

Aus der Universitätsfrauenklinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. H. G. Bender

**Tumorspezifische Gentherapie  
gynäkologischer Karzinome mit konditional replizierenden  
Adenoviren**

Dissertation

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

vorgelegt von

Marius René Peter Porten

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Rein

Koreferent: Prof. Dr. med. Hartmut Hengel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Klassische Therapieansätze</b>	<b>2</b>
1.1.1 Mechanismen der Resistenzentstehung gegen Zytostatika	2
<b>1.2 Gentherapie als alternativer Therapieansatz</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Adenovirale Gentherapie</b>	<b>5</b>
1.3.1 Problematik der adenoviralen Gentherapie	6
1.3.2 Möglichkeiten zur Steuerung der viralen Replikation	7
1.3.3 Weitere Möglichkeiten zur Steuerung der adenoviralen Replikation	8
1.3.4 Möglichkeiten zur Verbesserung der adenoviralen Transduktionseffizienz	9
<b>2. Fragestellung und Zielsetzung</b>	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>12</b>
3.1.2 Zellen und Zelllinien	12
3.1.3 Kultivierung der Zellen	12
3.1.4 Subkultivierung	12
3.1.5 Kryokonservierung	13
3.1.6 Induktion der MDR1-Expression	14
3.1.7 FICOLL-Dichtezentrifugation	14
<b>3.2 DNA-/RNA-Analytik</b>	<b>14</b>
3.2.1 Restriktionsanalyse	14
3.2.2 PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol)-Extraktion	15
3.2.3 Photometrische Bestimmung von DNA und RNA	15
3.2.4 RNA-Isolation	16
3.2.5 cDNA-Synthese	16
3.2.6 PCR (Polymerase Chain Reaction)	17
3.2.7 Überprüfung der Qualität der cDNA durch $\beta$ -Actin-PCR	18
3.2.8 Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression	18
<b>3.3 Gelelektrophoretische Auftrennungsmethoden</b>	<b>19</b>
3.3.1 Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen	19
3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
<b>3.4 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>21</b>
3.4.1 Bakterienstämme	21
3.4.2 Medien und Aufzucht von <i>E. coli</i>	21

3.4.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	21
<b>3.4.4 Klonierung</b>	<b>22</b>
3.4.4.1 Plasmide zur Klonierung rekombinanter Adenoviren	22
3.4.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
3.4.4.3 Elektroporation	22
3.4.4.4 Plasmidpräparation	23
<b>3.5 Adenoviraler Gentransfer</b>	<b>23</b>
3.5.1 Klonierung des rekombinanten Adenovirusgenoms	23
3.5.2 Homologe Rekombination	24
3.5.3 Transfer in Verpackungszelllinie und Klonselktion	25
3.5.4 Produktion rekombinanter Adenoviren	26
3.5.5 Isolation von Adenoviren	26
3.5.6 Aufreinigung und Dialyse	27
<b>3.6 Titerbestimmung</b>	<b>28</b>
3.6.1 Photometrische Titerbestimmung	28
3.6.2 TCID <sub>50</sub> - Methode (Tissue Culture Infectious Dose)	29
<b>3.7 Luziferase-Reporterassay</b>	<b>31</b>
<b>3.8 Zytotoxizitätsassay (MTS-Assay)</b>	<b>32</b>
<b>3.9 Immunhistochemie</b>	<b>33</b>
<b>3.10 Tumor-Chemosensitivitätsassay (TCA-100)</b>	<b>34</b>
<b>3.11 Statistische Analyse</b>	<b>36</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Transkriptionales Targeting</b>	<b>37</b>
4.1.2 Steuerung der adenoviralen Replikation - Promotorauswahl	38
4.1.3 Untersuchung der rekombinanten adenoviralen Klone	39
4.1.4 Reporterassays zur Analyse des transkriptionalen Targeting	41
<b>4.2 Transduktionales Targeting</b>	<b>46</b>
<b>4.3 Kombination aus transkriptionalem und transduktionalem Targeting</b>	<b>49</b>
4.3.1 MTS-Assays mit nicht chemoresistenten Ovarialkarzinomzelllinien	51
4.3.2 MTS-Assays mit Normalgewebe	55
4.3.3 MTS-Assays mit chemoresistenten Karzinomzellen	58
<b>4.4 Immunhistochemischer Nachweis des viralen E1A Gens in Kokultur</b>	<b>63</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>65</b>

<b>5.1 Transkriptionales Targeting</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Transduktionales Targeting</b>	<b>67</b>
<b>5.3 Kombination von transkriptionalem und transduktionalem Targeting</b>	<b>69</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7. Abkürzungen</b>	<b>75</b>
<b>8. Literatur</b>	<b>79</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>84</b>
<b>9.1 FIGO-Stadien mit TNM-Klassifikation für das Ovarialkarzinom</b>	<b>84</b>
<b>9.2 Promotorsequenzen</b>	<b>85</b>
<b>9.3 Primersequenzen</b>	<b>85</b>
<b>9.4 Plasmidkarten</b>	<b>85</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>11. Erklärung</b>	<b>91</b>
<b>12. Lebenslauf</b>	<b>91</b>

## 1. Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen stellen in Deutschland und westlichen Industrienationen nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 425000 Menschen neu an Krebs (Robert Koch-Institut, 2006), wobei die größte und klinisch relevanteste Gruppe der menschlichen Krebserkrankungen maligne Entartungen von Epithelzellen (Karzinome) sind. In der Bevölkerung westlicher Industrienationen ist das Bronchialkarzinom die am häufigsten diagnostizierte Krebsart, gefolgt vom Mammakarzinom und kolorektalen Karzinom. Die häufigsten Krebstodesursachen stellen das Bronchialkarzinom, das Magenkarzinom und das Leberzellkarzinom dar (Parkin, Bray et al. 2005).

In der weiblichen Bevölkerung der westlichen Welt ist das Ovarialkarzinom der zweithäufigste Genitaltumor der Frau (Jemal, Siegel et al. 2006) und stellt die häufigste Todesursache unter gynäkologischen Malignomen dar (Johnston 2004). Jährlich wird in westlichen Staaten bei ca. 16 von 100000 Frauen eine Diagnose auf Ovarialkarzinom gestellt, bei ca. 8000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in Deutschland (Deutsche Krebsgesellschaft, 2003). Die höchste Inzidenz findet man bei Frauen ab dem 45. Lebensjahr, mit einer Spitze um das 60. bis 70. Lebensjahr. Das Life-time-risk (Risiko, im Laufe des Lebens an einem Ovarialkarzinom zu erkranken) beträgt ca. 1-2%. Statistisch gesehen gehören Kinderlosigkeit, Sterilität, spät gebärende Frauen und ein hoher sozioökonomischer Status zu den wichtigen Risikofaktoren. Eine mögliche Erklärung ist die durch viele Eisprünge hervorgerufene erhöhte Anzahl an „Verletzungen“ des Ovarialepithels (langjährige Einnahme hormonaler Kontrazeptiva wirkt protektiv, da weniger Eisprünge) und die häufige Proliferation desselben, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur malignen Entartung erhöht wird. In ca. 5% der Fälle finden sich noch genetische Faktoren, die bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms eine Rolle spielen. Dazu gehören Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA-1 und BRCA-2, die das Erkrankungsrisiko auf über 60% steigern lassen. Eine Besonderheit stellt das so genannte Lynch-Syndrom dar, das aus kolorektalen Karzinomen in Kombination mit Ovarial-, Endometrium-, Magen-, Nierenbecken- oder hepatobiliären Tumoren besteht. Hier erhöht sich das Erkrankungsrisiko um das 40fache bei einem Life-time-risk von 30-60%.

Die Diagnose des vom Keimepithel abstammenden Ovarialkarzinoms erfolgt in 75% der Fälle in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III und IV. Es kann lange Zeit unbemerkt bleiben, da es sich frühzeitig in der freien Bauchhöhle ausbreiten kann, zuerst innerhalb des kleinen Beckens oder im Douglas-Raum, danach auch übergreifend auf das Omentum majus, Leberoberfläche, Zwerchfellkuppel oder das gesamte Peritoneum. Ohne wesentliche Größenzunahme werden kaum Beschwerden empfunden, in den meisten Fällen kommt es bei einer ausgeprägten Peritonealkarzinose zum Auftreten eines klinisch apparenten Aszites.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befindet sich das Ovarialkarzinom meist schon in FIGO-Stadium III oder IV (FIGO-Stadien siehe Anhang), was insgesamt zu einer schlechten Prognose des Ovarialkarzinoms führt. Die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) aller Ovarialkarzinome beträgt 30-40%. Dabei ist zu beachten, dass in FIGO-Stadium I noch eine 80%-ige 5-JÜR besteht, in FIGO-Stadium III und IV nur noch eine 23%-ige bzw. 14%-ige 5-JÜR (Coleman, Gatta et al. 2003). Zur schlechten Gesamtprognose trägt außerdem die hohe Rezidivgefahr bei, etwa 75% der Patientinnen entwickeln ein Rezidiv.

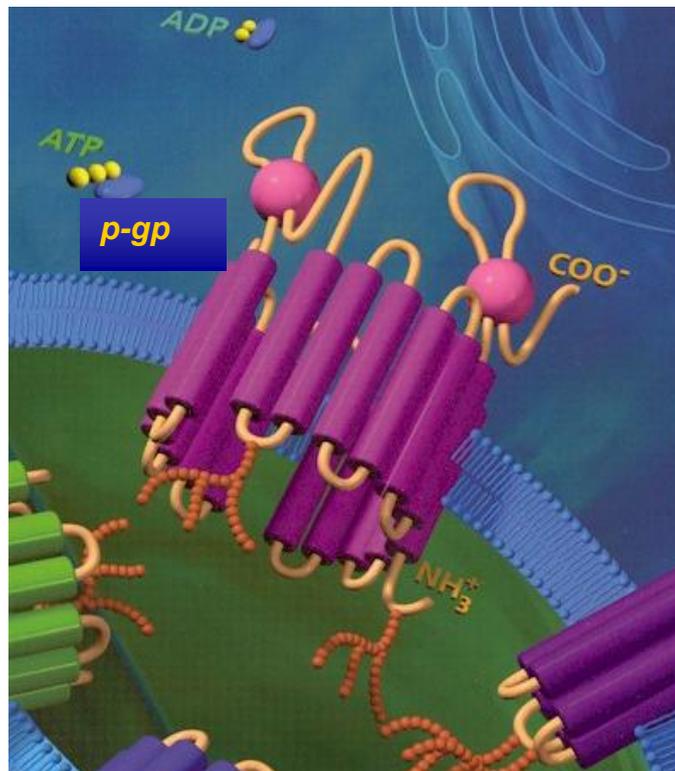
## **1.1 Klassische Therapieansätze**

Die Indikation zur Operation ist nach der Diagnose Ovarialkarzinom grundsätzlich gegeben (Pfisterer, Hilpert et al. 2003). Das Ziel einer Operation ist die komplette Entfernung des Primärtumors sowie aller intraperitonealen Metastasen. Eine optimale Tumorreduktion ist dabei Voraussetzung für das Langzeitüberleben (Breidenbach, Rein et al. 2002). Im Anschluss an die Operation erfolgt eine platinhaltige Kombinationschemotherapie mit Paclitaxel (Pfisterer, du Bois et al. 2004), die in der Regel in 6 Zyklen durchgeführt wird. Dadurch soll der Resttumor an einer Progression gehindert bzw. die verbliebenen Zellen zerstört werden. Die Chemotherapie kann auch neoadjuvant eingesetzt werden, mit dem Ziel bei primär inoperablen Befunden eine sekundäre Operation nach vorgeschalteter Chemotherapie zu ermöglichen. Grundsätzlich zeichnet sich das primäre Ovarialkarzinom durch eine hohe Chemosensitivität aus, doch unter der Primärtherapie kommt es oft zu einer Resistenzentstehung (Schondorf, Kurbacher et al. 2002). Trotz anfänglich guter Ansprechraten auf die Primärtherapie von etwa 70% kommt es häufig zu Rezidiven, an denen die Patienten letztendlich versterben (Ozols 2004). Zur Zeit gibt es keine kurative Therapie bei Rezidiv (Thigpen 2000). Daher hat die Chemotherapie beim Rezidiv lediglich palliativen Charakter und sollte sich an der Lebensqualität orientieren.

### **1.1.1 Mechanismen der Resistenzentstehung gegen Zytostatika**

Durch Analyse der Funktion und klinischer Bedeutung aktiver Transportproteine aus der Superfamilie der ABC-Transporter (ATP Binding Cassette) konnten Mechanismen für die beim Rezidiv des Ovarialkarzinoms auftretenden Resistenzen gegen Chemotherapie aufgeklärt werden. Unter den bislang 51 beim Menschen identifizierten Vertretern ist das MDR1-Genprodukt p-Glykoprotein (p-gp) der bisher am besten erforschte Stofftransporter. Das p-gp ist eine membranständige Effluxpumpe, die in vielen Geweben vorkommt und für die Stoffelimination aus der Zelle von Bedeutung ist. Es handelt sich um ein 170 kD großes phosphoryliertes und glykolisiertes Protein, das aus 1280 Aminosäuren besteht. P-gp besteht aus zwei homologen Hälften, die durch ein flexibles Mittelstück miteinander verbunden sind. Jede Hälfte hat eine hydrophobe Domäne mit sechs transmembranen

Regionen, gefolgt von einer ATP-Bindungsstelle. So entsteht eine Art Ring mit zentraler Pore mit einem Durchmesser von etwa 5 nm (siehe Abb. 1.1). Bevorzugt amphiphile, kationische Stoffe mit einer Größe von 200 bis 1800 kD werden dadurch unter ATP-Verbrauch von intrazellulär nach extrazellulär gepumpt.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des p-Glykoproteins, Quelle: [www.altcorp.com/AffinityLabeling/pglycoprotein.htm](http://www.altcorp.com/AffinityLabeling/pglycoprotein.htm)

Modellvorstellungen gehen davon aus, dass p-gp wie eine „Flippase“ funktioniert, die ihre Substrate nach Bindung an intrazelluläre Domänen in den Extrazellulärraum befördert. P-gp ist sehr unspezifisch. Zu seinen Substraten gehören verschiedene Medikamente wie die Zytostatika Doxorubicin, Paclitaxel, Vinblastin, Vincristin, oder die Herzmedikamente Verapamil, Chinidin, Amiodaron, Digoxin, und diverse Antiinfektiva wie Itraconazol, Indinavir oder Sparfloxacin (Fromm, Kauffmann et al. 2000; Westphal, Weinbrenner et al. 2000; Westphal, Weinbrenner et al. 2000; John, Kopke et al. 2002). Dabei sind einige Stoffe Induktoren, andere Stoffe Inhibitoren des p-gp. Die wichtigsten Induktoren des p-gp sind die Medikamente Rifampicin und Carbamazepin. Klinisch relevante Inhibitoren des p-gp sind Medikamente wie Itraconazol, Erythromycin, Verapamil, Ciclosporin, Atorvastatin oder Protonenpumpeninhibitoren. Daraus wird ersichtlich, dass bei entsprechender Kombination von Arzneistoffen durch Induktion oder Inhibition des p-gp der Serumspiegel von Medikamenten stark beeinflusst wird.

Physiologischerweise ist das p-gp funktioneller Bestandteil von Organschranken wie der Blut-Hirn-Schranke oder der Plazentabarriere. Es wird auf der luminalen Seite von Endothelzellen der Hirnkapillaren und der maternalen Seite des Synzytiotrophoblasten exprimiert und behindert den Übertritt von Wirkstoffen ins Gehirn bzw. den fetalen Kreislauf. Weitere wichtige Lokalisationen von p-gp sind Enterozyten in Dünn- und Dickdarm, Gallenkanälchen in der Leber, proximale Tubuluszellen in der Niere und Kapillarendothelzellen im Herz (Cordon-Cardo, O'Brien et al. 1990).

Man hat festgestellt, dass p-gp u.a. durch Behandlung mit Chemotherapeutika vermehrt auf der Zellmembran chemoresistenter Tumore exprimiert wird (Nooter and Herweijer 1991). Infolge einer Induktion des MDR1-Promotors durch Anthrazykline und Taxane kommt es zur erhöhten p-gp-Synthese, wodurch die Chemotherapeutika aktiv aus der Zelle befördert werden (Miller and Ojima 2001). Dadurch wird verhindert, dass die zytostatisch-wirkenden Chemotherapeutika ihre Toxizität intrazellulär entfalten.

## **1.2 Genterapie als alternativer Therapieansatz**

Die unzureichenden Heilungsaussichten des Ovarialkarzinoms nach klassischer Behandlung und die damit verbundene schlechte Prognose und verringerte Lebenserwartung der Patientinnen zeigen die Bedeutung und den Bedarf, der an neuen und alternativen Therapieansätzen in der Krebstherapie besteht. Es steht fest, dass die klassische Behandlung mit Operation und anschließender Chemotherapie zu einer effizienten Reduktion der Tumorlast führt. Die hohen Rezidivraten sowie die inapparente Mehrfachresistenzentwicklung unter Chemotherapie verdeutlichen den Bedarf an alternativen Therapieansätzen.

Die intensive Grundlagenforschung der letzten Jahre auf dem Gebiet der molekularen Medizin hat zu einem völlig neuen Verständnis von Krebserkrankungen geführt. Demnach ist Krebs das Ergebnis eines Akkumulationsprozesses genetischer Veränderungen, die meist erworben sind. Die Genterapie hat sich vor diesem Hintergrund als innovative Option zu einer molekularen Intervention von Krebserkrankungen entwickelt. Es gibt verschiedene genterapeutische Ansätze, die die molekularen Unterschiede zwischen malignen und benignen Zellen nutzen, um gezielt in den Prozess der Karzinogenese einzugreifen. Ein Ansatz ist die so genannte Mutationskompensation, welche die Korrektur der krebsverursachenden genetischen Veränderung durch das Einbringen eines funktionalen Gens bezeichnet (Nielsen and Maneval 1998). Die Suizidgenterapie (Prodrugtherapie) ist ein Ansatz, bei dem durch tumorspezifische Expression eines Suizidgens eine selektive Tumorzellzerstörung erreicht wird. Nach Gabe eines nicht toxischen Medikaments (Prodrug) wird durch das Produkt des Suizidgens, meist ein Enzym, das Medikament in ein Zellgift umgewandelt. Bei der Immunotherapie wird die immunologisch vermittelte

Tumorzellzerstörung unterstützt, indem die Tumorzellen genetisch modifiziert werden. Beim Einsatz konditional replikativer Adenoviren (CRAds) liegt jedoch ein grundsätzlich anderer Mechanismus zugrunde. Die Tumorzellzerstörung ist bei diesem Ansatz unmittelbare Folge der viralen Replikation (Webb and Smith 1970).

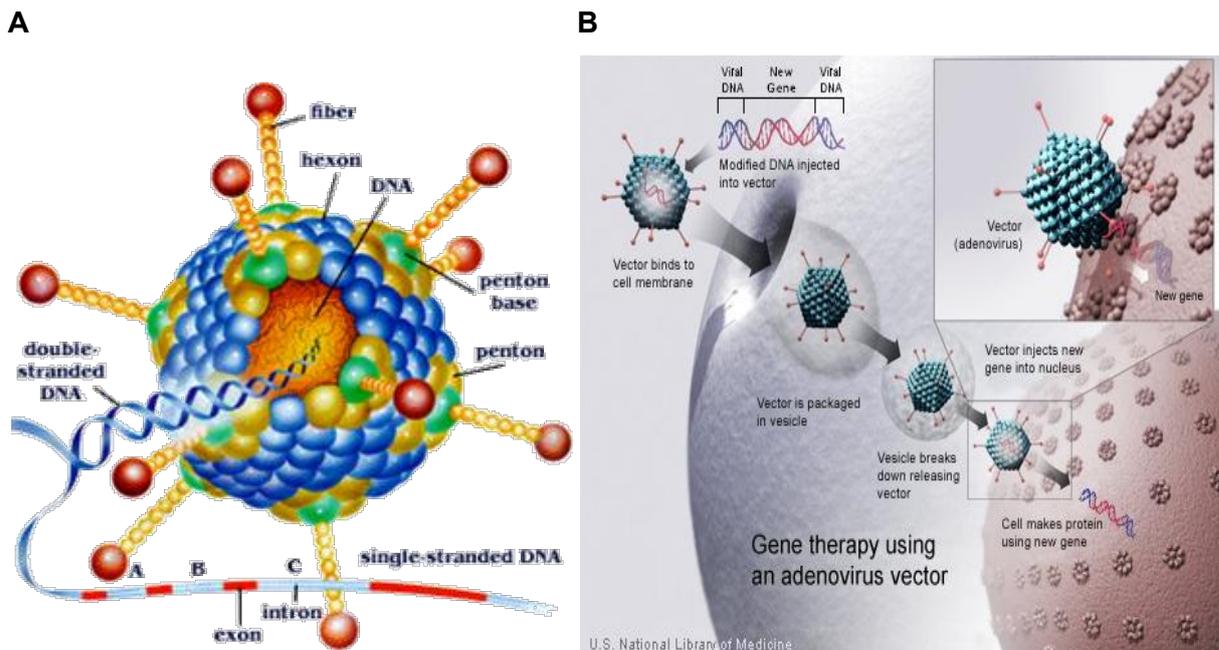
### 1.3 Adenovirale Gentherapie

Viren sind die zur Zeit am häufigsten eingesetzten Gentransfervektoren. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, sehr effizient Fremd-DNA in Zielzellen einzubringen. Sie weisen in Vergleich zu nicht viralen Vektoren, wie z.B. liposomalen Gentransfermethoden, eine viel höhere Gentransferkapazität auf. Unter den verschiedenen viralen Vektoren (Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpesviren) sind Adenoviren zur Zeit die bedeutendste Gruppe viraler Vektorsysteme, da sie ein breites Wirtszellspektrum besitzen, *in vivo* wie auch *in vitro* gute Gentransferraten zeigen, eine Gentransduktion auch in teilungsinaktiven Zellen ermöglichen und in großer Zahl kultiviert werden können (Bauerschmitz, Barker et al. 2002). Es wurden sowohl replikationsinkompetente als auch replikative Adenoviren erfolgreich in experimentellen Studien eingesetzt, wobei, wie oben bereits erwähnt, die Replikation der Adenoviren die Zellzerstörung zur Folge hat und die Freisetzung der Virionen, die ihrerseits Nachbarzellen infizieren.

Adenoviren sind ca. 80-100 nm groß, haben eine ikosaedrische Struktur, keine Membranhülle und ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 36 bis 38 kb Größe (siehe Abb. 1.3.1 A). Sie rufen beim Menschen überwiegend Atemwegserkrankungen hervor. Die Infektion der Adenoviren erfolgt über den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und den Vitronectin-Rezeptor, der aus  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen aufgebaut ist. Die Internalisierung des Adenovirus läuft in zwei Schritten ab (siehe Abb. 1.3.1 B). Zuerst bindet das Adenovirus an die Zelle und es kommt zur Interaktion zwischen dem zellulären CAR und der Fiber-Knob-Domäne des Virus. Danach interagieren in einem zweiten Schritt die adenoviralen Penton-Proteine mit dem Integrin-Rezeptor auf der Zelloberfläche. So wird das Adenovirus in Vesikeln in die Zelle aufgenommen, wobei es seine Fiber-Strukturen verliert (McDonald, Stockwin et al. 1999). In Endosomen-Vesikeln erfolgt eine Ansäuerung, die eine Konformationsänderung der Virus-Kapsid-Proteine zur Folge hat, die daraufhin mit der Endosomen-Membran interagieren können und die Zerstörung der Vesikel bewirkt. Die in das Zytoplasma freigesetzten Adenoviren werden mit Hilfe von Mikrotubuli zur Kernmembran transportiert und die virale DNA wird durch die Kernporen in den Zellkern eingeschleust, leere Virushüllen werden abgebaut.

Adenovirale Vektoren mit Deletionen der Genbereiche E1 und E3 können bis zu 7,5 kb Fremd-DNA aufnehmen. Der Genbereich E1 ist verantwortlich für die Regulation der Virusreplikation, Bereich E3 dient dem Schutz der infizierten Zelle vor dem Immunsystem.

Durch die Deletion des E1 Gens sind die rekombinanten adenoviralen Vektoren replikationsinkompetent. Die Produktion der rekombinanten Adenoviren muss deshalb in bestimmten Wirtszellen erfolgen, welche die Deletion der E1 Gene komplementieren und so die Replikation ermöglichen. Die E1-Genexpression, und somit die Virusreplikation, kann jedoch auch gezielt durch einen dem „frühen“ E1A Gen vorgeschalteten Promotor gesteuert werden (siehe 1.3.3).



**Abb. 1.3.1: Darstellung des Adenovirus Typ 5** **A:** schematische Darstellung; **B:** schematische Darstellung der Infektion der Zielzelle, Quellen: [www.dyralaeknir.com/www/index.st8](http://www.dyralaeknir.com/www/index.st8), <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/therapy/procedures>

### 1.3.1 Problematik der adenoviralen Gentherapie

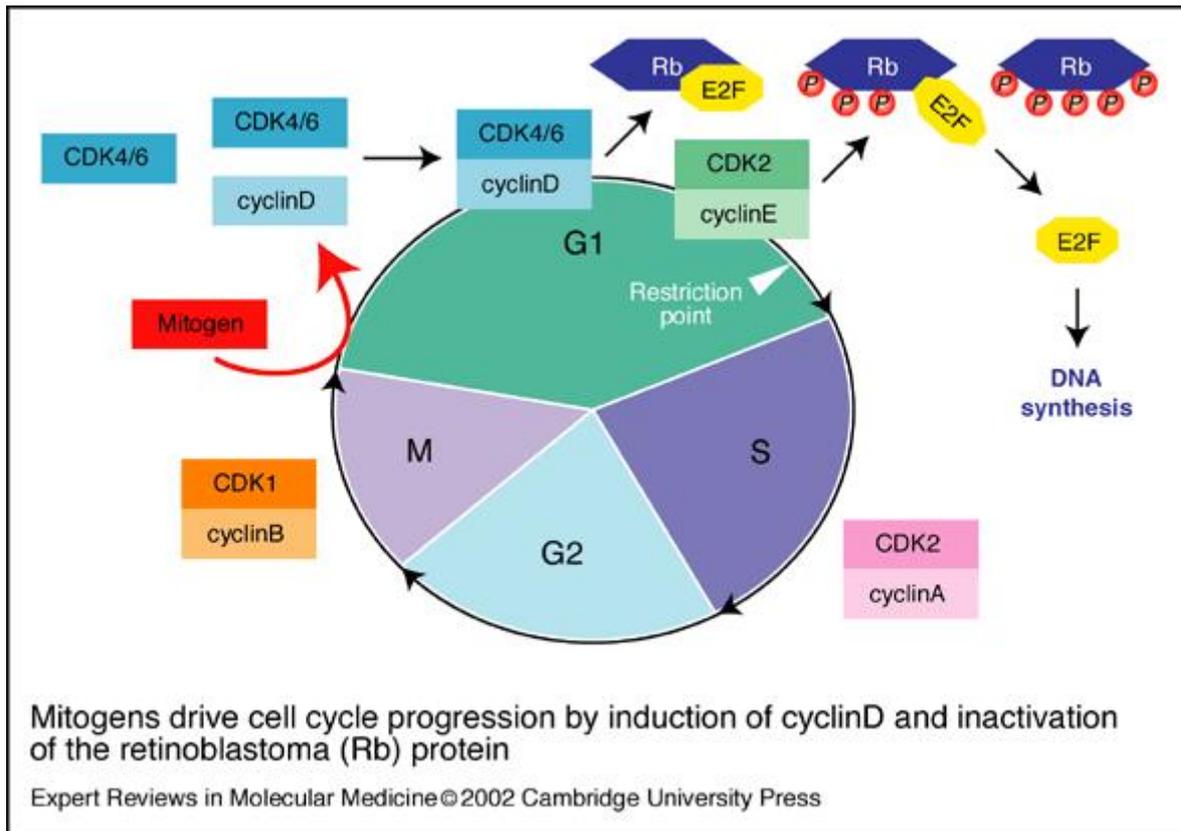
Die onkolytische Potenz der adenoviralen Gentherapie kann nur so gut sein wie die Transduktionsrate des Virus in die entsprechende Zielzelle. Dabei spielt die CAR-Dichte des jeweiligen Gewebes bei Infektion mit Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5.WT) eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass es verschiedene Tumorentitäten gibt, die eine nachgewiesene CAR-Defizienz aufweisen und mit Viren des Serotyp 5 kaum zu infizieren sind. (Dmitriev, Krasnykh et al. 1998; Hemmi, Geertsen et al. 1998; Li, Pong et al. 1999; Kanerva, Wang et al. 2002). Dazu gehören z.B. Ovarialkarzinome, Harnblasenkarzinome, Zervixkarzinome oder maligne Melanome. Allerdings findet sich in chemoresistenten Karzinomzellen wiederum eine erhöhte CAR-Expression (Hemminki, Kanerva et al. 2003). Noch ist die Funktion von CAR nicht endgültig aufgeklärt, sie sind vermutlich an der Zelladhäsion beteiligt, da sie in tight junctions lokalisiert sind (Cohen, Shieh et al. 2001). Aus dieser Problematik lässt sich schlussfolgern, dass eine Modifikation der adenoviralen Fiber-Knob-Domäne nötig ist, die zu einer CAR-unabhängigen Infektion der Zielzellen führt.

Im Gegensatz zu vielen Tumorzellen wird CAR jedoch ubiquitär auf der Zelloberfläche der meisten normalen Zellen exprimiert. Besonders in parenchymatösen Organen wie Leber, Milz, Lunge und Niere findet sich eine hohe CAR-Expression. Um Nebenwirkungen der adenoviralen Gentherapie in diesen wichtigen Organen zu limitieren, ist die Modifikation der viralen Fiber ebenso von Bedeutung.

### 1.3.2 Möglichkeiten zur Steuerung der viralen Replikation

So genannte Typ-1 CRAds stammen aus den ersten Ansätzen, die adenovirale Replikation zu steuern. Die Steuerung basiert auf dem Prinzip, spezifische biologische Veränderungen in Tumorzellen auszunutzen. In Typ-1 CRAds wird gezielt eine Mutation in der für die Virusreplikation notwendigen E1-Region durchgeführt, welche tumorspezifisch kompensiert werden kann. Dabei werden Unterschiede in der Zellzyklusregulation zwischen gesunden und Tumorzellen ausgenutzt. So zeigt sich in nahezu allen Tumorzellen eine Störung des G<sub>1</sub>-S-Phase-Checkpoint als Folge unterschiedlicher Deletionen oder Mutationen. Viele Tumorentitäten besitzen eine nachweisbare Deletion des Retinoblastom Gens 1 (Rb1) (Wang, Moran et al. 1995). Der Zellzyklus und die Funktion von Rb1 in gesunden Zellen sind in Abb. 1.3.2 schematisch dargestellt. Normalerweise bindet das adenovirale E1A-Genprodukt des Wildtypvirus an Rb1, das seinerseits an E2F gebunden ist. Dadurch kommt es zur E2F-Freisetzung, E1A bleibt an Rb1 gebunden, und die S-Phase wird induziert. So sorgt das Virus quasi „selber“ dafür, dass die Zelle proliferiert und es repliziert wird.

Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde 2000 ein Adenovirus entwickelt, welches eine 24-Basenpaare umfassende Deletion der Rb-Bindedomäne in der viralen E1A Region enthält (Fueyo, Gomez-Manzano et al. 2000). Dieses als Ad5.Δ24 bezeichnete Adenovirus repliziert nicht in gesunden Zellen mit intaktem G<sub>1</sub>-S-Phase-Checkpoint, sondern nur in Zellen, die einen Defekt im Rb-Pathway haben, proliferieren und dadurch für die Virusreplikation sorgen. Das von A. Kanerva et al. 2002 konstruierte Adenovirus Ad5/3.Δ24 besaß zusätzlich noch eine 5/3-Fiberchimäre (s.u.) und wurde erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet (Kanerva, Wang et al. 2002).



**Abb. 1.3.2: Zellzyklus** schematisch, Quelle: [www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004416h.htm](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004416h.htm)

### 1.3.3 Weitere Möglichkeiten zur Steuerung der adenoviralen Replikation

Beim so genannten „transkriptionalen Targeting“ wird das „frühe“ (immediate early) adenovirale E1A Gen unter Kontrolle eines der jeweiligen Tumorentität entsprechenden Promotors gestellt (so genannte Typ-2 CRAds). Das E1A Gen kodiert für ein Protein, das direkt nach Infektion der Zielzelle für die Aktivierung weiterer viraler Promotoren verantwortlich ist. Ohne die Aktivierung werden weitere adenovirale Gene nicht repliziert. Das bedeutet, dass im Idealfall virale Partikel hauptsächlich in Tumorgewebe, nicht aber im umgebenden Normalgewebe amplifiziert werden. Daher sind die Kriterien für die Auswahl geeigneter tumorspezifischer Promotoren zum einen die hohe Expression des korrespondierenden Gens im Tumor und zum anderen eine möglichst niedrige Expression in normalem Gewebe. Systematische Untersuchungen von Genexpressionsmustern in Tumoren und normalem Gewebe mittels Microarray- und Genchip-Technologie konnten in den vergangenen Jahren verschiedene potentiell geeignete Promotoren für verschiedene Tumorentitäten identifizieren. Geeignete Promotoren zur Steuerung adenoviraler Vektoren für die Therapie des Ovarialkarzinoms sind beispielsweise der Secretory Leucoprotease Inhibitor-Promotor (SLPI), der Mesothelin-Promotor (MSLN), oder der Cyclooxygenase-2-

Promotor (Cox-2). Für chemoresistente Ovarialkarzinome eignet sich der in dieser Arbeit untersuchte MDR1-Promotor (multy drug resistance).

Das SLPI-Gen kodiert für einen 11.7-kDa großen Proteaseinhibitor, der in unterschiedlichen Tumorentitäten wie dem Mamma-, Bronchial-, Endometrium- und Ovarialkarzinom nachgewiesen werden konnte. Mittels Genexpressionsanalysen wurde festgestellt, dass das SLPI-Gen in Tumorproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gegenüber gesundem epithelialen Ovarialgewebe 60-fach überexprimiert wird (Hough, Sherman-Baust et al. 2000; Hough, Cho et al. 2001). In der normalen menschlichen Leber wird das SLPI-Gen nur schwach exprimiert (Abe, Tominaga et al. 1997). Die hohe onkolytische Potenz von SLPI-gesteuerten CRAds verglichen mit dem Wildtyp-Virus zeigen die Arbeiten von Rein, 2005.

MSLN als weiteren Promotor-Kandidaten untersuchten Breidenbach und Rein 2005 (Breidenbach, Rein et al. 2005). Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das in verschiedenen Tumortypen wie Ovarialkarzinomen, Mesotheliomen und einigen Plattenepithelkarzinomen überexprimiert wird. In Normalgewebe wird es nicht exprimiert, mit Ausnahme von Mesothelzellen. Die MSLN-gesteuerten CRAds zeichneten sich durch eine hohe Tumorspezifität aus, was auch im Mausmodell bestätigt wurde.

Das Cox-2-Gen kodiert für das Enzym Cyclooxygenase-2, das die Synthese von Prostaglandinen in Entzündungsbereichen vermittelt. In den meisten Geweben ist dieses Enzym unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar, wird aber in Tumoren wie Kolonkarzinomen, Mamma- und Ovarialkarzinomen sehr stark exprimiert. Die Arbeitsgruppe um A. Kanerva hat 2004 CRAds mit inseriertem Cox-2-Promotor und RGD-4C-Motiv im HI-Loop der viralen Fiber getestet, die im Vergleich mit Adenoviren des Serotyp 5 eine viel höhere onkolytische Potenz besaßen (Kanerva, Bauerschmitz et al. 2004).

Der MDR1-Promotor gehört zu den so genannten induzierbaren Promotoren. Diese Promotoren zeigen eine niedrige basale Expressionsaktivität, aber nach Induktion steigt die Aktivität stark an und es kommt zu einer starken Genexpression (siehe 1.1.1). In dieser Arbeit wurden MDR1-gesteuerte CRAds kloniert und *in vitro* getestet.

