde der zweiseitige Student's T-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Werte angewendet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Streuung der Werte im interexperimentellen Vergleich der qPCR wurde anhand des Variationskoeffizienten ermittelt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson diente als Maß für die Vergleichbarkeit der qPCR, der FACS-Analyse und des ICA.

Bei den Zellkulturversuchen wurden die Ergebnisse der Kontrollen gleich 100% gesetzt und die Messwerte der übrigen Proben auf die Ergebnisse der Kontrolle bezogen.

C. ERGEBNISSE

C.I. Quantitative Real-time PCR zur Titration infektiöser rAAV-2-Partikel

C.I.1. S1 Nuklease-Verdauung

Die von uns etablierte PCR basiert auf dem Lebenszyklus von wt AAV-2 nach der Infektion der Wirtszelle. Nicht-infektiöse Partikel verbleiben entweder extrazellulär oder werden nach ihrer Endozytose nicht weiter prozessiert. In jedem Fall bleibt die virale DNA in ihrer einzelsträngigen Form, welche durch die Verdauung mit ssDNA-spezifischer S1-Nuklease entfernt werden kann. Die verbleibende virale dsDNA kann als die DNA der transkriptionell aktiven rAAV-2-Partikel angesehen werden, die somit in der Lage sind, Zellen zu infizieren.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu evaluieren, wurden die Inkubationszeit und die eingesetzte Anzahl an S1-Nuklease Einheiten variiert. Das Zelllysate von rAAV-2-GFP-infizierten HeLa-Zellen wurde mit 1 U S1-Nuklease für 10 und 60 Minuten sowie mit 10 U S1-Nuklease für 30 Minuten inkubiert und die verbleibende CMV-Promoter-haltige DNA mittels qPCR quantifiziert. Die Anzahl an Kopien wurde im Vergleich zu der Kontrolle ohne S1-Nuklease-Behandlung um die Faktoren 19,8 (SA \pm 1,2), 18,0 (SA \pm 0,1) und 18,2 (SA \pm 1,2) reduziert. Diese Ergebnisse weisen auf eine gleiche Verdauungseffizienz aller drei Bedingungen hin (Abb. 10). Für alle weiteren Experimente wurde das Zelllysate mit 10 U S1-Nuklease für 30 Minuten inkubiert.

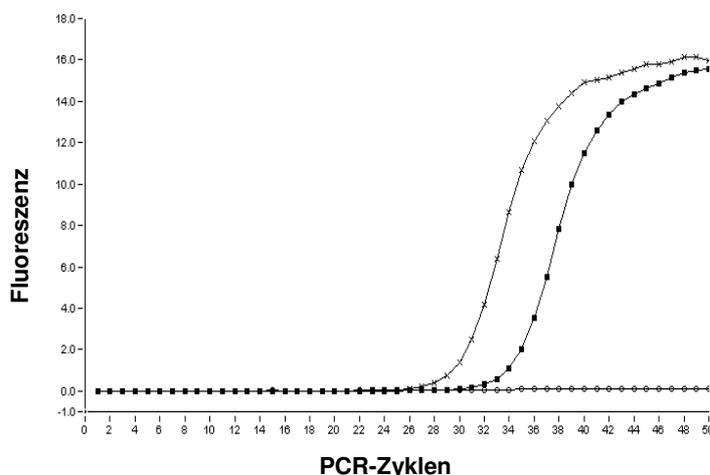


Abbildung 10:

Die PCR-Kurven zeigen die Messungen von nicht-infizierten HeLa-Zellen (offene Kreise), rAAV-2-GFP infizierte HeLa-Zellen ohne S1-Nuklease-Verdauung (Kreuze) und das gleiche Lysat mit S1-Verdauung mit 10 U für 30 Minuten (Kästchen).

Um den optimale Zeitpunkt für diesen Assay nach der Infektion der Zellen herauszufinden, wurden die Zellen mit der gleichen rAAV-2-GFP-Präparation infiziert und der Assay nach 24 und 48 Stunden durchgeführt. Die Werte der infektiösen Titer nach beiden Zeitpunkten unterschieden sich nur marginal um den Faktor 1,4 (SA \pm

0,36, n=6). Daher erschien die 24 h Periode zwischen Infektion und Ernte der Zellen für diesen Assay geeignet.

C.I.2. Sensitivität, Effizienz und Spezifität der qPCR

Für die Quantifikation der viralen DNA mit dem Vektor-Plasmid pAAV-GFP-AR6-musste eine Standardkurve generiert werden. Dazu wurden sieben zehnfache Verdünnungsstufen verwendet, die zwischen $1,3 \times 10^1$ und $1,3 \times 10^7$ Kopien lagen. Die geringste Anzahl von 13 Kopien konnte reproduzierbar in allen Reaktionen detektiert werden (n=15; Abb. 11). Der mittlere Regressionskoeffizient betrug 0,99 ($SA \pm 0,03$), die mittlere Steigung -3,38 ($SA \pm 0,15$), was einer Amplifikationseffizienz von 2 pro Zyklus entspricht. Schmelzkurvenanalyse und Agarosegel-Elektrophorese zeigten die Spezifität der PCR. Kein PCR-Produkt konnte bei nicht-infizierten HeLa Zellen detektiert werden (Abb. 12).

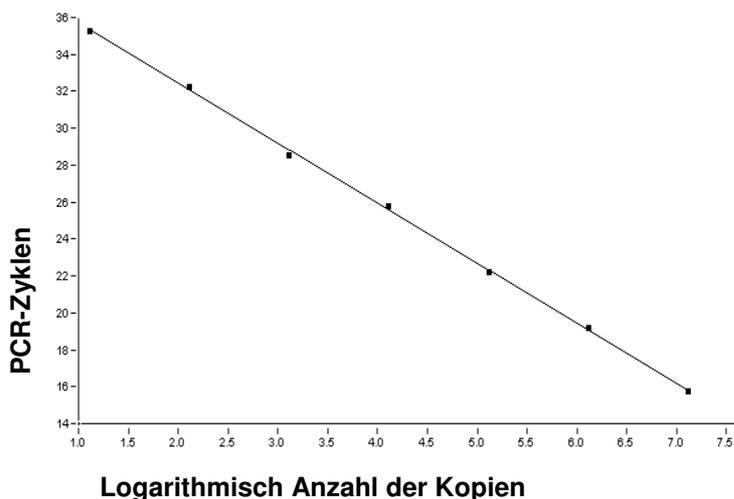


Abbildung 11:

Repräsentative Standardkurve für die Quantifikation der Virusproben. Für die Generation der Standardkurve wurden 7 zehnfache Verdünnungsstufen des pAAV-GFP-AR6-Plasmids verwendet. Die Anzahl der Kopien erstreckte sich von $1,3 \times 10^1$ bis $1,3 \times 10^7$ Kopien.

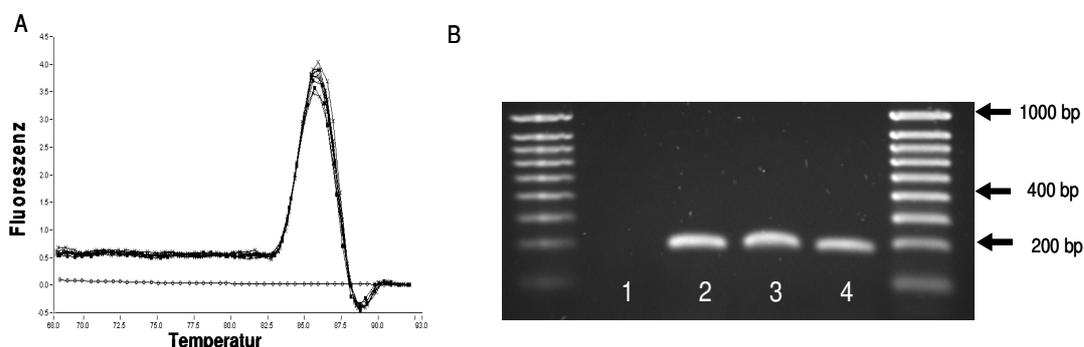


Abbildung 12: A. Repräsentative Schmelzkurvenanalyse. Die PCR-Produkte des Vektorplasmids (Kreuze) und der Virusprobe (Kästchen) haben identische Schmelzpunkte bei $86,2^\circ\text{C}$ (offene Kreise: Negativkontrolle).

B. Die Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR-Produkte zeigt, dass das Vektor-Plasmid (Banden 2 und 3) und das Zelllysate von infizierten Zellen (Bande 4) Produkte mit der selben Länge ergeben. Das Lysat von nicht-infizierten Zellen ergibt keine Bande (Bande 1). Die erwartete Produktlänge beträgt 200 bp.

C.I.3. Reproduzierbarkeit des Assays

Um die Reliabilität der neuen Methode festzustellen, wurden die inter-experimentellen Unterschiede der qPCR alleine, der S1-Nuklease Behandlung gefolgt von der qPCR und der gesamten Prozedur (inklusive Infektion der HeLa-Zellen, S1-Nuklease-Verdauung und qPCR) untersucht. Um die inter-experimentellen Schwankungen der qPCR zu erhalten, wurde die virale DNA in rAAV-2-GFP-infizierten HeLa-Zellen (nach S1-Nuklease-Verdauung) quantifiziert. Die Anzahl an Kopien von 30 Proben aus zwei unabhängigen qPCRs schwankte im Mittel um den Faktor 1,27 ($SA \pm 0,26$) mit einem Variationskoeffizienten von 20,5%. Um die Reproduzierbarkeit der S1-Nuklease-Verdauung und der qPCR zu bestimmen, wurden 16 Proben von rAAV-2-GFP-infizierten HeLa Zellen in zwei unabhängigen Experimenten mit der S1-Nuklease verdaut und die qPCR durchgeführt. Es ergab sich eine Variabilität um den Faktor 1,5 ($SA \pm 0,37$), der errechnete Variationskoeffizient betrug 24,6%. Um die inter-experimentellen Schwankungen des gesamten Assays zu ermitteln, wurde die gesamte Prozedur inklusive Infektion der HeLa Zellen zweimal unabhängig voneinander mit 30 verschiedenen rAAV-p53 und rAAV-GFP-Proben durchgeführt. Dabei ergab sich eine Schwankung der Werte um den Faktor 1,5 ($SA \pm 0,47$), der Variationskoeffizient betrug 31,3%.

C.I.4. Vergleich von rAAV-qPCR und Durchflusszytometrie

Um die neue Methode mit einer bereits etablierten zu vergleichen, wurden die infektiösen Titer von 33 unterschiedlichen rAAV-2-GFP-Proben mittels qPCR und FACS-Analyse parallel bestimmt (Abb. 13). Die Ergebnisse zeigten eine statistisch signifikante Korrelation ($p < 0,0001$) über 7 log Stufen mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$. Die Werte differierten im Mittel um den Faktor 1,60 ($SA \pm 0,65$) mit einem Variationskoeffizienten von 41%.

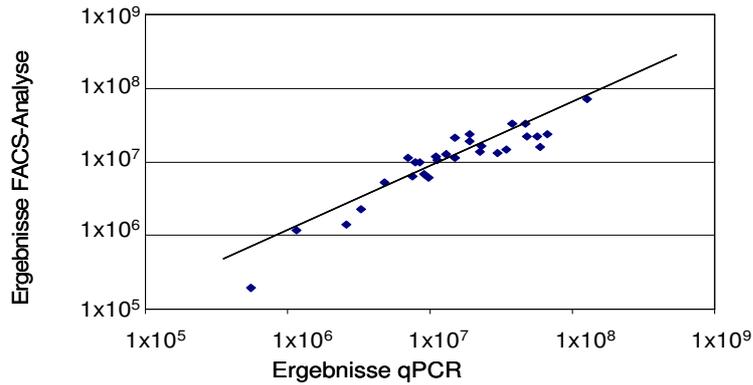


Abbildung 13: Vergleich der Ergebnisse der infektiösen Titer von 30 rAAV-GFP Fraktionen, gemessen mit der qPCR (x-Achse) und FACS-Analyse (y-Achse). Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 0,94.

