

Aus dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von  
Dr. rer. nat. Martina Anton

Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf)

**Charakterisierung adenoviraler Vektoren zur regulierten Expression der BS-RNase**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Bianca Wirth  
aus  
Coburg

München, 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Wolf  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Neubauer-Juric

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meiner Mutter gewidmet

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Gentherapie</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Prinzip .....	3
2.1.2	Vektoren .....	4
2.1.2.1	Nicht-virale Vektoren .....	4
2.1.2.2	Virale Vektoren .....	4
2.1.3	Indikationen. ....	5
2.1.3.1	Krebserkrankungen .....	5
2.1.3.2	Monogene Erbkrankheiten .....	6
2.1.3.3	Kardiovaskuläre Erkrankungen .....	6
2.1.4	Klinische Anwendungen .....	6
<b>2.2</b>	<b>BS-RNase</b> .....	<b>7</b>
2.2.1	Herkunft und biologische Aktivitäten .....	7
2.2.2	Struktur und intrazellulärer Weg .....	9
2.2.3	Therapieansätze .....	10
<b>2.3</b>	<b>Adenoviren</b> .....	<b>10</b>
2.3.1	Einteilung, Aufbau und Lebenszyklus .....	10
2.3.2	Adenovirale Vektoren für den Gentransfer .....	12
2.3.3	Anwendungen .....	14
<b>2.4</b>	<b>Reportergene</b> .....	<b>15</b>
2.4.1	Luciferase .....	16
<b>2.5</b>	<b>Tet-System</b> .....	<b>16</b>
2.5.1	Tet-Off- und Tet-On-System .....	16
2.5.2	Kombination von Tet-System und adenoviralen Vektoren .....	17
2.5.3	Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionaler Dämpfer .....	18

2.5.4	Kombination von adenoviral vermittelten Tet-On-System und BS-RNase als Zielgen .....	19
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellbiologische Materialien und Methoden .....</b>	<b>21</b>
4.1.1	Verwendete Zelllinien .....	21
4.1.2	Methoden der Zellkultur .....	22
4.1.2.1	Medium und Zusätze .....	22
4.1.2.2	Zellkulturbedingungen .....	22
4.1.2.3	Zellpassage .....	23
4.1.2.4	Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer .....	23
4.1.2.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	23
<b>4.2</b>	<b>Adenovirale Materialien und Methoden .....</b>	<b>24</b>
4.2.1	Verwendete adenovirale Vektoren .....	24
4.2.2	Lösungen und Zusätze .....	26
4.2.3	Herstellung eines Adenovirus Crude Stock .....	27
4.2.4	Adenovirus Titration .....	27
4.2.5	Cäsiumchlorid-Aufreinigung von Adenoviren .....	28
4.2.6	Infektion .....	29
<b>4.3</b>	<b>Infizierbarkeit der Zelllinien mit adenoviralen Vektoren .....</b>	<b>29</b>
4.3.1	Prinzip .....	29
4.3.2	Fluoreszenzmikroskopie und Fotodokumentation .....	30
4.3.3	Durchflusszytometrie .....	30
<b>4.4</b>	<b>Sensitivität der Zelllinien gegenüber gereinigter BS-RNase .....</b>	<b>31</b>
4.4.1	Prinzip .....	31
4.4.2	XTT-Assay .....	31
<b>4.5</b>	<b>Optimale Ratio zwischen dem Transaktivatorvirus und dem Responsevirus .....</b>	<b>32</b>
4.5.1	Prinzip .....	32

4.5.2	Luciferase-Assay .....	33
4.5.2.1	Lösungen und Puffer .....	33
4.5.2.2	Luciferase-Assay .....	33
4.5.3	BCA Protein-Assay .....	33
<b>4.6</b>	<b>Adenoviral induzierte BS-RNase-Produktion und Abtöten der Zellen .....</b>	<b>34</b>
4.6.1	Prinzip .....	34
4.6.2	XTT-Assay .....	35
4.6.3	Western Blot-Analyse .....	36
4.6.3.1	Reagenzien, Puffer und Antikörper .....	36
4.6.3.2	Dot Blots .....	37
4.6.3.3	Western Blot-Analyse .....	37
<b>4.7</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Infizierbarkeit der Zelllinien mit adenoviralen Vektoren .....</b>	<b>39</b>
5.1.1	Vorbereitung der Zelllinien .....	39
5.1.2	Fotodokumentation .....	39
5.1.3	Ergebnisse der Durchflusszytometrie .....	43
5.1.4	Vergleich der Zelllinien .....	46
<b>5.2</b>	<b>Sensitivität der Zelllinien gegenüber gereinigter BS-RNase .....</b>	<b>47</b>
5.2.1	Vorbereitung der Zellen .....	47
5.2.2	Sensitivität von A431-Zellen .....	48
5.2.3	Sensitivität von HeLa-Zellen .....	49
5.2.4	Sensitivität von CMS-5-Zellen .....	50
5.2.5	Sensitivität von Hs68-Zellen .....	51
5.2.6	Sensitivität von NIH/3T3-Zellen .....	52
5.2.7	Vergleich der Zelllinien .....	52
<b>5.3</b>	<b>Optimale Ratio zwischen dem Transaktivatorvirus und dem Responsevirus .....</b>	<b>54</b>
5.3.1	Vorbereitung der Zellen .....	54