#### **1.3.4 Möglichkeiten zur Verbesserung der adenoviralen Transduktionseffizienz**

In der Vergangenheit sind verschiedene Strategien entwickelt worden, die hohe CAR-Expression in normalen Geweben und die niedrige CAR-Expression in Tumorzellen zu umgehen. Beim so genannten „transduktionalen Targeting“ wird die adenovirale Fiber bzw. das Viruskapsid durch genetische Modifikation an die entsprechende Tumorentität angepasst, um bessere Gentransferraten zu erreichen. Eine Möglichkeit besteht in der Einfügung eines RGD-4C-Motivs (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) in den HI-Loop der viralen Fiber. Das RGD-4C-Motiv bindet an  $\alpha_v\beta$ -Integrine, die auf der Zelloberfläche von Ovarialkarzinomzellen überexprimiert werden (Hemminki, Belousova et al. 2001). Studien

haben gezeigt, dass auf diese Weise deutlich höhere Virus-Transduktionsraten erzielt werden können (Rein, Breidenbach et al. 2004).

Ein anderer Ansatz ist die Einfügung eines Polylysin-Motivs (pk7-Motiv) in das carboxyterminale Ende der Fiber (Dmitriev, Krasnykh et al. 1998; Krasnykh, Dmitriev et al. 1998). Das pk7-Motiv bindet an Heparansulfatproteoglykane, die auf der Zelloberfläche verschiedener Karzinome überexprimiert sind, darunter u.a. Zervixkarzinome (Blackhall, Merry et al. 2001; Sanderson 2001; Yamaguchi 2001; Shriver, Liu et al. 2002). Auch die Kombination von RGD-4C- und pk7-Motiv haben eine deutliche Verbesserung der Transduktionseffizienz in verschiedenen Zelltypen gezeigt (Rein, Breidenbach et al. 2004).

Eine weitere Strategie ist 2006 veröffentlicht worden (Koizumi, Kawabata et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um N. Koizumi hat dreifach-modifizierte CRAbs konstruiert, die CAR- HSG- (Heparansulfat-Glykosaminoglykan) und RGD-ablatiert sind durch Modifikation der FG-Loop bzw. der AB-Loop der Fiber-Knob-Domäne. Anstatt dieser enthalten die Adenoviren die Fiber des Serotyp 35. Die Leber-Transduktionsraten der konstruierten Viren mit Mutation der AB-Loop waren etwa 500fach niedriger als mit Adenoviren des Serotyp 5 und etwa 10fach niedriger als mit dem Adenovirus, das die Mutation der FG-Loop besaß. Auch in anderen Organen war die Transduktionsrate der AB-Loop-modifizierten CRAbs am geringsten.

Vor dem Hintergrund, dass viele Ovariakarzinomzellen die so genannte 3er Bindedomäne *nicht* herabreguliert haben (Kanerva, Mikheeva et al. 2002), gibt es die Möglichkeit, chimäre adenovirale Vektoren durch Ersatz der Fiber-Knob-Domäne des Adenovirus vom Serotyp 5 durch einen Fiber Knob des Adenovirus vom Serotyp 3 zu entwickeln. Kanerva, Mikheeva et al. haben 2002 die Gentransferraten von Adenoviren mit einer RGD-4C Modifikation und chimären 5/3 Adenoviren miteinander verglichen. Die chimären Ad5/3. Vektoren zeigten dabei deutlich verbesserte Gentransferraten und eine geringere Lebertoxizität als die des Serotyp 5.

Um die Replikation der CRAbs noch weiter zu spezifizieren, kann die 24-bp-Deletion im viralen E1A Gen mit einem vorgeschalteten tumorspezifischen Promotor kombiniert werden. Zusätzlich kann zur Transduktionsverbesserung noch eine Fiber-Modifikation vorgenommen werden.

In dieser Arbeit wurden eigenständig klonierte CRAbs getestet, die eine 5/3-Fiberchimäre besaßen und den MDR1-Promotor mit und ohne 24-Basenpaardeletion im viralen E1A Gen.

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Um die Gentherapie gynäkologischer Tumoren zu optimieren, muss sowohl eine effiziente Infektion des Zielgewebes, als auch eine möglichst tumorspezifische Replikation und damit Onkolyse durch die adenoviralen Vektoren gegeben sein. Zur Verbesserung der Infektiosität der Adenoviren wird der CAR-Mangel in vielen Tumorzellen durch Modifikation der adenoviralen Fiber umgangen. Da viele Ovarialkarzinomzellen den so genannten Ad3 Rezeptor verstärkt exprimieren, ist die Konstruktion von Adenoviren mit einer 5/3-Fiberchimäre ein Ansatz zur Optimierung der Infektiosität. Die Auswirkung der vermehrten CAR-Expression in chemoresistenten Karzinomzellen auf die Infektiosität von 5/3-fibermodifizierten Adenoviren verglichen mit nicht modifizierten Viren muss dabei ebenso untersucht werden.

Die virale Replikation soll durch Integration eines möglichst tumorspezifischen Promotors kontrolliert werden und so eine selektive Tumorzellzerstörung bewirken. In dieser Arbeit galt das Interesse speziell dem MDR1-Promotor, denn es ist bekannt, dass die Promotoraktivität von MDR1 in chemoresistenten Karzinomzellen stark erhöht ist. Eine weitere Möglichkeit, die virale Replikation zu steuern, ist die 24-bp-Deletion im viralen E1 Gen, das dem Promotor nachgeschaltet ist. Dadurch wird die Virusvermehrung an den Zellzyklus der Wirtszellen gekoppelt, denn die Replikation des Virus findet nur in Zellen mit Defekt im Retinoblastom-Pathway, d.h. in proliferierenden Zellen, statt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war also zum einen die Analyse der Infektiosität der 5/3-Fiberchimäre verglichen mit der 5er Fiber (Wildtypfiber) in nicht chemoresistenten Karzinomzellen und Normalzellen sowie in Zellen, die mit Anthrazyklinen behandelt wurden und sich dadurch durch eine verstärkte CAR-Expression auszeichneten. Dies sollte mit nicht replikativen Adenoviren mittels Reporterassays geschehen. Zum anderen sollten die Onkolytische Potenz bzw. die Toxizität der eigenständig klonierten konditional replikativen Adenoviren, die den MDR1-Promotor besaßen und die 5/3-Fiberchimäre, in chemoresistenten und nicht chemoresistenten gynäkologischen Tumorzelllinien und primären Zellen sowie Normalzellen mittels Zytotoxizitätsassays getestet werden. Die Auswirkung der 24-bp-Deletion im E1 Gen sollte ebenfalls in diesen Assays erfolgen. Mittels der oben bereits erwähnten Reporterassays sollte außerdem die MDR1-Induktion von Karzinomzellen nachgewiesen werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur

Alle Zellkulturen werden unter aseptischen Bedingungen in Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Begasungsschrank (Haereus, Hanau) kultiviert. Das verwendete, sterile Zellkulturmaterial wird von den Firmen Greiner bio-one (Cellstar®, Frickenhausen), Invitrogen (Gibco™, Karlsruhe) und Corning Incorporated (Costar®, USA) bezogen.

##### 3.1.2 Zellen und Zelllinien

Für die *in vitro* Versuche werden humane Zelllinien eingesetzt sowie primäre Zellen, die aus Aszites aufgereinigt wurden (s. 3.1.7). Die Produktion von Adenoviren wird in der Zelllinie 293A durchgeführt, die Teile des adenoviralen Genoms als stabile Integration enthält. Die Kulturmedien werden von der Firma Invitrogen (Gibco™) und PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen und enthalten unter anderem Glukose (1,0 bzw. 4,5 g/L), 110 mg/l Natriumpyruvat, 15 mM HEPES und L-Glutamin. Den Medien werden zusätzlich fötales Kälberserum (Mycoplex™, Foetal Bovine Serum (PAA, Österreich), 2%, 5% bzw. 10% v/v), L-Glutamin (20 mM, Invitrogen, Gibco™) und das Antibiotikum Gentamicin (50 µg/ml, Invitrogen, Gibco™) zugesetzt. Die verwendeten Zelllinien bzw. Zellen und weitere zell- und zelllinienspezifische Zusätze zu den Kulturmedien sind der Tabelle 3.1.1 zu entnehmen.

##### 3.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Zellen werden in Gewebekulturflaschen kultiviert und je nach Zellart bis zu einem konfluenten Wachstum von 70-90% im Begasungsschrank inkubiert. Während der Kultivierung wird mindestens zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel mittels steriler Einmalpipetten vorgenommen.

##### 3.1.4 Subkultivierung

Bei der Subkultivierung werden subkonfluente Kulturen durch Passagierung geerntet. Die adhärent wachsenden Zellen werden dazu nach Abnahme des Mediums mit PBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (1x, PAA) ) gewaschen und durch Zugabe von 0,5% Trypsin-EDTA (w/v) (10x, Invitrogen Gibco™, 1:10 mit PBS verdünnt) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins und zur Aufnahme der Zellen wird das gleiche Volumen zellspezifischen Mediums zugeführt und in ein steriles PP-Röhrchen (Cellstar®, Greiner bio-one) überführt. Durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) werden die

Zellen sedimentiert und dann nach Vereinzelnung in 1 ml Medium ihrem Wachstum entsprechend anteilig in einer Zellkulturflasche neu ausgesät.

**Tabelle 3.1.1:** Auflistung der Zellen, Zelllinien, Kultivierungsmedien und Bezugsquellen

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Zusätze	Bezugsquelle
293A	Nierenkarzinom	DMEM (4g/L)	--	Qbiogene, Heidelberg
Ov-4	Ovarialkarzinom	RPMI 1640	--	Prof. Curiel, University of Alabama, USA
Hey	Ovarialkarzinom	RPMI 1640	Vitamine (1% v/v)	Prof. Pfeleiderer, Universität Freiburg, Deutschland
MDAH 2774	Ovarialkarzinom	DMEM (4,5 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v)	ATCC (CRL-10303)
SKOV-3	Ovarialkarzinom	RPMI 1640	--	ATCC (HTB-77)
SKOV-3 i.p.	Ovarialkarzinom	DMEM/NutMix-F12	--	Prof. Curiel, University of Alabama at Birmingham, USA
HepG2	Leberkarzinom	RPMI 1640	--	ATCC (HB 8065)
HMEC	Reduktionsplastik	Ham's F-12	Insulin, Hydrocortison, Penicillin/ Streptomycin	Frauenklinik Düsseldorf
Keratinocyten	humaner Donor	Keratinocyte-Growth-Media	supplements	Hautklinik Düsseldorf
Fibroblasten	Normalgewebe	DMEM (1g/L)	--	Hautklinik Düsseldorf
Prim. Mamma bzw. Ov.-carcinomzellen	humaner Donor	RPMI 1640	Penicillin/ Streptomycin	Frauenklinik Düsseldorf

### 3.1.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung werden die sedimentierten Zellen in Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulphoxid, SIGMA®)) in einem Verhältnis von 1:2 resuspendiert und in Kryoröhrchen (Cellstar®, Greiner bio-one) überführt. Die Zellen werden dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Langzeitaufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

### 3.1.6 Induktion der MDR1-Expression

Um eine Resistenz der Zellkulturen gegenüber Anthrazyklinen zu erreichen, werden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des Chemotherapeutikums Doxorubicin (Adriamycin) inkubiert. Die langsame Steigerung der Konzentration ermöglicht den Zellen den Aufbau der Resistenz basierend auf dem MDR1-Gen. Es wird mit einer Konzentration von 30 ng/ml begonnen und die Dosis in Schritten von 30 ng/ml gesteigert.

### 3.1.7 FICOLL-Dichtezentrifugation

Um primäre Karzinomzellen aus Aszites aufzureinigen, wird dieser zuerst nach und nach in sterile PP-Röhrchen überführt und 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird jeweils verworfen und die sedimentierten Zellen werden dann in *einem* PP-Röhrchen vereinigt und in 15 ml Medium (RPMI 1640) resuspendiert. Danach wird mit 20 ml FICOLL (1,077 g/ml, SeroMed GmbH) unterschichtet. Dazu wird eine sterile 25 ml Pipette mit FICOLL gefüllt und mit der Spitze durch das Medium/Zellen Gemisch auf dem Boden des PP-Röhrchens platziert, worauf das FICOLL langsam entleert wird. Hiernach wird 30 min bei 2300 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellen sind nach der Zentrifugation in der Grenzschicht von FICOLL/Medium anzutreffen. Mit einer sterilen Pasteurpipette werden die Zellen vorsichtig mit kreisenden Bewegungen abgesogen und in ein steriles 15 ml PP-Röhrchen (Greiner, bio-one) überführt, evtl. wird ein zweiter Gradient gefahren. Danach wird zweimal mit je 10 ml Medium gewaschen, um das FICOLL zu eliminieren. Zwischen den Waschvorgängen wird zentrifugiert und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Anschließend wird eine Probe von 10 µl mit Trypanblau gefärbt (1:1) und auf einen Objektträger mit Deckglas pipettiert, um die Vitalität der Zellen unter dem Mikroskop zu beurteilen. Vitale Zellen lassen sich nicht durch Trypanblau anfärben. Die aufgereinigten Zellen werden nun kultiviert oder nach entsprechender Zählung für ein Assay ausgesät.

## 3.2 DNA-/RNA-Analytik

### 3.2.1 Restriktionsanalyse

Bei einer Restriktionsanalyse werden 1 µg DNA mit 2 U/µg DNA eines Restriktionsenzym für mindestens 2 h inkubiert. Bei einer Restriktion, die vorbereitend für eine Transfektion/Transformation adenoviraler DNA ist, werden 5 µg DNA (Shuttle-Plasmid) bzw. 10 µg (adenovirales Plasmid) mit 15-20 U/µg DNA des Enzyms *Pme* I bzw. *Pac* I für 5 h inkubiert. Restriktionsenzyme, enzymespezifische Zusätze und Puffer werden von der Firma New England BioLabs® (NEB, Frankfurt) bezogen. Die Reaktion findet nach Herstellerangaben unter den für das jeweilige Enzym spezifischen Pufferbedingungen bei 37°C statt. Finden Restriktionen mit mehreren Enzymen statt, werden die Reaktionen in

einem Ansatz unter den für alle Enzyme idealen Pufferbedingungen durchgeführt. Nach einer Restriktion werden die Enzyme bei 65°C für 20 min hitzeinaktiviert. Um eine Religation der Vektoren zu vermeiden, wird eine Dephosphorylierung der freien Phosphatgruppen durch 0,5 U/µg DNA CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, NEB) für 1 h bei 37° durchgeführt. Danach wird die DNA bei -20°C eingefroren oder mittels PCI-Extraktion weiter aufgereinigt.

### **3.2.2 PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol)-Extraktion**

Um die rekombinanten adenoviralen Konstrukte nach einer Restriktionsanalyse aufzureinigen, wird eine PCI-Extraktion durchgeführt. Die Extraktion der DNA beginnt mit der Zugabe von 1 Volumen PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 v/v, SIGMA®) zu der DNA-haltigen Probe. Der Ansatz wird dann zur Phasentrennung für 3 min bei Raumtemperatur und 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) zentrifugiert. Danach wird die obere, wässrige und DNA-haltige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine werden denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase. Die DNA wird mit 1/10 Volumen Natrium-Acetat-Lösung (3M) und 2-3 Volumen Ethanol absolut (-20°C) gefällt, wobei die Probe gemischt und anschließend zur Fällung mindestens 30 min bei -80°C inkubiert wird. Durch erneute Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wird die gefällte DNA pelletiert und das Pellet mit 1 Volumen 75% Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Ethanols und einer weiteren Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 15 min wird die DNA getrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

### **3.2.3 Photometrische Bestimmung von DNA und RNA**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wird photometrisch durch ein UV/VIS Spektrometer (PERKIN ELMER, Lambda Bio) gemessen. Die spektralphotometrische Messung der Nukleinsäuren erfolgt bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm (OD260 und OD280). Dabei stellen 260 nm das Extinktionsoptimum von DNA und RNA dar. Die Extinktion bei 280 nm Wellenlänge dient der Bestimmung der Menge an Protein in der Probe. Liegt der errechnete Quotient aus OD260/280 zwischen 1,7 und 2,0, kann eine Kontamination von Protein in der Probe ausgeschlossen werden. Zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wird das Lambert-Beer'sche Gesetz herangezogen. Es setzt die gemessene Extinktion in Beziehung zur Schichtdicke der Küvette sowie dem molaren Extinktionskoeffizienten von Nukleinsäuren. Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt bei 260nm für RNA und einzelsträngige DNA 25 cm<sup>2</sup>/mg, für doppelsträngige DNA 20 cm<sup>2</sup>/mg und für Oligonukleotide 30 cm<sup>2</sup>/mg. Die Konzentration der Nukleinsäuren ergibt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus folgender Formel:  $c = E \cdot 1/\epsilon \cdot 1/d$  (c: Konzentration in mg/ml; E: Extinktion bei 260 nm; d: Schichtdicke der Küvette = 1cm).

### 3.2.4 RNA-Isolation

Bei der Isolierung der RNA sind Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden. Darum müssen alle verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt werden. DEPC wird hierzu im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt und nach Inkubation bei 37°C über Nacht autoklaviert. Anschließend wird das DEPC im Verhältnis 1:100 den Lösungen zugesetzt. Zusätzlich werden alle Arbeitsflächen und Materialien mit 96% Ethanol gereinigt.

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wird die Zellernte 5 min bei 1000 rpm (Haereus Seprotech Megafuge 1.0) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und es wird mit dem gleichen Volumen an PBS gewaschen. Anschließend wird wieder zentrifugiert, der Überstand PBS verworfen und das Zellpellet in 1 ml TRIzol® aufgenommen. Die so homogenisierten Proben können für etwa einen Monat bei -80°C aufbewahrt, oder für die weitere RNA-Isolation aufbereitet werden. Für die weitere RNA-Isolation werden die homogenisierten Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit eine Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen ermöglicht wird. Danach werden 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben ca. 15 Sekunden geschüttelt. Hiernach wird 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Proben 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Oberphase wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und vorsichtig invertiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 12000 rpm) pelletiert, mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut für 5 min bei 9500 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Ethanols wird das RNA-Pellet im Heizblock bei 55°C für 5-10 min getrocknet und in 20 bis 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgt photometrisch.

### 3.2.5 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese werden mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Omniscript, QUIAGEN) mit Random-Primern (Hexaoligonukleotide) Gesamt-RNA (mRNA, tRNA und rRNA) in cDNA (complementary DNA) translatiert. Die Verwendung unspezifischer Random-Primer ermöglicht es, mehrere Transkripte gleichzeitig zu untersuchen und zu quantifizieren. Zunächst wird die RNA (5 µg) für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wird der Reaktionsansatz zugeben, sodass folgende Konzentrationen vorliegen: 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 15 mM DTT, je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U/µl RNasin, 1000 pmol Random-Primer und 9.5 U (0,5µl) Reverse Transkriptase. Für die cDNA Synthese wird der Reaktionsansatz 10 Minuten bei 25°C und danach 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wird die

Reverse Transkriptase durch 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Nach Abkühlung auf Eis werden die cDNA Proben bei -20°C gelagert.

### 3.2.6 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mittels PCR ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen durch eine DNA-abhängige Polymerase schnell zu amplifizieren. Dazu benötigt die Polymerase einen Nukleotidtriphosphat-Mix und chemisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer), die strangspezifisch und komplementär zur gewünschten zu amplifizierenden Sequenz sind. Ein stetiger Temperaturwechsel zwischen 95°C (Denaturierung) und 72°C (Elongation) in einem Thermo-Cycler (Hybaid, OmniGene, Heidelberg) ermöglicht eine wiederholende Denaturierung und Amplifizierung der neu synthetisierten DNA-Stränge. Die Anlagerung der Primer (annealing) wird durch eine spezifisch gewählte Temperatur gewährleistet und bildet zusammen mit der Denaturierung und der Elongation einen PCR-Zyklus. Jede PCR wird durch eine so genannte „*final extension*“ beendet (8 min bei 72°C). Die Tabelle 3.2.1 zeigt einen PCR-Ansatz mit den entsprechenden Reaktionsbedingungen. Die Reaktionskomponenten werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und, um das Verdunsten der Probe bei hohen Temperaturen zu verhindern, mit 1 Tropfen Mineralöl (SIGMA®) überschichtet.

**Tabelle 3.2.1:** PCR-Ansatz mit Reaktionsbedingungen

Komponente	Volumen/Reaktion	PCR-Bedingungen
Reaktionspuffer (10x) (Amersham Biosciences Buckinghamshire, England)	4,5 µl (1x)	94°C 10 min
dNTP (10nmol/µl) (Roche, Mannheim)	3 µl (0,6nmol/µl)	
5'Primer (10pmol/µl) (Metabion International AG, Martinsried)	5 µl (1pmol/µl)	94°C 1 min } 56°C 1 min } 30 Zyklen 72°C 1 min }
3'Primer (10pmol/µl) (Metabion)	5 µl (1pmol/µl)	
DNA (variable Konzentration)	1 µl	
Wasser	26,5 µl	72°C 8 min
Taq-Polymerase-Mix, bestehend aus: Taq-Polymerase (5 U/µl) 0,5 µl, Reaktionspuffer (1x) 0,5 µl, Wasser 4 µl	5 µl	

Der zu amplifizierende MDR1-Promotor hat eine Fragmentgröße von 485 bp. Die entsprechenden Primer flankieren den Promotor so, dass noch 600 bp des adenoviralen Genoms (Teil des E1-Gens) mit amplifiziert werden, sodass ein PCR-Produkt von 1,1 kb Größe entsteht. Die *annealing*-Temperatur der Primer beträgt 55°C.

Primersequenzen: 5'-MDR1-Promotor: 5'-cga gct ctt acg cgt gct a-3' und 3'-E1: 3'-att ttc act tac tgt aga caa aca-5'.

### 3.2.7 Überprüfung der Qualität der cDNA durch $\beta$ -Actin-PCR

Die synthetisierte cDNA wird mittels  $\beta$ -Actin-PCR (s. Tab. 3.2.2) auf ihre Qualität und eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA untersucht. Die Primer sind so gewählt, dass genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen ein größeres Fragment (652 bp) ergibt als das cDNA-Fragment (446 bp). Die unterschiedlichen Fragmente werden über die Gelelektrophorese im Agarosegel (3.3.1) aufgetrennt.

Primersequenzen:  $\beta$ -Actin-5'-Primer: 5'-att tgc ggt gga cga tgg ag-3' und  $\beta$ -Actin-3'-Primer: 5'-aga gat ggc cac ggc tgc tt-3'.

**Tabelle 3.2.2:** Reaktionsbedingungen und PCR-Bedingungen der  $\beta$ -Actin-PCR

Komponente	Volumen/Reaktion	PCR-Bedingungen
Reaktionspuffer (10x) (Amersham Biosciences)	4,5 $\mu$ l (1x)	94°C 10 min  94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 1 min } 35 Zyklen
dNTP (10nmol/ $\mu$ l) (Roche)	4 $\mu$ l (0,8nmol/ $\mu$ l)	
5'Primer (10pmol/ $\mu$ l) (Metabion)	2,5 $\mu$ l (1pmol/ $\mu$ l)	
3'Primer (10pmol/ $\mu$ l) (Metabion)	2,5 $\mu$ l (1pmol/ $\mu$ l)	72°C 8 min
cDNA (1:5 verdünnt)	1 $\mu$ l	
Wasser	30,5 $\mu$ l	
Taq-Polymerase-Mix, bestehend aus: Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) 0,4 $\mu$ l, Reaktionspuffer (1x) 0,5 $\mu$ l, Wasser 4 $\mu$ l	5 $\mu$ l	

### 3.2.8 Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR ist es möglich, die mRNA-Expression des MDR1-Gens zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens und eines bekannten in einfacher Kopienzahl vorliegenden Referenzgens. Als Referenzgen wird das humane ribosomale Protein RPLP0 verwendet. Wichtig ist, dass alleine die Menge der eingesetzten cDNA limitierend ist, also keine Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Primern, Nukleotiden oder Taq-Polymerase bestehen darf. Die Detektion der PCR Produkte und die quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgt mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzers. Damit das DNA-Sequenziergerät die PCR-Produkte detektieren kann, muss jeweils ein Primer des verwendeten Primerpaares Cy5 Fluorescein (Metaboin Int.) markiert sein. Graphisch dargestellt werden jeweils die delta delta Ct-Werte. Ct-Werte

beschreiben den x-ten PCR-Zyklus, wenn ein definierter Schwellenwert überschritten wird. Delta Ct bezieht den Schwellenwert von MDR1 auf das Referenzgen. Durch den Vergleich der delta Ct-Werte kann man die spezifische Gen-Expression in verschiedenen Zelllinien zu einander in Bezug setzen und es resultiert daraus der Wert delta delta Ct. Es wird nach dem Protokoll von ABI verfahren, der ABI PRISM® 7900HT Cycler wird verwendet.

### **3.3 Gelelektrophoretische Auftrennungsmethoden**

Die gelelektrophoretische Auftrennung ist eine wichtige Methode zur Untersuchung der Größe von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten. Die Auftrennung erfolgt in Agarose- oder Polyacrylamid-Gelen.

#### **3.3.1 Elektrophoretische Auftrennung mit Agarosegelen**

Die DNA-Fragmente oder PCR-Produkte werden in 1-3%-igen (w/v in 1x TBE-Puffer) Agarosegelen aufgetrennt. Die Proben werden dazu in einem Verhältnis von 1:1 mit Probenpuffer (SB-Puffer, 1x) vermischt. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen, werden die 1-kb-DNA-Leiter (Invitrogen, Gibco™, 5 µl/Spur) und/oder der SmartLadder (Eurogentec, 5 µl/Spur) mitgeführt. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente erfolgt die Elektrophorese bei 80 bis 100 V für 45 bis 120 min. Nach dem Lauf wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung für mindestens 20 min gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) wird die Fluoreszenz des interkalierenden Agens angeregt und die DNA-Fragmente werden sichtbar gemacht.

1x TBE-Puffer	0,2 M Tris
	0,17 M Borsäure
	2 mM EDTA, pH 8,0

#### **3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Um die RT-PCR-Produkte mittels A.L.F.-DNA-Sequenziergerät (Pharmacia) zu quantifizieren, wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Diese Methode ist sensitiv für geringe Mengen an PCR-Produkt. Das A.L.F.-DNA-Sequenziergerät arbeitet mit einem Helium-Neon-Laser, der bei einer Wellenlänge von 632,8 nm die Cy5-markierten PCR-Produkte zur Fluoreszenz anregt. Senkrecht zum Laserstrahl wird die emittierte Strahlung über Photodioden bei einer Wellenlänge von 670 nm detektiert. Vorgelagerte optische Filter verringern Streulicht und Hintergrundstrahlung. Ein optisches System nimmt die emittierte Strahlung als Messwert auf. Eine angeschlossene elektronische Datenverarbeitung verarbeitet die Daten. Die Auswertung erfolgt mit der ALFwin™ Sequence-Analyser-Software (Pharmacia). Messwerte werden als Kurven

dargestellt und die Fläche unter den Fluoreszenzsignalen berechnet. Der erhaltene Wert gilt hier als Maß der Signalstärke, wobei sich der relativ gemessene Expressionswert des Zielgens aus dem Verhältnis der Signalfläche des Zielgens zu der des Referenzgens ergibt. Das Polyacrylamidgel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen, die von zwei 0,5 mm dicken so genannten Spacern getrennt werden. Um eine bessere Haftung des Gels in den Probenaschen zu erreichen, wird der obere Teil der Glasplatten mit Bind-Silan-Lösung behandelt. Zur Herstellung der Polyacrylamid-Lösung werden 25,2 g Harnstoff (Invitrogen) mit 25,5 ml Aqua dest., 5 g Amberlite (Amberlite IRN-150L, Amersham Bioscience) und 9 ml Acrylamid (40% Acrylamid/N,N-Methylen-bisacrylamid (29:1), SIGMA®) für mindestens 5 min verrührt. Mittels eines Mikro-Filters (Sartorius) werden dann 6 ml 6x TBE filtriert. Die Acrylamid-Lösung wird in einer weiteren Filtration vom Amberlite getrennt und zusätzlich zusammen mit dem 6x TBE entgast. Nach Zugabe von 200 µl APS (Amoniumpersulfat 10%, Pharmacia) und 40 µl TEMED (N,N,N'N'-Tetramethylethylenediamin, BioRad) wird das Gel zwischen die Glasplatten gegossen und nach 2 h in die Elektrophorese eingesetzt.

Bind-Silan-Lösung	4 ml Ethanol absolut 15 µl Bind-Silan (Pharmacia) 1 ml 10% Essigsäure
Polyacrylamid-Lösung	25,2 g Harnstoff (SIGMA) 9 ml 40% Acrylamid/N,N-Methylen-bisacrylamid (29:1) 25,5 ml Aqua dest. 6 ml 6x TBE-Puffer 200 µl 10% APS (Pharmacia) 40 µl TEMED (BioRad)
Probenauftragspuffer	100 ml Formamid (deionisiert) 600 µg Dextranblau 4 ml 20 mM EDTA, pH 8,3
6x TBE	72,7 g Tris 30,8 g Borsäure 2,25 g EDTA

Die Proben müssen zur Auftragung auf das Gel erst vom Öl getrennt werden. Dann werden die Proben je nach PCR-Produktintensität mit Wasser im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 verdünnt. 6,5 µl der Proben werden mit 6,5 µl Probenauftragspuffer gemischt, für 5 min bei

95°C denaturiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt, woraufhin sie dann auf das Gel aufgetragen werden. Es wird ein 1:10 mit Aqua dest. verdünnter 6x TBE Puffer als Laufpuffer verwendet. Folgende Laufbedingungen sind erforderlich: max. Spannung 1500 V, max. Stromstärke 34 mA, max. Leistung 38 W, Temperatur 40°C und Laufzeit 200 bis 210 min.

### 3.4 Mikrobiologische Methoden

#### 3.4.1 Bakterienstämme

Es wird mit den *E. coli* Stämmen DH5 $\alpha$  und BJ5183 gearbeitet. Sie charakterisieren sich wie folgt:

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

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

#### 3.4.2 Medien und Aufzucht von *E. coli*

Alle *E. coli* werden generell in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,3) und bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgt auf einem Schüttler (GFL®, 180 rpm). Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wird dem Medium nach dem Autoklavieren 50  $\mu$ g/ $\mu$ l Ampicillin bzw. Kanamycin zugesetzt (Selektionsmedium). Feste Nährmedien enthalten zusätzlich 2% Agar (Agar-Agar, Merck, Darmstadt). Nach der Elektroporation wird ein mit Salzen und Glucose erweitertes SOC-Medium eingesetzt (0,5 g 0,5% Hefe-Extrakt, 2 g 2% Trypton, 0,06 g 10 mM NaCl, 0,018 g 2,5 mM KCl, 0,204 g 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,246 g 10 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,378 g 20 mM Glukose).

#### 3.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung kompetenter Zellen wird zunächst eine 10 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm) angezüchtet. Am folgenden Tag werden mit dieser Vorkultur 500 ml LB-Medium angeimpft. Das Zellwachstum wird photometrisch bei  $\lambda = 600$  nm verfolgt. Bei einer optischen Dichte von ca. OD<sub>600nm</sub> = 0,6 (nach etwa 2 h) werden die Zellen geerntet und in Zentrifugenröhrchen 10 Minuten auf Eis inkubiert, was ein weiteres Wachstum verhindern soll. Die Zellen werden bei 4°C und 6000 rpm (Beckman J2-H2) für 15 Minuten pelletiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit eiskaltem Wasser (500 ml und 250 ml) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml 10%-igem Glycerin und erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 1,5 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, in 50  $\mu$ l Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3.4.4 Klonierung

#### 3.4.4.1 Plasmide zur Klonierung rekombinanter Adenoviren

Zur Klonierung rekombinanter Adenoviren wird das AdEasy™-System der Firma Qbiogene (Heidelberg) verwendet. Die Insertion der Fremd-DNA in das Adenovirusgenom erfolgt mittels homologer Rekombination. Als homologe Bereiche dienen hierbei entweder die Region des linken und rechten Arms oder der rechte Arm und der Replikationsursprung (Ori) der Plasmide. Diese Regionen sind in beiden Plasmiden, pShuttle und pvkF5/3 (Adenovirusgenom), sequenzidentisch. Die Details der verschiedenen Plasmide können dem Anhang entnommen werden.

#### 3.4.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird das QIAquick® Gel Extraction Kit (QUIAGEN) verwendet. Nach der Auftrennung werden die gewünschten Banden unter einer UV-Licht aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Gewichtsbestimmung des Agarosestückchens wird dieses mit dem dreifachen Volumen des Puffers QG versetzt und bei 50°C geschmolzen. Nach Zugabe eines Volumens Isopropanol wird das Gemisch auf die Säule aufgetragen und 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Zur Aufreinigung der an die Siliconmembran der Säule gebundenen DNA wird diese nach Herstellerangaben mit einer Waschlösung (Puffer PE) behandelt und erneut 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird die DNA mit 30 µl Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation von der Säule eluiert.

#### 3.4.4.3 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine weit verbreitete molekularbiologische Methode, DNA-Moleküle in eine Bakterienzelle oder auch Eukaryontenzelle einzuschleusen. Ein kurzer elektrischer Spannungspuls erzeugt Poren in der Zytoplasmamembran, durch die DNA-Moleküle aufgenommen werden.

Kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden DNA gemischt. Das Gemisch wird in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand = 0,2 cm) gegeben. Die Elektroporation erfolgt in einem Gene Pulser (BioRad, München) durch einen exponentiell abfallenden Spannungspuls bei 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω und  $\tau = 4,5$ . Unmittelbar nach dem Puls werden die Zellen mit 800 µl vorgewärmtem SOC-Medium aus der Küvette herausgespült und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 h bei 30°C geschüttelt (180 rpm). Anschließend werden die Zellen auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 30°C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert. Nach 20 bis 24 Stunden werden jeweils

die kleinsten (homologe Rekombination) bzw. größten (Transfektion) Bakterienkolonien auf den Agar-Platten mit einem Zahnstocher gepickt und es werden 2 ml Übernackulturen (Selektionsmedium) angeimpft.