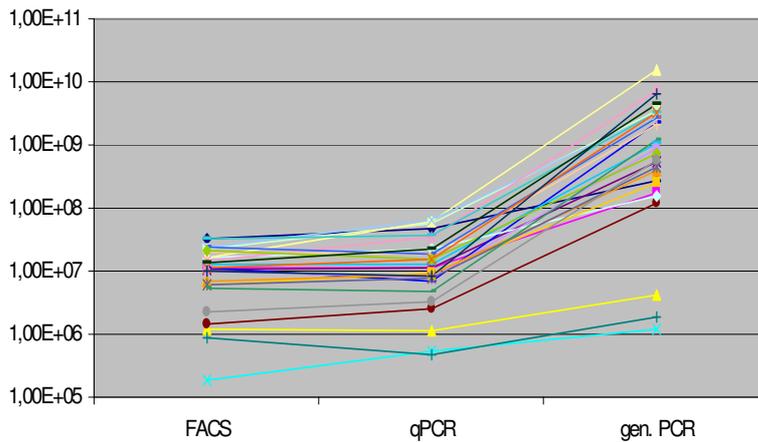


Abbildung 14: Vergleich der viralen Titer von 27 verschiedenen rAAV-GFP-Präparationen mit den in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methoden. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei den gemessenen Konzentrationen der infektiösen Titer im Vergleich zu den genomischen Titern, die jeweils eine höhere Konzentration aufwiesen.

C.I.5. Vergleich von rAAV-qPCR und *Infectious Center Assay* (ICA)

Neben der FACS-Analyse wurde der ICA als ebenfalls etablierte Methode zur Bestimmung von infektiösen Viruspartikeln mit der neuen qPCR verglichen. Dieser Assay wurde freundlicherweise im Labor von Frau Kröner-Lux, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, durchgeführt. Dazu wurden 7 unterschiedliche rAAV-2-GFP-Proben parallel analysiert und die Ergebnisse mit denen der qPCR, der FACS-Analyse und den korrespondierenden genomischen Titern verglichen (Abb. 15). Die Ergebnisse des ICA und der qPCR zeigten über 5 log Stufen eine signifikante Korrelation von 0,8 ($p < 0,001$), wobei die Werte im Mittel um den Faktor 3,41 ($SA \pm 1,49$) schwankten, der Variationskoeffizient betrug 43%.

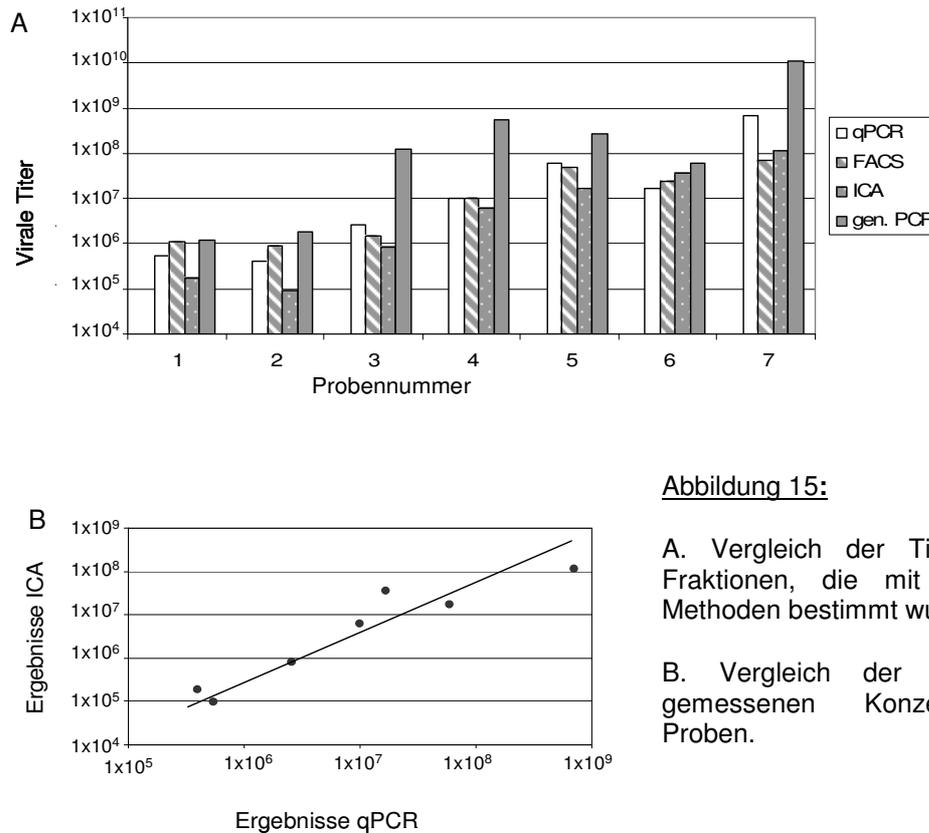


Abbildung 15:

A. Vergleich der Titer von 7 rAAV-GFP-Fraktionen, die mit den unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden.

B. Vergleich der mit FACS und ICA gemessenen Konzentrationen derselben Proben.

C.II. Nachweis des rAAV-p53 vermittelten Gentransfers auf Proteinebene

Um die Funktionalität der produzierten rAAV-p53-Vektoren zu überprüfen, wurden wt p53-negative H1299-Zellen mit 500 infektiösen Kopien des rAAV-p53-Vektors pro Zelle (MOI 500) infiziert und nach Inkubationszeiten von 0,5-30 Stunden das p53-Protein durch Western Blot Analyse detektiert. So konnten die Viruspräparationen identifiziert werden, deren p53-Gen in den Zellen erfolgreich exprimiert wird. Des Weiteren zeigte sich eine zeitabhängige p53-Proteinexpression (Abb. 16). Das p53-Gen wird unmittelbar nach Infektion der Zellen transkribiert, was sich in einem Anstieg der messbaren p53-Konzentration nach bereits wenigen Stunden zeigte. Im Vergleich zu der Bande nach 4 Stunden, ist nach 8 Stunden eine Zunahme der p53-Konzentration um 9% messbar und nach 12 Stunden um 23%. Nach 24 Stunden nimmt die Bandenstärke und somit die p53-Expression wieder um 11% im Vergleich zu dem 12 Stunden Wert ab, da die Zellen beginnen, apoptotisch zu werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde für weitere Western Blot Analysen eine 12-18 Stunden dauernde Inkubationsperiode gewählt. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Auswertung eines Western Blots, in weiteren

durchgeführten Western Blots konnte die Zeitabhängigkeit ebenfalls bestätigt werden.

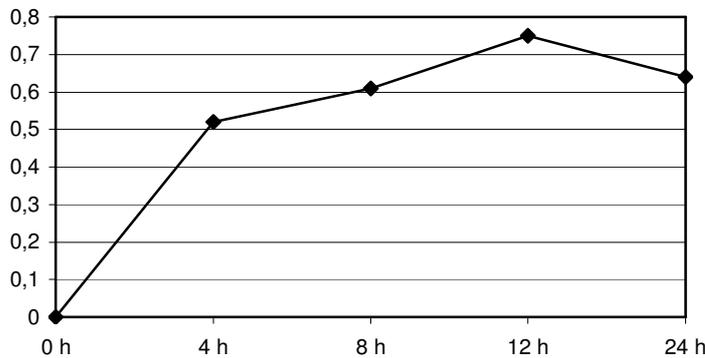


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt den Verlauf der relativen p53-Konzentration in H1299-Zellen nach der Inkubation mit rAAV-p53 für 0 bis 24 Stunden. Die GAPGH- und p53-Bandenstärke des Western Blots wurden mit der AlphaEase Software ausgewertet und der Quotient aus jeder p53- und der dazu gehörigen GAPDH-Bande berechnet. Auf der y-Achse sind die relativen Werte der Quotienten aufgetragen.

C.III. Effekte von rAAV-p53 und Bortezomib auf NSCLC Zelllinien

C.III.1. Dosisabhängige Effekte von rAAV-p53 und Bortezomib

Bevor die Effekte einer kombinierten Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib auf NSCLC-Zelllinien untersucht wurden, wurde die IC₅₀ für beide Substanzen und die IC₂₅ für Bortezomib ermittelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit aufsteigenden rAAV-p53-Konzentrationen zwischen der MOI₁₀ bis 1000 und Bortezomibkonzentrationen von 0,01-10 µM wurden die verbleibenden lebenden H460- und H1299-Zellen mittels Trypan-Blau gezählt. Es ergab sich eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl für beide Substanzen bei beiden Zelllinien (Abb. 17). Anhand der so ermittelten Hemmung wurden für die weiteren Kombinationsversuche die IC₅₀ für Bortezomib und rAAV-p53 und die IC₂₅ für Bortezomib evaluiert. Eine Bortezomibkonzentration von 0,03 µM zeigte eine 25%ige Hemmung, die IC₅₀ für Bortezomib lag bei 0,05 µM bei beiden Zelllinien. rAAV-p53 führte bei einer MOI von 150 bei den H1299 Zellen zu einer 50%igen Hemmung, bei den H460 Zellen resultierte eine MOI von 400 in einer 50%igen Hemmung.

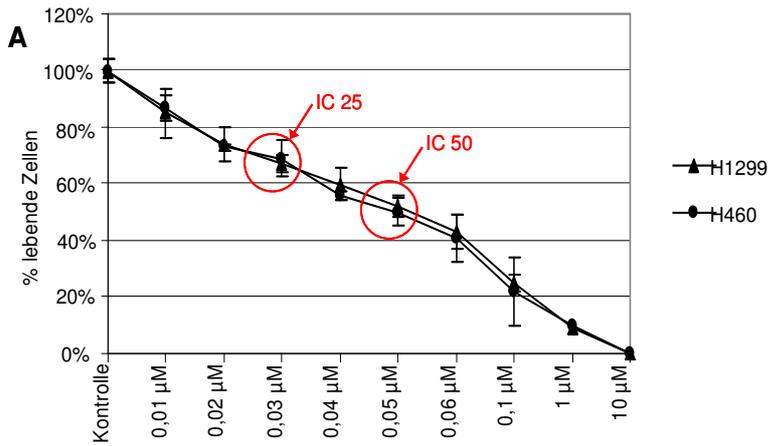


Abbildung 17: Zytotoxische Effekte auf die NSCLC Zelllinien H1299 und H460 nach einer 3 Tage dauernden Inkubation mit Bortezomib (A) und rAAV-p53 (B) in verschiedenen Konzentrationen. Für die Inkubation mit rAAV-GFP zeigt sich erst in hohen Konzentrationen ein Hemmeffekt auf das Zellwachstum.