5.3.2	Optimale Ratio für A431-Zellen .....	55
5.3.3	Optimale Ratio für HeLa-Zellen .....	57
5.3.4	Optimale Ratio für CMS-5-Zellen .....	60
5.3.5	Optimale Ratio für Hs68-Zellen .....	62
5.3.6	Gemeinsame optimale Ratio .....	64
<b>5.4</b>	<b>Adenoviral induzierte BS-RNase-Produktion der infizierten Zellen .....</b>	<b>64</b>
5.4.1	Optimale Antikörper-Konzentration .....	64
5.4.2	Vorbereitung der Zellen .....	65
5.4.3	BS-RNase-Produktion und -Sekernierung von HeLa-Zellen .....	66
5.4.4	BS-RNase-Produktion und -Sekernierung von CMS-5-Zellen .....	67
<b>5.5</b>	<b>Abtöten der Zellen durch die gebildete BS-RNase .....</b>	<b>69</b>
5.5.1	Absterben von HeLa-Zellen .....	69
5.5.2	Absterben von CMS-5-Zellen .....	72
5.5.3	Vergleich der Zelllinien .....	75
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>6.1</b>	<b>Diskussion der erzielten Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
<b>6.2</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>88</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>12</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>100</b>

## **1 EINLEITUNG**

Krebserkrankungen stellen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar.

Insgesamt werden unter Krebs alle bösartigen Neubildungen einschließlich der primär systemischen Lymphome und Leukämien verstanden. Nicht berücksichtigt werden laut internationalen Gepflogenheiten Hautkrebs (Ausnahme: Malignes Melanom der Haut) und nicht bösartige Neubildungen der Harnblase.

Laut den Daten der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID: „Krebs in Deutschland- Häufigkeiten und Trends“ 2006, in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)) spielen bei Männern v.a. Tumoren der Lunge, des Darms und der Prostata, bei den Frauen hingegen Tumoren der Brustdrüse, des Darms und der Lunge die wichtigsten Rollen (Sterbefälle 2002).

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 218250 Männer und 206000 Frauen neu an Krebs.

Die Therapieansätze zur Bekämpfung dieser Erkrankungen sind vielfältig und natürlich stark von der Pathologie und Lokalisation des jeweiligen Tumors, dem Stadium der Erkrankung und dem Allgemeinzustand des Patienten abhängig. Man unterscheidet generell die kurative (heilende) Therapie und die palliative Therapie, die auf die Linderung von Symptomen, Schmerzen und Funktionseinschränkungen gerichtet ist.

Die Frühstadien vieler Tumoren sind durch eine vollständige operative Entfernung heilbar. Häufig wird eine Operation aber auch mit anderen Behandlungsmethoden wie Chemotherapie oder Bestrahlung kombiniert.

Die systemisch wirkende Chemotherapie mit Zytostatika wird v.a. bei fortgeschrittenen, inoperablen Tumorstadien oder zur Vermeidung bzw. Therapie von Metastasen eingesetzt. Ihre Wirkung auf sich schnell teilende Zellen verursacht allerdings auch eine Reihe von Nebenwirkungen. So werden auch die Zellen der Schleimhäute, der Haarwurzeln und des Knochenmarks geschädigt.

Die Strahlentherapie bzw. Radiotherapie ist dagegen eine lokale Maßnahme, die ihre Wirkung nur innerhalb des Bestrahlungsfeldes entfaltet. Die elektromagnetischen oder Teilchenstrahlen schädigen das Erbgut der Tumorzelle und bringen diese dadurch zum Absterben. Gesunde Zellen besitzen eine gewisse Regenerationsfähigkeit ihrer DNS, die Tumorzellen i.d.R. fehlt. Möglich ist auch die Kombination von Radio- oder Chemotherapie mit Hyperthermie, wobei durch die kontrollierte Temperaturerhöhung die Wirkung dieser Methoden verstärkt werden soll.

Trotz vielfältiger Therapiekonzepte bleiben bestimmte Tumorerkrankungen weiterhin unheilbar, was eine große Bandbreite von verschiedenen Forschungsansätzen und Studien bedingt.

Einen weiteren innovativen Ansatz zur Behandlung von Tumoren stellt die Gentherapie dar. Mit Hilfe von Vektoren soll ein bestimmtes Gen oder Genfragment in die Tumorzellen eingebracht werden, dessen Produkt das weitere Wachstum verhindert oder die Zellen gezielt abtötet. Auf diesem Gebiet gibt es viele unterschiedliche Studien.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von adenoviralen Vektoren das Gen der zytotoxischen BS-RNase in Tumorzellen einzubringen, um diese nach Expression des Genprodukts gezielt abzutöten. Hierzu wurde zur Regulation der Genexpression das Tet-On-System verwendet, das die Produktion der BS-RNase kontrollieren sollte. Untersucht wurde dieses System *in vitro* anhand von unterschiedlichen Zelllinien, um die tatsächliche Produktion der BS-RNase und das dadurch erreichte Absterben der Zellen zu evaluieren und hierdurch die Grundlage für eine *in vivo*-Studie zu schaffen.