#### **3.4.4.4 Plasmidpräparation**

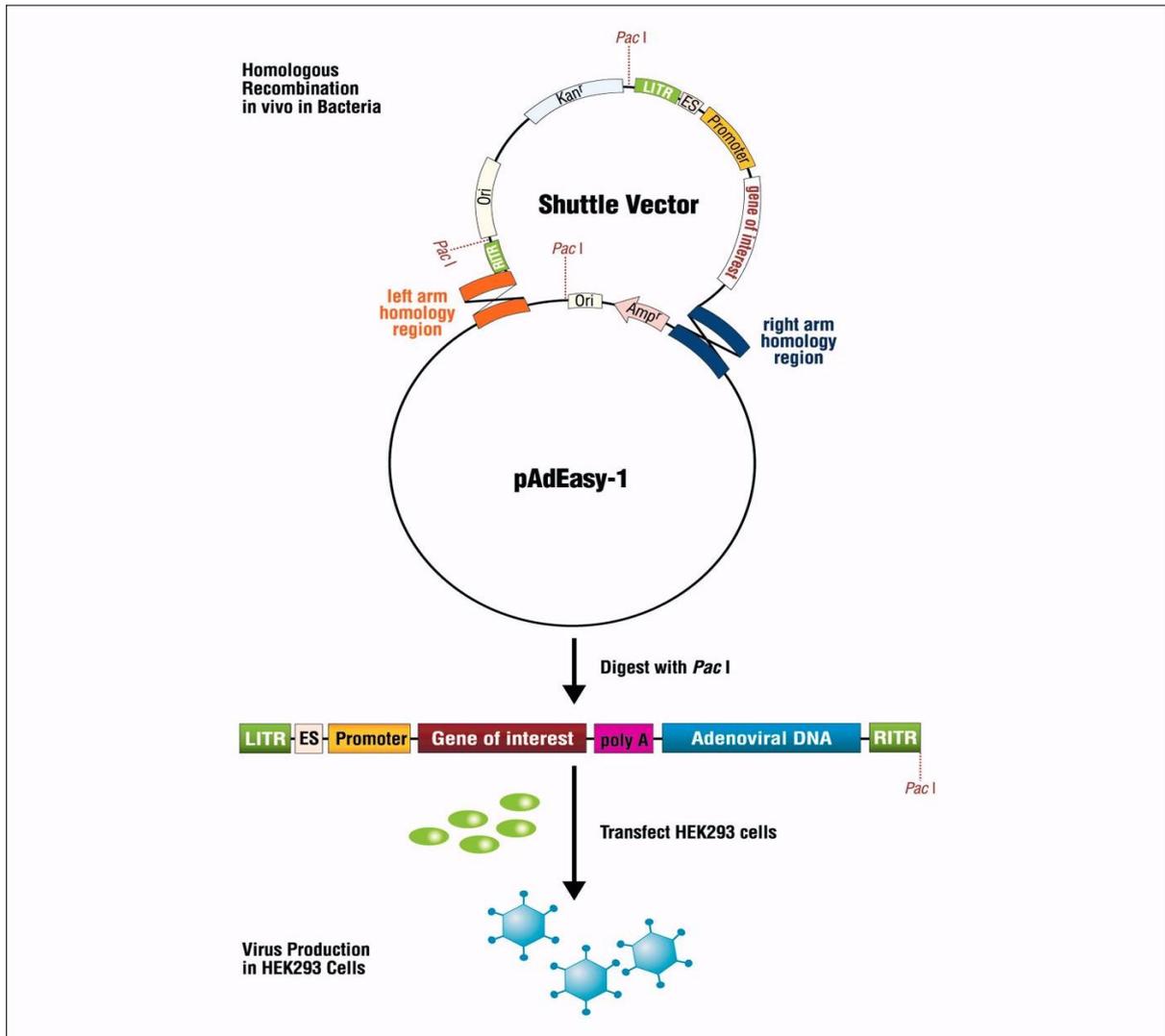
Für die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA werden verschiedene Kits verwendet. Die Plasmidpräparation aus einer 2 ml Übernackultur erfolgt mittels des GFX™ Micro Plasmid Prep Sample Kits (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Für eine Maxipräparation aus einer 250 ml Übernackultur wird das EndoFree Plasmid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

### **3.5 Adenoviraler Gentransfer**

Für die Herstellung rekombinanter adenoviraler Vektoren wird das AdEasy™-System (Qbiogene, Heidelberg) verwendet. Ein rekombinantes Adenovirus wird typischerweise in einem zweistufigen Prozess konstruiert. Zuerst wird die gewünschte Genexpressionskassette in einen Transfektor gebracht (Shuttle-Plasmid). Diese wird dann durch homologe Rekombination in das adenovirale Genom transferiert. Das rekombinante adenovirale Konstrukt wird anschließend mit dem Restriktionsenzym *pac* I linearisiert und in eine Verpackungszelllinie transfiziert, die die Virionenproduktion ermöglicht.

#### **3.5.1 Klonierung des rekombinanten Adenovirusgenoms**

Beim Adenovirusgenom handelt es sich um ein ca. 36 kb großes lineares DNA-Molekül, das die Erkennungssequenz von jedem kommerziell erhältlichen Restriktionsenzym mehrfach enthält. Deshalb eignet sich das Adenovirusgenom nicht zur direkten Klonierung. Zur Herstellung rekombinanter, adenoviraler Vektoren wird das AdEasy™-System (Qbiogene, Heidelberg) verwendet. Um nun die gewünschte Fremd-DNA in das Adenovirusgenom zu integrieren, wird dabei der „Umweg“ über so genannte Shuttle-Plasmide gewählt. Dabei wird in einem ersten Schritt das gewünschte DNA-Fragment in den Shuttle-Vektor eingebaut und dieses in einem zweiten Schritt über homologe Rekombination (s. Abb. 3.5.1) in das Adenovirusgenom integriert. Das Adenovirusgenom wurde von TG. Uil und V. Krasnykh, University of Alabama, USA bezogen und heißt pvkF5/3. Die Shuttle-Vektoren wurden von Frau I. Herrmann zur Verfügung gestellt und heißen pSMDR1E1, pSMDR1E1Δ24 und pSMDR1Luc.



**Abb. 3.5.1:** Herstellung rekombinanter Adenoviren nach dem AdEasy-System™ (Schema)

### 3.5.2 Homologe Rekombination

Um eine erhöhte Effizienz bei der homologen Rekombination zu erreichen, werden die Plasmide pvkF5/3 und pShuttle gleichzeitig in *E.coli* (BJ5183) transfiziert. BJ5183 ist ein Bakterienstamm, der die Rekombination möglich macht, allerdings sind die rekombinanten Plasmide in BJ5183 nicht über längere Zeit stabil, sodass für eine Präparation größerer Plasmidmengen auf den Stamm DH5 $\alpha$  zurückgegriffen werden muss. Die korrekten rekombinanten Klone werden durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen detektiert und die Plasmide in größerer Menge mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) hergestellt.

### 3.5.3 Transfer in Verpackungszelllinie und Klonselktion

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

Nach Linearisierung des hergestellten rekombinanten adenoviralen Plasmids mit *Pac I* und anschließender Aufreinigung mittels PCI wird die DNA in die 293A Zellen eingebracht. Die Transfektion erfolgt mit dem SuperFect™ Transfektionsreagenz (QUIAGEN). SuperFect™-DNA-Komplexe besitzen eine positive Ladung, die ihnen die Bindung an negativ geladene Rezeptoren auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen ermöglicht. Am Tag vor der Transfektion werden 293A Zellen in einer 6-well-Platte mit einer Zellzahl von 3 bis 5 x 10<sup>exp5</sup> Zellen/Well ausgesät, die dann eine Konfluenz von 50-80% erreichen sollen. Am folgenden Tag werden 5 µg DNA mit Wachstumsmedium ohne Zusätze auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt. Danach werden 10 µl SuperFect™ Transfektionsreagenz zur DNA gegeben und vorsichtig 5 bis 6x auf- und abpipettiert. Zur Komplexbildung wird der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wird das Medium von den 6-well-Platten abgenommen und die Zellen werden mit 4 ml PBS/Well gewaschen. Nach der Inkubationszeit werden 1 ml Wachstumsmedium mit Zusätzen zu der SuperFect™-DNA-Reaktion pipettiert, vorsichtig vermischt und sofort auf die Wells gegeben, indem das Gemisch langsam am Rand der Wells auf die Zellen geträufelt wird. Nach 1,5 h Inkubation unter normalen Wachstumsbedingungen wird das Medium mit den verbleibenden Komplexen von den Zellen entfernt und die Zellen erneut mit 4 ml PBS/Well gewaschen. Anschließend wird zur Kultivierung der Zellen 4 ml frisches Wachstumsmedium (10% FCS) pro Well zugefügt und unter üblichen Bedingungen kultiviert. Als Negativkontrolle dient ein DNA-freier Transfektionsansatz. Wenn die Transfektion erfolgreich verlaufen ist, kommt es zunächst zur Replikation der Adenoviren in den 293A Zellen. Die Produktion funktionaler adenoviraler Partikel als Folge der adenoviralen Replikation wird durch Auftreten des zytopathischen Effekts (CPE) nach etwa 7 bis 14 Tagen deutlich. Dieser zeigt sich primär in der Abkuglung und der Ablösung der Zellen im Zellmonolayer. Die Adenoviren sind bis zur Lyse der Zellen, die erst 1 bis 2 Tage später einsetzt, innerhalb der Zellen eingeschlossen und können so durch die Ernte der Zellen angereichert werden.

Die lytische Freisetzung der rekombinanten Adenoviren wird durch das Auftreten viraler Plaques im Monolayer sichtbar. Das Zelllysate wird nach vollständigem CPE als Virus-Stock geerntet und die Adenoviren werden wie unter 3.5.5 isoliert.

### 3.5.4 Produktion rekombinanter Adenoviren

Durch Transfektion der adenoviralen Vektoren in 293A Zellen werden nach Expression der adenoviralen Gene intakte virale Partikel in kleinen Mengen produziert. Um jedoch für die Experimente eine ausreichende Menge an Adenoviren zur Verfügung zu haben, wird die Virusproduktion in großem Maßstab durchgeführt. Dazu werden 293A Zellen in 15 bis 20 Zellkulturplatten (à 175 cm<sup>2</sup>, Cellstar®, Greiner bio-one) ausgesät und bei einer Konfluenz von 80-90% die adenovirale Infektion durchgeführt. Für die Virusinfektion wird ein Aliquot einer ersten Amplifikation (in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturplatten) verwendet. Die Infektion wird mit Kulturmedium durchgeführt, das 2% FCS enthält. Für die Infektion wird das Kulturmedium von den 293A Zellen entfernt und das virushaltige Medium (15 ml/Platte) zugegeben. Nach 2 h wird mit Kulturmedium (10% FCS) auf das normale Kultivierungsvolumen (30 ml) aufgefüllt. Dabei ist zu beachten, dass die Zellen durch die virale Infektion unter großem Stress stehen und sich leicht von dem Plattenboden ablösen. Um das zu verhindern, muss das Kulturmedium vorsichtig zugegeben werden. Die infizierten Kulturen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sich ein vollständiger CPE einstellt. Durch die Virusreplikation kommt es zum Durchlaufen eines lytischen adenoviralen Infektionszyklus und damit zum Absterben der Zellen nach Produktion der viralen Partikel. Der CPE dient hier also als Maßstab für eine erfolgreiche Virusproduktion. Die 293A Zellen beginnen sich ca. 2 Tage nach Infektion abzukugeln und lösen sich bis zum 3. Tag vom Boden der Kultivierungsplatte ab. Zu diesem Zeitpunkt können die Zellen geerntet werden. Dazu werden die Zellen vorsichtig mit einer Pipette vom Boden der Zellkulturplatte gespült und anschließend in 50 ml PP-Röhrchen (Greiner, bio-one) überführt. Von diesem Zeitpunkt an müssen die Zellen samt der eingeschlossenen Viren auf Eis gehalten werden. Um das Erntevolumen einzuengen, wird die Zellernte für 10 min bei 4°C und 1000 rpm (Beckman, Allegra™ 21R Centrifuge) abzentrifugiert, die Zellpellets werden in 5 ml Wachstumsmedium mit 5% FCS vereinigt. Zur Langzeitaufbewahrung werden die Zellen mit den eingeschlossenen Adenoviren bei -80°C gelagert.

### 3.5.5 Isolation von Adenoviren

Um die Adenoviren gezielt aus den Verpackungszellen (293A) freizusetzen, wird das Pellet nach der Ernte der Zellen durch einen so genannten Gefrier-Tau-Zyklus aufgeschlossen. Dabei wird die Zellsuspension abwechselnd für 20 min in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und sofort wieder im 37°C Wasserbad aufgetaut (20 min). Nach viermaligem Gefrier-Tau-Zyklus sind alle Zellen lysiert und die Viren liegen frei in der Lösung vor. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wird für 10 min bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert und der Virus-haltige Überstand (Zelllysat) in ein neues PP-Röhrchen überführt. Die so isolierten

Adenoviren werden dann über zwei diskontinuierliche CsCl-Gradienten und einer anschließenden Dialyse aufgereinigt (s. 3.5.6).

### 3.5.6 Aufreinigung und Dialyse

Im Viruslysats liegen neben den infektiösen viralen Partikeln auch defekte virale Partikel und Reste von Zelltrümmern vor, die nicht über Zentrifugation entfernt werden können. Um nun die infektiösen Partikel zu isolieren, wird das Viruslysats über zwei CsCl-Gradienten aufgereinigt. Dafür wird ein diskontinuierlicher CsCl-Gradient in Ultrazentrifugenröhrchen (Quick-Seal, Beckman, Palo Alto, CA, USA) gegossen, indem zuerst das Viruslysats (5 ml) eingefüllt wird. Anschließend wird die leichtere CsCl-Lösung (4 ml, Dichte: 1,33 g/cm<sup>3</sup>) unterschichtet und durch Unterschichten der schwereren CsCl-Lösung (4 ml, Dichte: 1,45 g/cm<sup>3</sup>) das Volumen des Röhrchens luftblasenfrei aufgefüllt. Das Röhrchen wird daraufhin für die Ultrazentrifugation am oberen Ende mittels LötKolben und entsprechendem LötHütchen verschweißt. Die austarierten Zentrifugenröhrchen werden für 2 h bei 7°C und 60.000 rpm ultrazentrifugiert (Kendro TGA-75). Nach der Zentrifugation ist eine weißliche Virenbande innerhalb des CsCl-Gradienten zu erkennen. Oberhalb dieser Bande ist eine zweite Bande aus Zelltrümmern und nicht intakten Virionen zu sehen. Die Bande der infektiösen viralen Partikel wird punktiert, die isolierten Viren mit HEPES (5 mM, pH 7,8) auf ein Endvolumen von 5 ml aufgefüllt und über einen zweiten identischen diskontinuierlichen Gradienten weiter aufgereinigt. Dieser zweite Gradient wird bei 7°C und 60.000 rpm für 18 h ultrazentrifugiert. Die Virusbande wird daraufhin ebenfalls punktiert. Die infektiösen, adenoviralen Partikel werden zur Entfernung des CsCl und anderer in der Viren-Lösung befindlicher Salze dialysiert. Für die Dialyse werden kommerziell erhältliche Dialyseschläuche (Cellulose-Ester-Schläuche) verwendet. Das Volumen des Dialysepuffers beträgt hierbei mindestens das 200fache Volumen der Viruslösung. Nach 1 h und nach 5 h wird der Dialysepuffer ausgewechselt, bevor dann über Nacht dialysiert wird (alles bei 4°C). Am nächsten Tag wird das dialysierte Volumen der Viruslösung abgemessen und 1:2 mit Aufbewahrungsmedium (viral preservation media) verdünnt. Daraufhin wird die Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

CsCl (1,33 g/cm <sup>3</sup> )	113,6 g CsCl
	1,25 ml HEPES 1M
	pH 7,8
	mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen, steril autoklavieren
	Lagerung bei Raumtemperatur

CsCl (1,45 g/cm <sup>3</sup> )	152,3 g CsCl 1,25 ml HEPES 1M pH 7,8 mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen, steril autoklavieren Lagerung bei Raumtemperatur
5 mM HEPES	250 µl HEPES 1M pH 7,8 49,75 ml Aqua dest. steril autoklavieren Lagerung bei Raumtemperatur
Dialysepuffer	20 ml 10mM Tris pH 8,0 100 g Sucrose 5% 2 ml MgCl <sub>2</sub> 2mM mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen steril autoklavieren, Lagerung bei 4°C
viral preservation media	1 ml 1M Tris pH 8,0 2 ml 5M NaCl 0,1 g BSA mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen 50 ml Glycerol vor Gebrauch steril filtrieren, Lagerung bei 4°C

### 3.6 Titerbestimmung

#### 3.6.1 Photometrische Titerbestimmung

Diese Methode basiert auf der Messung der Extinktion viraler DNA. Die Konzentration der Infektionseinheiten in der isolierten Virenlösung kann damit bestimmt werden. Dazu wird ein Aliquot der Viruslösung (200 µl) durch ein äquivalentes Volumen des Viruslysepuffers lysiert (1:2 Verdünnung), indem in einem Wasserbad für 20 min bei 56°C inkubiert wird. Durch Messung der optischen Dichte dieser Probe im Photometer (PERKIN ELMER, Lambda Bio) kann auf die Anzahl viraler Partikel (VP) in der Lösung geschlossen werden. Die Probe wird bei Wellenlänge 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Der Wert bei 320 nm wird dem Wert für die Messung bei 260 nm abgezogen, denn er entspricht der Absorption der Lösung

ohne virale Partikel. Idealerweise sollte der Wert bei 260 nm zwischen einer OD von 0,1 und 1 liegen. Dabei entspricht die Extinktion von 1  $OD_{260nm} = 1,1 \times 10^{12}$  Viren. Der Virustiter berechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1,1 \times 10^{12} = \text{Titer in VP/ml.}$$

$$OD_{260nm} = \text{Wert 260 nm} - \text{Wert 320 nm}$$

Viruslysepuffer      100 µl TrisHCL 1M pH 8,0  
                               20 µl EDTA 0,5 M pH 8,0  
                               500 µl SDS (10%)  
                               mit Aqua dest. auffüllen auf 10 ml

### 3.6.2 TCID<sub>50</sub>- Methode (Tissue Culture Infectious Dose)

Diese Methode basiert auf der Ausprägung des CPE in 293A Zellen. Dadurch werden die Auswirkungen der Viren auf den Wirtsorganismus getestet und können durch statistische Auswertung nach KÄRBER quantifiziert werden. Der Test wird in 96-Well-Platten durchgeführt (2fach-Bestimmung). Die Zellen werden dazu in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Well in 100 µl Wachstumsmedium (2% FCS) ausgesät und direkt im Anschluss mit den Viren infiziert. Die Spalten 11 und 12 (s. Abb. 3.6.1) stellen die Negativ-Kontrollen dar und werden deshalb nicht mit Virus infiziert. Für die virale Infektion werden die entsprechenden Verdünnungen der Stammlösung in 293A Kulturmedium mit 2% FCS angesetzt. Die Infektion wird mit den in Abbildung 3.6.1 angegebenen Virusverdünnungen und einem Volumen von 90 µl durchgeführt. Die Platte wird nun 10 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutbegasungsschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch Auszählung der Wells, die CPE zeigen. Ein Well wird als CPE-positiv gewertet, wenn nur wenige Zellen CPE zeigen. Zu beachten ist, dass die Virusverdünnungen so gewählt sind, dass die niedrigste Verdünnung CPE in allen Wells und die höchste Verdünnung in keinem Well CPE zeigt.

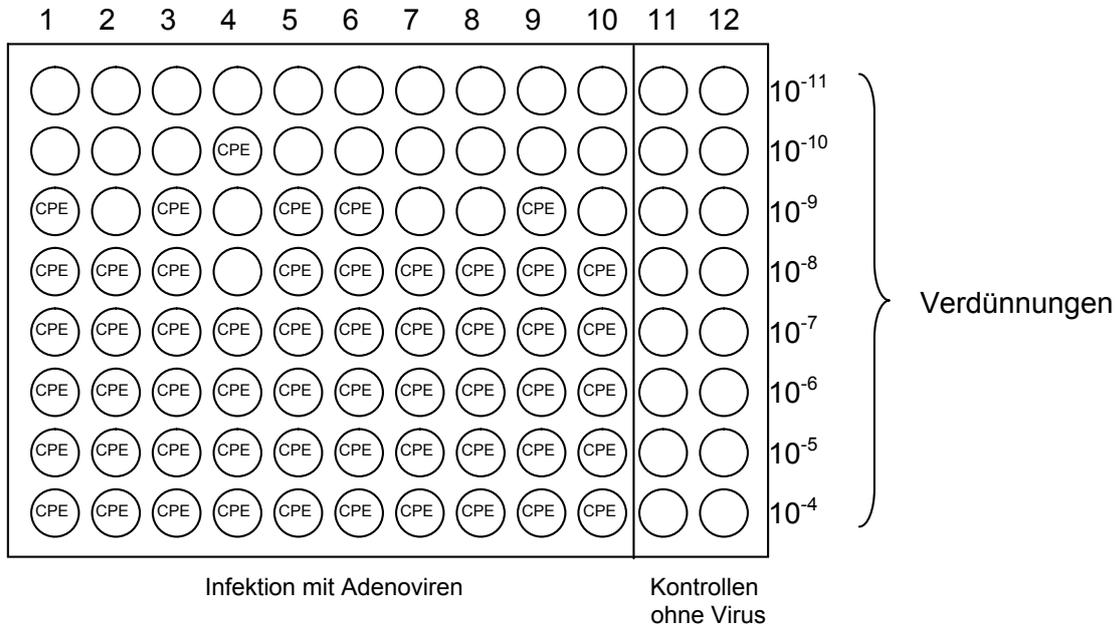
Der Virustiter T berechnet sich nach folgender Formel:

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

In dem angegebenen Beispiel (s. Abb. 3.6.1) ist die Verdünnung jeweils um den Faktor 10 erhöht worden, d.h.  $d=1$  und die Summe aller Wells mit CPE ist 85, da auch die ausgelassenen Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  für die Berechnung gewertet werden müssen. Demnach ergibt sich ein Titer von  $T = 10^{1+1(8,5-0,5)} = 10^9$  pro 90 µl, die für die Infektion verwendet worden sind. Um den Titer in die gebräuchliche Einheit „plaque forming

unit“ (PFU) umzurechnen, muss vom TCID<sub>50</sub>-Titer 0,7 log subtrahiert werden. In dem Beispiel ergibt sich also:

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



**Abb. 3.6.1: Pipettierschema eines TCID<sub>50</sub>**

### 3.7 Luziferase-Reportergenassay

Bei diesem Assay handelt es sich um ein Reportergenassay, das für die Messung von 96-Well-Platten entwickelt wurde (Bright-Glo™, Promega, Mannheim). Untersucht wird dabei die Genexpression des Luziferasegens. Das Luziferasegen kodiert für das Protein Luziferase, einem Enzym der amerikanischen Feuerfliege. Es setzt in einer biolumineszenten Reaktion Luziferin in Oxyluziferin um, wobei Licht emittiert wird. Das emittierte Licht wird in speziellen Luminometern gemessen und quantifiziert. Dadurch können indirekte Aussagen über die Stärke der Genexpression oder auch über die an die Genexpression gekoppelten Mechanismen gemacht werden. Das System hat den Vorteil, dass einerseits die Signalintensität der Luziferase-Reaktion stabiler ist (Halbwertszeit >25 min), so dass die reproduzierbare Messung von 96 Proben gewährleistet werden kann und andererseits die Sensitivität gegenüber anderen Signal-stabilisierten Luziferase-Assays höher ist. Dadurch können auch geringe Luziferaseaktivitäten im letzten Well der Messplatte analysiert werden. Für das Bright-Glo™-Assay werden die Zellen entsprechend den Angaben in Tabelle 3.7.1 in 100 µl zellspezifischem Wachstumsmedium ausgesät. Die adenovirale Infektion der Zellen erfolgt 24 h später. Zur Untersuchung der fibermodifizierten Viren werden die Zellen mit MOI (*multiplicity of infection, virus/cell*) 10, 100 und 1000 infiziert, wobei der photometrisch bestimmte Titer zu Grunde liegt. Für die Analyse der rekombinanten Viren mit tumorspezifischem Promotor werden die Zellen mit MOI 0,1, 1 und 10 infiziert, wobei die MOI sich hier auf den im TCID<sub>50</sub> festgestellten Titer bezieht. Die Infektion findet in 50 µl zellspezifischem Wachstumsmedium mit 2% FCS statt. Als Negativkontrolle werden Zellen ohne Virus nur mit Wachstumsmedium (2% FCS) versehen. Es wird eine Dreifachbestimmung pro MOI zur Reproduzierbarkeit der Daten durchgeführt. Die infizierten Zellen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsschrank (Haereus, Hanau) für 2 h inkubiert, danach werden 100 µl zellspezifisches Wachstumsmedium zugegeben (5% FCS). Nach 24 h erfolgt die Messung der Luziferaseaktivitäten. Zwei Stunden vor der Messung werden Zellen sowie Lysispuffer bei Raumtemperatur equilibriert. Dann wird das Medium zunächst von den Zellen entfernt. Pro Well werden daraufhin 100 µl Lysispuffer (Glo Lysis Buffer, Promega, Mannheim) zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur ist die Zelllyse abgeschlossen und 50 µl des Lysats werden in eine lichtundurchlässige Messplatte überführt. Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Bright-Glo™-Assay Reagenz und weiteren 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Luziferase-Aktivität gemessen. Dazu misst das Plattenluminometer (Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim) die Lichtemission jedes Wells für die Zeitdauer von 1 Sekunde. Eine angeschlossene EDV bringt die Messwerte in Zusammenhang mit der pipettierten Reihenfolge auf der 96-Well-Platte und stellt sie in einer MS Excel™ Tabelle dar.

**Tabelle 3.7.1:** ausgesäte Zellzahl/Well im Luziferase-Reportergenassay

Zelllinie	Zellzahl/Well
Skov-3	10000
Fibroblasten	20000
Hey	15000
MDAH 2774	15000
Primäre Zellen	10000

### 3.8 Zytotoxizitätsassay (MTS-Assay)

Das MTS-Assay ist eine Methode zur indirekten Messung der Zellvitalität. Es beruht auf der Tatsache, dass metabolisch aktive (vitale) Zellen mittels Dehydrogenasen MTS in Anwesenheit eines elektronenbindenden Stoffes (Phenazin-Methosulfat, PMS) in ein Formazan reduzieren können. Die Absorption des Formazans bei 490 nm kann direkt photometrisch gemessen werden. Nach der Messung im Absorptionsphotometer wird die so genannte relative Vitalität bestimmt. Dazu werden die Messwerte der Zellen, die mit onkolytischen Adenoviren infiziert wurden, in Relation zu den Messwerten derjenigen Zellen gesetzt, die mit einem nicht-replikativen Adenovirus infiziert wurden, das in den eingesetzten MOIs nicht zytotoxisch ist. Die errechneten Werte liegen idealerweise zwischen 0 und 1.

Für ein MTS-Assay werden in 96-Well-Platten pro Well 10000 Zellen in 100 µl zellspezifischem Wachstumsmedium ausgesät. 24 h später erfolgt die adenovirale Infektion. Es wird mit MOI 0,1, 1 und 10 infiziert, wobei mit dem biologischen Titer (TCID<sub>50</sub>-Methode) gearbeitet wird. Die Infektion findet in 50 µl zellspezifischem Wachstumsmedium mit 2% FCS statt. Als Negativkontrolle werden auch bei diesem Assay Zellen ohne Virus nur mit Wachstumsmedium (2% FCS) versehen (MOI 0). Zur Datenreproduzierbarkeit werden Vierfachbestimmungen pro MOI durchgeführt. In drei Wells, die keine Zellen enthalten, werden jeweils 100 µl Wachstumsmedium (5% FCS) gegeben, um die Hintergrundabsorption bestimmen zu können. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsschrank ist die virale Infektion abgeschlossen und zu jedem Well werden 200 µl zellspezifisches Wachstumsmedium (5% FCS) gegeben. Wenn nun das schnellste Virus in der kleinsten MOI (0,1) ca. 50% der Zellen lysiert hat (erkennbar am CPE, je nach Zellart etwa nach 7 bis 15 Tagen), wird gemessen. Dafür wird das Medium der Zellen bis auf 100 µl pro Well entfernt und auf jedes Well werden 20 µl MTS pipettiert. Danach erfolgt eine vierstündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Begasungsschrank. Nach dieser Zeit hat das anfangs gelbgrünliche MTS in den Wells eine, in der Intensität von der Anzahl vitaler Zellen abhängige, rot-bräunliche Farbe angenommen. Deren Absorption bei 490 nm wird nun im Absorptionsphotometer gemessen. Die Messergebnisse werden mit MS Excel™ verarbeitet.

### 3.9 Immunhistochemie

Zur Darstellung des p-Glykoproteins (p-gp) auf den Oberflächen von Zellen sowie des viralen E1A Gens im Zellkern von Zellen wird eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Bei dieser Methode werden Antigenstrukturen der Zielzellen über eine Antikörper-Färbung an fixierten Zellen auf Objektträgern optisch dargestellt. Für die Fixierung von Zellen auf Objektträgern werden autoklavierte Objektträger (HistoBond®, Marienfeld) in quadriPerm™ Platten (Greiner bio-one) eingesetzt. Auf diesen werden Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Für die Darstellung des viralen E1A Gens werden die Zellen in einer bestimmten Zellzahl auf Objektträgern ausgesät und nach 24 h mit MOI 1 mit dem entsprechenden Virus infiziert. Die Fixierung erfolgt dann nach festgelegten Zeiten. Zur Fixierung der Zellen werden die Objektträger in Küvetten umgesetzt und 15 min in 1x PBS/Formalin (2/3 / 1/3) fixiert. Dann werden die Objektträger in 1x PBS für 5 min gewaschen und anschließend in eine Küvette mit eiskaltem (-20°C) Methanol überführt (5 min). Nach Acetonzugabe für 1 min wird noch einmal 5 min mit 1x PBS gewaschen. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgt in Aufbewahrungsmedium bei -20°C. So gelagert sind sie etwa 6 Monate haltbar.

Die eingesetzten immunhistochemischen Färbungen werden mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode durchgeführt (ABC-Methode). Dazu werden die Objektträger zur Demaskierung zellulärer Proteine zunächst 5 min in Citratlösung gekocht. Über Nacht wird dann mit dem Primär-Antikörper (monoklonaler Antikörper, Acris-Antibodies GmbH, Hiddenhausen) inkubiert (Verdünnung 1:50), es kommt zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Danach wird ein biotinylierter, gegen den Primär-Antikörper gerichteter Sekundär-Antikörper aufgetragen, Inkubation 30 min. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zugegeben, der wegen der starken Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Sekundär-Antikörper bindet (Inkubation 30 min). Nach Zugabe einer chromogenen Substratlösung, die DAB (3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, ScyTek) enthält, wird das Substrat durch Aktivität der Peroxidase zu einem braunen Präzipitat oxidiert (5 min Inkubation). Danach werden die Zellen, wie auch zwischen den einzelnen Arbeitsschritten, mit Aqua dest. gespült. Eine anschließende Gegenfärbung mit Hämalaun (nach Meyer, MERCK) für 3 Sekunden erzeugt in saurem Milieu (pH 3) eine blaue Zellkernfärbung. Überschüssiges Hämalaun wird mit Wasser abgespült. Eine nachfolgende ansteigende Alkohol-Reihe entwässert die gefärbten Zellen, damit sie anschließend mit dem wasserfreien Einschlussmittel Eukitt® (Kindler GmbH & Co) für die mikroskopische Auswertung präpariert werden können. Zeigen die Zellen eine braune Färbung, hatte dort eine Umsetzung des Substrats stattgefunden. Die Intensität der Braunfärbung ist somit proportional zur Menge an umgewandeltem DAB-Substrat. Mit Hilfe von optischen Systemen von Nikon werden die fixierten und gefärbten Zellen auf den Objektträgern fotografiert.

Aufbewahrungsmedium	250 ml 1x PBS
	42,8 g Sucrose
	0,33 g MgCl <sub>2</sub>
	250 ml Glycerin

### 3.10 Tumor-Chemosensitivitätsassay (TCA-100)

Der Tumor-Chemosensitivitätsassay dient zur Bestimmung der Wirksamkeit von chemotherapeutischen Medikamenten (Zytostatika), die das Tumorzellwachstum *in vitro* hemmen. Das Testsystem wurde für solides Tumormaterial entwickelt, das durch enzymatische Verdauung in eine Einzelzellsuspension überführt wird. Es ist ebenso für Tumorzellen aus flüssigen Probenmaterialien (z.B. Aszites, Pleura-Aspirat) geeignet. Zur Bestimmung der Sensitivität oder Resistenz werden Tumorzellen enthaltende Proben für 6 bis 7 Tage *in vitro* in Gegenwart verschiedener Konzentrationen einzelner Zytostatika oder auch Kombinationen kultiviert. Zur Testdurchführung wird ein für Tumorzellen selektives Medium (Complete Assay Medium, CAM) mit einer bestimmten Mikrotiterplatte verwendet. Die Wachstumshemmung wird mittels eines Lumineszenzmessgeräts quantifiziert. Es misst das Licht, das bei der Biolumineszenzreaktion in Gegenwart von Luziferin und Luziferase proportional zum Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) emittiert wird.

Zytostatika oder Zytostatika-Kombinationen werden in jeweils sechs verschiedenen Konzentrationen entsprechend 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5% und 6,25% der *in vitro*-Bezugswerte (Test Drug Concentration, TDC) verwendet. Das Profil von 200-6,25% wird in Dreifachwerten angesetzt. Es können acht Zytostatika oder Zytostatika-Kombinationen mit den verwendeten 96-Loch-Mikrotiterplatten getestet werden. Die verbleibenden Vertiefungen werden für die M0- (0-Wert = Zellen ohne Zytostatikum) und MI-Kontrollen („Maximum Inhibitor, Zellen ohne ATP = Blindwert) benutzt. Dabei sind die Herstellerangaben zur Vorbereitung und Lagerung von Stammlösungen zu beachten. Stammlösungen für jedes Zytostatikum oder jede Zytostatika-Kombination sind entsprechend den Herstellervorgaben herzustellen. Die Stammlösungen werden zur Herstellung von 400% TDC-Lösungen entsprechend verdünnt, d.h. das angegebene Volumen Stammlösung in µl wird in 10 ml CAM gelöst. Dann werden jeweils 100 µl des Maximum ATP Inhibitor-Reagenz in die Vertiefungen H1-H12 der Mikrotiterplatte pipettiert (MI-Kontrollen). Anschließend werden mit einer Mehrkanalpipette jeweils 100 µl CAM in jede Vertiefung pipettiert, die für Zytostatika vorgesehen ist. Weiterhin werden je 100 µl CAM in die Vertiefungen G1-G12 für die M0-Kontrollen eingesetzt. Danach werden jeweils 100 µl der 400%-Lösungen in drei Vertiefungen der Reihe A nebeneinander pipettiert (Zytostatika-Konzentration in Reihe A: 200%). Mit einer Mehrkanalpipette werden jeweils 100 µl der Zytostatika-Verdünnungen aus

der Reihe A durch die Reihen B-F der Platte seriell verdünnt. Zum Schluss jeweils 100 µl aus der Reihe F entnehmen und verwerfen.

Um optimale Ergebnisse zu erhalten, werden 20000 lebende Zellen pro Vertiefung ausgesät. Diese werden vorher gewaschen, gezählt sowie in CAM resuspendiert. Es wird ein Master-Mix hergestellt, der pro 100 µl 20000 Zellen enthält, die in die für die Zytostatika-Testung bestimmten Vertiefungen pipettiert und vorsichtig gemischt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Pipettenspitzen beim Pipettieren in eine Spalte mit einem neuen Zytostatikum gewechselt werden. In die für die M0-Kontrollen und MI-Kontrollen vorgesehenen Reihen werden ebenso 100 µl des Master-Mixes pipettiert. Die Platten werden abgedeckt und im Begasungsschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und >95% Luftfeuchtigkeit für 6-7 Tage inkubiert.

Zur Messung wird zunächst das Luziferin-Luziferase-Lyophilisat mit 15 ml Rekonstitutionspuffer gelöst. Es wird vorsichtig gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Reagenzes sollte es stets von einer Aluminiumfolie umgeben sein. Danach werden zuerst jeweils 50 µl Tumorzell-Extraktionsreagenz pro Vertiefung in die Reihen der MI- und M0-Kontrollen, dann in die Reihen der Zytostatika pipettiert. Es wird sofort gemischt, wobei Blasenbildungen zu vermeiden sind. Es wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation werden mit einer Mehrkanalpipette 50 µl aus jeder Vertiefung entnommen und in geeignete weiße Mikroplatten (Fa. Costar, Katalog-Nr. 3912) pipettiert. Anschließend werden 50 µl Luziferin-Luziferase-Reagenz mittels Mehrkanalpipette in alle zu messenden Vertiefungen der weißen Mikroplatte pipettiert und gemischt. Sofort danach wird die Mikroplatte in das Mikroplattenluminometer eingesetzt und die Messung wird gestartet. Die Messzeit beträgt ca. 1 Sekunde.

Der Datentransfer und die Datenanalyse von Messergebnissen wird mit Hilfe von Software durchgeführt, die speziell für Mikroplattenluminometer entwickelt wurde. Während der Lumineszenzmessung werden die Daten in ein Windows™ Modul überspielt und dort gespeichert. Mit Hilfe einer Software werden die Daten anschließend konvertiert und in ein Verzeichnis importiert, das mit MS Excel™ kompatibel ist. Die Datenanalyse wird mit einer MS Excel™ Tabelle durchgeführt.