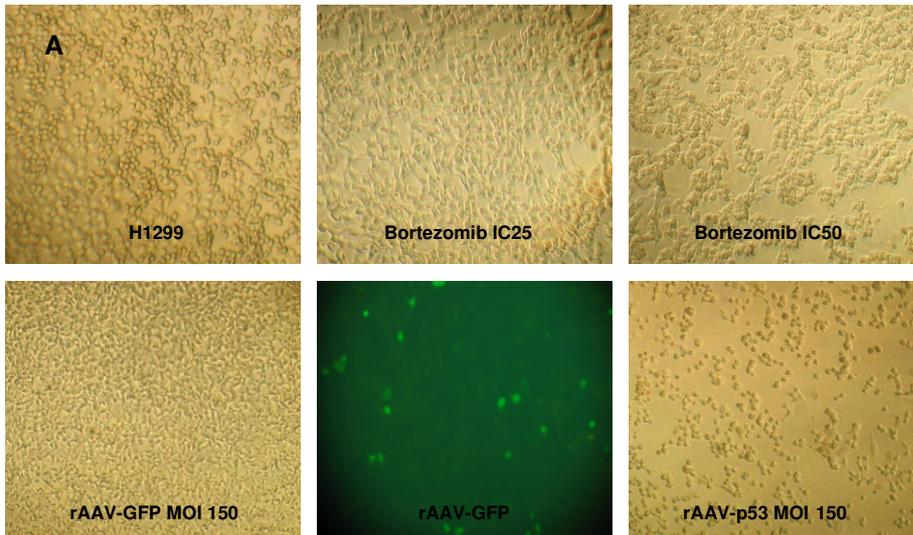
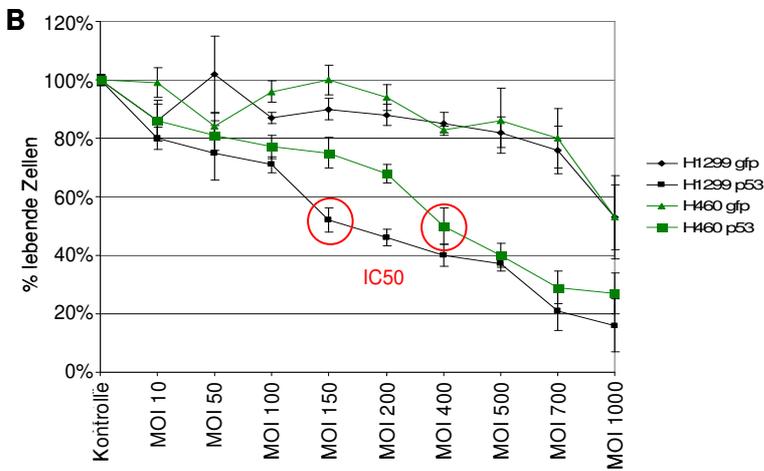
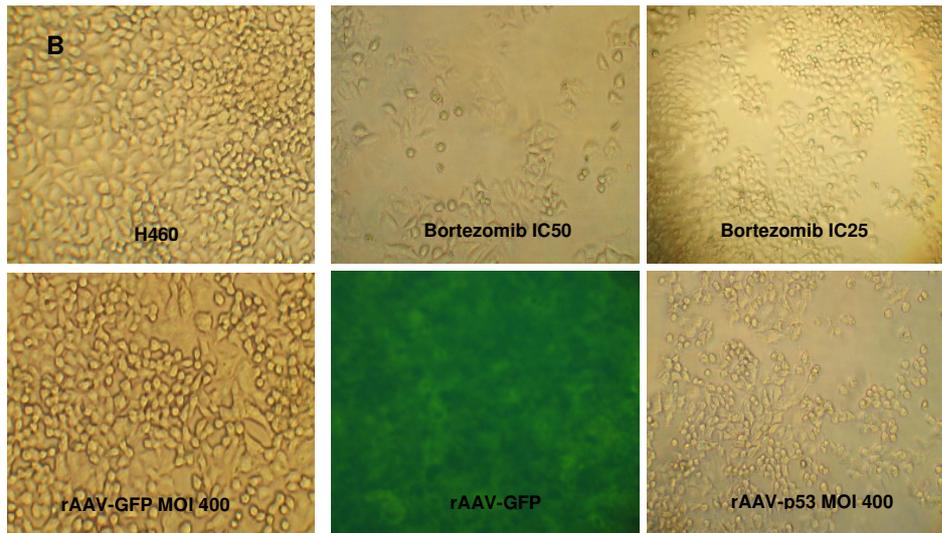


Abbildung 18: Fotografische Dokumentation der Wachstumshemmung der H1299 (A) und H460 (B) Zellen nach 3 Tagen Inkubation mit den Einzelsubstanzen.



C.III.2. Effekte des kombinierten Einsatzes von rAAV-p53 und Bortezomib auf die Viabilität und die Proliferation von NSCLC-Zelllinien

Nach der Evaluation der Effekte auf NSCLC-Zelllinien der einzelnen Substanzen untersuchten wir das Wachstumsverhalten der Zelllinien nach einer Koinkubation von Bortezomib und rAAV-p53. Nach einer drei Tage dauernden Inkubationsperiode mit rAAV-p53 und Bortezomib in der IC25 und IC50 zeigte sich eine additive bzw. überadditive Hemmung der Proliferation bei den NSCLC-Zelllinien (Abb.19). Nach der Inkubation der Zellen mit Bortezomib IC25 und rAAV-p53 IC50 zeigte sich eine Wachstumshemmung der H1299-Zellen um 62% ($SA \pm 3,8\%$) und der H460-Zellen um 69% ($SA \pm 3,4\%$). Die Inkubation mit der IC50 beider Substanzen resultierte in einer Wachstumshemmung um 74% ($SA \pm 2,44\%$) und um 82% ($SA \pm 5,70\%$) bei den H1299- und den H460-Zellen. Die Reduktion der Tumorzellzahl nach der kombinierten Behandlung war im Vergleich zu der mit rAAV-GFP und Bortezomib infizierten Kontrolle statistisch signifikant vergrößert ($p < 0,0001$). Die so ermittelten Überlebensraten wurden mit den berechneten Überlebensraten verglichen. Während die H1299-Zellen additive Effekte analog zu berechneten Überlebensraten zeigten, war der Hemmeffekt bei den H460-Zellen noch deutlicher. Die 69%-ige (Bortezomib IC25) bzw. die 82%-ige (Bortezomib IC50) Hemmung war signifikant höher als die errechnete Wachstumshemmung von 62,5% bzw. 75% bei der Multiplikation der Effekte beider Einzelsubstanzen ($p < 0,05$).

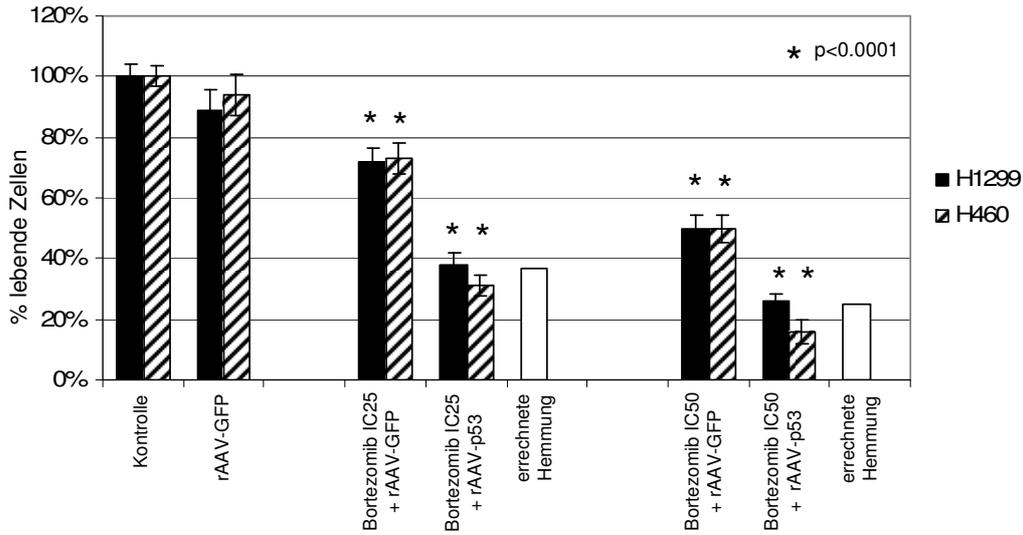


Abbildung 19: Viabilitäts-Test der NSCLC Zelllinien H1299 (schwarze Balken) und H460 (gestreifte Balken) nach der Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53. Analog zu den errechneten Überlebensraten zeigt sich eine additive Wachstumshemmung. Die kombinierte Behandlung resultierte in einer signifikanten Wachstumshemmung im Vergleich zu der Behandlung mit dem Kontrollvektor rAAV-GFP ($p < 0,0001$).

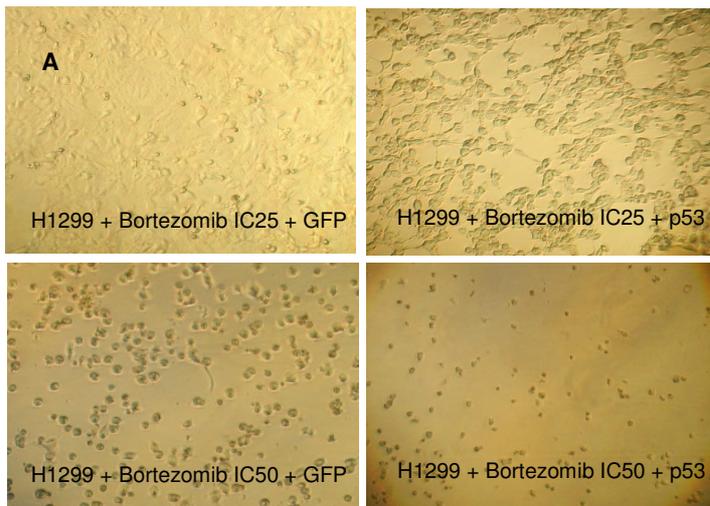
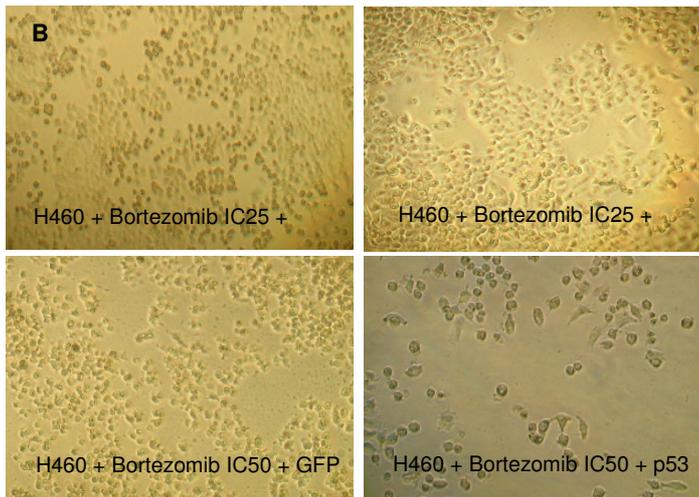


Abbildung 20: Fotodokumentation der H1299- (A) und H460-Zellen (B) aus einem repräsentativen Experiment nach der Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib im Vergleich zu der Behandlung mit rAAV-GFP.



Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde der *Cell Proliferation Assay* durchgeführt, der ähnliche Ergebnisse zeigte (Abb. 21). Auch hier lag eine additive Wachstumshemmung vor. Bei den Zellpopulationen, die mit der IC25 von Bortezomib und rAAV-p53 inkubiert wurden, zeigte sich bei beiden Zelllinien eine signifikant verminderte Proliferation um 60% (SA H1299 \pm 8,3%, SA H460 \pm 5,4%). Die Inkubation mit der IC50 von Bortezomib und rAAV-p53 führte zu einer um 70% (SA H1299 \pm 7,9%, SA H460 \pm 3,7%) reduzierten Proliferationsrate im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Die Proliferation war bei beiden Zelllinien im Vergleich zu den mit Bortezomib und dem Kontrollvektor rAAV-GFP inkubierten Zellen signifikant vermindert ($p < 0,0001$).