Ein kontrollierbares System von adenoviralen Vektoren und einem zytotoxisch wirksamen Protein wie der BS-RNase, das gezielt Tumorzellen abtöten kann und dabei so wenig unerwünschte Nebenwirkungen wie möglich bewirkt, wäre eine Bereicherung für die Palette der Therapiemöglichkeiten bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen.

## **2 SCHRIFFTUM**

### **2.1 Gentherapie**

#### **2.1.1. Prinzip**

Das Konzept der Gentherapie beinhaltet den Transfer von genetischem Material in eine Zelle, ein Gewebe oder ein ganzes Organ, mit dem Ziel, eine Krankheit zu heilen oder zumindest den klinischen Status des Patienten zu verbessern (VERMA und WEITZMANN 2005). Es verspricht neue Behandlungsmethoden für eine große Zahl von vererblichen und erworbenen Erkrankungen.

Das Ziel ist, eine definierte Gensequenz in eine spezifische Zelle des Patienten zu bringen, um entweder ein defektes Gen zu ersetzen oder um der Zelle eine neue Funktion (z.B. Sekretion eines therapeutisch wirkenden Proteins) hinzuzufügen (EDELSTEIN et al. 2004).

Ursprünglich sollte die Gentherapie nur bei monogenen Erbkrankheiten Verwendung finden, aber mittlerweile hat sich gezeigt, dass sie auch bei komplexeren Erkrankungen, wie z.B. Krebs, effektiv eingesetzt werden kann (RELPH et al. 2005).

Eine Schlüsselrolle spielt die Entwicklung von Systemen, die effizienten Gentransfer in eine große Bandbreite von Geweben ermöglichen, ohne dabei selbst einen pathologischen Effekt auszulösen. Solche Systeme zur Übertragung von Nukleinsäuren werden Vektoren genannt.

Der Prozess der Genübertragung und -expression wird als Transduktion bezeichnet. Ein idealer Vektor sollte durch ein einfaches und reproduzierbares Produktionsschema hochkonzentriert herstellbar sein und muss die für die jeweilige Erkrankung entscheidenden Zelltypen erreichen können. Je nach Erkrankung kann es sich hierbei um sich teilende oder nicht teilende Zellen handeln. In vielen Fällen wird zudem eine stabile, andauernde Genexpression gewünscht, die die Integration der Vektor-DNS in die DNS des Empfängers verlangt. In anderen Fällen ist eine transiente Genexpression ausreichend oder erwünscht, die die Erhaltung des Vektors als Episom verlangt. Weiterhin kann eine Regulation der Genexpression gewünscht sein, so dass die Transskriptionseinheit des Vektors für die Beeinflussung durch regulatorische Elemente empfänglich sein muss. Schließlich darf durch den Vektor kein pathogener oder anderweitig negativer Effekt, wie z. B. eine unerwünschte Immunantwort, entstehen.

## 2.1.2 Vektoren

Man unterscheidet nicht-virale und virale Vektoren.

### 2.1.2.1 Nicht-virale Vektoren

Nicht-virale Vektoren bestehen aus „nackter“ DNS, die durch Injektion, Liposome (kationische Lipid/Nukleinsäure-Komplexe), Nanopartikel oder auf andere Weise übertragen wird. Obwohl sie in großen Mengen hergestellt werden können und nur minimale immunologische oder toxische Probleme bedingen, ist ihr Gentransfer ineffizient.

Sie spielen daher nur in circa einem Viertel aller klinischen Studien eine Rolle (EDELSTEIN et al. 2004).

### 2.1.2.2 Virale Vektoren

Virale Vektorsysteme stellen momentan das Mittel der Wahl dar (VERMA und WEITZMANN 2005). Sie stammen von Viren mit DNS- oder RNS-Genomen und umfassen sowohl integrierende als auch nicht-integrierende Vektoren.

Das hierbei zugrunde liegende Konzept beruht auf der natürlichen Fähigkeit eines Virus, genetisches Material in die infizierte Zelle zu bringen. Ziel des Virus ist die Replikation und Produktion einer möglichst hohen Zahl von Nachkommen, wobei es zur Zerstörung der Wirtszelle kommen kann. Um Viren als Vektorsysteme nutzen zu können, müssen die Komponenten, die für die Infektion benötigt werden, von den krankheitserzeugenden getrennt werden. Die viralen Sequenzen, die für Replikation, Zusammenbau des Viruspartikels, Verpacken des viralen Genoms und den Transfer des Transgens in die Zelle verantwortlich sind, werden hierfür identifiziert und die entbehrlichen Gene eliminiert, um die Virusreplikation, die Pathogenität und die Expression immunogener Antigene zu reduzieren. Es handelt sich hierbei um eine biologische Schutzmaßnahme. Anschließend wird das Zielgen zusammen mit regulatorischen Elementen in den Vektor integriert. Dieser ist durch Bereitstellung der fehlenden Genprodukte *in trans* reproduzierbar.