Die Wachstumshemmung (Tumor Growth Inhibition, TGI) der Tumorprobe für jede Konzentration (TDC) einzelner Medikamente oder Kombinationen wird nach folgender Formel berechnet:

$$1 - (\text{Test} - \text{MI}) / (\text{M0} - \text{MI}) = \text{TGI}$$

wobei: Test = Durchschnitt der drei Messwerte pro Konzentration eines Zytostatikums

MI = Durchschnitt der zwölf Maximum Inhibitor-Kontrollen

M0 = Durchschnitt der zwölf Kontrollen ohne Zytostatika-Zusatz

Basierend auf den TGI-Werten berechnet die Software vier weitere Parameter:

AUIC = Area Under Inhibition Curve

IC<sub>50</sub> = Durch Interpolation ermittelte Zytostatika-Konzentration, die zu 50% TGI führt

IC<sub>90</sub> = Durch Interpolation ermittelte Zytostatika-Konzentration, die zu 90% TGI führt

S.I. = Sensitivitäts-Index

Folgende Richtlinien werden zur Interpretation von TCA-100 Ergebnissen für Zytostatika-Sensitivität und –Resistenz verwendet:

1. Zytostatika-Sensitivität ist erkennbar bei hohen AUIC-Werten, niedrigen IC<sub>90</sub>-, IC<sub>50</sub>- und S.I.-Werten und hohen TGI-Werten, die auf vollständige Unterdrückung des Wachstums der Tumorzellen hinweisen.
2. Zytostatika-Resistenz ist erkennbar bei niedrigen AUIC-Werten, hohen IC<sub>90</sub>-, IC<sub>50</sub>- und S.I.-Werten und niedrigen TGI-Werten, insbesondere bei hohen Zytostatika-Konzentrationen (schwache oder keine Dosis-Wirkungs-Beziehung).

Vier Kategorien der ex vivo Sensitivität wurden wie folgt definiert:

Starke Sensitivität	IC <sub>90</sub> < 100% TDC und IC <sub>50</sub> < 25% TDC
Partielle Sensitivität	IC <sub>90</sub> > 100% TDC und IC <sub>50</sub> < 25% TDC
Schwache Sensitivität	IC <sub>90</sub> < 100% TDC und IC <sub>50</sub> > 25% TDC
Resistenz	IC <sub>90</sub> > 100% TDC und IC <sub>50</sub> > 25% TDC

### 3.11 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse werden die Daten aus separaten Experimenten verwendet. Die MTS-Assays liegen in dreifacher, die Luziferasereporterassays in zwei- bzw. dreifacher Ausführung vor. Es werden stets Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Im Falle einer Berechnung der Signifikanz wird der Student's t-Test (paarweise, doppelseitig) verwendet. P-Werte <0,05 werden als signifikant gewertet.

## 4. Ergebnisse

Um die Vorteile adenoviraler Vektorsysteme für die Gentherapie gynäkologischer Tumore zu untersuchen, wurden onkolytische und Luziferase exprimierende adenovirale Vektoren hinsichtlich Tumorspezifität und Infektionseffizienz untersucht. Die Tabelle 4.1 zeigt die photometrisch und durch die TCID<sub>50</sub>-Methode bestimmten Titer der Viren, die in *in vitro* Versuchen eingesetzt wurden. Dabei geben die photometrisch bestimmten Titer die Anzahl an viralen Genomen pro  $\mu\text{l}$  Lösung an (VP = virale Partikel). Mit der TCID<sub>50</sub>-Methode wurde der biologische Titer bestimmt, d.h. die aktiven (intakten) viralen Partikel in der Virenlösung (Pfu = plaque forming unit). Der Quotient von VP und Pfu soll einen Anhaltspunkt für die Vergleichbarkeit der eingesetzten Viren sein. Die mit (\*) markierten Viren wurden eigenständig hergestellt sowie amplifiziert und sowohl deren photometrischer, als auch biologischer Titer wurden selber bestimmt. Die mit (\*\*) markierten Viren freundlicherweise erhalten von Prof. Curiel, University of Alabama, USA. Das mit (\*\*\*) markierte Virus freundlicherweise erhalten von A. Kanerva, University of Helsinki, Finnland.

**Tabelle 4.1:** photometrisch und über die TCID<sub>50</sub>-Methode bestimmte Titer der in den Versuchen eingesetzten Viren. VP = virale Partikel; Pfu = plaque forming unit; die mit (\*) markierten Viren wurden eigenständig kloniert; die mit (\*\*) markierten Viren wurden von Prof. Curiel (University of Alabama, USA), das mit (\*\*\*) markierte Virus wurde von A. Kanerva, University of Helsinki, Finnland, zur Verfügung gestellt.

Virus	Titer in VP/ml	Titer in VP/ $\mu\text{l}$	Titer in Pfu/ml	Titer in Pfu/ $\mu\text{l}$	(VP/ $\mu\text{l}$ )/(Pfu/VP)
Ad5.WT**	$5,24 \times 10^{12}$	$5,24 \times 10^9$	$3,16 \times 10^9$	$3,16 \times 10^6$	1:1658
Ad5/3. $\Delta$ 24***	$2,84 \times 10^{12}$	$2,84 \times 10^9$	$3,16 \times 10^{10}$	$3,16 \times 10^7$	1:89
Ad5/3.MDR1E1*	$6,51 \times 10^{11}$	$6,51 \times 10^8$	$8,97 \times 10^9$	$8,97 \times 10^6$	1:72
Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24*	$4,92 \times 10^{11}$	$4,92 \times 10^8$	$8,15 \times 10^9$	$8,15 \times 10^6$	1:60
Ad5/3.MDR1Luc*	$1,19 \times 10^{12}$	$1,19 \times 10^9$	$6,58 \times 10^9$	$6,58 \times 10^6$	1:180
Ad5/3.CMVLuc**	$9,13 \times 10^{11}$	$9,13 \times 10^8$	$7,13 \times 10^9$	$7,13 \times 10^6$	1:128
Ad5.CMVLuc**	$1,73 \times 10^{12}$	$1,73 \times 10^9$	$1,42 \times 10^{10}$	$1,42 \times 10^7$	1:121

### 4.1 Transkriptionales Targeting

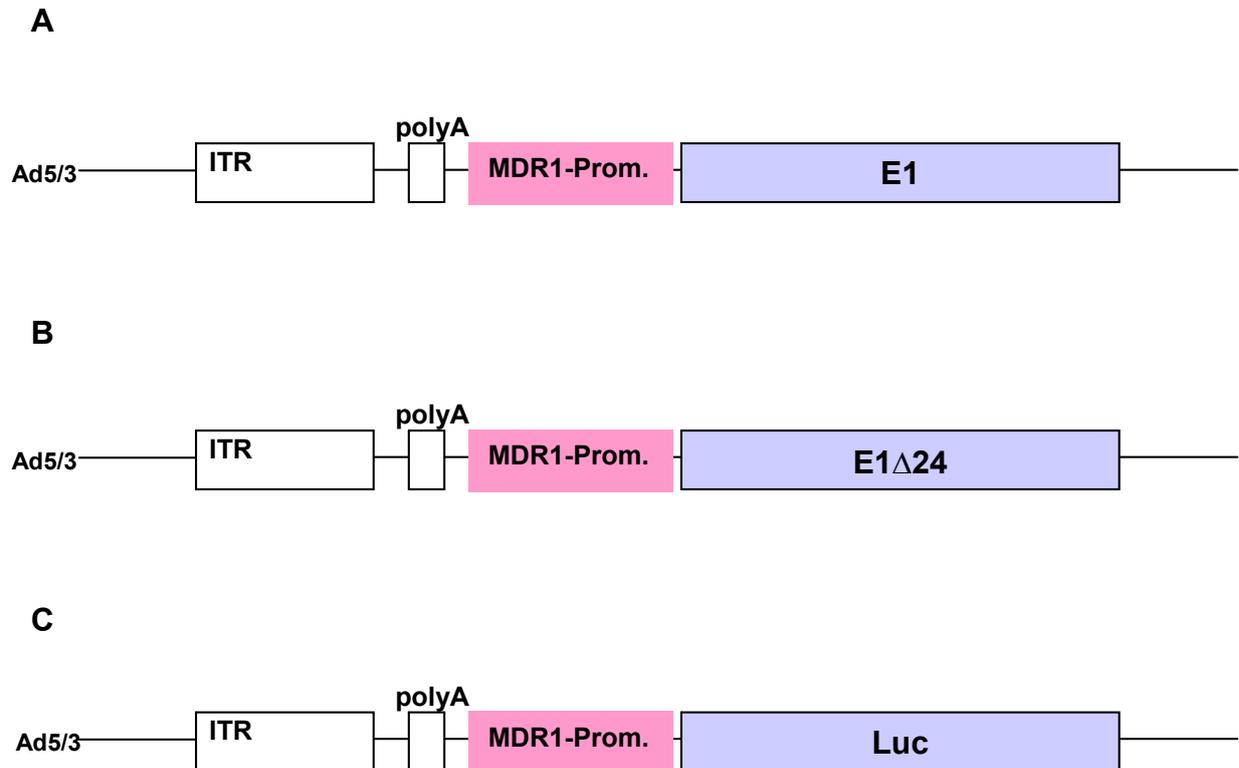
Die Replikation von Adenoviren in epithelalem Normalgewebe stellt den limitierenden Faktor in der Krebsgentherapie dar. Daher stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der Spezifität der adenoviralen Replikation durch einen tumorspezifischen Promotor möglich ist (transkriptionales Targeting). Außerdem sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die verbesserte Tumorspezifität zu einer verminderten Effizienz der adenoviralen Replikation führt und somit die onkolytische Potenz reduziert. Um diese Frage zu beantworten, wurden in dieser Arbeit Luziferase-Reporterassays sowie Zytotoxizitätsassays durchgeführt.

#### 4.1.2 Steuerung der adenoviralen Replikation - Promotorauswahl

Der tumorspezifische Promotor steuert beim transkriptionalen Targeting die virale Replikation. In den vergangenen Jahren konnten durch systematische Genexpressionsanalysen zahlreiche potentiell geeignete Promotoren für verschiedene Tumorentitäten identifiziert werden. Der Promotor des in vorbehandelten Tumorzellen überexprimierten Gens MDR1 erschien zur Steuerung einer Krebsgentherapie des Ovarial- und Mammakarzinoms besonders geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde die MDR1-Promotoraktivität zur Analyse der Tumorspezifität in chemoresistenten und nicht chemoresistenten Ovarialkarzinom- sowie Mammakarzinomzellen und Normalzellen untersucht. Die zytostatikainduzierte MDR1-vermittelte Chemoresistenz beruht u.a. auf einer verstärkten Expression des p-Glykoproteins auf der Zellmembran. In der adenoviralen Gentherapie sollte diese Eigenschaft zu einer Optimierung der Tumorspezifität führen. Dazu wurde in dieser Arbeit durch homologe Rekombination mittels eines p-Shuttle-Vektors der MDR1-Promotor in das adenovirale Plasmid pvkF5/3 kloniert. Das adenovirale Plasmid enthielt bereits die so genannte 5/3-Fiberchimäre. Zur zusätzlichen Steuerung der viralen Replikation wurde außerdem eine Modifikation im adenoviralen E1 Gen vorgenommen. Dazu standen p-Shuttle-Vektoren zur Verfügung, die mit freundlicher Unterstützung von Frau I. Herrmann, molekulargenetisches Labor der Frauenklinik, Düsseldorf, eingesetzt werden konnten. Erstens der p-Shuttle-Vektor pSMDR1E1, in welchen das für die Replikation notwendige frühe virale E1 Gen eingefügt worden war. Hierdurch sollte eine transkriptionelle Kontrolle der E1-Genexpression erreicht werden. Durch Rb-Phosphorylierung sollte nach E2F-Freisetzung die G1-Phase, die S-Phase und dann die Mitose induziert werden und dadurch das Virus unabhängig von der Proliferationsrate der Wirtszelle replizieren. Zweitens wurde der p-Shuttle-Vektor pSMDR1E1 $\Delta$ 24 verwendet, der eine 24-bp-Deletion an der Rb-Bindedomäne aufwies. Auf Grund des Defekts der Rb-Bindedomäne sollte die adenovirale Replikation an die Proliferation von Zellen gekoppelt werden, die ihrerseits einen Rb-Defekt aufweisen. Dies ist bei allen Tumorzellen der Fall. Durch diese „doppelte Sicherung“ sollte eine weitere Spezifität der adenoviralen rekombinanten Klone erreicht werden. Die onkolytische Potenz und Toxizität dieser klonierten adenoviralen Vektoren wurden in Zytotoxizitätsassays untersucht. Außerdem wurde ein dritter p-Shuttle-Vektor, pSMDR1Luc, verwendet, der, ebenso freundlicherweise erhalten von Frau I. Herrmann, an Stelle des viralen E1 Gens ein Luziferase-Reportergen enthielt, d.h. komplett E1-deletiert war. Dadurch wurde gewährleistet, dass das Adenovirus anstatt zu replizieren das Enzym Luziferase synthetisiert. Diese Eigenschaft wurde in Luziferase-Reportergenassays benötigt.

Die rekombinanten Viren werden Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 und Ad5/3.MDR1Luc genannt. Das alleinige virale Genom wird pAd5/3.MDR1E1, pAd5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 und pAd5/3.MDR1Luc genannt ( $\Delta$ 24 = d24).

Die Abbildung 4.1.1 gibt eine vereinfachte Schemazeichnung der klonierten Adenoviren wieder.

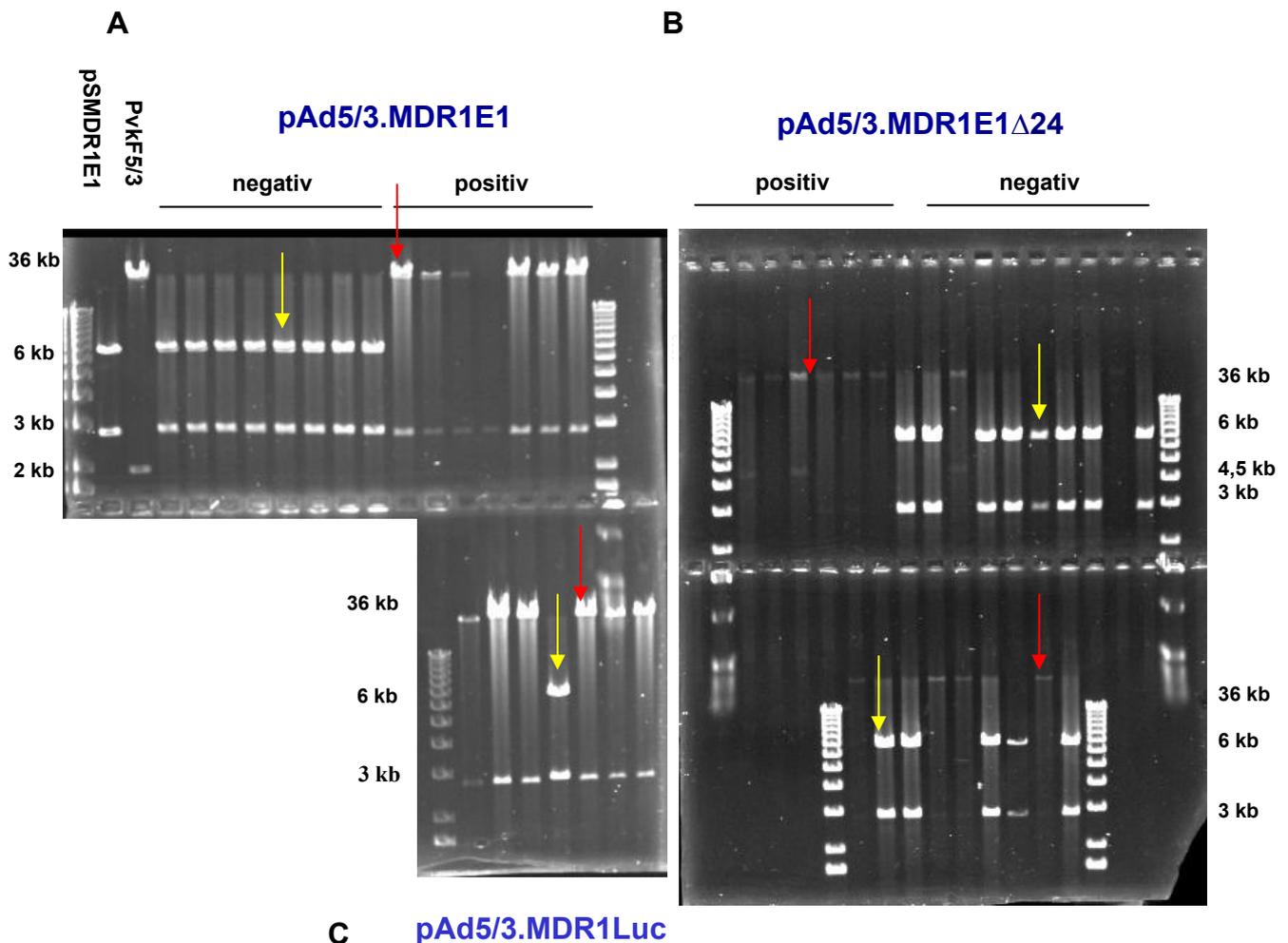


**Abb. 4.1.1: vereinfachte Schemazeichnung der klonierten Adenoviren** **A:** transkriptionelle Kontrolle der E1 Genexpression: E1A bindet an Rb-Protein -> Rb-Phosphorylierung -> E2F-Freisetzung -> Induktion der S-Phase; **B:** Kombination von Transkriptionskontrolle mit 24-bp-Deletion im E1 Gen der Rb-Bindedomäne -> Kopplung der adenoviralen Replikation an Zellen mit Rb-Defekt (z.B. Tumorzellen); **C:** komplette E1-Deletion, Substitution des E1 Gens durch Luziferase-Reportergen -> Luziferasesynthese; ITR = inverted terminal repeat.

#### 4.1.3 Untersuchung der rekombinanten adenoviralen Klone

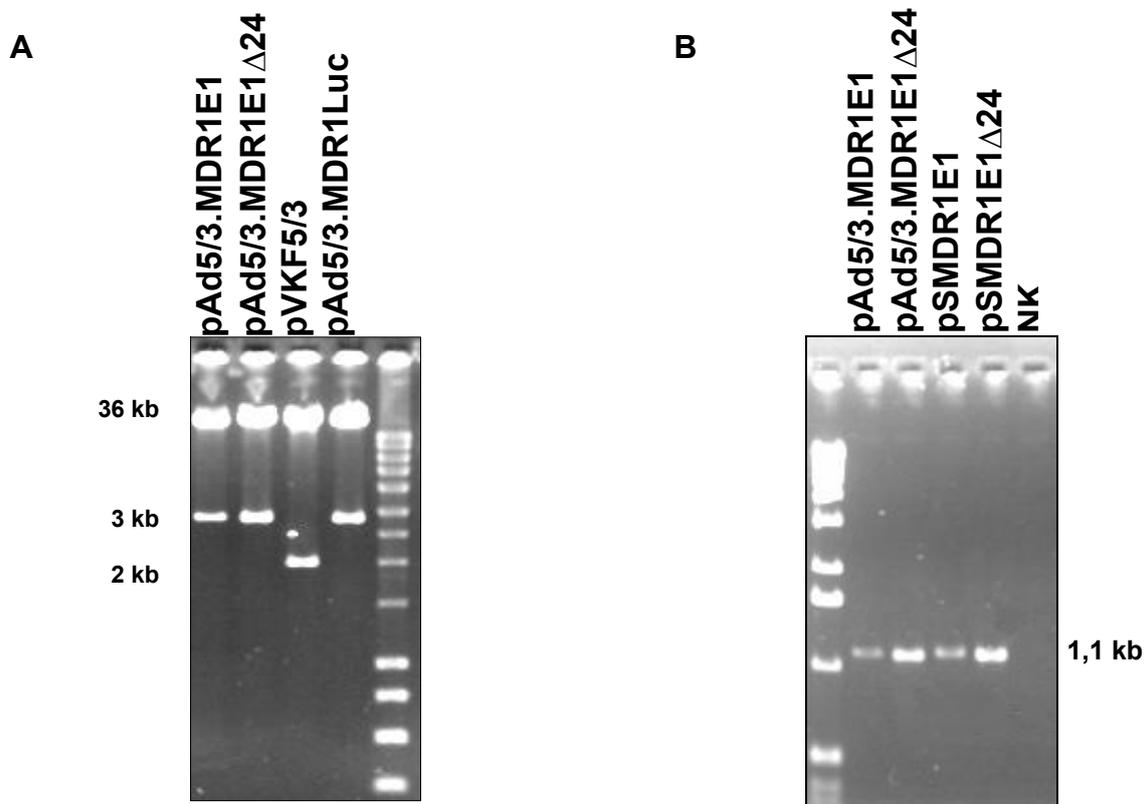
Nach erfolgter homologer Rekombination der p-Shuttle-Vektoren mit dem adenoviralen Plasmid pvkF5/3 durch den *E. coli* Stamm BJ5183 wurden nach Plasmidisolation die potentiell positiven Klone einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym *PacI* sowie einer PCR-Kontrolle zum Nachweis des MDR1-Promotors unterzogen. Später wurden die jeweils positiven adenoviralen Klone zur Amplifikation in den *E. coli* Stamm DH5alpha transformiert, bevor sie in 293A Zellen zur weiteren Amplifikation transfiziert wurden. Nach dieser Amplifikation erfolgte eine zweite *PacI* Restriktion zur Charakterisierung der amplifizierten adenoviralen Plasmide. Durch die Restriktion mit dem Enzym *PacI* wurden ein großes

Fragment von 36 kb und ein kleines Fragment von 3 kb bzw. 4,5 kb erwartet (s.o.). Diese Fragmente entsprechen der Größe des rekombinanten adenoviralen Genoms nach homologer Rekombination zwischen dem „linken Arm“, oder den Ori der beiden Vektoren und nachfolgender *PacI* Restriktion. Bei nicht erfolgter Rekombination sollten die DNA-Fragmente eine Größe von 6 kb und 3 kb haben, was der Größe des p-Shuttle-Vektors nach *PacI* Restriktion entspricht. Nach Restriktion wurden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. In der nachfolgenden Abbildung sind die Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente dargestellt.



**Abb. 4.1.2: Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente** nach Restriktion mit dem Enzym *PacI* **A:** positive Klone von pAd5/3.MDR1E1 nach homologer Rekombination zwischen dem 'linken Arm' beider Vektoren nach *PacI* Restriktion mit 36 kb sowie 3 kb Fragment; negative Klone mit 6 kb sowie 3 kb Fragment; zur Kontrolle pSMDR1E1 und pvkF5/3 nach *PacI* Restriktion; **B:** positive Klone von pAd5/3.MDR1E1Δ24 nach homologer Rekombination zwischen dem 'linken Arm' sowie den Ori beider Vektoren nach *PacI* Restriktion mit 36 kb sowie 3 kb bzw. 4,5 kb Fragment; negative Klone mit 6 kb und 3 kb Fragment; **C:** positive Klone und ein negativer Klon von pAd5/3.MDR1Luc (s.o.); roter Pfeil = positiver Klon, gelber Pfeil = negativer Klon.

Die Überprüfung des MDR1-Promotors in den positiven rekombinanten Klonen erfolgte mittels PCR. Die Primer flankierten den MDR1-Promotor vom 5'-ITR bis zum E1-Gen, so dass jeweils ein 1,1 kb großes Promotorfragment amplifiziert wurde. Die Abb. 4.1.3 zeigt exemplarisch den Nachweis des MDR1-Promotors mit den MDR1-spezifischen Primern am Beispiel der rekombinanten Klone pAd5/3.MDR1E1 und pAd5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24. Als Positivkontrolle dienten die p-Shuttle-Vektoren pSMDR1E1 und pSMDR1E1 $\Delta$ 24. Nach Amplifikation der positiven Klone in 293A Zellen wurden diese erneut durch *PacI* Restriktion untersucht und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der positiven Klone ist ebenso in Abb. 4.1.3 dargestellt.



**Abb. 4.1.3: Kontrolle der in 293A Zellen amplifizierten adenoviralen Plasmide durch Restriktionsanalyse und Nachweis des inserierten MDR1-Promotors mittels PCR** A: gelelektrophoretische Auftrennung nach Restriktion mit dem Enzym *PacI* zeigt DNA-Fragmente von 36 kb und 3 kb sowie 36 kb und 2 kb bei dem Kontrollplasmid pVKF5/3; B: PCR-Kontrolle des inserierten MDR1-Promotors; NK = Negativkontrolle.

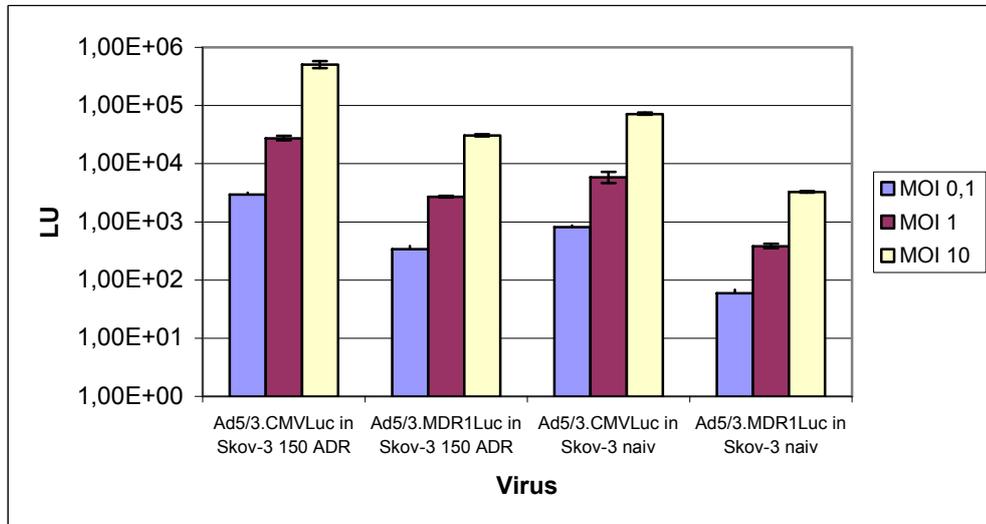
#### 4.1.4 Reportergenassays zur Analyse des transkriptionalen Targeting

Das Luziferase-Reportergen E1-deletierter oder replikationsinkompetenter adenoviraler Vektoren steht unter direkter Kontrolle des MDR1-Promotors und wurde anstelle des frühen viralen E1 Gens in den adenoviralen Vektor eingefügt. Somit lieferte die gemessene Luziferaseaktivität einen direkten Nachweis für die Promotoraktivität in den verwendeten Zellen. Dadurch konnte die basale MDR1-Promotoraktivität in Skov-3 und Normalzellen

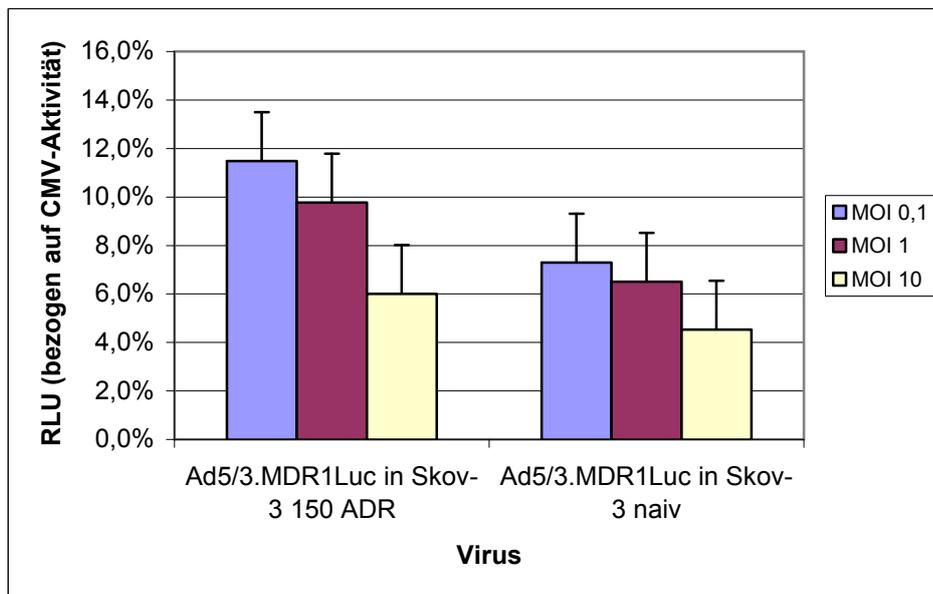
(Fibroblasten) analysiert und mit der adriamycininduzierten MDR1-Promotoraktivität in chemoresistenten Skov-3 Zellen verglichen werden. Innerhalb einer Zelllinie wurde die Luziferaseaktivität auf die Aktivität des starken und ubiquitär exprimierten Cytomegalieviruspromotors bezogen. Der Einfluss variierender Zellzahlen und toxischer Effekte der Virusinfektion auf die Messdaten konnte aufgrund der Sicherheit in der Versuchshandhabung und der guten Reproduzierbarkeit der Daten minimiert werden. Zur Auswertung geeignet waren nur Messdaten, die mindestens 10fach über den Hintergrundsignalen lagen. Außerdem waren die RLU in MOI 10 mit Vorsicht zu interpretieren, da die Aktivität des CMV-Promotors nicht-proportional stark zunahm.

Es konnte gezeigt werden, dass Zellen der Zelllinie Skov-3 nach Inkubation mit dem Zytostatikum Doxorubicin (Adriamycin, ADR) eine signifikant höhere MDR1-Promotoraktivität aufwiesen im Vergleich zu denjenigen Zellen, die nicht mit ADR behandelt wurden (Skov-3 naiv). Abb. 4.1.4 zeigt die Ergebnisse der gemessenen Luziferaseaktivitäten in absoluten (A) und relativen Werten (B). Die Zellen wurden mit MOI 0,1 (*Multiplicity of Infection; Virus/Zelle*), MOI 1 und MOI 10 infiziert (Infektion in PFU/Zelle). Es ist zu sehen, dass das Virus Ad5/3.CMVLuc in Skov-3 naiven Zellen, sowie in Skov-3 Zellen, die mit 150 ng/ml ADR inkubiert wurden (Skov-3 150 ADR Zellen), erwartungsgemäß eine stärkere Promotoraktivität aufwies als das Virus Ad5/3.MDR1Luc. Dabei schien die CMV-Promotoraktivität in Skov-3 150 ADR Zellen höher zu sein als die in Skov-3 naiven Zellen. Dies muss jedoch als Unterschied in der Transduktionseffizienz interpretiert werden (siehe Transduktionales Targeting). Wichtig ist, dass die MDR1-Promotoraktivität des Virus Ad5/3.MDR1Luc in Skov-3 150 ADR Zellen deutlich höher war, als in Skov-3 naiven Zellen. Es wurden nämlich etwa 7fach höhere LU in den chemoresistenten Zellen gemessen (siehe Absolutwerte), dargestellt in Abb. 4.1.4 A und in Abb. 4.1.4 B (relative MDR1-Aktivität). Die relative MDR1-Aktivität nahm nach Behandlung von Skov-3 Zellen mit ADR von 7,31% in Skov-3 naiven Zellen auf 11,5% in Skov-3 ADR Zellen zu bei MOI 0,1 ( $P = 0,002$ ). MOI 1 zeigte eine Zunahme der relativen MDR1-Aktivität von ca. 6,52% in Skov-3 naiven Zellen auf 9,79% in Skov-3 150 ADR Zellen ( $P = 0,0013$ ). Beim Vergleich der MOIs untereinander konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Virusmenge/Zelle und Luziferaseaktivität hergestellt werden. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass die Skov-3 naiven Zellen im Vergleich mit primären Fibroblasten eine relativ hohe basale MDR1-Promotoraktivität besaßen. Abb. 4.1.5 zeigt die Ergebnisse der Luziferaseaktivitäten in absoluten (A) und relativen LU (B). Die absoluten und relativen LU von Ad5/3.MDR1Luc der MOI 1 sind hier am ehesten mit denen in Skov-3 naiven Zellen vergleichbar. Die relative MDR1-Aktivität in primären Fibroblasten betrug 3,28% bei MOI 1. Es lag also eine relativ geringe MDR1-Promotoraktivität in Fibroblasten vor und eine darauf bezogen hohe in Skov-3 naiven Zellen.

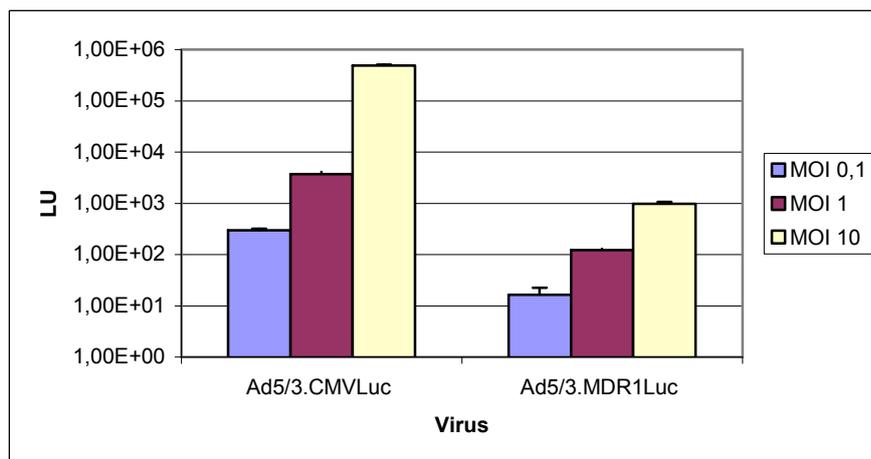
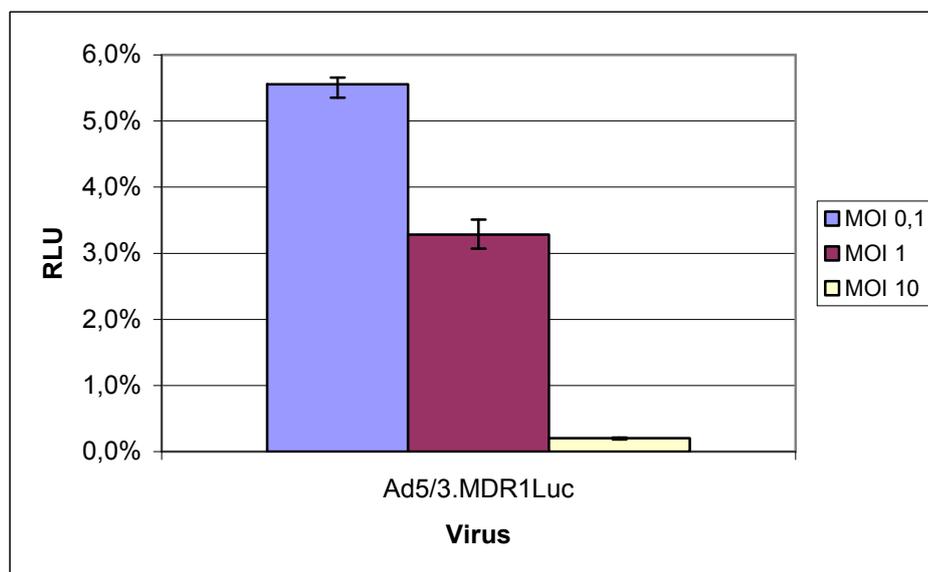
A



B



**Abb. 4.1.4: absolute und relative Luziferaseaktivitäten (LU, RLU) in Skov-3 Zellen** **A:** absolute Luziferaseaktivitäten in Skov-3 150 ADR sowie in Skov-3 naiven Zellen nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5/3.MDR1Luc; Diagramm beinhaltet Mittelwert und Standardabweichungen von zwei Experimenten, in denen jeder Wert in Dreifachbestimmung gemessen wurde; **B:** relative Luziferaseaktivitäten von Ad5/3.MDR1Luc bezogen auf Ad5/3.CMVLuc; die Quotienten wurden jeweils aus den Mittelwerten der entsprechenden absoluten Luziferaseaktivitäten (A) gebildet.