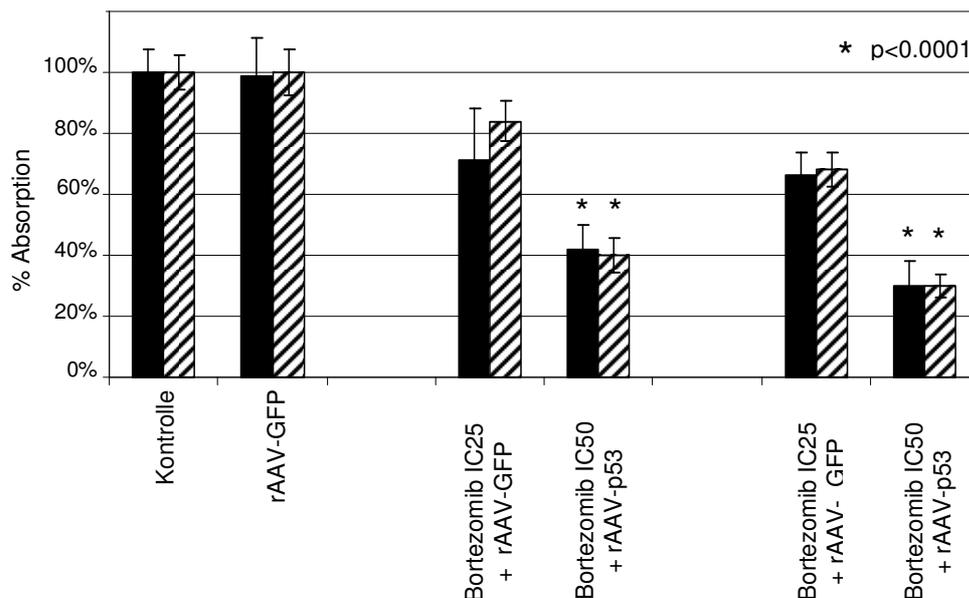


Abbildung 21: Der Proliferations Assay zeigt nach der Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 additive Effekte der Wachstumshemmung bei den H1299- (schwarze Balken) und H460-Zellen (gestreifte Balken). Bei beiden Zelllinien reduzierten sich die Proliferationsraten signifikant im Vergleich zu den Zellen, die mit rAAV-GFP statt rAAV-p53 behandelt waren ($p < 0,0001$).

C.III.3. Beeinflussung des klonogenen Wachstums der NSCLC-Zelllinien

Da nach der Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 18-75% der Zellen überlebten, stellte sich die Frage, in wieweit sich dadurch Effekte auf die Fähigkeit dieser überlebenden Zellen zum klonogenem Wachstum ergeben. Dazu wurden 500 der überlebenden Zellen für 7 Tage in frischem Medium weiter kultiviert und anschließend die Kolonien gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden (Abb. 22). Für die H1299-Zellen ergab sich eine signifikante Reduktion der Kolonien bei alleiniger Behandlung mit rAAV-p53 um 48% ($SA \pm 3,0\%$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,0001$). Nach der Inkubation mit Bortezomib in einer IC25 reduzierten sich die Kolonien um 28% ($SA \pm 4,2\%$) und mit der IC50 um 47% ($SA \pm 4,3\%$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Der kombinierte Einsatz von Bortezomib IC25 und rAAV-p53 resultierte in einer Reduktion der Kolonien um 55% ($SA \pm 4,0\%$). Die Kombination mit der IC50 von Bortezomib zeigte 58% ($SA \pm 3,4\%$) weniger Kolonien verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Als weitere Kontrolle wurden die Zellen statt mit rAAV-p53 mit rAAV-GFP alleine und in Kombination mit Bortezomib inkubiert. Während es bei den mit rAAV-p53 behandelten Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Koloniezahl kam ($p < 0,001$, bzw. $p < 0,0001$), zeigten die Zellen, die mit dem Kontrollvektor rAAV-GFP behandelt waren, keine signifikante Hemmung in der Koloniebildung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Auch bei der Ko-Inkubation von Bortezomib und rAAV-GFP waren die Zellen im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Bortezomib nicht signifikant in ihrer Fähigkeit zum klonogenem Wachstum beeinträchtigt. Somit ließ sich nachweisen, dass die Kombination aus Bortezomib und rAAV-p53 zu einer Hemmung des klonogenem Wachstums führte, selbst wenn sich die Zellen in einem optimalen Wachstumsmillieu befanden.

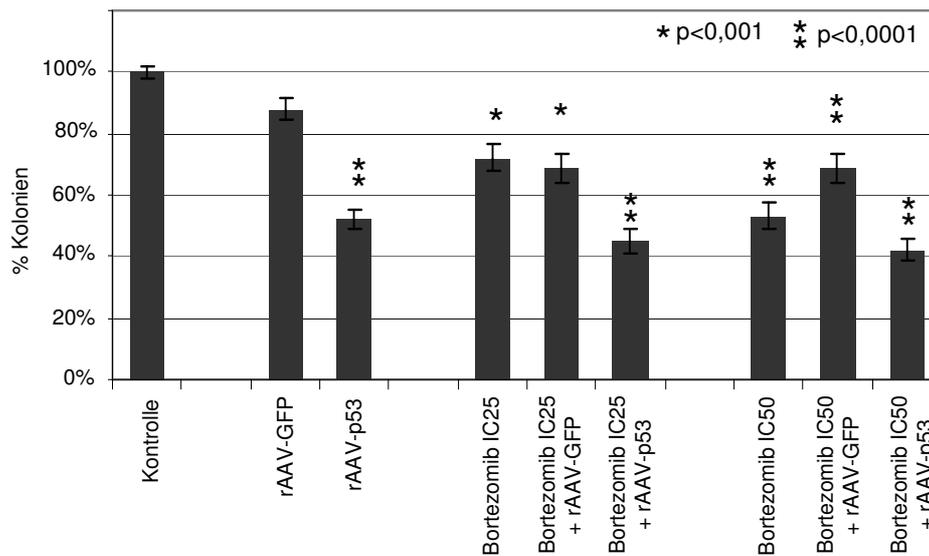


Abbildung 22: Klonogener Langzeit-Assay der H1299-Zellen nach der Vorbehandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib. Die Zellen, die mit rAAV-p53 und Bortezomib behandelt waren, waren im Vergleich zu den mit rAAV-GFP behandelten Zellen signifikant in ihrer Fähigkeit gehemmt, Kolonien zu bilden.

Für die H460-Zellen ergaben sich noch deutlichere zytotoxische Effekte auf die Fähigkeit der Zellen Kolonien auszubilden (Abb. 23). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen resultierte die Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 sowohl alleine als auch kombiniert zu einer signifikanten Reduktion der gebildeten Kolonien ($p < 0,0001$). Die Inkubation der Zellen mit Bortezomib in einer IC von 25 resultierte in einer Hemmung des Koloniewachstums um 22% ($SA \pm 6,10\%$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombination von Bortezomib (IC25) und rAAV-p53 führte zu einer Abnahme des klonogenen Wachstums um 66% ($SA \pm 6,0\%$). Gleiches galt für eine Bortezomibkonzentration in einer IC von 50. Hier lag die Abnahme der Kolonien bei 45% ($SA \pm 2,1\%$), während sie um 81% ($SA \pm 5,2\%$) abfiel, wenn mit rAAV-p53 ko-inkubiert wurde. Dies war nicht der Fall, wenn man den Kontrollvektor rAAV-GFP verwendete. Hier zeigte sich keine Abnahme in der Koloniezahl im Vergleich zu der alleinigen Inkubation mit Bortezomib.

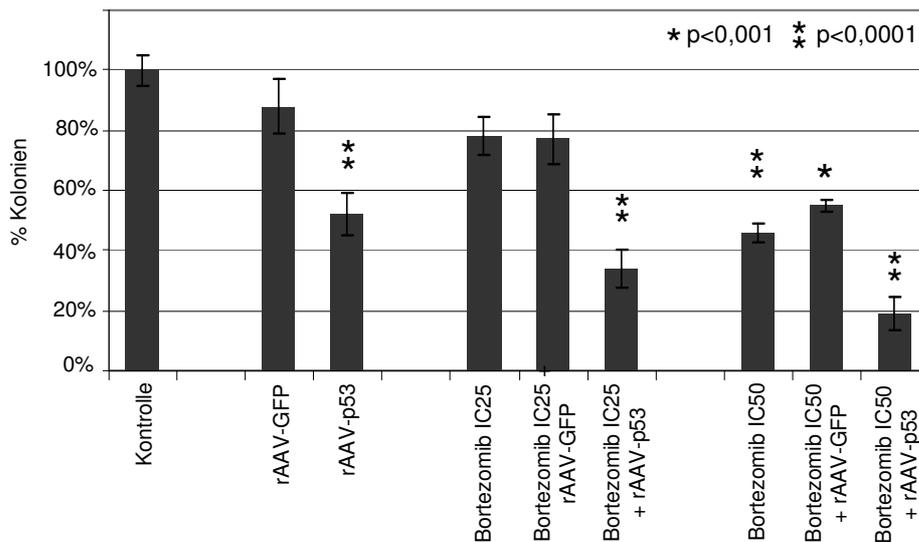


Abbildung 23: Beeinflussung des klonogenen Wachstums der H460-Zellen durch die Inkubation mit rAAV-p53 und Bortezomib. Die überlebenden Zellen waren nach der kombinierten Behandlung in ihrer Fähigkeit, Kolonien zu bilden, im Vergleich zu den Zellen signifikant gehemmt, die mit rAAV-GFP statt mit rAAV-p53 behandelt wurden ($p < 0,001$, bzw. $p < 0,0001$).

C.III.4. Intrazelluläre Stabilisierung von p53

Die Einflüsse auf die p53-Proteinexpression der Zellen durch die Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 wurde mit dem Western Blot untersucht. Dazu wurden H1299-(p53 negativ) und H460-Zellen (wt p53) mit Bortezomib und rAAV-p53 alleine und in Kombination für einen Tag inkubiert und die p53-Expression in einem Western Blot detektiert und fotodokumentiert (Abb. 24). Erwartungsgemäß zeigte sich bei den p53-negativen H1299-Zellen weder in der unbehandelten Kontrolle noch nach Bortezomibinkubation eine p53-Bande. Die Infektion der Zellen mit rAAV-p53 führte zur Reexpression des p53-Proteins. Durch die kombinierte Behandlung der Zellen mit rAAV-p53 und Bortezomib zeigte sich durch den fehlenden Bortezomib-vermittelten intrazellulären Abbau des Proteins im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit rAAV-p53 eine Zunahme der p53-Proteinexpression um 17%. Auch wenn die p53-Bande nach der Inkubation der Zellen mit Bortezomib und rAAV-2-vermittelten p53-Restitution nicht wesentlich stärker wirkt, ergibt sich der errechnete Anstieg der p53-Konzentration aus der Bildung des Quotienten mit der korrespondierenden GAPDH-Bande.

Die Zelllinie H460 zeigt auch unbehandelt eine geringe p53-Expression. Durch die Inkubation mit Bortezomib wird sie um 7,4% erhöht, da der Abbau von p53

vermindert ist. Der rAAV-2-vermittelte Gentransfer von p53 führt im Vergleich zu den Zellen, die nur mit Bortezomib behandelt wurden, zu einer stärkeren Expression von p53 um 32,7%. Kombiniert man Bortezomib und p53, so sieht man die, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, um 50,4% erhöhte stärkste p53-Expression der gesamten Versuchsreihe. Diese hohe p53-Expression resultiert aus dem endogenen und dem rAAV-p53-vermittelten p53 sowie dem fehlenden Abbau durch Bortezomib.