Die meist verwendeten RNS-Vektoren stammen von Retroviren. Diese sind unter den ersten viralen Vektorsystemen, die für die Gentherapie verwendet wurden. Es handelt sich um eine große Familie von umhüllten RNS-Viren, die in allen Vertebraten gefunden werden kann. Diese teilt sich in Oncoretroviren, Lentiviren und Spumaviren. Das virale RNS-Genom der Retroviren wird durch das virale Enzym Reverse Transkriptase in eine doppelsträngige provirale DNS umgewandelt, die zusammen mit viralen Proteinen als Präintegrationskomplex den Nukleus erreicht und dort in das Zellgenom integriert. Retrovirale Vektoren haben eine

limitierte Kapazität für das therapeutische Gen, erlauben allerdings durch die Integration eine lang anhaltende Genexpression.

Zu den meist genutzten DNS-Vektoren gehören Adenoviren (Ad) und das adeno-assoziierte Virus (AAV). Das Adenovirus besteht aus einem doppelsträngigen DNS-Genom mit einer Größe von ca. 36 kb und integriert sich normalerweise nicht in das Genom der Wirtszelle.

Das AAV besitzt dagegen nur ein Einzelstrang-DNS-Molekül von ca. 4,7 kb und stellt ein nichtpathogenes humanes Parvovirus dar. Eine Infektion mit AAV benötigt eine Coinfektion mit Helferviren, beispielsweise Adeno- oder Herpesviren.

Auch das Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) kann als viraler Vektor verwendet werden. Es handelt sich um ein großes DNS-Virus mit doppelsträngigem Genom, das eine große Menge an fremder DNS beherbergen kann. Es wird vor allem für die Transduktion von Nervenzellen verwendet.

Kein einzelnes Vektorsystem ist für alle möglichen Indikationen der Gentherapie geeignet, sondern es wird je nach spezifischer Anforderung das virale System gewählt, das das therapeutische Gen in die entsprechende Anzahl der Zellen des Zielgewebes transportiert und dort eine therapeutische Menge des kodierten Proteins oder einer funktionellen Nukleinsäure (shRNS) über eine festgelegte Zeitspanne exprimiert (KAY et al. 2001).

### **2.1.3 Indikationen**

Gentherapie lässt sich theoretisch für nahezu jede Krankheit einsetzen. Sie wird als innovative Strategie vor allem für solche Erkrankungen erwogen, die durch klassische Medikamente nicht, oder nur unzureichend therapierbar sind.

Derzeit stellen Krebserkrankungen die häufigste Indikation der Gentherapie, gefolgt von monogenen Erbkrankheiten und kardiovaskulären Erkrankungen (EDELSTEIN et al. 2004).

Eine weitere Indikation sind die Infektionskrankheiten, wobei HIV das Hauptziel ist.

#### **2.1.3.1 Krebserkrankungen**

Zur gentherapeutischen Behandlung von Krebs gibt es unterschiedliche Strategien.

Ein Ansatz ist das Einbringen eines Tumor-Unterdrückungs-Gens („tumor suppressor gene“), das das Tumorwachstum stoppen und die Apoptose der Tumorzellen fördern soll. Häufig findet hierbei das Gen des p53-Proteins Anwendung, das den Zellzyklus anhalten kann und in die Apoptose involviert ist (EDELSTEIN et al 2004).

Die Immuntherapie dagegen versucht, die Antitumor-Immunantwort des Patienten zu stärken, um den Tumor so zu kontrollieren (EDELSTEIN et al 2004).

Schließlich können auch Gene, die Enzyme kodieren, die Wirkstoffvorstufen in zytotoxische Wirkstoffe umsetzen, Verwendung finden. Dies ermöglicht die Gabe von hohen Dosen an nichttoxischen Vorstufen ohne unerwünschte Effekte, die dort, wo sie benötigt werden, ihre Wirksamkeit erlangen (EDELSTEIN et al 2004).

Mögliche Anwendungsgebiete für die gentherapeutische Behandlung von Krebserkrankungen wären beispielsweise das Adenokarzinom, eine maligne epitheliale Neubildung des Drüsengewebes (z.B. Mammatumor der Frau), oder das Fibrosarkom als hochmaligner Tumor der Haut, der sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin von Bedeutung ist. Da beide Tumorarten zu Metastasen neigen, sind sie mit konventionellen Behandlungsmethoden nur schwer zu therapieren.

#### 2.1.3.2 Monogene Erbkrankheiten

Bei diesen Erkrankungen soll ein defektes Gen durch ein funktionierendes ersetzt und die normale Zellfunktion wiederhergestellt werden. Das Ziel ist der stabile Transfer des Gens in sich teilende Zellen, um das permanente Bestehen der Korrektur zu sichern (EDELSTEIN et al 2004). Circa ein Drittel der hierzu durchgeführten Studien befasst sich mit Zystischer Fibrose, die meistverbreitete Erbkrankheit in Europa und den USA. Weitere 20 Prozent der Studien zielen auf das Schwere kombinierte Immunodefizienz-Syndrom (SCID) ab. Allein hier können bisher andauernde und klinisch bedeutungsvolle therapeutische Nutzen erzielt werden (CAVAZZANA-CALVO et al. 2000 und 2001).