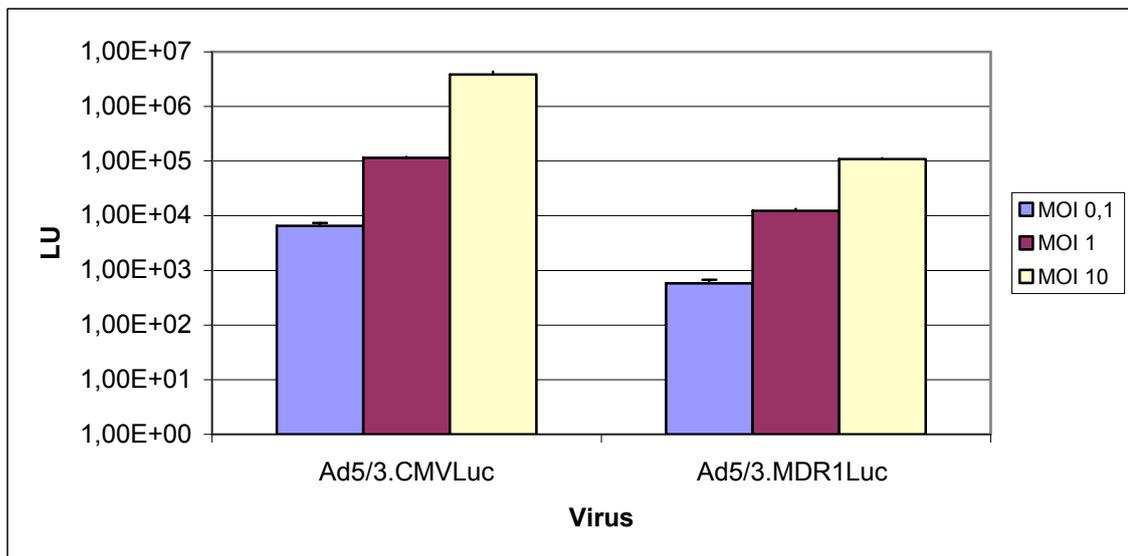
**A****B**

**Abb. 4.1.5: absolute und relative Luziferaseaktivitäten (LU, RLU) in primären Fibroblasten** **A:** absolute Luziferaseaktivitäten in primären Fibroblasten nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5/3.MDR1Luc; Diagramm beinhaltet Mittelwert und Standardabweichungen von zwei Experimenten, in denen jeder Wert in Dreifachbestimmung gemessen wurde; **B:** relative Luziferaseaktivitäten von Ad5/3.MDR1Luc bezogen auf Ad5/3.CMVLuc; Quotient gebildet aus den Mittelwerten der entsprechenden absoluten Luziferaseaktivitäten (A).

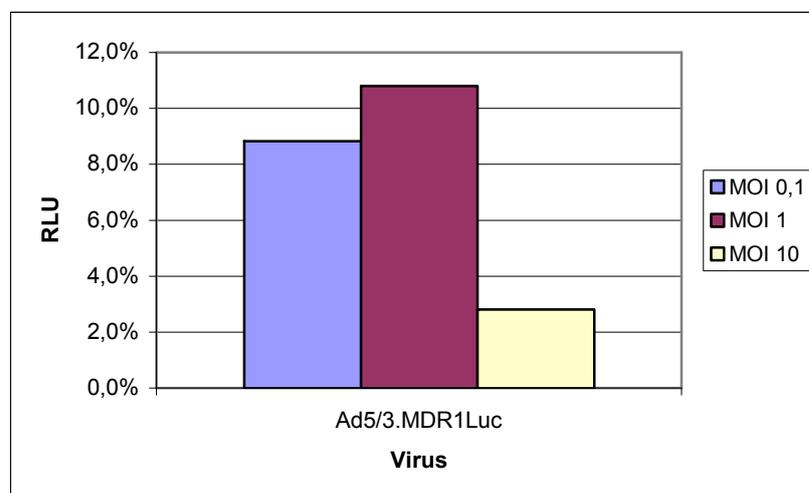
Die MDR1-Promotoraktivität wurde auch in primären Mammakarzinomzellen untersucht. Die primären Tumorzellen stammten von mehrfach vorbehandelten Mammakarzinompatientinnen, und die Zellen wurden aus Aszites gewonnen und aufgereinigt. Unmittelbar danach wurden sie im Luziferase-Reporterassay eingesetzt. Abb. 4.1.6 zeigt die Ergebnisse der absoluten (A) und relativen (B) Luziferaseaktivitäten. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die MDR1-Promotoraktivität in den mit Chemotherapie behandelten malignen Zellen verglichen mit Skov-3 naiven Zellen signifikant

höher war. Bei MOI 0,1 wurde eine relative MDR1-Aktivität von 8,83% erreicht ( $P = 0,05$ ), die bei MOI 1 mit 10,81% noch übertroffen wurde ( $P = 0,001$ ). Bei MOI 10 zeigte sich wieder die nicht-proportionale Zunahme der CMV-Aktivität.

**A**



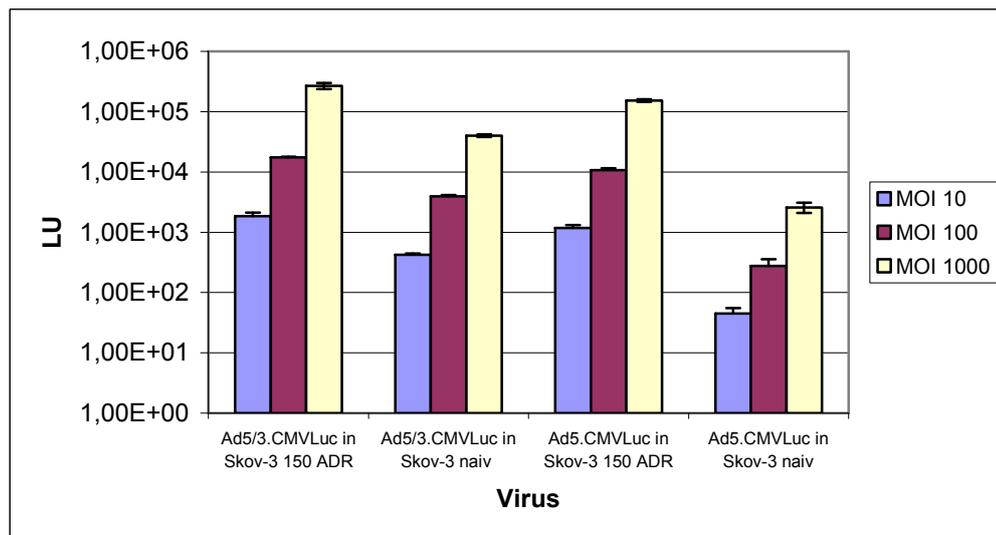
**B**



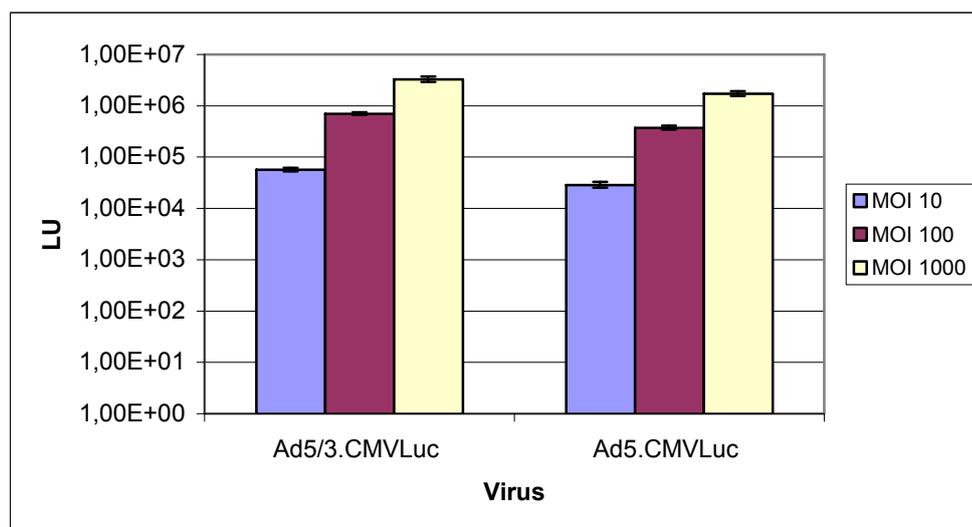
**Abb. 4.1.6: absolute und relative Luziferaseaktivitäten (LU, RLU) in primären Mammakarzinomzellen, mit Chemotherapie vorbehandelt** **A:** absolute Luziferaseaktivitäten nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5/3.MDR1Luc; Diagramm beinhaltet Mittelwert und Standardabweichungen von zwei Experimenten, in denen jeder Wert in Dreifachbestimmung gemessen wurde; **B:** relative Luziferaseaktivitäten von Ad5/3.MDR1Luc bezogen auf Ad5/3.CMVLuc; Quotient gebildet aus den Mittelwerten der entsprechenden absoluten Luziferaseaktivitäten (A).

## 4.2 Transduktionales Targeting

Ergänzend zum transkriptionalen Targeting sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Modifikation der adenoviralen Fiber eine Verbesserung der Infektion von Tumorgewebe ("infectivity enhancement") bewirkt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass u.a. Ovarialkarzinomzellen verstärkt den so genannten Ad3 Rezeptor auf der Zellmembran exprimieren und daher eine CAR-abhängige Infektion wegen nicht vorhandener CAR-Rezeptoren kaum möglich ist (Kanerva, Mikheeva et al. 2002). Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob die wiederum erhöhte tumorale Expression des CAR-Rezeptors nach Behandlung mit Chemotherapeutika (Hemminki, Kanerva et al. 2003) eine bessere Transduktion der für die Infektion CAR-abhängiger adenoviralen Vektoren zur Folge hat, oder ob fibermodifizierte Adenoviren auch in diesen Geweben zu einer verbesserten Transduktion führen. Um diese Frage zu klären, wurde das Virus Ad5/3.CMVLuc in Luziferase-Reporterassays untersucht. Ad5/3.CMVLuc wurde durch homologe Rekombination gentechnisch modifiziert, so dass es anstatt der Ad5.WT Fiber (CAR-abhängig) eine Chimäre aus dem langen 5er Schaft und dem kleineren 3er Knob erhielt, was eine CAR-unabhängige Infektion ermöglichen sollte. Als Vergleich dienten Adenoviren, die nicht fibermodifiziert waren, d.h. die Wildtypfiber besaßen (Ad5.CMVLuc). Beide enthielten den CMV-Promotor und anstelle des viralen E1 Gen das Luziferasegen, so dass sie sich nur in der Fibermodifikation unterschieden. Die gemessenen Luziferaseaktivitäten standen also in direktem Zusammenhang mit der Transduktionseffizienz. In Abb. 4.2.1 sind die Ergebnisse der gemessenen Luziferaseaktivitäten in Zellen der Zelllinie Skov-3 dargestellt, die einmal mit 150 ng/ml ADR behandelt wurden (Skov-3 150 ADR Zellen) bzw. nicht behandelt wurden (Skov-3 naive Zellen). Infiziert wurden die Zellen jeweils mit MOI 10, MOI 100 und MOI 1000 (Infektion mit VP/Zelle). Der Vergleich der Infektiosität des Virus Ad5/3.CMVLuc mit dem Virus Ad5.CMVLuc zeigte eine deutliche absolute Transduktionsverbesserung für Ad5/3.CMVLuc sowohl in Skov-3 150 ADR Zellen, als auch in Skov-3 naiven Zellen. Dabei war die Transduktionsverbesserung stärker in Skov-3 naiven Zellen ausgeprägt als in Skov-3 150 ADR Zellen, denn Ad5.CMVLuc zeigte in Skov-3 150 ADR Zellen eine 100-fach erhöhte Zunahme der Infektiosität. Es fand sich eine vierzehn bis fünfzehnfach höhere Transduktionseffizienz für Ad5/3.CMVLuc in Skov-3 naiven Zellen, hingegen eine 1,6 bis 1,7fach höhere bei Skov-3 150 ADR Zellen. Die Transduktionseffizienz wurde ebenso in primären Mammakarzinomzellen untersucht, die aus Aszites von Tumorpatientinnen gewonnen wurden, welche bereits mehrfach mit Chemotherapie vorbehandelt worden waren. Abb. 4.2.2 ist zu entnehmen, dass die Fibermodifikation des Virus Ad5/3.CMVLuc ebenfalls zu einer besseren Transduktionseffizienz führte verglichen mit Ad5.CMVLuc. In den MOIs 10, 100 und 1 000 war sie etwa zweifach höher als die des Virus mit der Wildtypfiber.



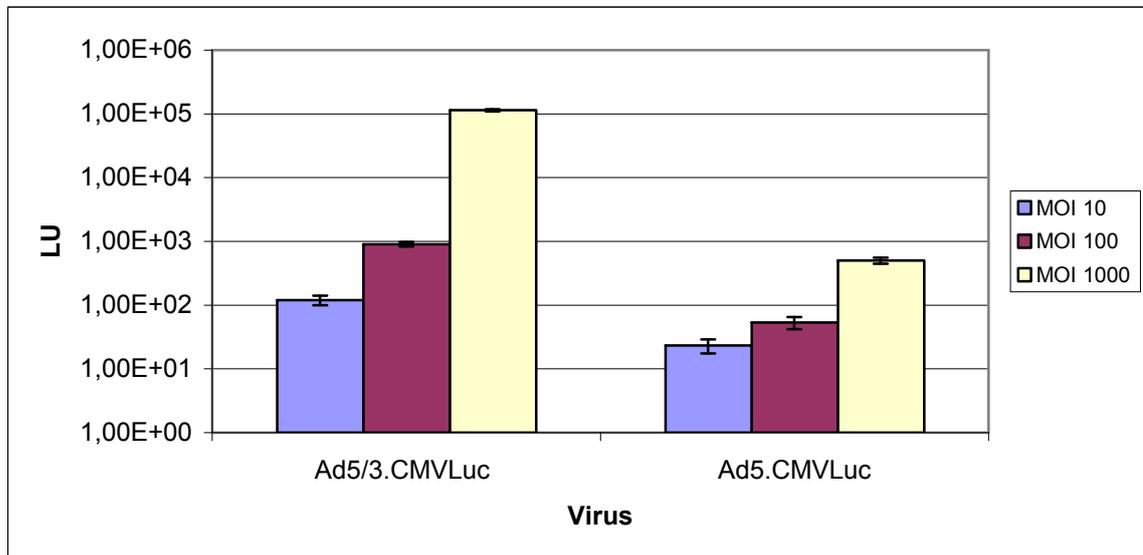
**Abb. 4.2.1: Luziferaseaktivitäten (LU) in Skov-3 150 ADR Zellen und Skov-3 naiven Zellen nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc; Diagramm beinhaltet Mittelwert und Standardabweichung eines Experiments, in dem jeder Wert in einer Dreifachbestimmung gemessen wurde.**



**Abb. 4.2.2: Luziferaseaktivitäten (LU) in primären Mammakarzinomzellen, mit Chemotherapie vorbehandelt nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc; Diagramm beinhaltet Mittelwert und Standardabweichung von zwei Experimenten, in denen jeder Wert in einer Dreifachbestimmung gemessen wurde.**

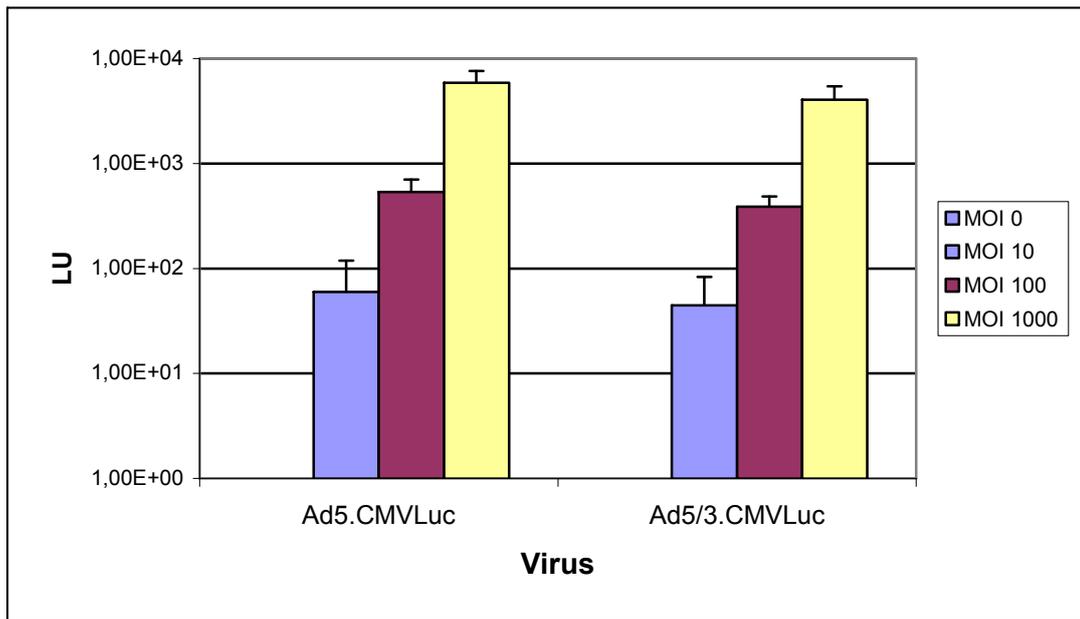
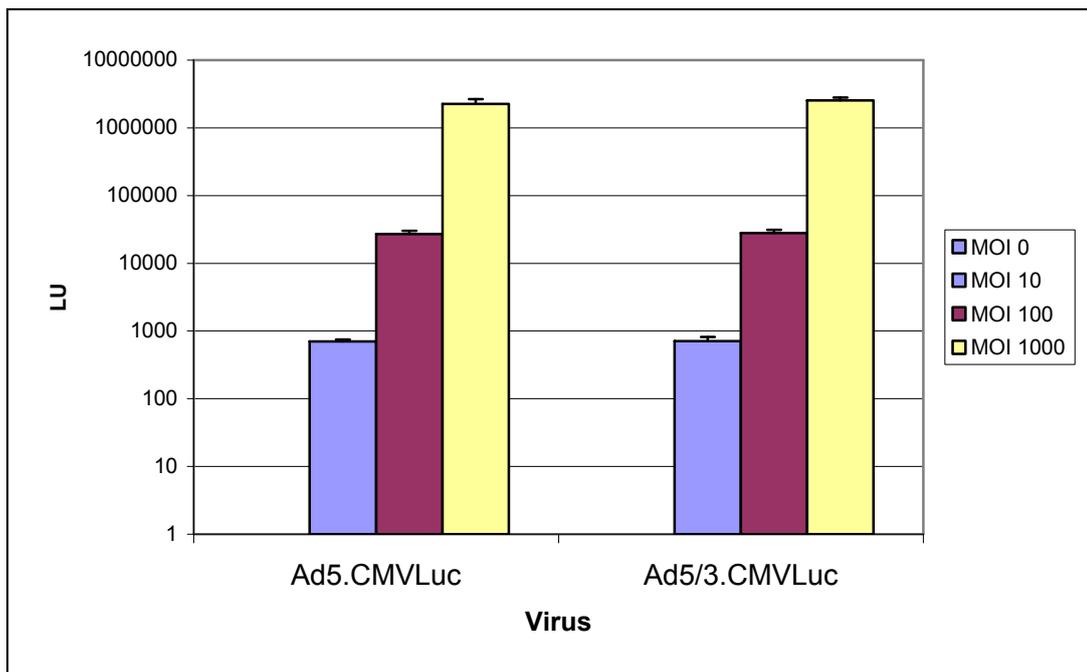
Um die Infektiosität der Viren an Normalgewebe zu analysieren, wurden primäre Fibroblasten mit den Viren Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc infiziert und die Luziferaseaktivitäten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2.3 dargestellt. Es zeigte sich, dass durch die Fibermodifikation eine 230fach höhere Transduktionseffizienz bei MOI 1000 erreicht werden konnte im Vergleich zum Virus mit Wildtypfiber. Die MOIs 10 und 100 konnten wegen der geringen Luziferaseaktivität (<100 LU) bei Ad5.CMVLuc nicht in ein

auswertbares Verhältnis zu Ad5/3.CMVLuc gesetzt werden, zeigten aber, dass das Virus mit der Wildtypfiber die Fibroblasten kaum infizieren konnte.



**Abb. 4.2.3: Luziferaseaktivitäten (LU) in primären Fibroblasten** nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc; Diagramm beinhaltet Mittelwert und Standardabweichung von zwei Experimenten, in denen jeder Wert in einer Dreifachbestimmung gemessen wurde.

Ergänzend zu den Experimenten mit der Ovarialkarzinomzelllinie Skov-3 wurden die Ovarialkarzinomzelllinien MDAH 2774 und Hey einem Luziferase-Reporterassay zur Analyse der Infektiosität von Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc unterzogen. Die Zelllinie MDAH 2774 exprimiert vermehrt CAR-Rezeptoren (Kim, Lee et al. 2002). Hey wurde ausgewählt, da Zytotoxizitätsassays vorliegen (s. 4.3), in denen das Virus Ad5.WT eine relativ starke Zytotoxizität in dieser Zelllinie zeigte. Es sollte untersucht werden, wie sich die Viren Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc hinsichtlich der Infektiosität in diesen Zelllinien verhielten. Wie der Abb. 4.2.4 (A) zu entnehmen ist, war das Virus Ad5.CMVLuc in der Zelllinie MDAH 2774 infektiöser als das fibermodifizierte Virus Ad5/3.CMVLuc, etwa um das 1,4fache. In der Zelllinie Hey besaßen beide Viren etwa die gleiche Infektiosität, Ad5/3.CMVLuc war minimal infektiöser (s. Abb. 4.2.4 (B)).

**A****B**

**Abb.: 4.2.4: Luciferaseaktivitäten (LU) nach Infektion mit Ad5/3.CMVLuc und Ad5.CMVLuc A:** Zelllinie **MDAH 2774**; **B:** Zelllinie **Hey**; Diagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung nach Dreifachbestimmung eines Experiments.

### 4.3 Kombination aus transkriptionalem und transduktionalem Targeting

Um eine erfolgreiche onkolytische Gentherapie zu ermöglichen, ist eine optimale Transduktionseffizienz und eine spezifische Replikation der Adenoviren in Tumorgewebe von

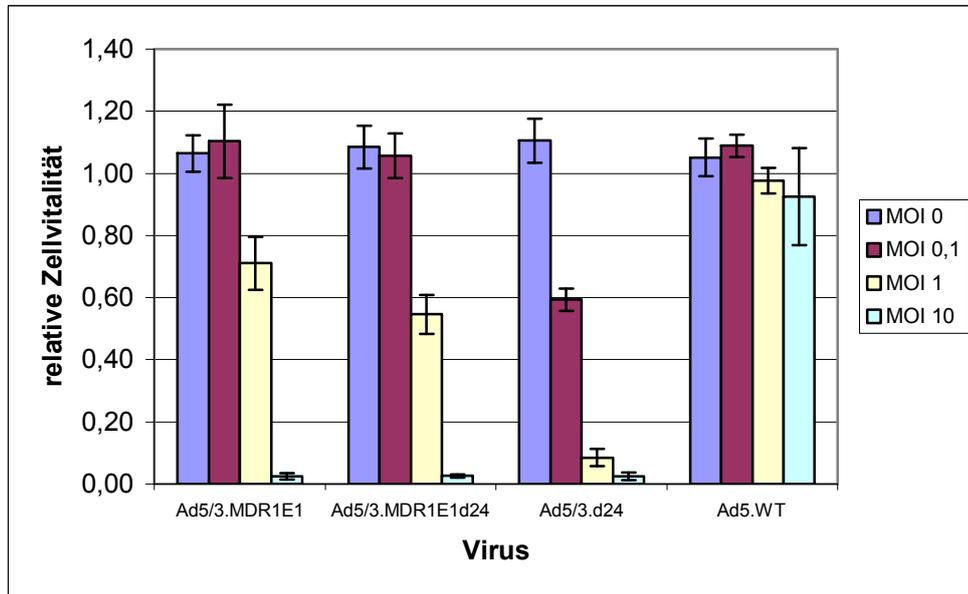
Bedeutung. Die Ergebnisse des transkriptionalen Targetings (s. 4.1.4) zeigten eine erhöhte Promotoraktivität in mit ADR behandelten Skov-3 Zellen sowie in mit Polychemotherapie vorbehandelten Mammakarzinomzellen für den MDR1-Promotor. Außerdem zeigten die Luziferase-Reportergenassays für das transduktionale Targeting (s. 4.2) eine erhöhte Transduktionseffizienz durch Fibermodifikation (5/3-Fiberchimäre) des Adenovirus in Skov-3 naiven Zellen, in Skov-3 ADR Zellen und auch in primären Fibroblasten. Es sollte nun untersucht werden, ob die Kombination von transkriptionalem und transduktionalem Targeting zu einer Verbesserung der Tumorspezifität mit gleichzeitig verbesserter Infektiosität führt. Dazu wurden Adenoviren mit inseriertem MDR1-Promotor und integriertem viralem E1 Gen bzw. mit 24-bp-Deletion im E1A Gen und modifizierter Fiber in Zytotoxizitätsassays (MTS-Assays) eingesetzt. Mittels dieser MTS-Assays konnte indirekt die Zellvitalität gemessen und so auf die Toxizität bzw. onkolytische Potenz der eingesetzten Adenoviren geschlossen werden. Als Vergleichsviren der eigenständig hergestellten Adenoviren Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 wurden das Virus Ad5.Wildtyp (Ad5.WT) sowie das Virus Ad5/3. $\Delta$ 24 in den *in vitro* Versuchen verwendet. Ad5.WT besaß die Wildtypfiber sowie den Wildtyppromotor, Ad5/3. $\Delta$ 24 die 5/3-Fiberchimäre, die 24-bp-Deletion im viralen E1A Gen und den Wildtyppromotor. So war eine Vergleichbarkeit aufgrund isogenetischer Vektoren gegeben. Es wurden MTS-Assays mit den Ovarialkarzinomzelllinien Ov-4, Hey, MDAH 2774, Skov-3 und Skov-3 i.p. durchgeführt, in welchen durch immunhistochemische Färbung die Expression des p-Glykoproteins und somit des MDR1-Promotors untersucht wurde. Zur Analyse der Toxizität der Viren an Normalgewebe wurden humane Mammaepithelzellen (HMEC), primäre Keratinozyten, primäre Fibroblasten und die Leberkarzinomzelllinie HepG2 verwendet. Auf Grund der unveränderten CAR-Expression im Vergleich zu normalen Leberzellen kann HepG2 eingesetzt werden, um primäre Leberzellen zu simulieren. Bei den Zellen des Normalgewebes wurde die p-Glykoprotein-Expression ebenso immunhistochemisch untersucht. Außerdem wurden Skov-3 Zellen in den MTS-Assays eingesetzt, die vorher mit ADR inkubiert wurden, um den MDR1-Promotor zu induzieren, was wiederum immunhistochemisch untersucht wurde. Des Weiteren erfolgte eine qPCR-basierte Analyse der MDR1-Genexpression in Skov 90 ADR Zellen, um eine MDR1-vermittelte Resistenz nachzuweisen. Weiterhin konnten native Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen in MTS-Assays untersucht werden, die aus Aszites einer Patientin gewonnen wurden, die bereits mit mehreren Chemotherapien vorbehandelt worden war. Zur Analyse der Chemoresistenz der primären Zellen wurden Chemosensitivitätsassays durchgeführt. Um eine Bezugsgröße zum Errechnen der relativen Zellvitalität zu erhalten, wurden die entsprechenden Zellen in jedem MTS-Assay außer mit den o.g. Viren auch mit der Negativkontrolle Ad5/3.CMVLuc infiziert, welches in den eingesetzten MOIs 0,1 bis 10 nicht

zytotoxisch wirkte. Zur Untersuchung der Spezifität der Adenoviren für Tumorzellen im Zellverband und um deren Replikation nachzuweisen, wurden Kokulturen aus Fibroblasten und Skov-3 ADR 90 Zellen auf Objektträgern angelegt. Diese wurden jeweils mit Ad5/3.MDR1E1 mit MOI 1 infiziert und nach zwei, drei und fünf Tagen in Formalin fixiert. Es wurde dann das virale E1A Gen immunhistochemisch untersucht, um die Virusmenge in Fibroblasten und Skov-3 ADR Zellen vergleichend darzustellen.

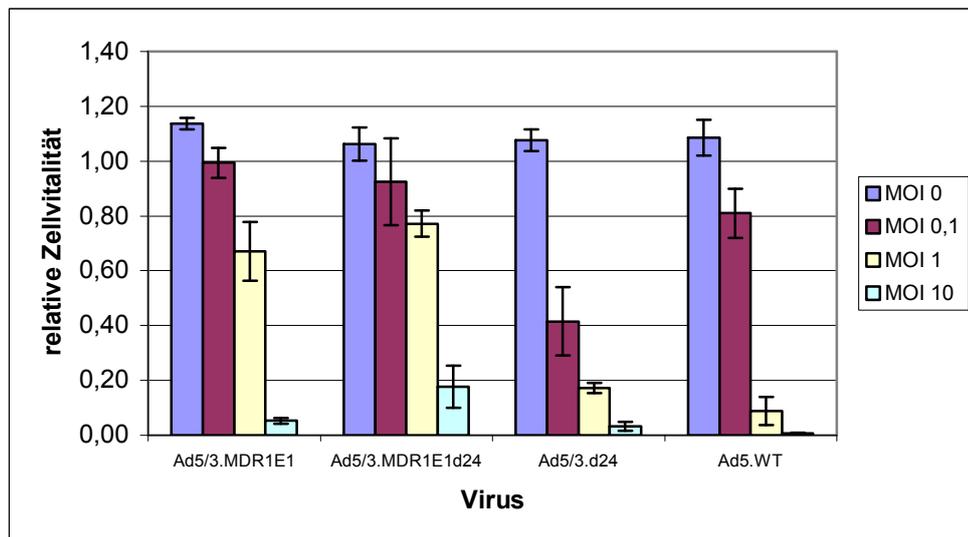
#### **4.3.1 MTS-Assays mit nicht chemoresistenten Ovarialkarzinomzelllinien**

Bei den Versuchen mit nicht chemoresistenten Ovarialkarzinomzelllinien zeigte sich, dass das Virus Ad5/3.Δ24 in den Zelllinien Ov-4, Hey, Skov-3 und Skov-3 i.p. mit MOI 0,1 und MOI 1 eine deutlich höhere onkolytische Potenz besaß als die Viren Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1Δ24 und Ad5.WT (s. Abb. 4.3.1 bis 4.3.3). Nach 11 (Skov-3), 12 (Skov-3 i.p., Hey), 13 (Ov-4) und 14 Tagen (MDAH 2774) konnten bei MOI 0,1 relative Zellvitalitäten von 54,64% (Skov-3), 53,91% (Skov-3 i.p.), 41,56% (Hey), 59,34% (Ov-4) und 56,61% (MDAH 2774) gemessen werden, während nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 bzw. Ad5/3.MDR1E1Δ24 mit MOI 0,1 relative Zellvitalitäten von 73,79% bzw. 76,01% in Skov-3, 99,63% bzw. 94,76% in Skov-3 i.p., 99,39% bzw. 92,51% in Hey, 110,34% bzw. 105,6% in Ov-4 und 96,02% bzw. 105,9% in MDAH 2774 gemessen wurden. Nach Infektion mit dem Virus Ad5/3.Δ24 wurden relative Zellvitalitäten von 27,55% (Skov-3), 14,94% (Skov-3 i.p.), 17,3% (Hey), 8,48% (Ov-4) und 27,51% (MDAH 2774) gemessen. Nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1Δ24 wurden bei MOI 1 relative Zellvitalitäten von 39,59% bzw. 43,15% in Skov-3, 53,23% bzw. 31,73% in Skov-3 i.p., 67,16% bzw. 77,2% in Hey, 71,04% bzw. 54,59% in Ov-4 und 32,73% bzw. 41,82% in MDAH 2774 gemessen. Mit MOI 10 war zwischen den fibermodifizierten Viren kein signifikanter Unterschied in der onkolytischen Potenz messbar. Eine Infektion mit 10 Viruspartikeln pro Zelle war unabhängig vom Promotor und der Modifikation im E1 Gen stark zytotoxisch, über 90% der Zellen überlebten die Infektion nicht. Das Virus Ad5.WT war in Ov-4 und Skov-3 und Skov-3 i.p. Zellen bei MOI 0,1, 1 und 10 kaum zytotoxisch. In MDAH 2774 Zellen konnte aber eine deutlich höhere onkolytische Potenz von Ad5.WT nachgewiesen werden, sie war höher als die der Vergleichsviren Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1Δ24 und Ad5/3.Δ24 (s. Abb. 4.3.2 A). Auch in der Zelllinie Hey (s. Abb. 4.3.1 B) zeigte Ad5.WT eine höhere onkolytische Potenz als Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1Δ24, Ad5/3.Δ24 war jedoch etwas toxischer. Abb. 4.3.4 zeigt den immunhistochemischen Nachweis der p-Glykoprotein-Expression der entsprechenden Zelllinien. Man sieht, dass in den eingesetzten Ovarialkarzinomzelllinien immunhistochemisch keine p-Glykoprotein-Expression nachgewiesen werden konnte (vgl. mit der Positivkontrolle), da sich die Zellmembran nicht braun anfärben ließ.