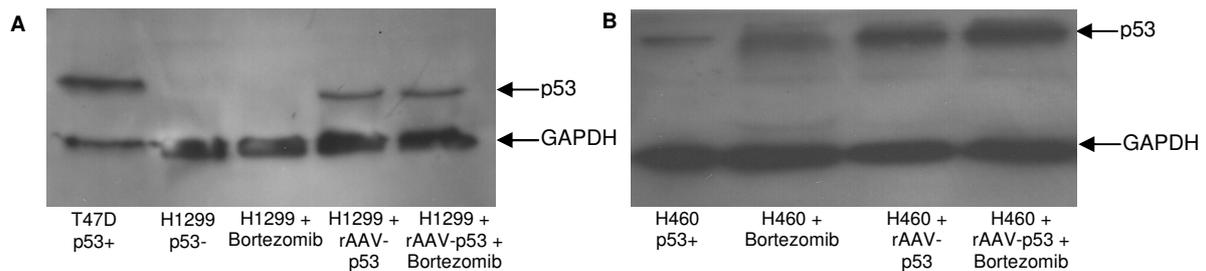


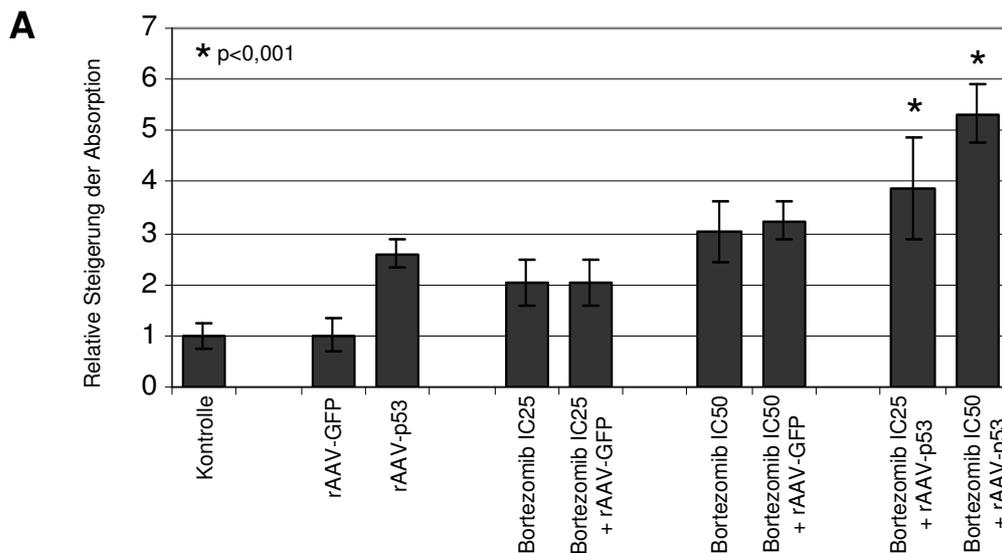
Abbildung 24: Der Western Blot demonstriert die Stabilisierung von p53 nach der Inkubation der Zellen mit Bortezomib und rAAV-p53. A: Die p53-negativen H1299-Zellen zeigen nach der Wiederherstellung von p53 durch den rAAV-2-vermittelten Gentransfer eine starke p53-Expression. Die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 führt zu einer Hemmung des p53-Abbaus und einer gesteigerten p53-Konzentration um 17%. B: Unbehandelte H460-Zellen zeigen eine geringe p53-Expression, die durch die Transfektion mit rAAV-p53 um 19,7% gesteigert werden konnte. Die kombinierte Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib resultierte in der höchsten intrazellulären p53-Konzentration mit einem Anstieg von 50,4% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

C.III.5. rAAV-p53 und Bortezomib vermittelte Apoptoseinduktion

Um herauszufinden, ob die synergistischen Effekte von rAAV-2 vermitteltem p53-Gentransfer und Bortezomib durch eine erhöhte apoptotische Aktivität der NSCLC-Zelllinien bedingt sind, wurde ein *Cell Death Detection* ELISA durchgeführt. Nach einer dreitägigen Inkubation der Zellen wurde die Apoptoserate als Ausdruck einer relativen Änderung der DNA-Fragmentierung der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gemessen (Abb. 25). Bei den H1299-Zellen erhöhte sich die Apoptoserate signifikant bei der Behandlung mit Bortezomib in der IC₂₅ bzw. der IC₅₀ um den Faktor 2,05 (SA ± 0,45) bzw. 3,02 (SA ± 0,60) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (p < 0,001). Ein rAAV-2 vermittelter Gentransfer von p53 steigerte die Apoptoserate um den Faktor 2,60 (SA ± 0,27). Die Kombination mit Bortezomib in einer IC₂₅ und IC₅₀ führte zu einer signifikanten Erhöhung der

apoptotischen Aktivität um den Faktor 3,86 ($SA \pm 0,99$) und 5,33 ($SA \pm 0,56$), während dies durch die Kombination mit rAAV-GFP nicht erfolgte ($p < 0,001$).

Die H460-Zellen zeigten eine noch höhere Apoptoserate. Die Behandlung der Zellen mit Bortezomib in einer IC von 25 und 50 erhöhte sie um den Faktor 4,08 ($SA \pm 0,76$) und 5,69 ($SA \pm 1,04$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($p < 0,0001$). Die Behandlung mit rAAV-p53 resultierte in einer um den Faktor 8,00 ($SA \pm 2,08$) gesteigerten Apoptoserate. Durch die kombinierte Behandlung mit rAAV-p53 und der IC25 von Bortezomib ergab sich eine Zunahme um den Faktor 9,23 ($SA \pm 1,91$) und 14,47 ($SA \pm 2,38$) durch die Kombination mit der IC50 von Bortezomib ($p < 0,0001$). Bis auf eine nicht signifikante ($p < 0,92$) Erhöhung der Apoptoserate um den Faktor 1,38 ($SA \pm 0,22$) bei alleiniger Inkubation der Zellen zeigten sich keine Einflüsse durch rAAV-GFP.



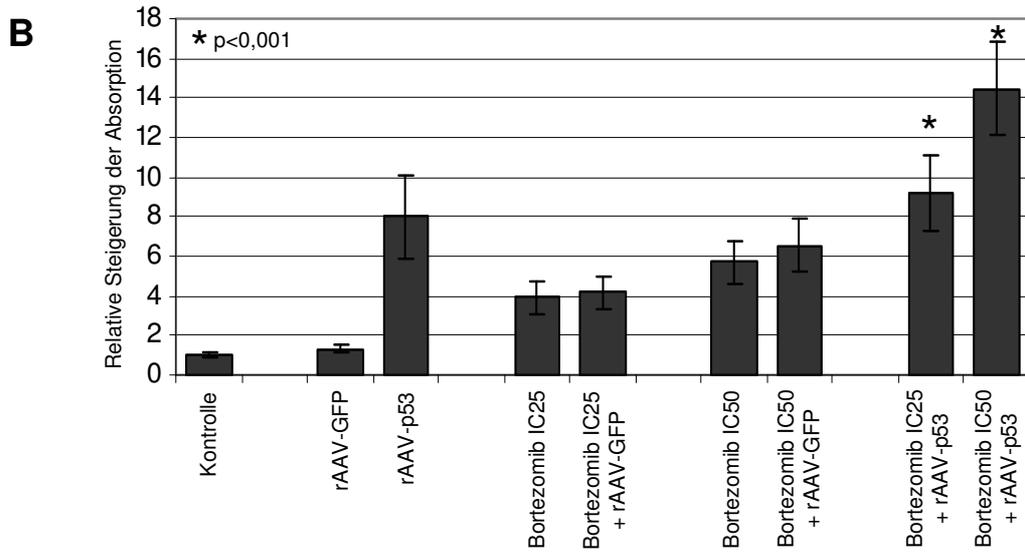


Abbildung 25: Apoptose-Induktion in den Zelllinien H1299 (A) und H460 (B) nach der kombinierten Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib. Die gemessene apoptotische Aktivität entspricht dem relativen Anstieg der nukleosomalen DNA-Fragmentierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei beiden Zelllinien zeigt sich nach der kombinierten Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib ein signifikanter Anstieg in der apoptotische Aktivität im Vergleich zu den Zellen, die mit rAAV-GFP und Bortezomib behandelt wurden ($p < 0,001$).

D. DISKUSSION

D.I. Quantifizierung von rAAV-2-Partikeln

Rekombinante adeno-assoziierte Viren stellen einen viel versprechenden Vektor für die gentherapeutische Behandlung maligner und genetischer Erkrankungen dar. Effiziente Verfahren zur Herstellung und Quantifizierung von Viruspartikeln bilden die Basis für den klinischen Einsatz im Rahmen von Arzneimittelstudien und für präklinische Forschungen. Nach der Produktion und Aufreinigung von rAAV-2-Vektoren beinhaltet eine Viruscharge infektiöse, biologisch aktive Partikel sowie nicht-infektiöse DNA-haltige Viruspartikel, wobei abhängig von der Qualität der Vektorproduktion infektiöse zu nicht-infektiösen Partikel in einem Verhältnis zwischen 1:56 bis zu 1:1000 entstehen^{108, 111, 112}. Als infektiös werden die Partikel betrachtet, die die Wirtszelle infizieren, in den Zellkern gelangen und deren Gene daraufhin exprimiert werden. Infektions-defiziente Partikel sind entweder gar nicht erst in der Lage, Zellen zu infizieren, oder aber sie dringen zwar in die Zelle ein, ihre Gene werden jedoch nicht exprimiert. Diese viralen Partikel verbleiben in ihrer einzelsträngigen, transkriptionell inaktiven Form. Daher geben Titrationsmethoden, die nur die virale DNA messen, egal ob einzel- oder doppelsträngige, den genomischen Titer wieder und messen nur recht ungenau den Anteil der tatsächlich infektiösen Partikel. Einige der bisher etablierten Standardmethoden zur Detektion von infektiösen Titern haben Nachteile. Die vielfach verwendete durchflusszytometrische Analyse benötigt ein fluoreszierendes Protein kodierendes Markergen, so dass mit dieser Methode keine therapeutischen Vektoren gemessen werden können^{89, 118}. Zwar stellt die Durchflusszytometrie eine hervorragende Methode für die Titration experimenteller Vektoren dar, biologische Einflüsse durch ein Markergen können aber nicht ausgeschlossen werden, weshalb sich diese Methode nicht für therapeutische Vektoren eignet. Für *dot-blot* Analysen und *Replication Center Assays* (RCA) müssen aufwendige Verdünnungsreihen hergestellt werden, alleine dieser Schritt ist aufwendig und fehleranfällig¹¹³. Die Bestimmung viraler Titer, basierend auf den biologischen Eigenschaften von rAAV-2, benötigt meist lange Inkubationszeiten und vielfach den Einsatz von Adenoviren, was das Vorhandensein von S2-Laboratorien voraussetzt^{110, 113}. Ein von Atkinson et al. entwickelter Mikrotiter-Assay benötigt ebenfalls aufwendige Verdünnungsreihen und zeigt bei Chargen mit einem hohen Titer bis zu 1000-fache Abweichungen¹¹⁹. Dabei

ist es gerade für den klinischen Einsatz wichtig, den Titer einer Viruspräparation möglichst exakt und wenig zeitaufwendig zu bestimmen. Bisher veröffentlichte PCR-Methoden benötigen ebenfalls serielle Verdünnungsreihen oder sind auf spezielle Gene gerichtet, wodurch die Einsatzmöglichkeit stark beschränkt ist.

In dieser Arbeit etablierten wir eine neue Methode für die Titration von infektiösen, transkriptionell aktiven rAAV-2-Partikeln ohne den Einsatz aufwendiger Verdünnungsreihen, Radioaktivität oder die Superinfektion mit Adenoviren oder Wildtyp AAV-2. Der hier vorgestellte Assay basiert auf dem Lebenszyklus von wt und rekombinanten AAV-2 nach der Infektion der Wirtszelle. Nach der Bindung an den Rezeptor, Endozytose und Translokation der Virionen in den Nukleus wird dort die virale ssDNA in dsDNA umgeschrieben, damit sie transkribiert werden kann. Ein älteres Model beschreibt eine *de Novo* Synthese des zweiten Stranges^{120, 121}, wohingegen eine neuere Arbeit Hinweise für die Rekrutierung von Plus- und Minus-ssDNA zur Herstellung von dsDNA unabhängig von der *de Novo* DNA-Synthese liefert¹²². Nicht-infektiöse Partikel gelangen nicht in die Zielzelle oder werden nach ihrer Endozytose nicht weiter prozessiert. In beiden Fällen bleibt die virale DNA in ihrer einzelsträngigen Form, welche in unserem Ansatz durch Verdauung mit ssDNA-spezifischer S1-Nuklease entfernt wurde. Die verbleibende virale dsDNA kann als die DNA der transkriptionell aktiven rAAV-2-Partikel angesehen werden. Die dsDNA kann mittels qPCR quantifiziert werden. Diese Methode ist weniger zeitaufwendig als die bisher verwendeten und erlaubt die Quantifikation von mehr als 20 verschiedenen Virussuspensionen innerhalb von fünf Stunden nach einer 24 h Inkubationsperiode. Unsere Ergebnisse sind konform mit denen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass sich drei Stunden nach der Infektion von HeLa-Zellen 93% aller AAV-2-Partikel bereits im Nukleus befinden¹²³. Die Konversion viraler ssDNA in dsDNA ist 24 Stunden nach der Infektion abgeschlossen¹²⁴, mit einer maximalen Konzentration von transkriptionell aktiven dsAAV-2 24 Stunden *post infectionem*^{124, 125}. Neben der schnellen und einfachen Anwendbarkeit ist dieser Assay mit hoher Reliabilität durchführbar. Die inter-experimentelle Variabilität liegt lediglich bei Faktor 1,5 ($SA \pm 0,47$). Vergleicht man dies z.B. mit einer anderen Standardmethode zur Titration von infektiösen AAV-2-Partikeln, der *dot blot* Analyse, so zeigt diese Standardabweichungen bis zu einem Faktor 100¹¹⁹.