#### 2.1.3.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Hier liegen die Ansätze beispielsweise in der therapeutischen Angiogenese (Stimulation der Bildung neuer Blutgefäße durch Wachstumsfaktoren), Schutz des Myocards, Regeneration und Reparatur des Gewebes oder Prävention einer Restenose (EDELSTEIN et al 2004).

### 2.1.4 Klinische Anwendungen

Weltweit wurden bzw. werden bereits über 600 klinische Studien zur Anwendung von Gentherapie durchgeführt. Über 70% davon finden auf dem Gebiet der Tumorerkrankungen statt. Die meisten Studien befinden sich derzeit in Phase I oder II, weniger als 1% in Phase III (VERMA und WEITZMANN 2005).

Diese Studien sollen die Machbarkeit und Sicherheit der Gentherapie etablieren und gleichzeitig die Expression des therapeutischen Genes *in vivo* und dessen therapeutischen Effekt demonstrieren (EDELSTEIN et al. 2004).

Eine Studie, die Aufsehen erregte, wurde von Alan Fischer an Kindern durchgeführt, die an

der erblichen SCID-X1-Immundefizienz leiden. Dabei wird die Entwicklung von T- und NK-Zellen aufgrund von Mutationen in der  $\gamma$ c-Zytokinrezeptor-Untereinheit blockiert. Hämatopoetische Stammzellen, die durch einen retroviralen Vektor diese Untereinheit exprimierten, wurden den Patienten infundiert. In der Folgezeit konnte eine altersentsprechende Zellmenge und Funktion festgestellt werden. Allerdings entwickelten zwei der zehn Kinder drei Jahre nach der Therapie eine T-Zell-Leukämie, die wahrscheinlich durch die Behandlung mit retroviralen Vektoren ausgelöst worden ist (HACEIN-BEY-ABINA et al. 2003, VERMA und WEITZMANN 2005).

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit Hämophilie B, einer Krankheit, die auf der Defizienz des Gerinnungsfaktors IX beruht. Den Patienten wurden AAV-Vektoren, die den humanen Faktor IX exprimierten, intramuskulär injiziert, woraufhin sich eine klinische Besserung einstellte (KAY et al. 2000). Die direkte Injektion des Vektors in die Leber zeigte jedoch eine noch nicht geklärte Toxizität (VERMA und WEITZMANN 2005).

Ein erster Todesfall durch die Gentherapie musste nach einer überschießenden Reaktion auf die Gabe von adenoviralen Vektoren verzeichnet werden (VERMA und WEITZMANN 2005, RAPER et al. 2003).

Trotz einiger Rückschläge trägt die Gentherapie noch immer das Potential eines neuen, effektiven Behandlungsansatzes für viele Erkrankungen, für die es momentan keine Behandlungsmethoden gibt oder bei denen diese unzufriedenstellend sind (EDELSTEIN et al. 2004).

Eine Hoffnung der Gentherapie für die Krebstherapie liegt in der Möglichkeit, durch virale Vektoren letale Gene in Krebszellen einzubringen oder das Immunsystem so zu stimulieren, dass die Krebszellen als fremd erkannt werden. In Phase II Studien konnten vielversprechende Resultate durch die Kombination von oncolytischen Viren und Chemotherapie erreicht werden (VERMA und WEITZMANN 2005).

## **2.2 BS-RNase**

Die Verwendung von Nukleasen zum gezielten Angriff von Tumorzellen stellt eine potentielle Therapieoption in der Krebstherapie dar. Bei der BS-RNase (bovine seminal RNase) handelt es sich um eine solche zytotoxische Nuklease.

### **2.2.1 Herkunft und biologische Aktivitäten**

Die BS-RNase wird aus der Samenflüssigkeit des Bullen gewonnen.

1963 beschrieben D'ALESSIO und LEONE erstmals eine starke Ribonuklease-Aktivität im

Seminalplasma des Bullen und Matousek berichtete 1966 über eine Degeneration des Hodengewebes des Schafbocks nach subkutaner Injektion boviner Samenflüssigkeit (zitiert von MATOUSEK 2001). Es wird vermutet, dass die Ribonukleaseaktivität dazu dient, durch Abbau der ribosomalen RNS (rRNS) die genetische Information fremder Spermien während der Fertilisation zu eliminieren (MATOUSEK 2001). DOSTAL und MATOUSEK gelang es 1973, das Protein, das diese aspermatogenetische Aktivität exprimiert, aus der Samenflüssigkeit zu isolieren und Matousek beschrieb erstmals die zytotoxische Aktivität der BS-RNase gegenüber Tumoren bei Mäusen (MATOUSEK 1973). Diese Wirkung wurde durch zahlreiche Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für verschiedene Typen von Tumorzellen bestätigt (z.B. MATOUSEK und STANEK 1977, VESCIA und TRAMONTANO 1981), wobei der Antitumoreffekt auf Metastasenzellen sogar noch stärker zu sein schien, als auf die ursprünglichen Tumorzellen (LACCETTI et al. 1992, LACCETTI et al. 1994). Entscheidend war aber die selektive Toxizität gegenüber malignen Zellen *in vitro*, während normale Zellen nicht beeinträchtigt wurden (LACCETTI et al. 1992). Dies bestätigte sich auch *in vivo* bei Experimenten mit Ratten und Mäusen, wobei eine deutliche Verminderung des Tumorwachstums nach s.c. bzw. i.p. Injektion von BS-RNase beobachtet werden konnte, während weder das Verhalten noch die physische Erscheinung der Tiere durch die Behandlung beeinträchtigt waren (LACCETTI et al. 1992, LACCETTI et al. 1994). Selbst MDR(multidrug resistance)-Neuroblastom-Zellen, die Resistenzen gegen etliche antitumorale Wirkstoffe aufweisen, konnten mit Hilfe der BS-RNase *in vitro* wie *in vivo* abgetötet werden (CINATL et al. 1999, CINATL et al. 2000).