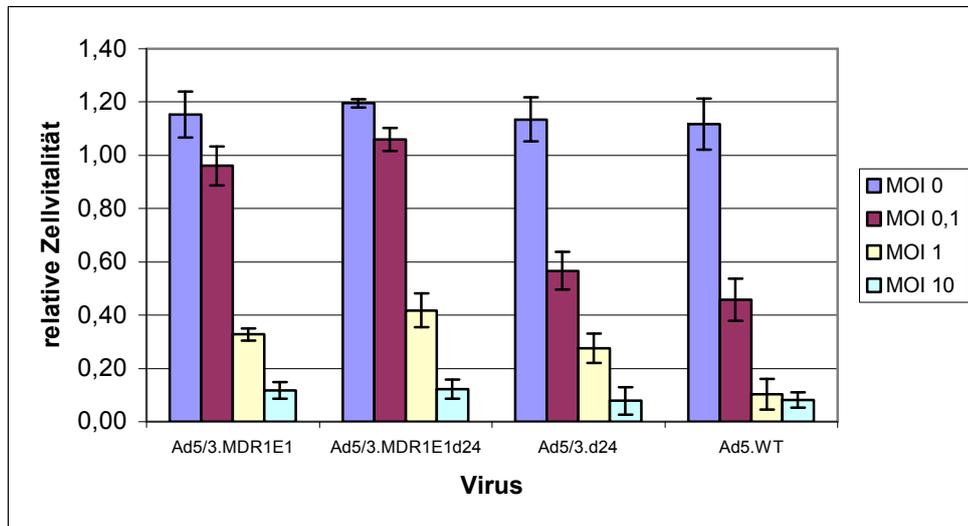
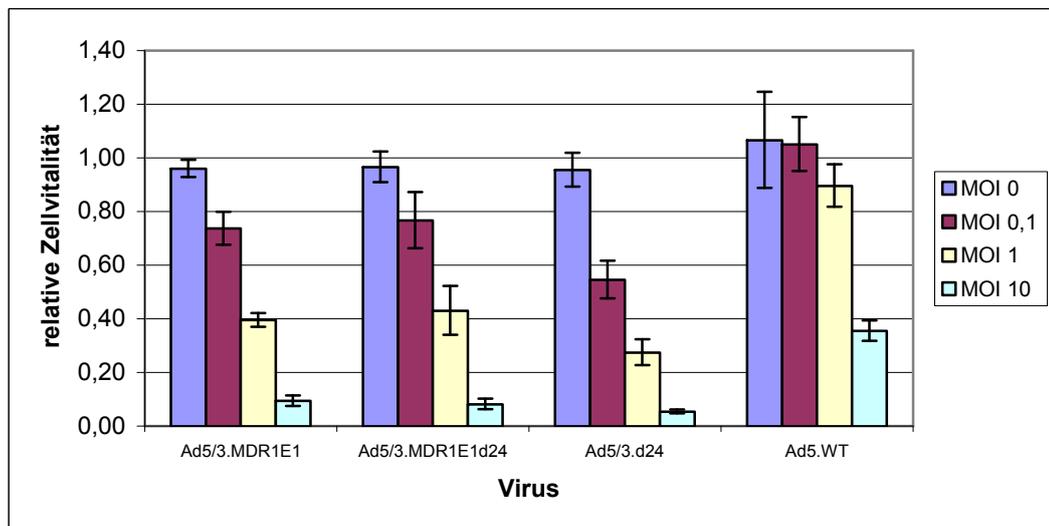
A



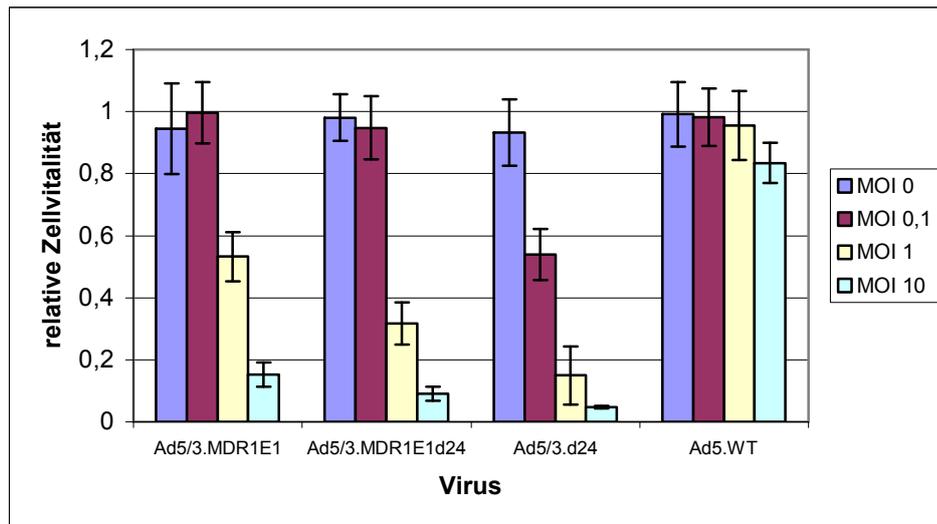
B



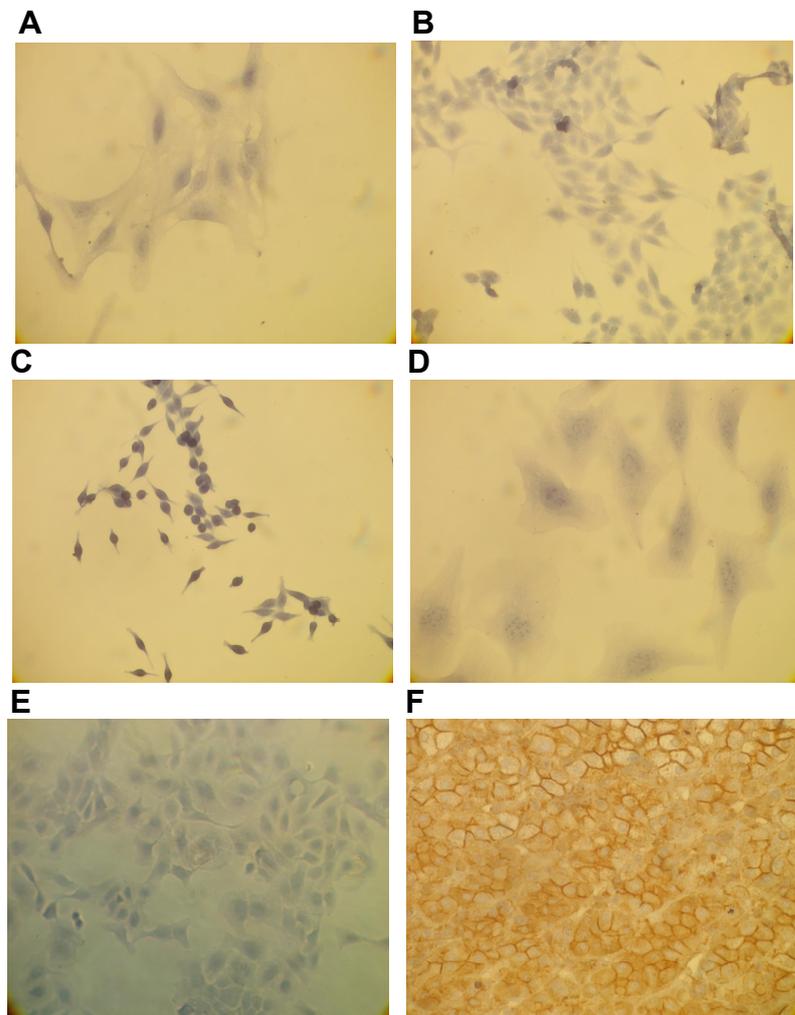
**Abb. 4.3.1: Zellvitalität** nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24, Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT **A:** Zelllinie **Ov-4**, gemessen nach 13d; **B:** Zelllinie **Hey**, gemessen nach 12d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von drei separaten Experimenten.

**A****B**

**Abb. 4.3.2: Zellvitalität** nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24, Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT **A:** Zelllinie **MDAH 2774**, gemessen nach 14d; **B:** Zelllinie **Skov-3**, gemessen nach 11d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von drei separaten Experimenten.



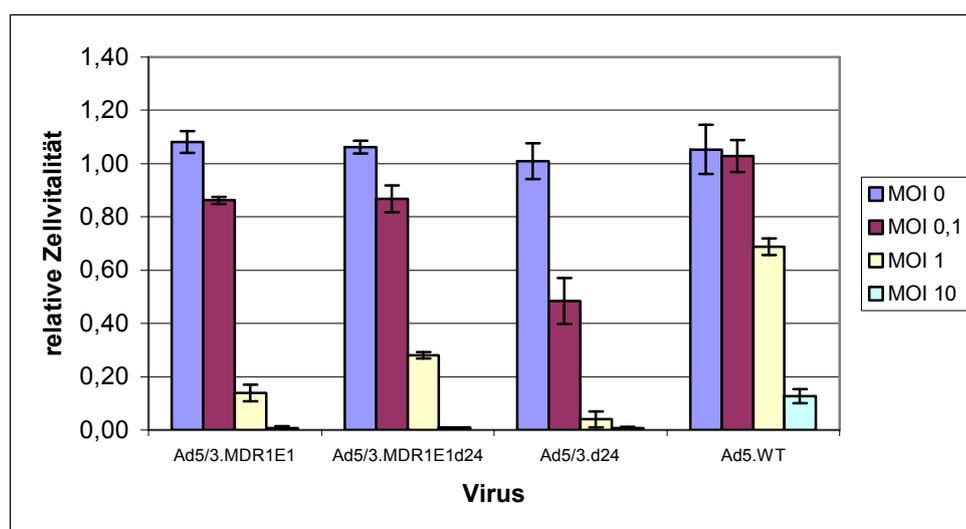
**Abb. 4.3.3: Zellvitalität** nach Infektion der Zelllinie **Skov-3 i.p.** mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24, Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT, gemessen nach 12d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von drei separaten Experimenten.



**Abb. 4.3.4: Immunhistochemische Färbung des p-Glykoproteins in Ovarialkarzinomzelllinien**  
Die Zellen wurden vorher auf Objektträgern fixiert und die Färbung erfolgte durch die Avidin-Biotin-Methode; braune Färbung: Umsetzung des DAB-Chromogens mit Peroxidase zu einem braunen Präzipitat; blaue Färbung: Kernfärbung mit Hämalaun; **A** = Ov-4, **B** = Hey, **C** = MDAH, **D** = Skov-3, **E** = Skov-3 i.p., **F** = Nebennierenrinde, Positivkontrolle; Vergrößerung = 200x, D = 400x

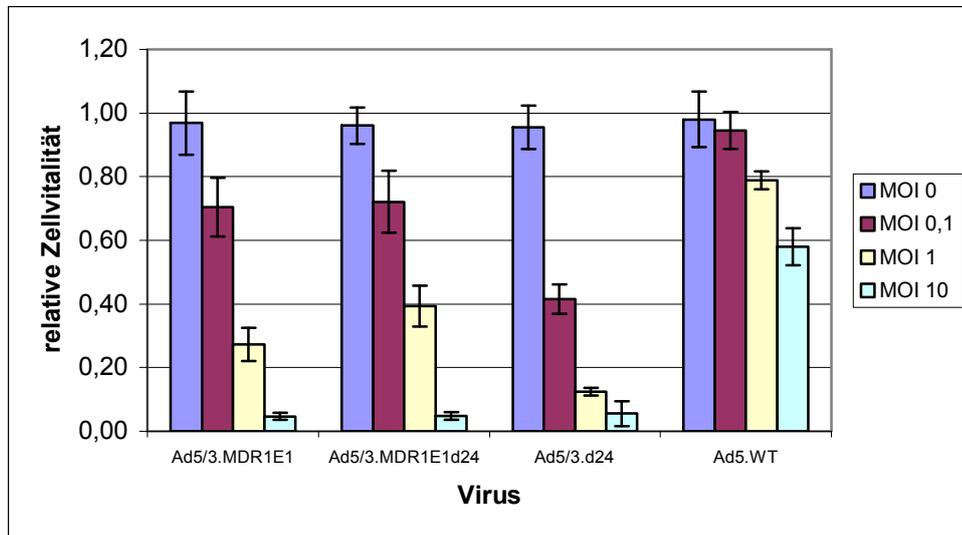
### 4.3.2 MTS-Assays mit Normalgewebe

Bei den Versuchen mit Normalgewebe zeigte das Virus Ad5/3.Δ24 in HMEC, Keratinozyten und der Zelllinie HepG2 die höchste Toxizität, gefolgt von Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1Δ24 (s. Abb. 4.3.5 bis 4.3.7). Nach Infektion mit Ad5/3.Δ24 wurden jeweils nach 9 (HepG2) bzw. 10 Tagen (HMEC, primäre Keratinozyten) bei MOI 0,1 relative Zellvitalitäten von 49% in HepG2, 48,44% in HMEC und 42% in prim. Keratinozyten gemessen, wobei nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 bzw. Ad5/3.MDR1E1Δ24 relative Zellvitalitäten von 71% bzw. 80% (HepG2), 86,24% bzw. 86,81% (HMEC) und 70% bzw. 72% (prim. Keratinozyten) gemessen wurden. In HMEC waren Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1Δ24 auch sehr toxisch bei MOI 1 (s. Abb. 4.3.5), es zeigten sich relative Zellvitalitäten von 14% bzw. 28%. Mit MOI 10 führten die fibermodifizierten Viren bei den Normalzellen, ähnlich wie bei den Versuchen mit Ovarialkarzinomzelllinien, zum Zelltod von über 90% der Zellen. Eine Infektion mit Ad5.WT führte lediglich bei den HMEC und bei HepG2 nach Infektion mit MOI 10 zu einer stärkeren Toxizität (s. Abb. 4.3.5 und 4.3.6 B). Die Fibroblasten bildeten einen Sonderfall, in diesen Zellen war eine Unterscheidung der Toxizität zwischen Ad5/3.Δ24, Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1Δ24 bei allen MOI schwierig (s. Abb. 4.3.7). Ad5/3.MDR1E1 war bei MOI 0,1 etwas toxischer als Ad5/3.MDR1E1Δ24 und Ad5/3.Δ24. Das Virus Ad5.WT zeigte hier kaum Toxizität. Allerdings dauerte es mit 15 Tagen relativ lange, bis die Messungen erfolgen konnten. In Abb. 4.3.8 sind die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises der p-Glykoprotein-Expression der entsprechenden Zellen dargestellt. Man erkennt, dass sich in HMEC, Keratinozyten, Fibroblasten und HepG2 immunhistochemisch keine p-Glykoprotein-Expression nachweisen ließ, denn die Zellmembran konnte nicht braun angefärbt werden (vgl. Positivkontrolle).

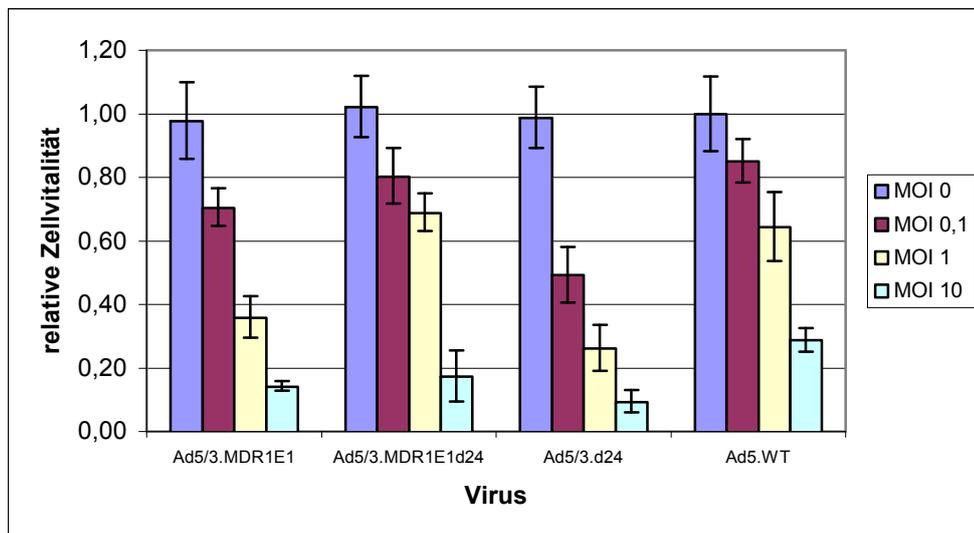


**Abb. 4.3.5: Zellvitalität** nach Infektion von **HMEC** mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1Δ24, Ad5/3.Δ24 und Ad5.WT, gemessen nach 10d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von drei separaten Experimenten.

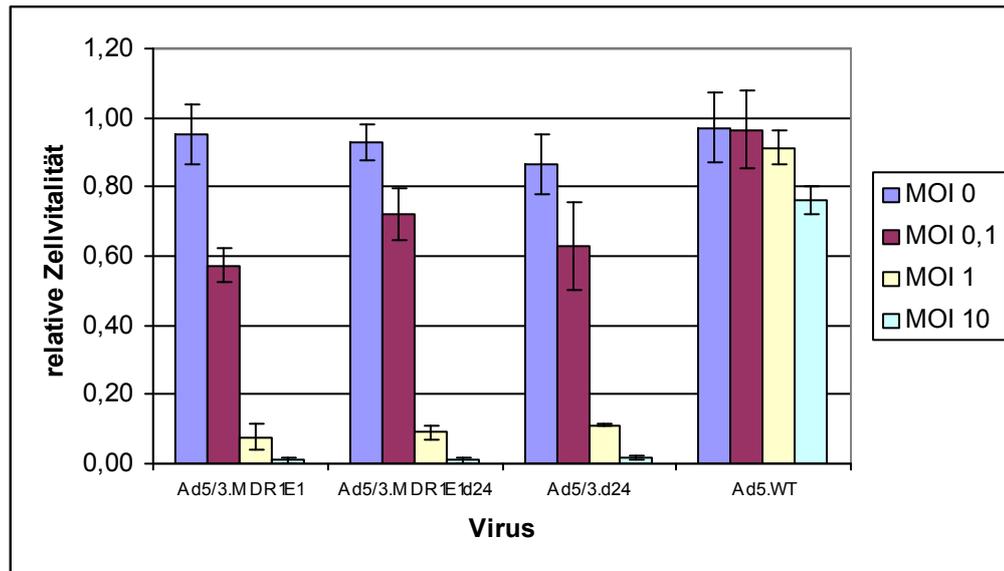
A



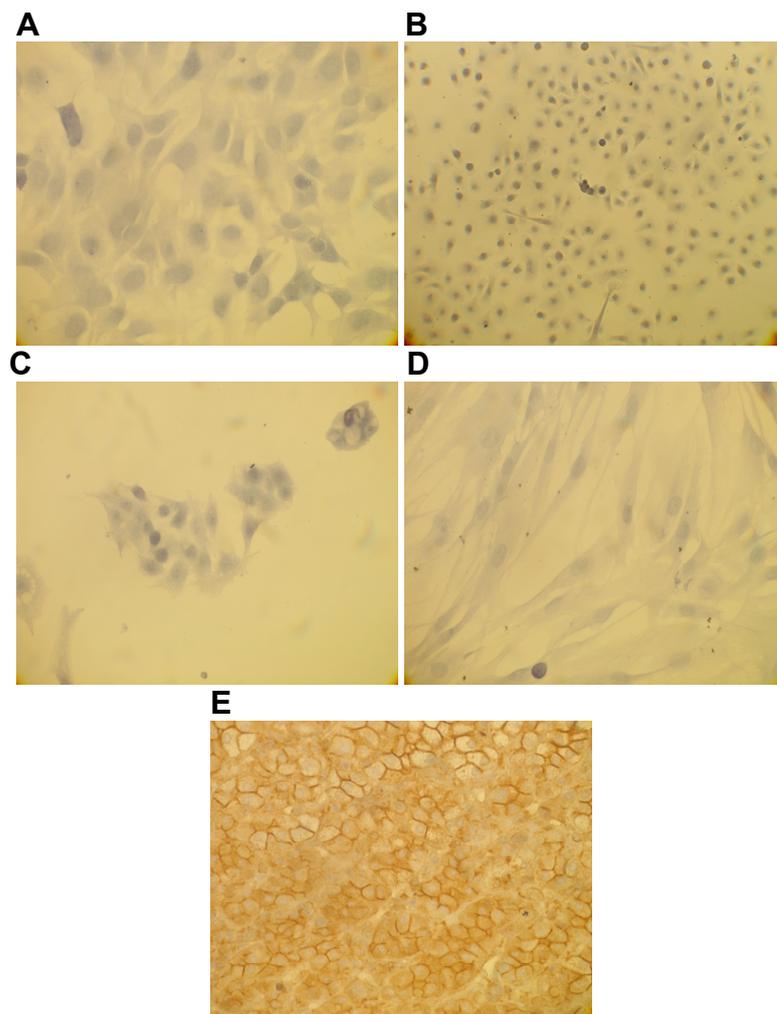
B



**Abb. 4.3.6: Zellvitalität** nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24, Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT **A: primäre Keratinozyten**, gemessen nach 10d; **B: Zelllinie HepG2**, gemessen nach 9d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von zwei separaten Experimenten.



**Abb. 4.3.7: Zellvitalität** nach Infektion von **primären Fibroblasten** mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24, Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT, gemessen nach 15d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von zwei separaten Experimenten.



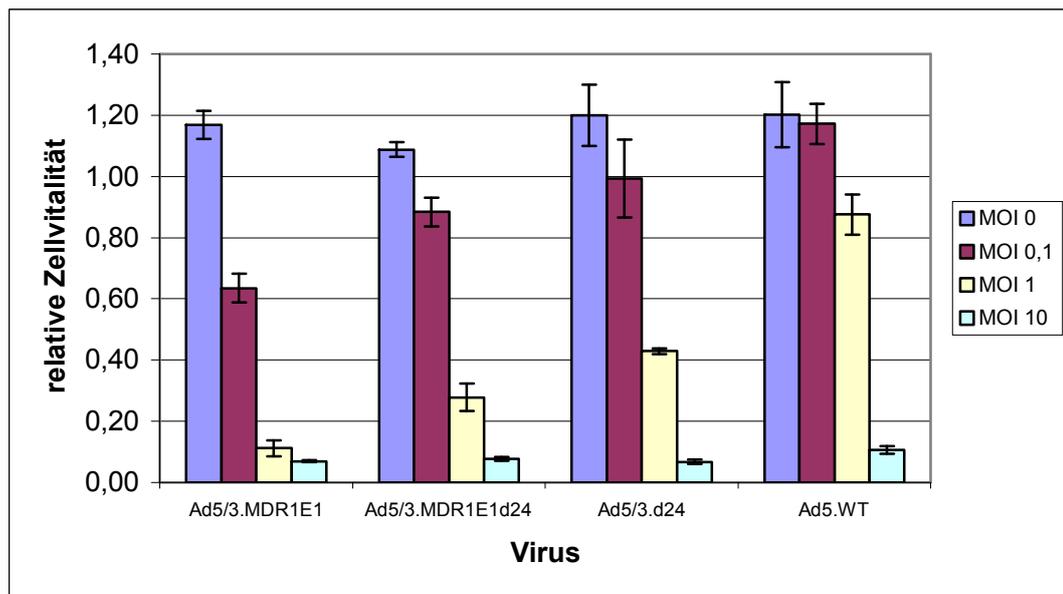
**Abb. 4.3.8: Immunhistochemische Färbung des p-Glykoproteins an Normalzellen** Die Zellen wurden vorher auf Objektträgern fixiert; die Färbung erfolgte durch die Avidin-Biotin-Methode; braune Färbung: Umsetzung des DAB-Chromogens mit Peroxidase zu einem braunen Präzipitat; blaue Färbung: Kernfärbung mit Hämalaun; **A** = HMEC, **B** = primäre Keratinozyten, **C** = HepG2, **D** = primäre Fibroblasten, **E** = Nebennierenrinde, Positivkontrolle, Vergrößerung = 200x.

### 4.3.3 MTS-Assays mit chemoresistenten Karzinomzellen

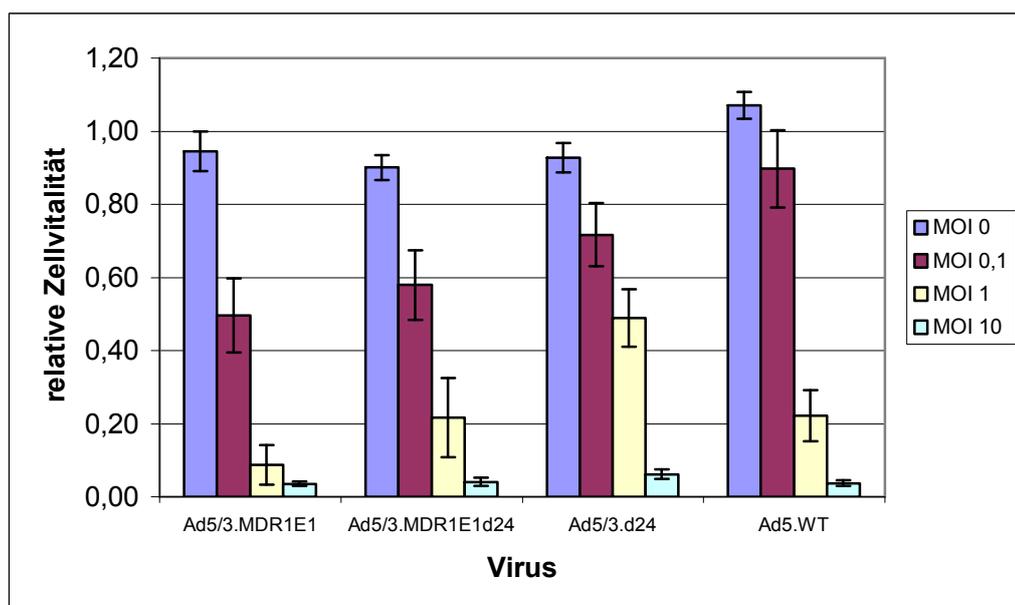
Bei den Experimenten mit chemoresistenten Karzinomzelllinien und primären Karzinomzellen zeigte das Virus Ad5/3.MDR1E1 die höchste onkolytische Potenz, gefolgt von Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 und Ad5/3. $\Delta$ 24 (s. Abb. 4.3.9, 4.3.10). Bereits nach sechs (primäre Ovarialkarzinomzellen, Skov-3 150 ADR Zellen) bzw. sieben Tagen (primäre Mammakarzinomzellen, Skov-3 90 ADR Zellen) zeigten die Zellen nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 mit MOI 0,1 relative Zellvitalitäten von 49,57% (Skov-3 150), 63,52% (Skov-3 90), 52,72% (primäre Mammakarzinomzellen) und 44,67% (primäre Ovarialkarzinomzellen). Ad5.WT zeigte die schwächste onkolytische Potenz. In Skov-3 90 ADR Zellen war ein Unterschied in der onkolytischen Potenz zwischen Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 und Ad5/3. $\Delta$ 24 nur schwer festzustellen (s. Abb. 4.3.9 A). Dieser wurde in Skov-3 150 ADR Zellen deutlicher darstellbar (s. Abb. 4.3.9 B). Mit MOI 0,1 wurden nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 relative Zellvitalitäten von 57,96% gemessen (Skov-3 150), mit MOI 1 21,67% (nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 nur noch 8,81%). Nach Infektion mit Ad5/3. $\Delta$ 24 wurden hingegen relative Zellvitalitäten von 71,67% mit MOI 0,1 gemessen und 48,91% mit MOI 1. In primären Mamma- und Ovarialkarzinomzellen von Patientinnen, die mit mehreren Zytostatikaregimen vorbehandelt worden waren, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (s. Abb. 4.3.10). Ad5/3.MDR1E1 war das Virus mit der stärksten onkolytischen Potenz, gefolgt von Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24. Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT zeigten die schwächste onkolytische Potenz, wobei die Unterschiede der onkolytischen Potenz mit MOI 0,1 und 1 nur etwa 10% relative Zellvitalität ausmachten. Vergleiche besonders mit Abb. 4.3.2 B. Man beachte, dass im Gegensatz zu den Experimenten mit nicht chemoresistenten Karzinomzellen und Normalgewebe bereits nach 6 bis 7 Tagen (s.o.) post infektionem das Virus mit der höchsten onkolytischen Potenz in der kleinsten MOI zum Zelltod von ca. 50% der Zellen führte. Abb. 4.3.11 zeigt den immunhistochemischen Nachweis des p-gp bei Skov-90 ADR Zellen. Man erkennt eine eindeutige braune Färbung der Zellmembran, was eine erhöhte p-Glykoprotein-Expression nachweist. Die Abb. 4.3.12 zeigt ergänzend dazu die Ergebnisse der Expressionsanalyse mittels quantitativer RealTime PCR. Unter den relevanten Genen, die bei der Ausprägung der Multidrugresistance beteiligt sind, wurde eine spezifische Erhöhung der MDR1-Expression in resistenten Skov-3 Zellen festgestellt. Die Expression von MDR1 war unverändert in Resistenzellen. Demnach konnte die ADR-Resistenz auf spezifische Expression des MDR1-Gens zurückgeführt werden. In Abb. 4.3.13 und 4.3.14 sind die Ergebnisse der Chemosensitivitätsassays der primären Mamma- und Ovarialkarzinomzellen dargestellt. Man sieht, dass beim primären Mammakarzinom Zytostatikakonzentrationen von über 100% nötig waren, um eine 50 prozentige Inhibition des Tumorwachstums zu erreichen. Zytostatikakonzentrationen, die zu einer 90 prozentigen Inhibition des Tumorwachstums führten, konnten gar nicht ermittelt werden. Dies spricht für

eine sehr starke Resistenz der eingesetzten primären Mammakarzinomzellen. Bei den primären Ovarialkarzinomzellen mussten über 25 prozentige Zytostatikakonzentrationen eingesetzt werden, um eine 50 prozentige Wachstumshemmung zu erreichen. Für eine 90 prozentige Inhibition des Tumorwachstums waren Zytostatikakonzentrationen von über 100% nötig. Also war auch beim primären Ovarialkarzinom definitionsgemäß eine starke Chemoresistenz vorhanden.

## A

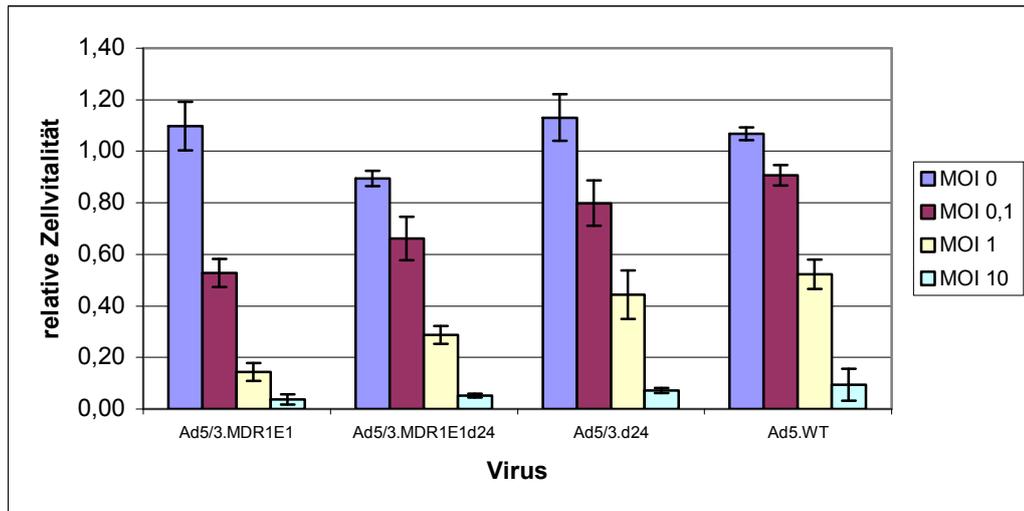


## B

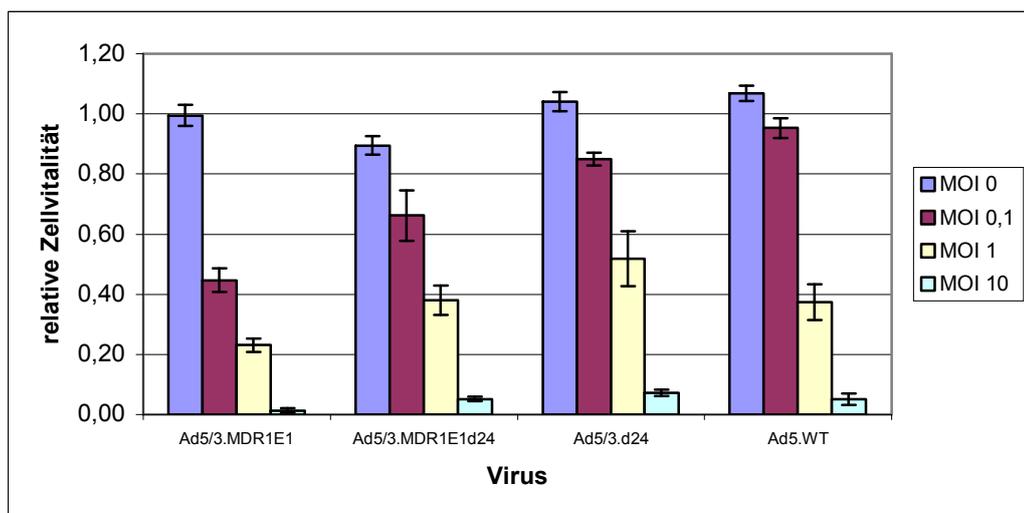


**Abb. 4.3.9: Zellvitalität** nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1Δ24, Ad5/3.Δ24 und Ad5.WT **A: Skov-3 90 ADR Zellen**, gemessen nach 7d; **B: Skov-3 150 ADR Zellen**, gemessen nach 6d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von zwei separaten Experimenten.

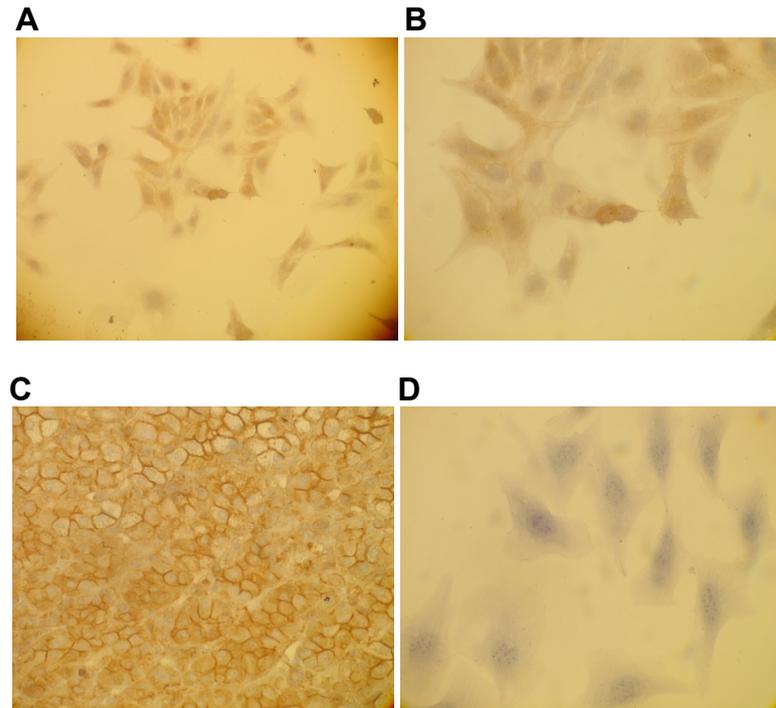
A



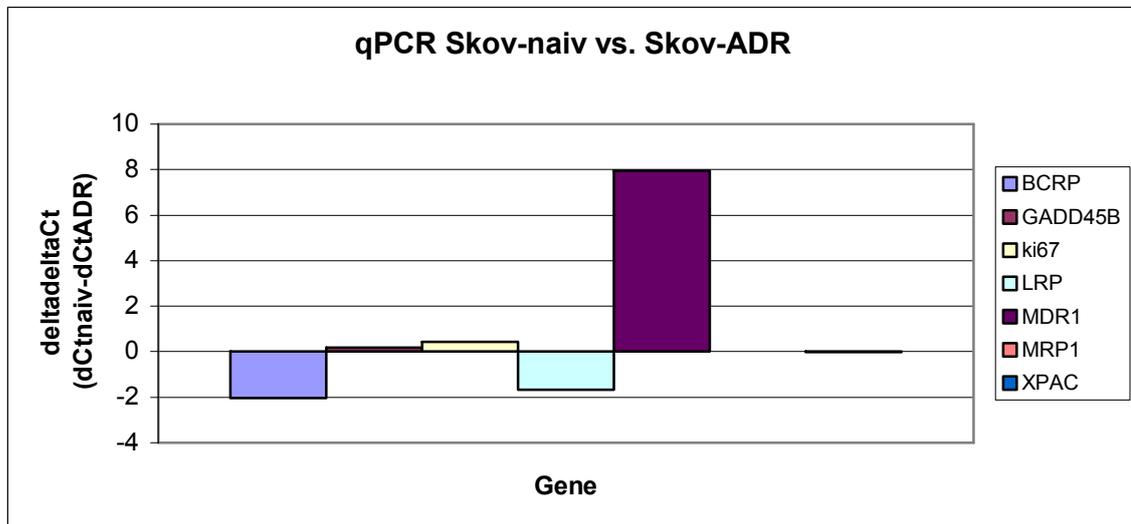
B



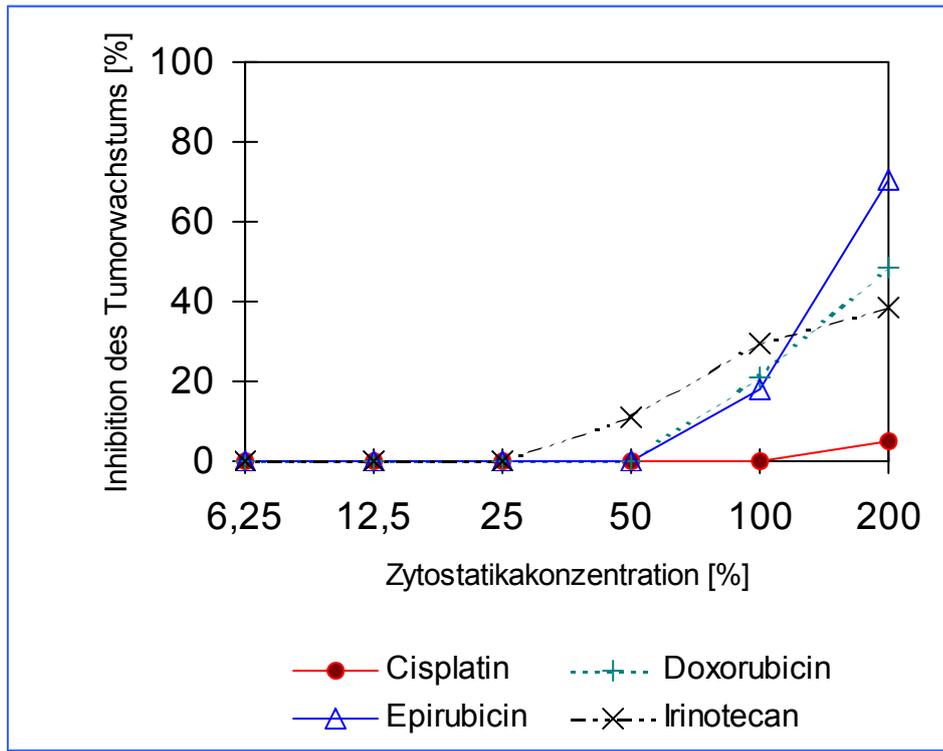
**Abb. 4.3.10: Zellvitalität** nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24, Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT **A: primäre Mammakarzinomzellen**, vorbehandelt u.a. mit Doxorubicin und Cisplatin, gemessen nach 7d; **B: primäre Ovarialkarzinomzellen**, auch vorbehandelt u.a. mit Doxorubicin und Cisplatin, gemessen nach 6d; dargestellt sind die Mittelwerte aus Vierfachbestimmung mit Standardabweichung von zwei separaten Experimenten.