Nachdem wir zeigen konnten, dass unser neuer Assay eine hohe Reliabilität aufweist, bestimmten wir für 33 Viruspräparationen die Titer und verglichen diese mit

den Ergebnissen einer Methode, die auf dem Nachweis des eGFP-Proteins beruht, welches per Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt wird^{89, 126}. Im Vergleich der Ergebnisse zeigte sich eine signifikante Korrelation der infektiösen Titer (Korrelationskoeffizient $r=0,99$) über 7 log Stufen. Neben der FACS-Analyse wurde der ICA als zweite Standardmethode zur Quantifikation von infektiösen rAAV-2-Partikeln gewählt. Auch hier zeigte sich eine signifikante Korrelation ($r=0,8$) über 5 log Stufen mit einer mittleren Differenz der Werte um den Faktor 3,41. Der Grund für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden könnte durch die postinfektiöse Konversion von viraler ssDNA in dsDNA erklärt werden. Nakai et al. zeigten, dass nach der Infektion mit AAV-2 die stabile dsDNA durch Rekrutierung einer komplementären Plus- und Minus-ssDNA synthetisiert wird, um dsDNA unabhängig von einer *de novo* Synthese zu bilden. Dies könnte einen Unterschied um den Faktor 2 zwischen den qPCR und ICA Ergebnissen erklären, da die qPCR beide, die minus und plus ssDNA von zwei infektiösen Partikeln detektiert.

Zusammengefasst stellt die qPCR eine schnell und einfach durchzuführende Methode für die Messung von infektiösen rAAV-2-Partikeln dar, die unabhängig von einem Markergen ist und somit für unterschiedliche therapeutische Gene, wie z.B. p53, verwendet werden kann. Die zuverlässige Quantifizierung von rAAV-2-Partikeln ist zum einen für gentherapeutische *in vivo* Experimente unerlässlich, um die Ergebnisse innerhalb eines Labors und zwischen unterschiedlichen Laboratorien vergleichen zu können. Des Weiteren stellen diese präklinischen Studien die Basis für rAAV-2 vermittelte gentherapeutische Anwendungen in der Klinik dar, wo es sich um eine unabdingbare Grundvoraussetzung handelt, den infektiösen Titer der viralen Präparationen zu kennen und dosieren zu können.

D.II. Zytotoxische Effekte von rAAV-p53 und Bortezomib auf NSCLC-Zelllinien

Aufgrund der erhöhten Resistenz für konventionelle Therapien bei einigen Tumoren mit p53-Mutationen wurden klinische Studien initiiert, bei denen eine p53-Gentersatztherapie durch adenovirale Vektoren mit einer Cisplatinapplikation bei Patienten mit inkurablen NSCLC kombiniert wurde^{82, 84}. Hier zeigten sich eine sehr geringe vektorbezogene Toxizität und kein Anstieg von Nebenwirkungen, die durch Cisplatin verursacht werden. Patienten, die mit p53 und Cisplatin behandelt wurden, zeigten eine signifikant größere lokale Tumorrogression als die Patienten aus der Kontrollgruppe, denen kein p53 injiziert wurde⁸². Eine der ersten klinischen Studien,

in denen p53 mittels eines adenoviralen Vektors bei Patienten mit inkurablen NSCLC direkt in den Tumor injiziert wurde, wurde von J.A. Roth 1996 veröffentlicht¹²⁷, eine weitere folgte 1999. Bei dieser Phase-I-Studie mit 28 Patienten zeigte sich ein erfolgreicher Gentransfer in 86% der auswertbaren Fälle, eine Genexpression war in 46% nachweisbar. Bei 92% der Patienten, die das Gen exprimierten, wurde eine erhöhte Apoptoserate der Tumorzellen gemessen. Dabei wurde bei keinem der Patienten eine signifikante Toxizität beobachtet. Bei Zweien ergab sich eine Tumorreduktion um mehr als 50%, ein Patient war nach mehr als einem Jahr tumorfrei und bei 64% zeigte sich eine Stabilisierung der Erkrankung über 2-14 Monate⁸³. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine kombinierte Behandlung bestehend aus Chemo- und Gentherapie sinnvoll erscheint.

Neben „klassischen“ Chemotherapeutika liegt der Fokus präklinischer und klinischer Untersuchungen auf der Entwicklung neuer molekularer, gezielter Therapien und deren Kombination mit konventioneller Chemotherapie oder mit anderen neuen Substanzklassen. Zu diesen „modernen“ Therapiemöglichkeiten gehören zum einen die Gentherapie und der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib.

Bortezomib hemmt selektiv das 26S Proteasom, welches eine wichtige Funktion bei der Degradation von Proteinen spielt, die in multiple zelluläre Prozesse eingebunden sind. Dabei handelt es sich um Proteine des Zellzyklus, der Gentranskription und Apoptose. Einige Arbeitsgruppen untersuchten die Fähigkeit von Bortezomib, Tumorzellen für die apoptotischen Effekte konventioneller Chemotherapien zu sensibilisieren, obwohl diese Mechanismen noch nicht genau verstanden sind¹²⁸⁻¹³⁰.

Wie bereits gezeigt wurde, sind NSCLC Zelllinien hoch empfänglich für die Infektion mit rAAV-2-Vektoren und die Behandlung mit rAAV-p53 erhöht die Sensitivität der Zellen für konventionelle Chemotherapie^{90, 126}. In der hier vorliegenden Arbeit haben wir die Effekte einer kombinierten Behandlung mit rAAV-p53 und dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib auf NSCLC-Zelllinien untersucht. Die kombinierte Behandlung von NSCLC-Zelllinien mit rAAV-p53 und Bortezomib führte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer signifikanten Hemmung des Tumorzellwachstums um 74% bei den H1299 und um 82% bei den H460 Zellen ($p < 0,0001$). Durch die Koinkubation mit beiden Substanzen wurde außerdem die Fähigkeit der Zellen zum klonogenen Wachstum signifikant gehemmt ($p < 0,0001$). Es ergab sich eine Reduktion der Koloniezahl um 58% und 82% für die H1299- und H460-Zellen. Die wachstumshemmenden Effekte waren mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert.

Dabei nimmt p53 eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose ein^{23, 25}. Mutationen in diesem Gen kommen in einem großen Anteil der Malignome vor^{25, 30-32}. Proteasomen-Inhibitor-induzierte Apoptose wurde sowohl p53-abhängig¹³¹ als auch p53-unabhängig beschrieben¹³². Dies impliziert, dass die Akkumulation von p53 und die daraus resultierende Hemmung des Tumorwachstums zumindest einen der Effekte der Proteasomen-Hemmung darstellen. Ebenso wie in Arbeiten von Mortensen et al.¹³⁰ und Yang et al.¹³³ konnten wir einen Anstieg der p53-Konzentration nach der Behandlung von NSCLC-Zelllinien mit Bortezomib zeigen. Dieser Effekt wurde durch die kombinierte Behandlung mit rAAV-p53 noch verstärkt.

Die Untersuchung der Apoptose ergab bei den p53-negativen H1299-Zellen einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate durch die Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib alleine. Die Kombination beider resultierte in einem additiven apoptotischen Effekt. Diese Ergebnisse repräsentieren den Einfluss von p53 auf die Apoptose und deuten ebenfalls auf die vielfältigen Ansatzpunkte von Bortezomib hin, Apoptose zu induzieren. Bei den H460-Zellen, die über einen normalen p53-Status verfügen, zeigte sich im Vergleich zu den H1299-Zellen bei allen Experimenten höhere Apoptoseraten. Die kombinierte Behandlung mit Bortezomib und rAAV-p53 resultierte in einem signifikanten, überadditiven Anstieg der Apoptose um den Faktor 14,45. Diese Ergebnisse unterstreichen die von Chen et al. beschriebene Beobachtung, dass Wildtyp-p53 Zellen für Proteasomen-Inhibitor-induzierte Apoptose zu sensibilisieren scheint¹³⁴.

Weitere Studien zeigen, dass die rAAV-2-Virionen nach der Infektion der Zielzelle durch Proteasomen degradiert werden und somit nur ein Teil der therapeutischen Transgene tatsächlich in den Nukleus gelangt und transkribiert werden kann¹³⁵. Durch die zusätzliche Behandlung mit dem Proteasomen-Inhibitor MG-132 konnte die Transduktionseffizienz von rAAV-Partikeln signifikant gesteigert werden, da das virale Kapsid nicht degradiert wird und das Vektorgenom so in den Nukleus gelangen kann^{136, 137}. Diese Ergebnisse sind eine weitere mögliche Erklärung für die von uns gemachten Beobachtungen der additiven Effekte auf NSCLC-Zellen durch die kombinierte Behandlung mit dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib und rAAV-p53. Trotz der ermutigenden Ergebnisse der gentherapeutischen klinischen Studien mit adenoviralen Vektoren ergeben sich für den klinischen Einsatz in der Therapie des Bronchialkarzinoms jedoch einige Schwierigkeiten. Im Gegensatz zu retroviralen

Vektoren, die sich zufällig in das Genom integrieren, wodurch die Gefahr von Insertions-Mutationen wichtiger Gene besteht, haben rAAV-2 durch die Entfernung der *rep-cap* Sequenzen die Fähigkeit zur spezifischen Integration in das menschliche Genom verloren. Das Genom von rAAV-2 liegt meist intrazellulär extrachromosomal vor, wodurch sich das Risiko einer vektorbedingten Mutation verringert⁸⁵⁻⁸⁷. Es bestehen jedoch Schwierigkeiten bei der Applikation der Vektoren. Eine intravenöse Anwendung ist bisher nicht erfolgreich durchführbar. Die meisten Menschen sind bereits mit dem Wildtyp AAV-2 in Kontakt gekommen⁸⁵. Dieser ist dem rAAV-2 in seinen antigenen Eigenschaften gleich, so dass zumindest eine Teilimmunisierung durch das Vorhandensein neutralisierender Antikörper vorliegen könnte. Dadurch können die Viren durch die Antikörper neutralisiert werden, bevor sie im Tumorgewebe wirksame Konzentrationen überhaupt erreicht haben. Aufgrund des weit gestreuten Tropismus von rAAV-2 ist es möglich, dass sie zum Beispiel an die Endothelzellen der Blutgefäße binden und so ebenfalls viele Viren die Tumorzellen gar nicht mehr erreichen¹¹⁶. Daher war es bisher nur möglich, virale Vektoren bronchoskopisch oder CT-gesteuert direkt in den Tumor zu applizieren. Denkbar wäre daher die Entwicklung von rAAV-2 mit einem spezifischen Tropismus für NSCLC, die eventuell als Aerosol verabreicht werden könnten.