Neben diesen Wirkungen sind weitere biologische Aktivitäten des Proteins Embryotoxizität (MATOUSEK 1975), Immunsuppression (SOUCEK et al. 1983, TAMBURRINI et al. 1990) und die Beeinträchtigung der bovinen Oozytenreifung (SLAVIK et al. 2000).

MATOUSEK et al. (2003) verglichen die biologischen Aktivitäten der BS-RNase mit denen der Onconase. Das Zytotoxin Onconase wird aus Eiern und Embryonen des Leopardenfrosches *Rana pipiens* gewonnen und ist wie BS-RNase ein Homologon der bovinen RNase A. Sie wurde in klinischen Phase III-Studien zur Behandlung des malignen Mesothelioms verwendet (MATOUSEK et al. 2003). Es zeigte sich, dass Onconase eine stärkere antitumorale, aspermatogenetische und embryotoxische Aktivität und geringere Immunogenität als BS-RNase entwickelt. Allerdings war sie im Gegensatz zu dieser toxisch für humane Knochenmarkszellen (MATOUSEK et al. 2003).

### 2.2.2 Struktur und intrazellulärer Weg

Das Enzym gehört zur RNase A-Superfamilie, ebenso wie die bovine Pankreas-RNase A und die humane Pankreas-RNase.

Im Gegensatz zu den beiden genannten RNasen ist die BS-RNase ein Dimer, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten, die über zwei Disulfidbrücken und nicht-kovalente Kräfte miteinander verbunden sind. Das monomere Derivat der BS-RNase ist zwar enzymatisch aktiv, weist aber keine Zytotoxizität auf. Die dimere Struktur des Proteins scheint so zunächst, ebenso wie seine enzymatische Aktivität, essentielle Voraussetzung für die selektive Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen zu sein (VESCIA et al. 1980).

BRACALE et al. (2002) beschrieben die wichtigsten Stationen der BS-RNase auf ihrem intrazellulären Weg an Hand von benignen 3T3- und malignen 3T3-SVT2-Zellen. Die BS-RNase bindet an der extrazellulären Matrix der Zelle und wird durch Endozytose internalisiert. Dies geschieht in benignen und malignen Zellen. Nicht-zytotoxische RNasen, wie RNase A oder das Monomer der BS-RNase, binden nicht an der Zelloberfläche und werden nicht aufgenommen. Von den Endosomen erreicht die BS-RNase in malignen Zellen das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und schließlich das Zytosol, wo sie ribosomale RNS abbaut. Dadurch wird die Proteinsynthese blockiert, was zum Tod der Zelle führt. Eine kleine Fraktion erreicht außerdem den Zellkern. In gutartigen Zellen verbleibt das Protein in den Endosomen.

Monomere RNasen, wie RNase A, und monomere Derivate der BS-RNase werden weiterhin von dem RNase-Inhibitor (RI) des Zytosols gebunden und können somit nicht als Antitumoragens wirken. Die Antitumoraktivität der BS-RNase beruht darauf, dass sie der neutralisierenden Aktivität des Inhibitors ausweichen kann, sofern sie sich in ihrer nativen dimeren Struktur befindet. BRACALE et al. (2003) gelang es, synthetische Monomere der BS-RNase herzustellen, die zwar von dem Inhibitor gebunden wurden, aber trotzdem selektive zytotoxische Aktivität gegenüber malignen Zellen zeigten. Diese Monomere entstehen durch das reduktive Lösen der Disulfidbrücken des nativen Enzyms. Entscheidend ist die anschließende Bindung der exponierten Sulfhydryle an kleine Thiole. Sulfhydryle der Zelle können so das native Dimer der BS-RNase wiederherstellen, das dann aufgenommen wird und seine Antitumoraktivität aufzeigt. BRACALE et al. folgerten daraus, dass diese Prozesse ebenfalls ablaufen, wenn die native BS-RNase von der Zelle endozytiert wird, indem sie durch Sulfhydryle der Zelle vom Dimer zum Monomer und wieder zum Dimer umgewandelt wird.