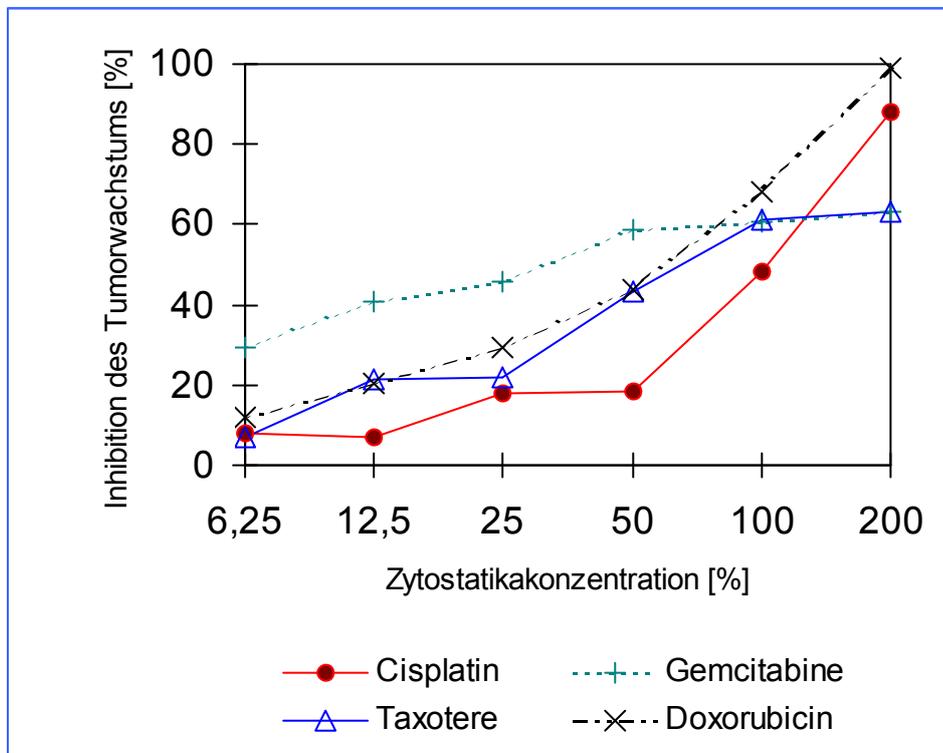
**Abb. 4.3.11: Immunhistochemische Färbung des p-Glykoproteins an Skov-3 90 ADR Zellen** Die Zellen wurden vorher auf Objektträgern fixiert; die Färbung erfolgte durch die Avidin-Biotin-Methode; braune Färbung: Umsetzung des DAB-Chromogens mit Peroxidase zu einem braunen Präzipitat; blaue Färbung: Kernfärbung mit Hämalaun; **A:** Vergrößerung = 200x; **B:** Vergrößerung = 400x; **C:** Nebennierenrinde, Positivkontrolle, Vergrößerung = 200x; **D:** zum Vergleich Skov-3 naiv, Vergrößerung = 400x.



**Abb. 4.3.12: Quantitative RealTime PCR zum Nachweis der MDR1-basierten Resistenz von Skov-ADR 90 Zellen** Diagramm beinhaltet Mittelwerte aus Zweifachbestimmung eines Experiments; Werte von MRP1 und XPAC waren zu gering, um auf dieser Skalierung gut dargestellt zu werden (<0,001).



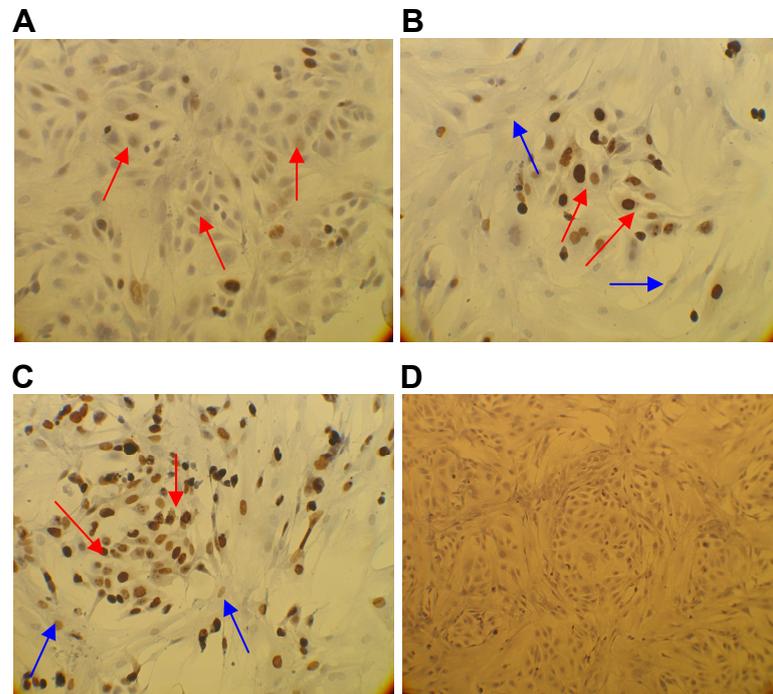
**Abb. 4.3.13: Chemosensitivitätsassay mit primärem Mammakarzinom** Diagramm beinhaltet Mittelwerte aus Dreifachbestimmung eines Experiments.



**Abb. 4.3.14: Chemosensitivitätsassay mit primärem Ovarialkarzinom** Diagramm beinhaltet Mittelwerte aus Dreifachbestimmung eines Experiments.

#### 4.4 Immunhistochemischer Nachweis des viralen E1A Gens in Kokultur

Um die Spezifität der Adenoviren für Tumorzellen zu untersuchen und um eine tumorspezifische Replikation der rekombinanten CRAds (konditional replizierende Adenoviren) nachzuweisen, wurden Kokulturen aus Fibroblasten und Skov-3 Zellen, die in 90 ng/ml ADR inkubiert wurden, auf Objektträgern angelegt. Es wurden insgesamt auf sechs Objektträgern Fibroblasten mit Skov-3 90 ADR Zellen in gleicher Anzahl ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf dem Objektträger mit dem Virus Ad5/3.MDR1E1 mit MOI 1 infiziert. Nach zwei, drei und fünf Tagen (t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub> und t<sub>5</sub>) wurden je zwei Objektträger aus dem Medium entnommen und die Zellen in Formalin fixiert. Anschließend erfolgte der immunhistochemische Nachweis des viralen E1A Gens. Eine braun-schwarze Anfärbung des Zellkerns wurde jeweils als positiv gewertet, da die virale Replikation im Zellkern erfolgt. Eine blaue Kernfärbung wurde als negativ gewertet, da dort keine Virusreplikation erfolgt sein konnte. Je dunkler sich der Zellkern anfärben ließ, desto mehr Viruspartikel waren in den Zellkernen vorhanden. Somit bestand eine Korrelation zwischen der Virusmenge und der intrazellulären Viruskonzentration. In Abb. 4.4 sind die Ergebnisse der Immunhistochemie des viralen E1A Gens für Ad5/3.MDR1E1 dargestellt, wobei von den beiden Objektträgern zum Zeitpunkt t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub> und t<sub>5</sub> je ein repräsentativer Ausschnitt ausgewählt wurde. Beim Vergleich mit der Negativkontrolle fällt auf, dass nach zwei Tagen nur einige wenige Zellkerne angefärbt werden konnten. Die wenigen schwach angefärbten Zellkerne ließen sich auf Grund ihrer Morphologie und des Wachstums in so genannten Zellnestern größtenteils den Skov-3 90 ADR Zellen zuordnen (siehe rote Pfeile in Abb. 4.4 A). Die Fibroblasten, die ein spindelförmiges Zytoplasma besaßen und um die so genannten Zellnester der Skov-3 ADR Zellen herum wuchsen, zeigten kaum eine Zellkernanfärbung. Nach drei Tagen zeigte sich bereits eine deutlichere Kernfärbung der Skov-3 ADR Zellen (siehe rote Pfeile in Abb. 4.4 B). Der Großteil der umgebenden Fibroblasten ließ jedoch nur eine schwache Zellkernfärbung zu (siehe blaue Pfeile in Abb. 4.4 B). Nach fünf Tagen zeigte sich eine starke Kernfärbung der Skov-3 ADR Zellen (siehe rote Pfeile in Abb. 4.4 C) und auch ein Teil der Fibroblasten zeigte bereits eine schwache Färbung (siehe blaue Pfeile in Abb. 4.4 C). Dennoch überwog die Anzahl und Intensität der Kernfärbung der Skov-3 ADR Zellen. Es zeigten sich außerdem bereits erste Lücken im Zellverband. Dies wies auf beginnenden Zelltod der Skov-3 ADR Zellen hin, da durch den Fixiervorgang nicht vitale Zellen durch mangelnde Haftung auf dem Objektträger verloren gingen. Das Virus Ad5/3.MDR1E1 replizierte also in dem Beobachtungszeitraum von fünf Tagen deutlich schneller in den chemoresistenten Skov-3 Zellen, in Fibroblasten fand eine langsamere Replikation statt. Man kann anhand dieser Ergebnisse von einer optimierten tumorselektiven Zellzerstörung sprechen.



**Abb. 4.4: Immunhistochemische Färbung des viralen E1A Gens an Fibroblasten und Skov-3 90 ADR Zellen nach Infektion mit Ad5/3.MDR1E1 mit MOI 1** Die Zellen wurden vorher auf Objektträgern fixiert; die Färbung erfolgte durch die Avidin-Biotin-Methode; braune Färbung: Umsetzung des DAB-Chromogens mit Peroxidase zu einem braunen Präzipitat; blaue Färbung: Kernfärbung mit Hämalaun; **A** = 2 Tage post infectionem (p.i.); **B** = 3 Tage p.i.; **C** = 5 Tage p.i.; **D** = Negativkontrolle, Vergrößerung = 200x; rote Pfeile = Skov-3 Zellen, blaue Pfeile = Fibroblasten.

## 5. Diskussion

Der Einsatz konditional replizierender Adenoviren zur Behandlung chemoresistenter gynäkologischer Tumoren ist ein neuer Ansatz zur selektiven Tumorzellerstörung. Dabei ist die Onkolyse direkte Folge der viralen Replikation. Adenoviren zeichnen sich durch ein großes Wirtszellspektrum, gute Transduktionseffizienz und die Eigenschaft, eine bleibende, stabile Genexpression zu erzeugen aus. Sie können im Gegensatz zu retroviralen Vektoren auch teilungsinaktive Zellen infizieren und die Produktivität der Adenovirusinfektion ist sehr hoch. Ein Problem beim Einsatz von adenoviralen Vektoren stellt allerdings die unterschiedliche CAR-Expression in epithelialeem Gewebe und die niedrige CAR-Expression in Tumorgewebe dar. Dies führt einerseits zur Infektion von Normalgewebe, andererseits zu einer schlechten Transduktion von Tumorgewebe. Eine Möglichkeit, eine CAR-unabhängige Infektion zu erreichen, ist die Modifikation der adenoviralen Fiber durch Einsatz einer 5/3-Fiberchimäre. Um eine spezifische Replikation der Adenoviren in Tumorzellen zu gewährleisten, wird die Integration eines tumorspezifischen Promotors propagiert. Durch systematische Untersuchung von Genexpressionsmustern in Tumoren und normalem Gewebe konnten in den letzten Jahren potentiell geeignete Promotoren für diverse Tumorentitäten gefunden werden. In dieser Arbeit galt das Interesse speziell dem MDR1-Promotor, der verstärkt in chemoresistenten Karzinomzellen exprimiert wird. Außerdem wurde zur weiteren Spezifizierung der viralen Replikation auch eine Modifikation des dem Promotor nachgeschalteten viralen E1 Gens vorgenommen. Die *in vitro* Experimente von Fibermodifikation, tumorspezifischem Promotor, Modifikation im viralen E1 Gen und deren Kombination sollten die Frage der Infektiosität der Adenoviren und der Promotorspezifität beantworten.

### 5.1 Transkriptionales Targeting

Zur Untersuchung eines potentiell geeigneten tumorspezifischen Promotors für die adenovirale Gentherapie wurde der MDR1-Promotor im Luziferase-Reportergenassay untersucht. Es ist durch Studien belegt, dass die MDR1-Promotoraktivität durch Einsatz von Chemotherapeutika, wie z.B. Anthrazyklinen, induzierbar ist (Schondorf, Neumann et al. 2003). Um die Induzierbarkeit des MDR1-Promotors nachzuweisen, eignet sich besonders die Zelllinie Skov-3, da sie bereits eine basale MDR1-Promotoraktivität besitzt. Es wurden relative MDR1-Aktivitäten von ca. 6% (bezogen auf den ubiquitär exprimierten starken CMV-Promotor) in dieser Arbeit gemessen (s. Abb. 4.1.4). Durch Kultivierung von Skov-3 Zellen in Adriamycin (ADR) haltigem Medium konnte die MDR1-Expression induziert werden. So wurde durch schrittweise Erhöhung der Dosis von ADR um jeweils 30 ng/ml bis auf 150 ng/ml in dieser Arbeit die relative MDR1-Promotoraktivität auf 9,8% mit MOI 1 und 11,5% mit

MOI 0,1 gesteigert (s. Abb. 4.1.4). Ziel dieser Arbeit war es, die Plasmakonzentration von Adriamycin bei Patienten in therapeutischer Dosis mit Mittelwerten von ca. 150 bis 200 ng/ml während einer 4-stündigen Infusion (Speth, Linssen et al. 1987) zu simulieren. Zwar können nach i.v. Gabe kurzzeitig Plasma-Peaks von >1000 ng/ml erreicht werden, diese fallen jedoch schnell wieder ab und eine intratumorale, für die adenovirale Replikation relevante Konzentration von etwa 150 ng/ml kann als realitätsnah angenommen werden. Eine stabile, induzierte MDR1-Aktivität von max. 3 Wochen ohne Chemotherapieapplikation kann dabei erzielt werden (Hu, Slater et al. 1999).

Das bedeutet, dass eine ausreichende MDR1-Aktivität für die CRAd-Replikation unter natürlichen Therapiebedingungen mit ADR gegeben ist und die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen mit *in vivo* Verhältnissen verglichen werden können.

Eine durch ADR induzierte erhöhte MDR1-Aktivität ließ sich ebenso in primären Ovarial- sowie Mammakarzinomzellen mittels Luziferase-Reporterassay nachweisen. Es wurden relative Luziferaseaktivitäten von 8,8% mit MOI 0,1 bis 10,8% mit MOI 1 gemessen (s. Abb. 4.1.6). In primären Fibroblasten wurden lediglich relative Luziferaseaktivitäten von 3% mit MOI 1 gemessen (s. Abb. 4.1.5), wobei die relative MDR1-Aktivität mit MOI 0,1 nicht ausgewertet werden kann, da absolute LU von <100 gemessen wurden und diese wegen Hintergrundlumineszenz und Überstrahlung des emittierten Lichts nicht zur Interpretation herangezogen werden konnten.

Die Ergebnisse zur Induzierbarkeit des MDR1-Promotors decken sich mit den Literaturangaben und lassen zusammenfassend auf eine tumorspezifische Expression in chemoresistenten Karzinomzellen schließen. Auf Tumorgewebe allein bezogen trifft dies zu, auch verglichen mit der MDR1-Promotoraktivität in den in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten, die Normalgewebe darstellen sollten. Wenn man aber die Funktion und damit die Expression des p-Glykoproteins (p-gp) im menschlichen Körper berücksichtigt, kann man nur eingeschränkt von einer Spezifität des MDR1-Promotors sprechen. Denn die physiologische Lokalisation des p-gp in Leber, Pankreas, Niere, Nebenniere (siehe auch Positivkontrolle Immunhistologie des p-gp) und Endothelzellen physiologischer Barrieren lässt an eine vermutlich toxische Wirkung der klonierten so genannten MDR-CRAds (CRAd = konditional replikativer Adenovirus) in diesen Geweben denken. Für diese Arbeit standen aber keine Gewebe dieser Art zur Verfügung, so dass experimentell keine Aussage über die Toxizität an diesen Geweben gemacht werden konnte. Da die adenovirale Genterapie additiv zu den bisherigen Therapiemöglichkeiten erfolgen soll und die Viren nicht i.v., sondern intratumoral verabreicht werden sollen, stellt sich außerdem die Frage, in wieweit die Viren in den extratumoral gelegenen Organen kumulieren und dort toxische Wirkungen erzielen können. Um diese Frage zu beantworten, sind *in vivo* Versuche unumgänglich.

## 5.2 Transduktionales Targeting

Zur Untersuchung der Transduktionseffizienz fibermodifizierter Adenoviren verglichen mit dem unmodifizierten Virus wurden Ovarialkarzinomzelllinien, primäre Karzinomzellen und Fibroblasten in Luziferase-Reporterassays eingesetzt. Die Zellen wurden mit Viren infiziert, welche die 5/3-Fiberchimäre besaßen (Ad5/3.CMVLuc) und, um einen Vergleich herstellen zu können, mit Viren, welche die natürliche Adenovirusfiber vom Serotyp 5 besaßen (Ad5.CMVLuc). Bei beiden Virustypen war dem Luziferasegen der ubiquitär exprimierte starke CMV-Promotor vorgeschaltet, so dass die gemessenen Luziferaseaktivitäten in direktem Zusammenhang mit der Transduktionseffizienz standen. Es ist bekannt, dass die so genannte 5/3-Fiberchimäre eine optimierte Transduktion in das Zielgewebe bewirkt (Kanerva, Wang et al. 2002; Volk, Rivera et al. 2003). Durch die Fibermodifikation findet eine CAR-unabhängige Infektion der Zellen statt. Dies ist bei vielen Ovarialkarzinomzellen von Bedeutung, da diese vermehrt den so genannten Ad3 Rezeptor auf der Zellmembran exprimieren und daher eine Infektion dieser Zellen mit der natürlichen Adenovirusfiber vom Serotyp 5 nicht möglich ist. Auch ist bekannt, dass bei Behandlung mit Chemotherapeutika der zelluläre CAR-Rezeptor verstärkt exprimiert wird (Hemminki, Kanerva et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Fibermodifikation eine bessere adenovirale Transduktionseffizienz bewirkt und ob auch nach Behandlung mit Chemotherapeutika, die mit erhöhter CAR-Rezeptorexpression einhergeht, die Transduktionseffizienz in das Zielgewebe durch die 5/3-Fibermodifikation weiterhin besser ist, als durch die natürliche Fiber vom Serotyp 5.

Wie der Abb. 4.2.1 zu entnehmen ist, konnte in Skov-3 Zellen für die Viren mit 5/3-Fiberchimäre eine vierzehn- bis fünfzehnfach höhere Transduktionseffizienz gemessen werden. Diese Ergebnisse sind ähnlich denen in Literaturangaben, wobei die Zahlen je nach Gewebe variieren. In den mit ADR behandelten Skov-3 Zellen fand sich nur noch eine 1,6 bis 1,7fach höhere Transduktionseffizienz, was mit der sehr starken Zunahme der Infektiosität von Ad5.WT in diesen Zellen zusammenhängt. Die in der Literatur beschriebene erhöhte CAR-Rezeptorexpression nach Chemotherapie wurde bestätigt und führte zu einer verbesserten Infektion durch Ad5.WT. Sie war der Grund dafür, dass die Skov-3 ADR Zellen durch fibermodifizierte Adenoviren besser infiziert werden konnten als durch nicht-fibermodifizierte Viren. Die Skov-3 naiven Zellen zeigten jedoch eine erheblich gesteigerte Infektiosität mit Ad5.WT. Bei den primären Mammakarzinomzellen konnte, wie Abb. 4.2.2 zu entnehmen ist, eine signifikant höhere Transduktionseffizienz gemessen werden. Auch diese Ergebnisse sind mit verstärkter CAR-Rezeptorexpression in diesen Zellen zu erklären. Es ist also festzuhalten, dass trotz erhöhter CAR-Expression nach Behandlung mit Chemotherapie die 5/3-Fibermodifikation einen Vorteil hinsichtlich der Infektiosität brachte.

Wie der Abb. 4.2.3 zu entnehmen ist, hat die 5/3-Fiberchimäre auch in Fibroblasten eine signifikante Transduktionsverbesserung zur Folge. Mit MOI 10 und 100 konnten bereits LU von >100 bzw. 1000 gemessen werden, während nach Infektion mit Viren mit Wildtypfiber in entsprechenden MOIs LU <100 gemessen wurden. Mit MOI 1000 erreichten die fibermodifizierten Adenoviren sogar eine 230fach höhere Transduktionseffizienz. Dies passt zu den Literaturangaben, wonach Fibroblasten auf der Zellmembran kaum CAR-Rezeptoren exprimieren (Hidaka, Milano et al. 1999) und folglich weitgehend resistent sind gegen Infektion mit Adenoviren, welche die Fiber vom Serotyp 5 besitzen. Die 5/3-Fiberchimäre verleiht dem Virus also in diesen Geweben einen offensichtlichen Vorteil hinsichtlich der Infektiosität. Verglichen mit den Ergebnissen der Skov-3 Zellen ist die Transduktionseffizienz in Fibroblasten deutlich höher. Der Unterschied erklärt sich durch die relativ höhere CAR-Expressionsrate in Skov-3 Zellen im Vergleich zu Fibroblasten. Eine signifikant stärkere CAR-Expression zeigten die Ovarialkarzinomzelllinien MDAH 2774 und Hey. Die in der Literatur beschriebene verstärkte CAR-Rezeptorexpression dieser Zelllinien (Kim, Lee et al. 2002), besonders der Zelllinie MDAH 2774, konnte in den durchgeführten Luziferase-Reporterassays bestätigt werden. Wie der Abb. 4.2.4 (A) zu entnehmen ist, war das Virus mit der Wildtypfiber etwa 1,4fach infektiöser als das fibermodifizierte. In der Zelllinie Hey (s. Abb. 4.2.4 (B)) zeigten sich nur minimale Unterschiede in der Infektiosität zwischen Ad5 und Ad5/3. Die CAR-Rezeptorexpression war in dieser Zelllinie also auch erhöht, aber nicht so stark wie in MDAH 2774. Deswegen konnte das fibermodifizierte Virus diese Zelllinie nicht wesentlich besser infizieren als Ad5.CMVLuc.

Vor dem Hintergrund, dass die Adenoviren nach intratumoraler Applikation in den Kreislauf gelangen, ist eine Infektion von Leber und anderen lebenswichtigen Organen zu berücksichtigen. Da die Leber das Hauptorgan ist, das Adenoviren aus dem peripheren Blut eliminiert und dadurch auch Organ mit der höchsten Virusaufnahme ist, gilt ihr das größte Interesse im Hinblick auf Toxizität der CRAds. Man weiß, dass die hepatischen Kupfferzellen eine sehr wichtige Rolle in der Viruselimination spielen (Tao, Gao et al. 2001). Erst ab einer Dosis von etwa  $2 \times 10^{10}$  VP tritt eine Sättigung auf und die Viren sind für andere Gewebe infektiös. R. Alemany et al. haben 2000 gezeigt, dass die Halbwertszeit von Adenoviren nach intravenöser Einzelinjektion durch die Arbeit der Kupfferzellen unter 2 Minuten liegt (Alemany, Suzuki et al. 2000). Des Weiteren geht aus Arbeiten von A. Kanerva et al. aus 2002 hervor, dass es keinen Unterschied in der Bluteliminierungsrate zwischen Virus mit Wildtypfiber (Ad5) und Fibermodifikation (Ad5/3) gibt. Was die Lebertoxizität betrifft, konnte sogar beobachtet werden, dass Ad5 in 50% der Fälle eine unspezifische Hepatitis verursachte, Ad5/3 nur in 17% der Fälle. Obwohl in der Leber die höchsten Luziferaseaktivitäten gemessen wurden nach Infektion mit fibermodifizierten Adenoviren, war die Genexpression dieser Viren deutlich geringer im Vergleich mit Ad5. Es fanden sich mehr

als drei Mal so viele Kopien pro ng DNA nach Infektion mit Ad5 in der Leber als mit Ad5/3. Als möglicher Grund werden Unterschiede im Uptake von Kupfferzellen und Hepatozyten diskutiert. Denn Ad5 infiziert Kupfferzellen zwar besser als die Fiberchimäre Ad5/3, diese sind aber kaum zu einer effektiven Genexpression fähig (Wolff, Worgall et al. 1997; Tao, Gao et al. 2001), was allerdings auch bestritten wird (Wheeler, Yamashina et al. 2001). Daraus resultieren mehr DNA-Kopien, aber weniger Genexpression. Dies könnte auch eine Erklärung für die höhere Lebertoxizität von Ad5 sein. Die Arbeiten von A. Kanerva et al. aus 2002 haben auch gezeigt, dass sowohl im Gehirn, als auch in Blutzellen die Genexpression von Ad5 signifikant höher war als von Ad5/3.

Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend eine bessere Infektiosität der 5/3-fibermodifizierten Adenoviren in Ovarialkarzinomzellen, die eine erhöhte Ad3-Rezeptorexpression aufweisen und auch solchen, die mit Chemotherapie behandelt wurden. In Ovarialkarzinomzellen jedoch, die sich durch eine sehr starke CAR-Rezeptorexpression auszeichnen, konnte, je nach CAR-Rezeptorstatus, keine bzw. nur eine minimal bessere Infektiosität nachgewiesen werden. Die Arbeiten von A. Kanerva et al., 2002 und R. Alemany et al., 2000 weisen darauf hin, dass 5/3-fibermodifizierte Adenoviren in lebenswichtigen Organen nicht toxischer sind als Viren, welche die Wildtypfiber besitzen und sich auch in der Bluteliminationsrate kaum von Ad5 unterscheiden. Verglichen damit scheinen die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten nicht repräsentativ zu sein im Hinblick auf Toxizität der 5/3-fibermodifizierten Adenoviren in wichtigem menschlichen Normalgewebe. Die kurze Halbwertszeit im peripheren Blut und die relativ hohe Sättigungsrate der Kupfferzellen lassen darauf schließen, dass die fibermodifizierten Adenoviren nach intratumoraler Applikation in klinischer Anwendung in wichtigen Organen kaum toxischer sind als Viren ohne Fibermodifikation. Auch an dieser Stelle sei wie in 5.1 auf die Notwendigkeit von *in vivo* Experimenten hingewiesen, da erstens Gewebe wie Leber, Blutzellen oder Nervenzellen in Zellkulturen nur sehr schwer zu kultivieren sind, und zweitens die Kinetik von Adenoviren im gesamten Organismus durch *in vitro* Experimente nicht berücksichtigt werden kann.

### **5.3 Kombination von transkriptionalem und transduktionalem Targeting**

Um die Kombination des transkriptionalen mit dem transduktionalen Targeting zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Ovarialkarzinomzelllinien, chemoresistente Ovarialkarzinomzelllinien, primäre chemoresistente Ovarial- sowie Mammakarzinomzellen, primäre Fibroblasten, HMEC und Keratinozyten sowie die Zelllinie HepG2 in Zytotoxizitätsassays eingesetzt. Diese wurden mit eigenständig klonierten Adenoviren infiziert, die sowohl die 5/3-Fiberchimäre als auch den MDR1-Promotor besaßen. Dem MDR1-Promotor war einmal das frühe virale E1 Gen nachgeschaltet, so dass dieses unter direkter Kontrolle der MDR1-Promotoraktivität stand (Ad5/3.MDR1E1). Dadurch sollte bei

erhöhter MDR1-Promotoraktivität in der Zelle das Virus unabhängig vom Zellzyklus der infizierten Wirtszelle replizieren und zum Zelltod selbiger führen. Umgekehrt sollte eine geringe MDR1-Promotoraktivität die Replikation des Adenovirus bremsen. Beim zweiten klonierten Virus wurde dem MDR1-Promotor ein 24-bp-deletiertes E1 Gen nachgeschaltet (Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24), so dass dieses Virus in ruhenden Zellen nicht replizieren kann, sondern nur in proliferierenden Zellen, die ihrerseits einen Rb-Bindedomänedefekt aufweisen. Dadurch sollte neben dem Promotor eine zweite „Sicherung“ eingefügt werden, damit die Adenoviren in proliferierenden Tumorzellen replizieren und nicht in ruhendem Normalgewebe. Als Vergleichsviren wurden Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT in den Zytotoxizitätsassays eingesetzt. Ad5/3. $\Delta$ 24 besaß die 5/3-Fiberchimäre, aber den Wildtyppromotor. Ad5.WT besaß die Wildtypfiber und den Wildtyppromotor. So wurde ein Vergleich des transduktionalen und transkriptionalen Targetings möglich. In den durchgeführten Zytotoxizitätsassays sollte der Frage nachgegangen werden, ob die MDR-CRAbs in Zellen, die eine niedrige MDR1-Promotoraktivität besaßen, auch langsamer replizieren und dadurch diese Zellen weniger schnell lysieren als die Vergleichsviren. Umgekehrt sollten die MDR-CRAbs in Zellen, die eine verstärkte MDR1-Promotoraktivität besaßen, auch schneller replizieren und so schneller zum Zelltod führen als Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5.WT. Die MDR1-Promotoraktivität wurde mittels Immunhistochemie bzw. Chemosensitivitätsassay untersucht. Ergänzend dazu wurde bei der Zelllinie Skov-3 die MDR1-Genexpression mittels qPCR untersucht, um sicherzustellen, dass es sich bei der induzierten Resistenz wirklich um eine MDR1 vermittelte Resistenz handelt. Um die Transduktionseffizienz zu untersuchen, konnten Ad5/3.MDR1E1, Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 und auch Ad5/3. $\Delta$ 24 hinsichtlich ihrer onkolytischen Potenz bzw. Toxizität mit Ad5.WT verglichen werden. Zur Analyse der Spezifität der klonierten Adenoviren für Tumorzellen und zum Nachweis der adenoviralen Replikation wurden Kokulturen auf Objektträgern aus Fibroblasten und Skov-3 Zellen angelegt, die in 90 ng/ml ADR inkubiert wurden, und diese mit MOI 1 mit Ad5/3.MDR1E1 infiziert. Nach zwei, drei und fünf Tagen wurden die Zellen fixiert und das virale E1A Gen immunhistochemisch nachgewiesen. So konnte dargestellt werden, in welchen Zellen wie hohe Virusmengen vorhanden waren.

Die Abb. 4.3.1 bis 4.3.3 zeigen, dass in nicht chemoresistenten Ovarialkarzinomzelllinien die MDR-CRAbs deutlich langsamer replizierten als Ad5/3. $\Delta$ 24. Die Immunhistochemie (s. Abb. 4.3.4) zeigt weiter, dass die eingesetzten Ovarialkarzinomzellen keine nachweisbar verstärkte MDR1-Promotoraktivität besaßen. Die geringe MDR1-Expression der Karzinomzellen führte also erwartungsgemäß zu einer signifikant geringeren onkolytischen Potenz der MDR-Crads. Nach Infektion mit MOI 10 führte die 5/3-Fibermodifikation der Adenoviren bei allen Zelllinien zum Zelltod von über 90% der Zellen, unabhängig vom Promotor. Dies war u.a. Folge der veränderten Transduktionseffizienz, denn Ad5.WT, das

keine Fibermodifikation besaß, war in den Zelllinien Ov-4, Skov-3 und Skov i.p. kaum infektiös. Zudem ist von der Zelllinie Skov-3 bekannt, dass sie schwach CAR exprimiert (Kim, Lee et al. 2002) und daher weitgehend resistent ist gegen Infektion mit Ad5.WT.

Die Zelllinien MDAH 2774 und Hey verhielten sich anders als Ov-4, Skov-3 und Skov i.p. hinsichtlich der Infektion mit Ad5.WT. Von der Zelllinie MDAH 2774 ist bekannt, dass sie eine erhöhte CAR-Rezeptorexpression aufweist (Kim, Lee et al. 2002). Wie in Abb. 4.3.2 A ersichtlich ist, war Ad5.WT das Virus, das die stärkste onkolytische Potenz in dieser Zelllinie besaß. Die erhöhte CAR-Rezeptordichte hatte also eine bessere Transduktion von Ad5.WT mit MOI 0,1 und 1 zur Folge (siehe auch Abb. 4.2.4). Das fibermodifizierte Virus Ad5/3.Δ24 zeigte jedoch eine nur unwesentlich niedrigere Tumorzelllyse. Die Transduktionseffizienz der 5/3-fibermodifizierten Adenoviren ist bei höherer CAR-Expression offensichtlich unverändert. In der Zelllinie Hey zeigte Ad5.WT auch eine starke onkolytische Potenz mit MOI 1 und 10, was ebenfalls durch eine erhöhte CAR-Rezeptorexpression in dieser Zelllinie bedingt ist und dem Wildtypvirus in dieser Zelllinie eine hohe Infektiosität verleiht (siehe auch Abb. 4.2.4). Die CAR-Rezeptorexpression ist nicht so hoch wie in der Zelllinie MDAH 2774, denn Ad5/3.Δ24 führte mit MOI 0,1 schneller zum Zelltod von ca. 50% der Zellen als Ad5.WT. Die MDR-CRAbs hatten hingegen in den Zelllinien MDAH 2774 und Hey die schwächste onkolytische Potenz. Somit zeigt sich eine Korrelation zwischen MDR-Expression und Promotoraktivität in den untersuchten Zellreihen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der onkolytischen Potenz zwischen Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1Δ24 ließ sich bei den eingesetzten Ovariakarzinomzelllinien nicht feststellen. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei diesen Zellen um proliferierende Zellen handelte, und demzufolge die Bremse durch die 24-bp-Deletion im viralen E1 Gen keine Rolle gespielt hat.

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass die MDR-CRAbs in den untersuchten Ovariakarzinomzelllinien, die keine immunhistochemisch nachweisbar erhöhte MDR1-Promotoraktivität besaßen, durch die 5/3-Fiberchimäre eine verbesserte Infektiosität erhielten, durch die Steuerung über den MDR-Promotor jedoch an einer schnellen Replikation gehindert wurden und somit langsamer zum Zelltod führten als das Vergleichsvirus Ad5/3.Δ24, das den Wildtyppromotor besaß.

Die Zytotoxizitätsassays mit den Kontrollzellen (s. Abb. 4.3.5 bis 4.3.7) zeigen, dass auch hier das Virus Ad5/3.Δ24 schneller replizierte als die MDR-CRAbs. Ad5.WT zeigte in allen Zellen die niedrigste Toxizität. Wie der Abb. 4.3.8 zu entnehmen ist, konnte auch bei den Normalzellen immunhistochemisch keine erhöhte MDR1-Promotoraktivität festgestellt werden.