Auch wenn der gentherapeutische Einsatz von rAAV-p53 noch einige Schwierigkeiten bereitet, ist die präklinische Evaluation von geeigneten Therapieschemata wichtig für die spätere klinische Anwendung. Basierend auf den Ergebnissen von Mortenson et al., die bei NSCLC Zelllinien synergistische Effekte von Bortezomib mit Gemcitabin und Carboplatin in Abhängigkeit von der Reihenfolge der Applikation fanden¹³⁰, wurde eine klinische Phase-II-Studie initiiert, bei der Bortezomib zusätzlich zu Gemcitabin/Carboplatin verabreicht wurde. Dadurch wurden bei akzeptabler Toxizität die mittleren Überlebensraten der Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC deutlich verbessert, so dass sich eine Phase-III-Studie derzeit in Entwicklung befindet¹³⁸.

Die in-vitro bisher wenig untersuchte Kombination von Bortezomib mit Docetaxel zum Beispiel brachte in einer klinischen Phase-II-Studie an Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC keinen Überlebensvorteil im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Bortezomib, lediglich eine höhere Rate an Nebenwirkungen¹³⁹. Diese Beispiele verdeutlichen den Nutzen von präklinischen Untersuchungen

möglicher synergistischer oder antagonistischer Effekte, um die Effizienz von neuen Therapiestrategien bei Patienten mit NSCLC zu steigern.

Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29.
2. Schiller JH. Current standards of care in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2001; 61: 3-13.
3. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 2003; 41: 245-258.
4. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *BBA* 1998; 1378: F21-F59.
5. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thor Cardiovasc Surg* 1999; 118: 1136-1152.
6. Pitterle DM, Jolicoeur EMC, Belper G. Hot spots for molecular genetic alterations in lung cancer. *In Vivo* 1998; 12: 643-658.
7. Drings P, Dienemann H, Wannenmacher M. Management des Lungenkarzinoms. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2003.
8. Field RW, Krewski D, Lubin JH et al. An overview of the North American residential radon and lung cancer case-control studies. *J Toxicol Environ Health A* 2006; 69: 599-631.
9. Kunzli N, Tager IB. Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med Wkly* 2005; 135: 697-702.
10. Maeshima AM, Niki T, Maeshima A, Yamada T, Kondo H, Matsuno Y. Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. *Cancer* 2002; 95: 2546-2554.

11. Fontenelle LJ, Campbell D. Coexisting bronchogenic carcinoma and pulmonary tuberculosis. *Ann Thorac Surg* 1970; 9: 431-435.
12. Cassidy A, Myles JP, Liloglou T, Duffy SW, Field JK. Defining high-risk individuals in a population-based molecular-epidemiological study of lung cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 1295-1301.
13. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059-1068.
14. Müller KM, Wiethage T. Pathologie, Klassifikation und Stadieneinteilung bösartiger Lungentumoren. *Radiologe* 2004; 44: 415-426.
15. Wittekind Ch, Klimpfinger M, Sobin LH. UICC (2005) TNM Atlas. Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. 5. Aufl., Springer Medizin, Heidelberg.
16. Flood WA. Overview of non-small cell lung cancer. *Manag Care* 2005; 14: 4-8.
17. Belani CP. Adjuvant and neoadjuvant therapy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: S9-S15.
18. Pujol JL, Carestia L, Daures JP. Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *Br J Cancer* 2000; 83: 8-15.
19. Urban T, Baleyte T, Chastang CL et al. Standard combination versus alternating chemotherapy in small cell lung cancer: a randomised clinical trial including 394 patients. *Lung Cancer* 1999; 25: 105-113.
20. Kosmidis PA, Samantas E, Fountzilas G et al. Cisplatin/etoposide versus carboplatin/etoposide chemotherapy and irradiation in small cell lung cancer: A randomized phase III study. *Semin Oncol* 1994; 21: 23-30.

21. Minna JD, Fong K, Zöchbauer-Müller S, Gazdar AF. Molecular pathogenesis of lung cancer and potential translational applications. *Cancer J* 2002; 8: 41-46.
22. Greenblatt MS, Harris CC. Molecular Genetics of lung cancer. *Cancer Surveys* 1995; 25: 293-313.
23. Breuer RHJ, Postmus PE, Smit EF. Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* 2005; 72: 313-330.
24. Kohno T, Yokota J. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis* 1999; 20: 1403-1410.
25. Campling BG, El-Deiry WS. Clinical implication of p53 mutation in lung cancer. *Mol Biotech* 2003; 24: 141-156.
26. Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Oláh E, Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathology Oncology Research* 2001; 7: 6-13.
27. Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, Soria E, Pardo J. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation , low apoptosis and worse prognosis in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 2004; 17: 440-448.
28. Tomizawa Y, Nakajima T, Kohno T, Saito R, Yamaguchi N, Yokota J. Clinicopathological significance of FHIT protein expression in stage I non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 5478-5483.
29. Rohr UP, Rehfeld N, Geddert H et al. Prognostic relevance of fragile histidine triad protein expression in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 180-185.
30. Nakamura Y. Isolation of p53 target genes and their functional analysis. *Cancer Sci* 2004; 95: 7-11.

- ³¹. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
- ³². Schreiber G, Pitterle D, Kim YC, Belper G. Molecular genetic analysis of primary lung cancer and cancer metastatic to the lung. *Anticancer Research* 1999; 19: 1109-1116.
- ³³. O'Connor PM, Jackman J, Bae I et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlation with the growth inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57: 4285-4300.
- ³⁴. Isobe T, Hiyama K, Yoshida Y, Fujiwara Y, Yamakido M. Prognostic significance of p53 ras gene abnormalities in lung adenocarcinoma patients with stage I disease after curative resection. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1240-1246.
- ³⁵. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4828-4831.
- ³⁶. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. P53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 8493-8497.
- ³⁷. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 1995; 10: 109-115.
- ³⁸. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; 35: 531-539.
- ³⁹. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.

40. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
41. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327.
42. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinomas of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323: 561-565.
43. Ohta Y, Watanabe Y, Murakami S et al. Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 1041-1045.
44. Rehfeld N, Geddert H, Atamna A et al. The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 2006; 5: 4.
45. Zhang X, Horwitz G, Heaney AP, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. Human pituitary tumor transforming gene (PTTG): structure, function and expression in pituitary tumors. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 156-166.
46. Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J Biol Chem* 2000; 275: 19422-19427.
47. Dominguez A, Ramos-Morales F, Romero F et al. hPTTG, a human homologue of rat PTTG, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene*, 1998; 17: 2187-2193.
48. McCabe CJ, Gittones NJ. PTTG- a new pituitary tumor transforming gene. *J Endocrinol* 1999; 162: 163-166.
49. Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with

advanced non-small cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3210-3218.

50. Gautschi O, Betticher DC. Molekulare Therapie beim Lungenkarzinom. *Therapeutische Umschau* 2004; 61: 365-371.

51. Leslie WT, Bonomi PD. Novel treatments in non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004; 18: 245-267.

52. Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R et al. Targeted Therapies for Cancer 2004. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 598-609.

53. Janne PA. The role of epidermal growth factor receptor in advanced non-small cell lung carcinoma. *Ann Med* 2003; 35: 450-457.

54. Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 397-406.

55. Maione P, Rossi A, Airoma G, Ferrara C, Castaldo V, Gridelli C. The role of targeted therapy in non-small cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004; 51: 29-44.

56. Cascone T, Morelli MP, Ciardiello F. Small molecule epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 46-48.

57. Sheperd FA, Rodriguez PJ, Ciuleanu T et al. Erlotinib in previously treated non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123-132.

58. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763.

- ⁵⁹. Saba N, Khuri F. Novel targeted agents in the treatment of lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13: 609-629.
- ⁶⁰. Sandler AB, Gray R, Brahmer J et al. Randomized phase II/III trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC #704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial –E4599. Presented at the 41st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Orlando, FL, 2005.
- ⁶¹. Adams J. The Proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews* 2004; 4: 349-360.
- ⁶². Park DJ, Lenz HJ. The role of proteasome inhibitors in solid tumors. *Ann Med* 2004; 36: 296-303.
- ⁶³. Adams J. The proteasome: structure, function and role in the cell. *Cancer Treat Rew* 2003a; 29: 3-9.
- ⁶⁴. Gillissen S, Groettrup M, Cerny T. The Proteasome, a new target for cancer therapy. *Onkologie* 2002; 25: 534-539.
- ⁶⁵. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 630-639.
- ⁶⁶. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome Inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 290-296.
- ⁶⁷. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2003b; 5: 417-421.
- ⁶⁸. Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *The Oncologist* 2002; 7: 9-16.

- ^{69.} Voorhees PM, Dees EC, O'Neil BO, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Cin Cancer Res* 2003; 9: 6316-6325.
- ^{70.} Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: a novel, first-in-class Proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 2003; 10: 361-369.
- ^{71.} Adams J, Elliott PJ. New agents in cancer clinical trials. *Oncogene* 2000; 19: 6687-6692.
- ^{72.} Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 301-310.
- ^{73.} Cusack JC, Liu R, Houston M et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor- κ B inhibition. *Cancer Res* 2001; 61: 3535-3540.
- ^{74.} Wang C, Cusack J, Liu R, Baldwin A. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nat Med* 1999; 5: 412-417.
- ^{75.} Gumerlock PH, Kawaguchi T, Moisan LP et al. Mechanisms of enhanced cytotoxicity from docetaxel-PS341 combination in non-small cell lung carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: 304a.
- ^{76.} Loo TW, Clarke DM. Quality control by proteases in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1998; 273:14671-4.
- ^{77.} Lenz HJ. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 41-48.
- ^{78.} Bunn PA. The potential role of proteasome inhibitors in the treatment of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5263-4265.

- ^{79.} Jackson G, Einsele H, Moreau P, Miguel JS. Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 591-602.
- ^{80.} Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 2005; 104: 1794-1807.
- ^{81.} Scagliotti G. Proteasome inhibition in lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 58: 177-189.
- ^{82.} Roth JA, Grammer SF. Gene replacement therapy for non-small cell lung cancer: a review. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004; 18: 215-229.
- ^{83.} Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91: 763-771.
- ^{84.} Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 609-622.
- ^{85.} Berns KI, Giraud C. Biology of Adeno-associated Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 218: 1-23.
- ^{86.} Tal J. Adeno-Associated Virus-Based Vectors in Gene Therapy. *J Biomed Sci* 2000; 7: 279-291.
- ^{87.} Young SM, Samulski RS. Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *PNAS* 2001; 98: 13525-13530.
- ^{88.} Wang XS, Khuntirat B, Qing K et al. Characterization of Wild-Type Adeno-Associated Virus Type 2-like Particles Generated during Recombinant Viral Vector Production and Strategies for their Elimination. *J Virol* 1998; 72: 5472-5480.

- ⁸⁹. Hörster A, Teichmann B, Hormes R, Grimm D, Kleinschmidt J, Sczakiel G. Recombinant AAV-2 harboring gfp-antisense/ribozyme fusion sequences monitor transduction, gene expression and show anti-HIV-1 efficacy. *Gene Ther* 1999; 6: 1231-1238.
- ⁹⁰. Rohr UP, Wulf MA, Stahn S et al. Non-small lung cancer cells are prime targets for p53 gene transfer mediated by a recombinant adeno-associated virus type-2 vector. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 898-906.
- ⁹¹. Monahan PE, Samulski RJ. AAV: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* 2000a; 7: 24-30.
- ⁹². Veldvijk MR, Berlinghoff S, Laufs S et al. Suicide gene therapy of sarcoma cell lines using recombinant adeno-associated virus 2 vectors. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 577-584.
- ⁹³. Wendtner CM, Kofler DM, Mayr C, Bund D, Hallek M. The potential of gene transfer into primary B-CLL cells using recombinant virus vectors. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 897-904.
- ⁹⁴. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 2000; 18: 119-128.
- ⁹⁵. Anderson WF. Excitement in gene therapy! *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1483-1484.
- ⁹⁶. Xu R, Li H, Tse LY, Kung HF, Lu H, Lam KS. Diabetes gene therapy: potential and challenges. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 65-82.
- ⁹⁷. Lee HC. Recent advance in hepatic insulin gene therapy. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66: 3-10.
- ⁹⁸. Rucker M, Fraites TJ, Porvasnik SL et al. Rescue of enzyme deficiency in embryonic diaphragm in a mouse model of metaolic myopathy: Pompe disease. *Development* 2004; 131: 3007-3019.