LEE und RAINES (2005) synthetisierten monomere Varianten der BS-RNase, die den

RNase-Inhibitor des Zytosols umgehen konnten und volle enzymatische Aktivität behielten. Die zytotoxische Aktivität dieser Monomere war bis zu 30-fach höher als die der nativen BS-RNase. Sie folgerten, dass ein Teil nativer BS-RNase in der reduzierenden Umgebung des Zytosols dissoziieren kann und als Monomer an den Inhibitor gebunden wird, so dass ihre Zytotoxizität beeinträchtigt ist. Die dimere Struktur scheint demnach nicht ausschlaggebend für die zytotoxische Aktivität des Enzyms zu sein.

### **2.2.3 Therapieansätze**

Aufgrund ihrer spezifischen Tumortoxizität fand die BS-RNase bisher in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien mit den unterschiedlichsten Tumormodellen Verwendung.

Schon MATOUSEK und STANEK wiesen 1977 ihre Wirkung an murinen Leukämiezellen nach.

LACCETTII et al. (1992) konnten den Antitumoreffekt an einem Model eines Epithelialtumores der Schilddrüse der Ratte und dessen Lungenmetastasen *in vitro* und *in vivo* nachweisen.

CINATL et al. (1999 und 2000) zeigten die Wirksamkeit der BS-RNase gegenüber humanen MDR(multidrug resistance)-Neuroblastomzellen, ebenfalls sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, im Mausmodell.

Auch VIOLA et al. (2005) konnten den zytotoxischen Effekt auf humane Adenokarzinomzellen des Kolons nachweisen.

## **2.3 Adenoviren**

### **2.3.1 Einteilung, Aufbau und Lebenszyklus**

Adenoviren (Ad) sind doppelsträngige DNS-Viren (BENIHOUD et al. 1999, KOVESDI et al. 1997) mit Proteinhülle (Kapsid), die die Lyse der Wirtszellen bewirken. Beschrieben wurden sie erstmals von ROWE et al.(1953), denen die Isolation aus Rachenpolypen und Tonsillen gelang. Der Name „adeno“ leitet sich aus dem Griechischen ab („aden“ = Drüse), entsprechend dem erstem Fundort der Viren.

Adenoviren verursachen meist relativ milde, nicht mortale Erkrankungen. Akute, respiratorische oder enterale Erkrankungen treten in der Regel nur bei Kindern bzw. Jungtieren auf.

Typische Erkrankungen des Menschen sind beispielsweise akute respiratorische Erkrankungen, Pharyngitiden, Konjunktivitiden oder Gastroenteritiden und Pneumonien, diese v.a. bei Kindern (VOLPERS und KOCHANNEK 2004). Hepatitis Contagiosa Canis

(Infektiöse Hundehepatitis) ist eine wichtige Adenoviruserkrankung des Hundes.

Adenoviren sind stark immunogen und hinterlassen nach Infektion einen lebenslangen Schutz gegen den entsprechenden Serotyp. Da sie in Infizierten lange persistieren, sind sie weltweit ubiquitär verbreitet und häufig an Faktorenerkrankungen beteiligt. Diese entstehen, wenn die Abwehrmechanismen des Wirtes durch endo- oder exogene Faktoren geschwächt werden.

Adenoviren werden in zahlreichen Spezies und Gewebetypen gefunden (VERMA und WEITZMAN 2005). Die Familie Adenoviridae teilt sich u.a. in die zwei Mastadenoviren (Mensch und andere Säuger) und Aviadenoviren (Vögel), die von den Mastadenoviren durch das Fehlen deren genusspezifischen Antigens unterschieden werden können. Adenoviren sind wirtsspezifisch, allerdings können humane Adenoviren auch Zellen anderer Spezies (z.B. von Maus, Ratte, Schwein) infizieren, sich dort aber nicht replizieren. Mittlerweile sind 51 humane Serotypen bekannt (CAO et al. 2004), die sich in fünf Gruppen (A-F, nach Hämagglutination) aufteilen.

Adenoviren sind ca. 70-100 nm groß und icosaedrale Partikel ohne Membranhülle (non-enveloped), bestehend aus elf Strukturproteinen. Sieben dieser Proteine bilden das Kapsid, während vier mit der DNS als Core verpackt sind. Der Viruspartikel besitzt ca. 36 Kilobasen (kb) doppelsträngige, lineare DNS (VERMA und WEITZMAN 2005). Diese kann in vier frühe Transkriptionseinheiten (Early Genes: frühe Gene; E1-E4) und späte Transkriptionseinheiten (Late Genes: späte Gene; L1-L5) unterteilt werden. Während die späten Gene vor allem Strukturproteine kodieren, haben die frühen Gene regulatorische Funktion (RELPH et al. 2005). E1 reguliert die Transkription der viralen DNS, E2 kodiert Proteine zur DNS-Replikation, E3 moduliert die Immunantwort des Wirtsorganismus und steuert die Virusfreisetzung, während E4 sowohl die Transkription, den mRNA-Transport als auch die DNS-Replikation reguliert.