Die humanen Mammaepithelzellen ließen sich mit den fibermodifizierten Adenoviren deutlich besser infizieren als mit Ad5.WT. Dieser Unterschied war mit MOI 10 aber kaum noch zu

erkennen, ca. 90% der Zellen wurden nach Infektion mit Ad5.WT lysiert. Auch mit MOI 1 führte die Infektion mit Ad5.WT zum Zelltod von ca. 30% der Zellen. Dies liegt möglicherweise daran, dass HMEC wie andere Epithelzellen CAR exprimieren (Zhang, Mei et al. 2003) und daher auch sensibel für eine Infektion mit Viren sind, die über den Ad5 Fiberknopf verfügen. Die fibermodifizierten Viren zeigten jedoch die höchste Toxizität. Nach Infektion mit MOI 1 überlebten ca. 20 bis 30% der Zellen. Somit zeigte sich eine niedrigere Toxizität im Vergleich zu Ad5/3.Δ24. Eine Erklärungsmöglichkeit ist zum einen die starke Proliferation der HMEC, zum anderen die, wenn auch immunhistochemisch nicht nachweisbare, geringe MDR1-Promotoraktivität, die HMEC für ihre physiologische Funktion als sekretorische Epithelzellen besitzen (Zhang, Mei et al. 2003). Bei den primären Keratinozyten zeigte sich auch ein Unterschied hinsichtlich der Toxizität mit MOI 1 zwischen den MDR-CRAbs und Ad5/3.Δ24. Dadurch, dass es sich bei Keratinozyten um weniger proliferationsstarke Zellen handelte als bei HMEC, wirkte sich die Bremsfunktion des Promotors offensichtlich deutlicher aus. In der Zelllinie HepG2 war nun zu erkennen, dass die 24-bp-Deletion im E1 Gen erst in noch schwächer proliferierenden Zellen ihre Wirkung entscheidend entfaltete. Denn Ad5/3.MDR1E1 war toxischer als Ad5/3.MDR1E1Δ24, was am deutlichsten nach Infektion mit MOI 1 erkennbar war. Was die Toxizität von Ad5.WT betrifft, war das Virus entsprechend der höheren CAR-Rezeptordichte der Zelllinie HepG2 (Zhang, Mei et al. 2003) mit MOI 1 und 10 auch toxischer als in den primären Keratinozyten. Die Interpretation der MTS-Assays mit primären Fibroblasten ist schwierig. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Toxizität zwischen den MDR-CRAbs und Ad5/3.Δ24 ermittelt werden. Die Promotoraktivität in Fibroblasten schien eine geringe Rolle zu spielen, die erhöhte Infektiosität durch die 5/3-Fiberchimäre führte vermutlich zur toxischen Wirkung. Entsprechend der Ergebnisse aus Abb. 4.2.3 waren die Fibroblasten auch unsensibel für Infektion mit Ad5.WT.

Für die Zytotoxizitätsassays mit Normalzellen lässt sich also zusammenfassend sagen, dass die MDR-CRAbs auch in diesen Zellen durch eine geringe zelluläre MDR1-Promotoraktivität an einer schnellen Replikation gehindert wurden und dadurch deutlich weniger zytotoxisch waren als Ad5/3.Δ24. Die 5/3-Fiberchimäre führte zu einer verbesserten Infektiosität verglichen mit der Wildtypfiber. In relativ replikationsschwachen Zellen konnte der bremsende Einfluss der 24-bp-Deletion im E1 Gen auf die virale Replikation festgestellt werden.

Die Abb. 4.3.9 zeigt, dass die MDR-CRAbs in Skov-3 Zellen, die jeweils mit 90 bzw. 150 ng/ml Adriamycin (ADR) behandelt wurden, deutlich schneller replizierten als die Vergleichsviren Ad5/3.Δ24 und Ad5.WT. Dabei replizierte Ad5/3.MDR1E1 schneller als Ad5/3.MDR1E1Δ24. Abb. 4.1.10 zeigt, dass ähnliche Ergebnisse bei primären

Karzinomzellen erzielt werden konnten. Wie der Abb. 4.3.11 zu entnehmen ist, konnte immunhistologisch eine verstärkte Expression des p-Glykoproteins auf der Zellmembran von Skov-3 90 ADR Zellen nachgewiesen werden, was eine ebenso starke MDR1-Promotoraktivität in diesen Zellen mit sich bringt. Der immunhistologische p-gp-Nachweis für Skov-3 90 ADR Zellen soll auch repräsentativ für Skov-3 150 ADR Zellen gelten, denn diese stammten aus der selben Passage und wurden lediglich in einem nächsten Schritt mit 150 ng/ml ADR behandelt. Die Abb. 4.3.12 zeigt, dass es sich in den Skov-3 90 ADR Zellen um eine MDR1-vermittelte Resistenz handelte. Die sehr starke Chemoresistenz der primären Karzinomzellen veranschaulichen die Abb. 4.3.13 und 4.3.14. Es ist also zu schlussfolgern, dass die induzierte erhöhte MDR1-Promotoraktivität zu einer deutlich schnelleren Replikation der MDR-CRAbs führte verglichen mit Ad5/3. $\Delta$ 24 und Ad5WT. Vergleicht man die Ergebnisse von Skov-3 90 mit denen von Skov-3 150 ADR Zellen, so war der Unterschied hinsichtlich der onkolytischen Potenz zwischen Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 und Ad5/3. $\Delta$ 24 in Skov-3 90 ADR Zellen nicht wesentlich, in Skov-3 150 ADR Zellen aber viel deutlicher. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass es einer gewissen Mindestdosis an ADR bedurfte, damit das Virus infolge der MDR1-Promotorinduktion schneller replizieren konnte als das Virus mit Wildtyppromotor. Die schnellere Onkolyse von Ad5/3.MDR1E1 verglichen mit Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 war offensichtlich Folge der zellzyklusunabhängigen Replikation von Ad5/3.MDR1E1. Denn obwohl es sich bei Skov-3 Zellen um proliferierende Zellen handelte, stellte eine an den Zellzyklus gekoppelte Replikation einen Nachteil dar verglichen mit einer zyklusunabhängigen Replikation. Denn trotz Resistenz von Skov-3 Zellen gegen ADR in dieser Dosis verlief die Zellteilung entsprechend der Wirkung dieses Medikaments langsamer als bei Zellen, die nicht mit ADR kultiviert wurden. In Zellkulturflaschen war dieses Phänomen daran zu erkennen, dass Skov-3 ADR Zellen später konfluent waren als Skov-3 naive Zellen. MDR1-Promotorinduktion und zellzyklusunabhängige Replikation waren also synergistische Effekte, die zur potentesten Onkolyse durch Ad5/3.MDR1E1 führten. Zu beachten ist auch die steigende Toxizität von Ad5.WT. Entsprechend der in der Literatur (s.o.) beschriebenen erhöhten CAR-Rezeptorexpression nach Chemotherapie besaß das Wildtypvirus in Skov-3 150 ADR Zellen und in primären chemoresistenten Mamma- sowie Ovarialkarzinomzellen eine fast ähnliche onkolytische Potenz wie Ad5/3. $\Delta$ 24 (vgl. Abb. 4.3.2). Das in 5.2 diskutierte „*infectivity enhancement*“ schien in Zytotoxizitätsassays mit replikativen Adenoviren also eine geringere Rolle zu spielen. Die in Luziferase-Reporterassays gemessene Infektiositätssteigerung durch die 5/3-Fiberchimäre um das 1,6 bis 2fache (s.o.) konnte offensichtlich nur unwesentlich zu einer effektiveren Onkolyse durch Ad5/3. $\Delta$ 24 verglichen mit Ad5.WT beitragen. Erwähnenswert ist außerdem noch die Zeit, in der das schnellste Virus (Ad5/3.MDR1E1) in MOI 0,1 etwa 50% der Zellen lysierte. Bereits nach sechs bis sieben Tagen konnten die Zytotoxizitätsassays gemessen werden,

das ist etwa die Hälfte der Zeit, die durchschnittlich bei Assays mit den nicht chemoresistenten Zellen gewartet werden musste. Zurückzuführen ist die rasante Virusreplikation wahrscheinlich im überwiegenden Teil auf die starke MDR1-Promotorinduktion. Weiterhin muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass mit steigender Dosis von ADR auch vermehrt Zellmembranschäden hervorgerufen werden, die zusammen mit der Toxizität der Viren und viraler Partikel eher zum Zelltod führen.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die MDR-CRAds in Zellen, die nachgewiesener Weise eine hohe Chemoresistenz besaßen, durch Induktion des MDR1-Promotors eine deutlich bessere onkolytische Potenz zeigten als die Vergleichsviren. Dabei war die zellzyklusunabhängige virale Replikation der zyklusabhängigen überlegen. Die bessere Infektiosität durch die 5/3-Fiberchimäre spielte eine untergeordnete Rolle.

Betrachtet man das Verhalten von Ad5/3.MDR1E1 im Zellverband von Skov-3 Zellen, die mit 90 ng/ml ADR inkubiert wurden, und Fibroblasten, konnte gezeigt werden, dass der MDR-CRAd eine hohe onkolytische Potenz in den chemoresistenten Skov-3 Zellen besaß und eine vergleichsweise geringere Toxizität in den Fibroblasten (s. Abb. 4.4). Durch die MDR1-promotorinduzierte Virusreplikation konnte eine erhöhte Spezifität des MDR-CRAd für chemoresistente Tumorzellen nachgewiesen werden sowie eine schnellere Replikation, die bereits nach fünf Tagen zum Zelltod der meisten Tumorzellen führte.

## 6. Zusammenfassung

Der Einsatz konditional replizierender Adenoviren (CRAds) ist ein neuer Ansatz der Krebsgentherapie zur selektiven Tumorzellzerstörung. Um die Tumorspezifität der Adenoviren zu verbessern und Normalgewebe zu schonen, wird ein gewebe- bzw. tumorspezifischer Promotor in das Virusgenom kloniert. Der MDR1-Promotor (multiple drug resistance gene) erschien geeignet, da das korrespondierende Gen in zytostatikavorgebehandelten Zellen induziert werden kann. Um die Effizienz der viralen Infektion zu verbessern, erfolgte zusätzlich eine Modifikation des adenoviralen Kapsids. Dies geschah durch Ersatz der adenoviralen Fiber-Bindungsregion vom Serotyp 5 durch eine Fiber-Knob-Chimäre vom Adenovirus Serotyp 3. Aufgrund der Erkenntnis, dass in nahezu allen Tumorzellen eine nachweisbare Mutation des Retinoblastom Gens 1 (Rb1) vorliegt, wurde zusätzlich eine 24-Basenpaare umfassende Deletion der Rb-Bindedomäne in die virale E1A Region eingefügt. Diese wird in Tumorzellen komplementiert, so dass das klonierte Virus nur in Zellen mit defektem Rb1-Pathway replizieren konnte.

Der MDR1-Promotor wurde mittels Shuttleplasmiden durch homologe Rekombination in das adenovirale Plasmid pvkF5/3 kloniert. Die onkolytische Potenz der klonierten CRAds Ad5/3.MDR1E1 und Ad5/3.MDR1E1 $\Delta$ 24 wurde in gynäkologischen Tumorzelllinien und primären Tumorzellen, sowie nicht malignen humanen Zellen mittels Zytotoxizitätsassays getestet und die Spezifität immunhistochemisch untersucht. Die MDR1-Expression in chemoresistenten gynäkologischen Zelllinien wurde mittels RT-PCR untersucht, und die Resistenz von mit Chemotherapie vorbehandelten primären gynäkologischen Tumorzellen wurde durch Chemosensitivitätsassays analysiert. Mittels Luziferase-Reporterassays wurden die Induktion des MDR1-Promotors sowie die Transduktionseffizienz der Fiber-Knob-Chimäre untersucht.

In solchen Zellen, die mit ADR inkubiert wurden, zeigte sich eine signifikant erhöhte Aktivität des MDR1-Promotors. In diesen Zellen replizierten die MDR-CRAds schneller als die Vergleichsviren, die den Wildtyppromotor besaßen. In nicht chemoresistenten Zellen hingegen zeigte sich eine langsamere Replikation der MDR-CRAds verglichen mit Wildtyp-Adenoviren. Dabei war die zellzyklusunabhängige virale Replikation der zyklusabhängigen überlegen. Die Fiber-Knob-Chimäre führte zu einer verbesserten Infektiosität verglichen mit der Fiber vom Serotyp 5. Die MDR-CRAds sind also geeignete Kandidaten für eine kombinierte Chemo- und Gentherapie gynäkologischer Malignome.

## 7. Abkürzungen

$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
$\mu\text{m}$	Micrometer
a	Adenin
Ad	Adenovirus
Ad5	Adenovirus des Serotyp 5
Ad3	Adenovirus des Serotyp 3
ADR	Adriamycin (=Doxorubicin)
A.L.F.	Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American type culture collection
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin
ca.	circa
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CMV	immediate early Promotor des Cytomegalovirus
Cox2	Cyclooxygenase 2
CPE	zytopathischer Effekt
CRAd	conditional replikativer Adenovirus
CsCl	Cäsiumchlorid
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
Cy5	Flouresceinmarkierung
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat

DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Extinktion
E1A	adenovirales immediat early E1-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
FCS	fötales Kälberserum
g	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
HSG	Heparansulfatglykosaminoglykan
ITR	inverted terminal repeats
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
Luc	Luziferase
mA	Miliampere
MDR	multiple drug resistance
mg	Miligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MK	Midkine
ml	Milliliter
mM	Milimol
mRNA	messenger RNA
MLSN	Mesothelinpromotor
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-2yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	Plaque forming unit

Pk7	poly-Lysin (7x)
pmol	picomol
RLU	relative Lichteinheit
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-dodecyl-Sulfat
SLPI	secretory leukoprotease inhibitor
t	Thymin
t	Zeit
Taq	Taq-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U	Unit (Enzymaktivität)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VP	Virus Partikel
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 8. Literatur

- Abe, T., Y. Tominaga, et al. (1997). "Bacterial pneumonia causes augmented expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in the murine lung." Am J Respir Crit Care Med **156**(4 Pt 1): 1235-40.
- Aleman, R., K. Suzuki, et al. (2000). "Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2605-9.
- Bauerschmitz, G. J., S. D. Barker, et al. (2002). "Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review)." Int J Oncol **21**(6): 1161-74.
- Blackhall, F. H., C. L. Merry, et al. (2001). "Heparan sulfate proteoglycans and cancer." Br J Cancer **85**(8): 1094-8.
- Breidenbach, M., D. T. Rein, et al. (2005). "Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy." Gene Ther **12**(2): 187-93.
- Breidenbach, M., D. T. Rein, et al. (2002). "Individualized long-term chemotherapy for recurrent ovarian cancer after failing high-dose treatment." Anticancer Drugs **13**(2): 173-6.
- Cohen, C. J., J. T. Shieh, et al. (2001). "The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15191-6.
- Coleman, M. P., G. Gatta, et al. (2003). "EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century." Ann Oncol **14 Suppl 5**: v128-49.
- Cordon-Cardo, C., J. P. O'Brien, et al. (1990). "Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues." J Histochem Cytochem **38**(9): 1277-87.
- Dmitriev, I., V. Krasnykh, et al. (1998). "An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism." J Virol **72**(12): 9706-13.
- Fromm, M. F., H. M. Kauffmann, et al. (2000). "The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters." Am J Pathol **157**(5): 1575-80.

- Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, et al. (2000). "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo." Oncogene **19**(1): 2-12.
- Hemmi, S., R. Geertsen, et al. (1998). "The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures." Hum Gene Ther **9**(16): 2363-73.
- Hemminki, A., N. Belousova, et al. (2001). "An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression." Mol Ther **4**(3): 223-31.
- Hemminki, A., A. Kanerva, et al. (2003). "Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression." Cancer Res **63**(4): 847-53.
- Hidaka, C., E. Milano, et al. (1999). "CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts." J Clin Invest **103**(4): 579-87.
- Hough, C. D., K. R. Cho, et al. (2001). "Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer." Cancer Res **61**(10): 3869-76.
- Hough, C. D., C. A. Sherman-Baust, et al. (2000). "Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer." Cancer Res **60**(22): 6281-7.
- Hu, X. F., A. Slater, et al. (1999). "Induction of MDR1 gene expression by anthracycline analogues in a human drug resistant leukaemia cell line." Br J Cancer **79**(5-6): 831-7.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." CA Cancer J Clin **56**(2): 106-30.
- Johne, A., K. Kopke, et al. (2002). "Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene." Clin Pharmacol Ther **72**(5): 584-94.
- Johnston, S. R. (2004). "Ovarian cancer: review of the National Institute for Clinical Excellence (NICE) guidance recommendations." Cancer Invest **22**(5): 730-42.
- Kanerva, A., G. J. Bauerschmitz, et al. (2004). "A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma." Gene Ther **11**(6): 552-9.

- Kanerva, A., G. V. Mikheeva, et al. (2002). "Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells." Clin Cancer Res **8**(1): 275-80.
- Kanerva, A., M. Wang, et al. (2002). "Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses." Mol Ther **5**(6): 695-704.
- Kim, J. S., S. H. Lee, et al. (2002). "Enhancement of the adenoviral sensitivity of human ovarian cancer cells by transient expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)." Gynecol Oncol **85**(2): 260-5.
- Koizumi, N., K. Kawabata, et al. (2006). "Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, alphav integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity." Hum Gene Ther **17**(3): 264-79.
- Krasnykh, V., I. Dmitriev, et al. (1998). "Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob." J Virol **72**(3): 1844-52.
- Li, Y., R. C. Pong, et al. (1999). "Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy." Cancer Res **59**(2): 325-30.
- McDonald, D., L. Stockwin, et al. (1999). "Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells." Gene Ther **6**(9): 1512-9.
- Miller, M. L. and I. Ojima (2001). "Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents." Chem Rec **1**(3): 195-211.
- Nielsen, L. L. and D. C. Maneval (1998). "P53 tumor suppressor gene therapy for cancer." Cancer Gene Ther **5**(1): 52-63.
- Nooter, K. and H. Herweijer (1991). "Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer." Br J Cancer **63**(5): 663-9.
- Ozols, R. F. (2004). "NICE guidelines for ovarian cancer: recommendations versus standard care." Cancer Invest **22**(5): 815-7.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.

- Pfisterer, J., A. du Bois, et al. (2004). "Docetaxel and carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced gynecological tumors. A phase I/II trial of the Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie (AGO-OVAR) Ovarian Cancer Study Group." Gynecol Oncol **92**(3): 949-56.
- Pfisterer, J., F. Hilpert, et al. (2003). "State-of-the-art first-line treatment of ovarian cancer." Onkologie **26**(5): 446-50.
- Rein, D. T., M. Breidenbach, et al. (2004). "Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses." Int J Cancer **111**(5): 698-704.
- Sanderson, R. D. (2001). "Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis." Semin Cell Dev Biol **12**(2): 89-98.
- Schondorf, T., C. M. Kurbacher, et al. (2002). "Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines." Anticancer Res **22**(4): 2199-203.
- Schondorf, T., R. Neumann, et al. (2003). "Cisplatin, doxorubicin and paclitaxel induce mdr1 gene transcription in ovarian cancer cell lines." Recent Results Cancer Res **161**: 111-6.
- Shriver, Z., D. Liu, et al. (2002). "Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions." Trends Cardiovasc Med **12**(2): 71-7.
- Speth, P. A., P. C. Linssen, et al. (1987). "Cellular and plasma adriamycin concentrations in long-term infusion therapy of leukemia patients." Cancer Chemother Pharmacol **20**(4): 305-10.
- Tao, N., G. P. Gao, et al. (2001). "Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver." Mol Ther **3**(1): 28-35.
- Thigpen, J. T. (2000). "Chemotherapy for advanced ovarian cancer: overview of randomized trials." Semin Oncol **27**(3 Suppl 7): 11-6.
- Volk, A. L., A. A. Rivera, et al. (2003). "Enhanced adenovirus infection of melanoma cells by fiber-modification: incorporation of RGD peptide or Ad5/3 chimerism." Cancer Biol Ther **2**(5): 511-5.
- Wang, H. G., E. Moran, et al. (1995). "E1A promotes association between p300 and pRB in multimeric complexes required for normal biological activity." J Virol **69**(12): 7917-24.

- Webb, H. E. and C. E. Smith (1970). "Viruses in the treatment of cancer." Lancet **1**(7658): 1206-8.
- Westphal, K., A. Weinbrenner, et al. (2000). "Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein." Clin Pharmacol Ther **68**(1): 6-12.
- Westphal, K., A. Weinbrenner, et al. (2000). "Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction." Clin Pharmacol Ther **68**(4): 345-55.
- Wheeler, M. D., S. Yamashina, et al. (2001). "Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB activation and cytokine production." J Leukoc Biol **69**(4): 622-30.
- Wolff, G., S. Worgall, et al. (1997). "Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ." J Virol **71**(1): 624-9.
- Yamaguchi, Y. (2001). "Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis." Semin Cell Dev Biol **12**(2): 99-106.
- Zhang, L. Q., Y. F. Mei, et al. (2003). "Human adenovirus serotypes 4 and 11 show higher binding affinity and infectivity for endothelial and carcinoma cell lines than serotype 5." J Gen Virol **84**(Pt 3): 687-95.

## 9. Anhang

### 9.1 FIGO-Stadien mit TNM-Klassifikation für das Ovarialkarzinom

- I** (=T1) Tumor auf die Ovarien begrenzt
- IA(=T1a)** Tumor auf ein Ovar begrenzt, intakte Kapsel, keine malignen Zellen in der Peritonealspülung / Aszites
  - IB(=T1b)** Tumor auf beide Ovarien begrenzt, intakte Kapsel keine malignen Zellen in der Peritonealspülung / Aszites
  - IC(=T1c)** Tumor auf die Ovarien begrenzt, Kapsel durchbrochen, und/oder maligne Zellen in der Peritonealspülung / Aszites
- II** (=T2) Tumor der Ovarien und Ausbreitung im Becken
- IIA(=T2a)** Ausbreitung auf Tuben oder Uterus
  - IIB(=T2b)** sonstige Ausbreitung im Becken
  - IIC(=T2c)** Ausbreitung im Becken und maligne Zellen in der Peritonealspülung / Aszites
- III** (=T3) Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens od. regionäre LK-Metastasen
- IIIA(=T3a)** mikroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens
  - IIIB(=T3b)** makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens <2 cm
  - IIIC(=T3c o. N1)** makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens >2 cm od. regionäre LK-Metastasen (sakral, paraaortal, paracaval, inguinal)
- IV** (=M1) Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

## 9.2 Promotorsequenzen

### Promotor des multiple drug resistance gene 1 (420bp, Acc.No. X58723)

```
GATCTGATAT CATCGATGAA TTCCTTGCCC TTTCTAGAGA GGTGCAACGG AAGCCAGAAC
ATTCCCTCCTG GAAATTCAAC CTGTTTCGCA GTTTCTCGAG GAATCAGCAT TCAGTCAATC
CGGGCCGGGA GCAGTCATCT GTGGTGAGGC TGATTGGCTG GGCAGGAACA GCGCCGGGGC
GTGGGCTGAG CACAGCCGCT TCGCTCTCTT TGCCACAGGA AGCCTGAGCT CATTTCGAGTA
GCGGCTCTTC CAAGCTCAA GAAGCAGAGG CCGCTGTTCG TTTCCTTTAG GTCTTTCCAC
TAAAGTCGGA GTATCTTCTT CAAAATTTT ACCTCTTGGT GGCCGTCCA AGGAGCGCGA
GGTAGGGGCA CGCAAAGCTG GGAGCTACTG GATCCTCTAG AGTCGACCTG CAGGCATGCA
```

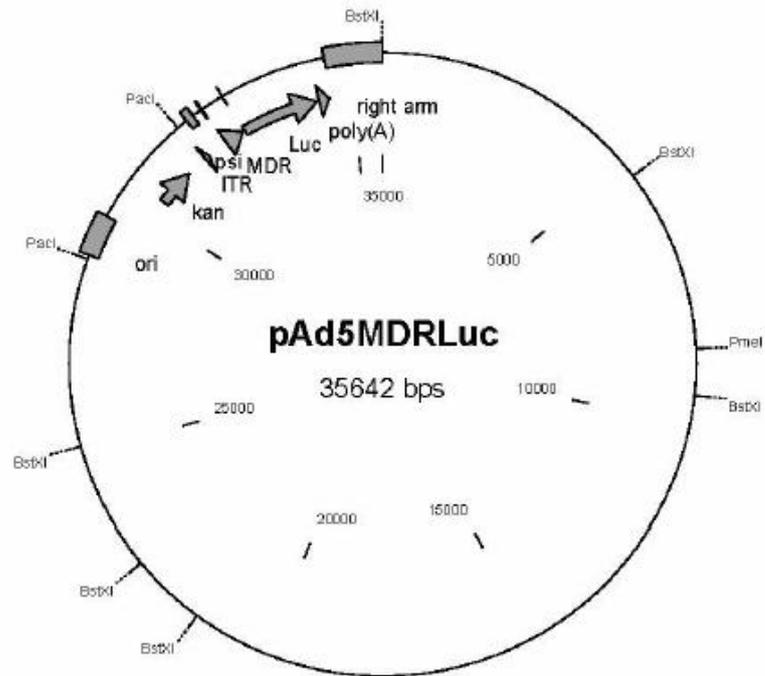
## 9.3 Primersequenzen

5'β-Aktin	5'-aga gat ggc cac ggc tgc tt-3'
3'β-Aktin	5'-att tgc ggt gga cga tgg ag-3'
5'GAPDH-Cy5	5'-cca tgg aga agg ctg ggg-3'*
3'GAPDH	5'-caa agt tgt cat gga tga cc-3'
5'MDR-Prom	5'- cga gct ctt acg cgt gct a-3'
3'MDR-Prom	5'-aaa gcc tga cac ttg gga ac-3'
5'MDR-Expression-Cy5	5'-tca ttc gag tag cgg ctc tt-3'*
3'MDR-Expression	5'-ctt ctt tgc tcc tcc att gc-3'
5'Sequenzierprimer	5'-cga cgt tgt aaa acg acg gcc ag-3'*
3'Sequenzierprimer	5'-cag gaa aca gct atg ac-3'*
5'SeqITR	5'-cgg gaa aac tga ata aga gga agt ga-3'
3'Ad1124-1100	5'- att ttc act tac tgt aga caa aca t-3'
3'MDR-Intron	5'-aaa gcc tga cac ttg gga ac-3'

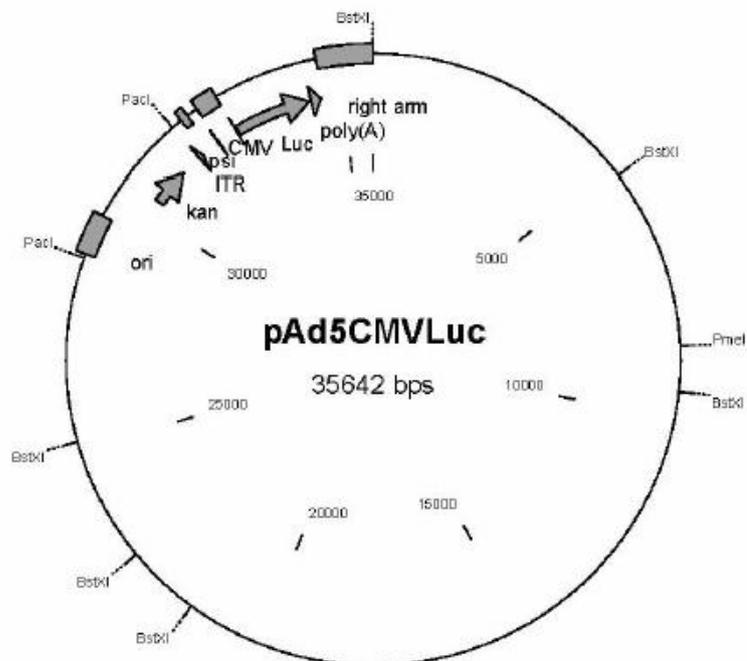
## 9.4 Plasmidkarten



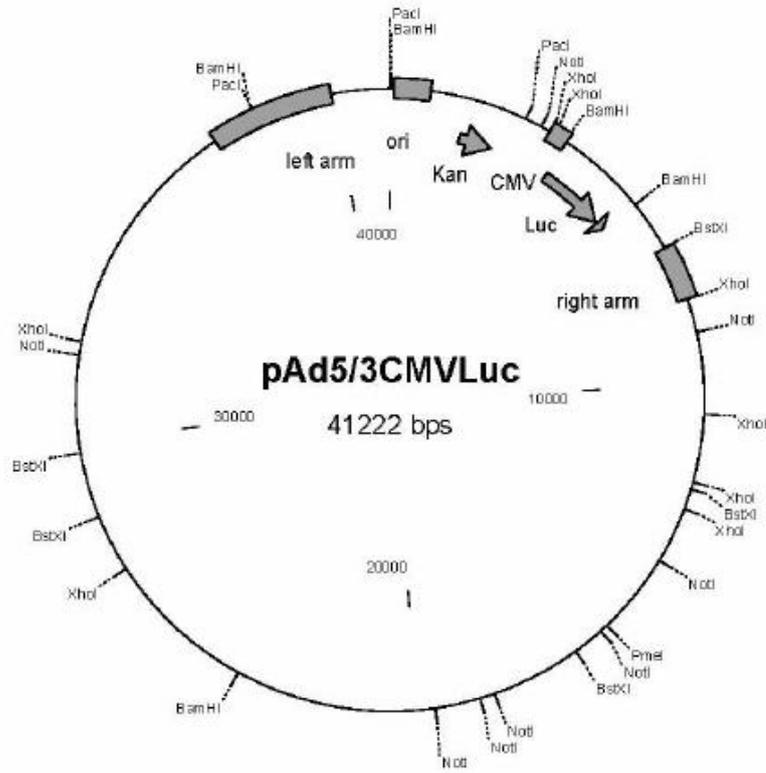
## pAd5MDRLuc



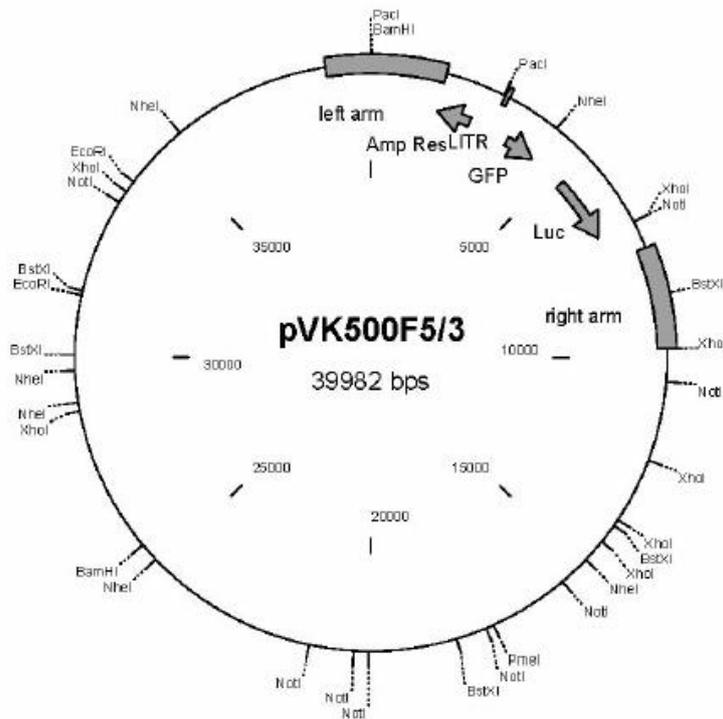
## pAd5CMVLuc



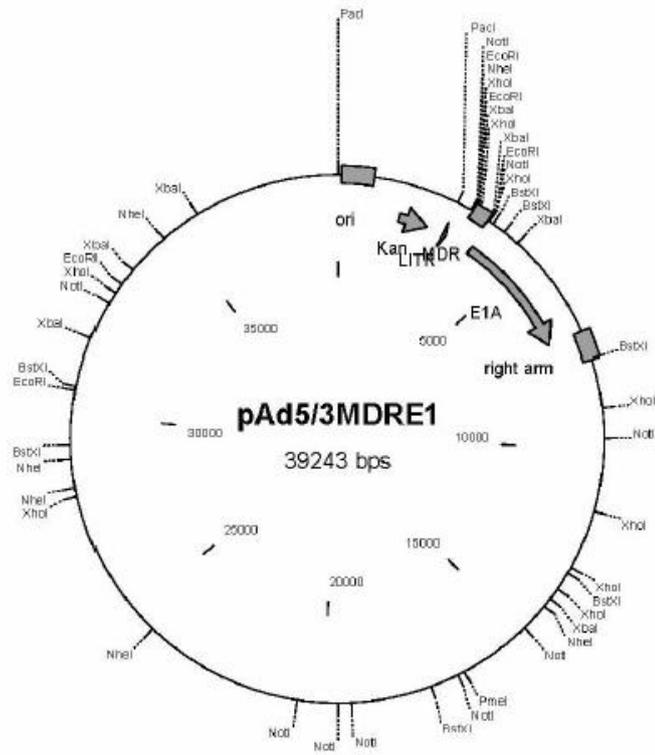
### pAd5/3CMVLuc



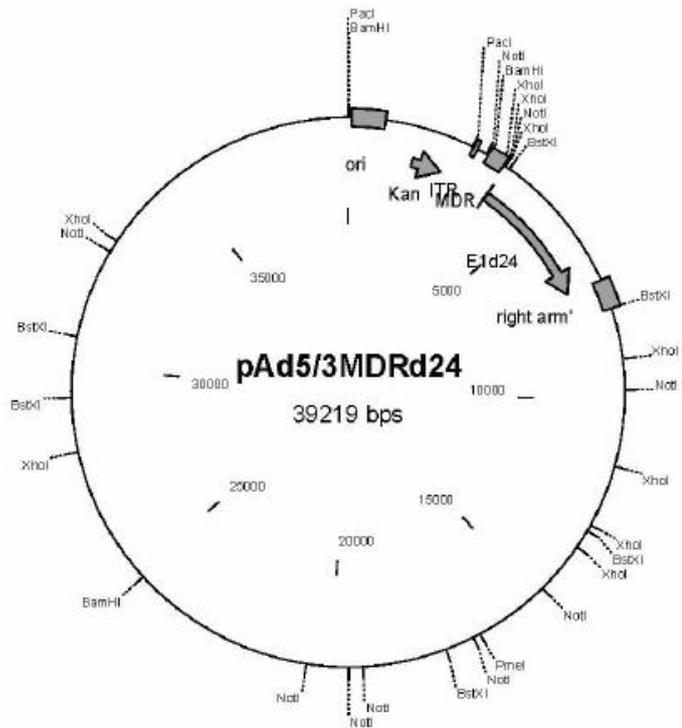
### pVK500F5/3



### pAd5/3MDRE1



### pAd5/3MDR $\Delta$ 24



## 10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. Dall danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn PD Dr. D. Rein danke ich für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit, die fachliche Beratung und kompetenten Hilfestellungen.

Herrn Dr. D. Niederacher danke ich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. B. Prisack, Dr. G. Roeder und der onkologischen Chemie danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Chemosensitivitätsassays und Bereitstellung von Tumormaterial.

Herrn Prof. D. Curiel und Frau Dr. A. Kanerva danke ich für die Bereitstellung der Adenoviren und Plasmide.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Herrmann, die mich während dieser Arbeit super unterstützt und betreut und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Mitarbeitern des molekulargenetischen Labors der Frauenklinik und des BMFZ möchte ich für die gute Zusammenarbeit, das kollegiale Miteinander und die gegenseitige Hilfe danken.

Zum Schluß noch ein Dankeschön an meine Eltern, die mich während meines Studiums und dem Erstellen dieser Arbeit immer unterstützt haben.

## 11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde in dieser vorgelegten oder ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 14.06.2007

Marius Porten

## 12. Lebenslauf

Name:	PORTEN, Marius René Peter
Geboren:	27. Februar 1980 in Düsseldorf
Familienstand:	ledig
1986 bis 1990	evangelische Grundschule 'Friedrich-von-Bodelschwingh' Neuss
1990 bis 1999	Quirinus-Gymnasium Neuss
Juni 1999	Abitur am Quirinus-Gymnasium Neuss
Nov. 1999 bis Aug. 2000	Grundwehrdienst beim Wachbtl. BMVg in Siegburg
Oktober 2000	Beginn Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
Aug./Sept. 2002	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
März 2003	Famulatur in der Kardiologie, Charité Berlin
August 2003	1. Staatsexamen
September 2003	Famulatur in der Allgemein- Viszeral- und Thoraxchirurgie Lukaskrankenhaus Neuss
September 2004	Famulatur in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe Johanna-Etienne-Krankenhaus Neuss
Januar 2004	Beginn der Promotionsarbeit im molekulargenetischen Labor der Frauenklinik, Universität Düsseldorf
Aug./Sept. 2005	2. Staatsexamen
Okt. 2005 bis Sept. 2006	Praktisches Jahr im Lukaskrankenhaus Neuss und Regionalkrankenhaus Bozen/Italien
November 2006	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt
Seit Januar 2007	Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik Krankenhaus Maria-Hilf, Krefeld