- ^{99.} Hong YB, Kim EY, Yoo HW, Jung SC. Feasibility of gene therapy in Gaucher disease using an adeno-associated virus vector. *J Hum Genet* 2004; 49: 536-543.
- ^{100.} Griffey M, Bible E, Vogler C et al. Adeno-associated virus 2-mediated gene therapy decreases autofluorescent storage material and increases brain mass in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 360-369.
- ^{101.} Gao K, Wu YJ, Wu XB, Rao CM, Wang JZ. Expression of human nerve growth factor beta gene in central nervous system mediated by recombinant adeno-associated viruses type-2 vector. *Chin Med J* 2004; 117: 1370-1376.
- ^{102.} Yamada M, Iwatsubo T, Mizuno Y, Mochizuki H. Overexpression of alpha-synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of alpha-synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease. *J Neurochem* 2004; 91: 451-461.
- ^{103.} Rolling F. Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther* 2004; 11: 26-32.
- ^{104.} Moss RB, Rodman D, Spencer LT et al. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* 2004; 125: 509-521.
- ^{105.} Wagner JA, Reynolds T, Moran ML et al. Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFRT in maxillary sinus. *Lancet* 1998; 351: 1702-1703.
- ^{106.} Kay MA, Manno CS, Ragni MV et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000; 24: 257-261.

- ¹⁰⁷. Grimm D, Kern A, Pawlita M, Ferrari FK, Samulski RJ, Kleinschmidt JA. Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther* 1999a; 6: 1322-1330.
- ¹⁰⁸. Flotte TR, Solow R, Owens RA et al. Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 349-356.
- ¹⁰⁹. Rohr UP, Wulf MA, Stahn S et al. Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR. *J Virol Methods* 2002a; 106: 81-89.
- ¹¹⁰. Veldwijk MR, Topaly J, Laufs S et al. Development and optimization of a real-time quantitative PCR-based method for the titration of AAV-2 vector stocks. *Mol Ther* 2002; 6: 272-278.
- ¹¹¹. Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* 1992; 66: 6922-6930.
- ¹¹². Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 1999; 6: 973-985.
- ¹¹³. Salvetti A, Orève S, Chadeuf G et al. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 695-706.
- ¹¹⁴. Drittanti L, Rivet C, Manceau P, Danos O, Vega M. High throughput production, screening and analysis of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 2000; 7: 924-929.
- ¹¹⁵. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2745-2760.

- ^{116.} Rohr UP, Kronenwett R, Grimm D, Kleinschmidt J, Haas R. Primary human cell differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression. *J Virol Methods* 2002b; 105: 265-275.
- ^{117.} Woodall CA. E.coli plasmid vectors. *Methods and Applications* 2003; 235: 55-60.
- ^{118.} Cao L, Liu Y, Daring MJ, Xiao W. High-Titer, Wild-Type Free Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Production Using Intron-Containing Helper-Plasmids. *J Virol* 2000; 74: 11456-11463.
- ^{119.} Atkinson EM, Debelak DJ, Hart LA, Reynolds TC. A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors. *Nucl Acids Res* 1998; 26: 2821-2823.
- ^{120.} Ferrari FK, Samulski T, Shenk T and Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1996; 70: 3227-3234.
- ^{121.} Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, Dematteo R, Burda JF, Wilson JM. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading strand synthesis. *J Virol* 1996;70: 520-532.
- ^{122.} Nakai H, Storm TA, Kay MA. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* 2000; 74: 9451-9463.
- ^{123.} Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by Rac1 and Phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* 2000; 74: 9184-9196.
- ^{124.} Vincent-Lacaze N, Snyder RO, Gluzman R, Bohl D, Lagarde C Danos O. Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of skeletal muscle. *J Virol* 1999; 73: 1949-1955.

- ¹²⁵. Duan D, Sharma P, Dudus et al. Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J Virol* 1999; 73: 161-166.
- ¹²⁶. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989; 63: 3822-3828.
- ¹²⁷. Roth JA , Nguyen D, Lawrence DD et al. Retrovirus mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Med* 1996; 2: 985-991.
- ¹²⁸. Bold RJ, Chandra J, McConkey DJ. Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 279-285.
- ¹²⁹. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2638-2645.
- ¹³⁰. Mortenson MM, Schlieman MG, Virudachalam S, Bold RJ. Effects of the proteasome inhibitor bortezomib alone and in combination with chemotherapy in the A549 non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 343-353.
- ¹³¹. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. P53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 1997; 272: 12893-12896.
- ¹³². Shinohara K, Tomioka M, Nakano H, Toné S, Ito H, Kawashima S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem J* 1996; 317: 385-388.
- ¹³³. Yang Y, Ikezoe T, Saito T, Kobayashi M, Koeffler HP, Taguchi H. Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling. *Cancer Sci* 2004; 95: 176-180.

- ¹³⁴. Chen F, Chang D, Goh M, Klibanov SA, Ljungman M. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. *Cell Growth Differ* 2000; 11: 239-246.
- ¹³⁵. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 397-403.
- ¹³⁶. Douar AM, Poulard K, Stockholm D, Danos O. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 2001; 75: 1824-1833.
- ¹³⁷. Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* 2000; 105: 1573-1587.
- ¹³⁸. Davies AM, McCoy J, Lara PN, Gumerlock PH, Crowley J, Gandara DR. Bortezomib + Gemcitabine (Gem)/carboplatin (Carbo) results in encouraging survival in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a phase II Southwest Oncology Group (SWOG) trial (S0339). *Am Soc Clin Oncol* 2006; Abstract No: 7017.
- ¹³⁹. Fanucchi MP, Fossella F, Fidias P. Bortezomib ± docetaxel in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase 2 study. *Am Soc Clin Oncol* 2005; Abstract No: 7024.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Ulrich Rohr, der jederzeit für meine Fragen ein offenes Ohr hatte. Seine Bereitschaft, sich Zeit für Diskussionen zu nehmen und mir mit konstruktiver Kritik und Anregungen zur Seite zu stehen, wenn es einmal nicht weiter ging, hat wesentlich zu dem Fortkommen meiner Arbeit beigetragen. Ich freue mich sehr, dass ich sie in einem so angenehmen Arbeitsklima durchführen konnte, und dass aus dieser Zeit freundschaftliche Beziehungen entstanden sind.

Mein Doktorvater und Referent PD Dr. med. Ralf Kronenwett hat mich mit großem Engagement bei der Durchführung und schriftlichen Ausarbeitung unterstützt und meine Arbeit begutachtet. Für seine ständige Hilfsbereitschaft bin ich ihm sehr dankbar.

Prof. Dr. med. Rainer Haas danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Mein Mitstreiter Marc-André Wulf hat mich zeitaufwendig und mit viel Geduld in die Labortechniken eingeführt. Ich danke ihm für seine Hilfestellung, die mir den Einstieg in meine Arbeit wesentlich erleichtert hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich bedanken, deren Förderung und Unterstützung mir ein reibungsloses Studium mit dem Abschluss dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein persönlicher Dank gilt Marc Micheel, der mich jederzeit bei meiner Arbeit unterstützt hat.

Die Hilfsbereitschaft meiner Familie, Uta und Peter Sander und meiner Kollegen hat wesentlich zu der erfolgreichen Arbeit an meiner Promotion beigetragen.

Curriculum Vitae

Zu meiner Person

Adresse	Germaniastr. 35 40223 Düsseldorf
Geburtstag	30.08.1979
Geburtsort	Mettmann
Familienstand	ledig

Schulbildung

1986-1990	Städtische Gemeinschaftsgrundschule Erkrath-Hochdahl
1990-1999	Städtisches Gymnasium Erkrath-Hochdahl

Hochschulausbildung

Seit 1999	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Dezember 2002	Beginn meiner Dissertation „Quantifizierung von infektiösen rAAV-2-Partikeln und deren therapeutischer Einsatz bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien“ Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
2002 – 2005	Studentische Hilfskraft im Institut für Immunbiologie und in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
2005 - 2006	Praktisches Jahr in der Universitätsklinik Düsseldorf und dem Regionalspital Fricktal, Rheinfelden, Schweiz
August 2001	Ärztliche Vorprüfung
August 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

15.06. – 30.09.2006	Assistenzärztin in der Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie bei Herrn PD Dr. med. Haage, HELIOS Klinikum Wuppertal
Seit 15.10.2006	Assistenzärztin in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie bei Herrn Prof. Dr. med. R. Haas, Universitätsklinikum Düsseldorf

Zusammenfassung

Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) stellen einen interessanten Vektor für eine somatische Gentherapie bei angeborenen Erkrankungen und Tumoren dar. Ihr Einsatz erfordert zur exakten Dosierung eine zuverlässige Quantifizierung der infektiösen Viruspartikel. Viele der Standardverfahren sind jedoch zeitaufwendig und fehleranfällig. Daher etablierten wir eine quantitative real-time PCR für die Titration von infektiösen rAAV-2-Partikeln. Diese qPCR misst die doppelsträngige DNA (dsDNA) der Viren, die nach der Infektion der Zellen in den Zellkern gelangt sind und deren DNA transkribiert wird. Bei der Titration 30 verschiedener rAAV-2 Fraktionen ergab sich eine Schwankung der Werte um den Faktor 1,5 ($SA \pm 0,47$) mit einem Variationskoeffizient von 31,3%. Die infektiösen Titer der qPCR wurden mit den Ergebnissen von Standardmethoden wie der FACS-Analyse oder des aufwendigeren *infectious center assays* (ICA) verglichen. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation über 7 log Stufen mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,99$ bzw. $0,80$ ($p<0,001$). Der Vorteil der qPCR besteht in der gleichzeitigen Quantifizierung infektiöser rAAV-2-Partikel von mehreren rAAV-2-Präparationen, unabhängig von einem bestimmten Markergen.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand aus dem präklinischen Einsatz von therapeutischen rAAV-2-Vektoren, die das Tumorsuppressorgen p53 in Zielzellen transferieren. P53 wurde gewählt, da es in vielen Tumoren Mutationen aufweist und eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Progression spielt. Im Zentrum stand die Frage, welche Effekte die Kombination mit einem neuen Medikament in der Tumorthherapie, dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib, in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien hervorruft. Dabei wurden mittels Viabilitäts-Assay, *Colony long term assay*, Apoptose-ELISA und Western Blot das Verhalten der Zellen nach der einzelnen und kombinierten Behandlung mit rAAV-p53 und Bortezomib untersucht. Die zytotoxischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen zeigten bei der Kombination synergistische Effekte. So wurde das Tumorzellwachstum abhängig von der Zelllinie um bis zu 82% ($SA \pm 5,70\%$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle gehemmt und die Apoptoserate signifikant bis um den Faktor 14,47 ($SA \pm 2,38$) gesteigert ($p<0,001$). In einem klonogenen Langzeit-Assay bildeten kombiniert behandelte Zellen 58%-81% weniger Kolonien als die unbehandelten Zellen. Im Gegensatz zu rAAV-p53 hatte der Kontrollvektor rAAV-GFP keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Durch die Transfektion der Zellen mit rAAV-p53 zeigte sich eine Zunahme der p53-Proteinexpression, die durch die Koinkubation mit Bortezomib noch verstärkt wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Therapie des Bronchialkarzinoms die Restitution bzw. Erhöhung der p53-Expression in einem multimodalen Ansatz therapeutisch sinnvoll erscheint.