Der Lebenszyklus eines humanen Adenovirus beginnt mit der Adsorption an die Zelloberfläche. Der Fiber Knob des Viruskapsids interagiert mit dem zellulären Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor (CAR) der Zelle (außer Subgruppe B), einem Transmembranprotein, das den nicht strukturverwandten Coxsackie B Viren und Adenoviren als Rezeptor dient (BERGELSON et al. 1997). Dessen RNS konnte in verschiedenen humanen Geweben wie Pankreas, Gehirn, Herz, Dünndarm, Hoden, Prostata, Leber und Lunge nachgewiesen werden (TOMKO et al. 1997). HONG et al. (1997) berichteten außerdem, dass die  $\alpha 2$ -Domäne des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse I ebenfalls als Rezeptor für den adenoviralen Fiber Knob dienen kann.

WICKHAM et al. (1993) berichteten, dass die Bindung des Virus an den CAR-Rezeptor und

die darauf folgende Aufnahme in die Zelle zwei unabhängige, aber essentielle Ereignisse darstellen. Anschließend an die Adsorption interagiert die Penton Base des Kapsids mit Integrinen der Zelloberfläche. Es folgt die Internalisierung durch rezeptorvermittelte Endozytose. Da zunächst eine Bindung an CAR und die Integrine der Zelle stattfinden muss, bedeutet dies, dass deren Expression die Aufnahme des Virus in die Zelle limitiert.

Durch eine Dissoziation des Pentons folgt eine Ansäuerung des Endosoms, in dem sich das Viruspartikel nun im Zytoplasma befindet. Es wird durch Proteasen schrittweise abgebaut und schließlich aus dem Endosom freigesetzt. Es folgt der zytoplasmatische Transfer zum Zellkern, wo die virale Transkription stattfindet. Nach Replikation der viralen DNS werden die Strukturproteine des Virus synthetisiert. Diese werden zunächst als leere Kapside zusammengesetzt, anschließend die DNS eingefädelt (Encapsidation) und als neue virale Partikel durch die Lyse der Zelle freigesetzt (RELPH et al. 2005).

### **2.3.2 Adenovirale Vektoren für den Gentransfer**

Adenoviren sind als Vektoren für den Transfer fremder Gene weit verbreitet.

Zu ihren Vorteilen gegenüber anderen Vektoren zählen die Möglichkeit, bei der Vektorproduktion hohe Titer zu erreichen und die Fähigkeit, eine Vielzahl sowohl sich teilender als auch postmitotischer Zelltypen zu infizieren (BENIHOUD et al. 1999, KOVESDI et al. 1997).

Da die zur Subgruppe C der humanen Adenoviren gehörenden Ad2 und Ad5 molekularbiologisch gut charakterisiert sind, werden sie als Vektoren für den adenoviralen Gentransfer verwendet.

Man unterscheidet drei verschiedene Typen von adenoviralen Vektoren (AdV): helperunabhängige Vektoren, helperabhängige Vektoren (Gutless oder Gutted oder High capacity AdV: HC AdV) und replikationskompetente, onkolytische Vektoren.

Die helperunabhängigen adenoviralen Vektoren teilen sich wiederum in die der ersten und zweiten Generation.

AdV der ersten Generation weisen eine Deletion in der E1-Region ( $\Delta E1$ ) des viralen Genoms auf (evtl. zusätzlich auch in der E3-Region:  $\Delta E3$ ). Da die E1-Region die Transkription reguliert und damit den Prozess der viralen Genexpression in Gang setzt, ist sie essentiell für die Virusreplikation (KAY et al. 2001). Das Fehlen dieser Region bedeutet somit, dass die Vektoren nicht replikationskompetent sind. Es können bis zu 8 kb fremder DNS eingebaut werden. Diese Vektoren sind nicht integrativ und führen nur zu einer transienten Genexpression sowohl in ruhenden als auch in proliferierenden Zellen. Dennoch findet eine

geringe Expression der viralen Gene statt, wodurch eine gewisse Toxizität und Immunogenität nicht vermieden werden kann. Die Produktion der Vektoren geschieht mit Hilfe von 293 HEK-Zellen (Humane embryonale Nierenzellen, HEK = Human Embryonic Kidney Cells), die die viralen Gene E1A und E1B exprimieren und durch diese Transkomplementierung die Expression anschalten. Hierbei ist das Auftreten replikationskompetenter Ads durch spontane homologe Rekombination der Vektorsequenzen mit der E1-Region der 293 HEK-Zellen allerdings nicht ausgeschlossen (BENIHOUD et al. 1999).

Helferunabhängige adenovirale Vektoren der zweiten Generation weisen zusätzliche Deletionen in den Regionen E2 und/oder E4 auf ( $\Delta E2$  und/oder  $\Delta E4$ ) und haben daher eine Kapazität von 10-13 kb für fremde DNS (CAO et al. 2004). Die verringerte Expression viraler Gene führt zu einer geringeren Toxizität und Immunogenität. Allerdings sind die zur Vektorproduktion benötigten transkomplementierenden Zelllinien schwer herzustellen, schwierig anzuzüchten und können zu niedrigen Virustitern führen (RELPH et al. 2005).

Helferabhängige Vektoren haben eine Deletion des gesamten viralen Genoms außer den Inverted Terminal Repeats (ITR) als Replikationsstartpunkte und  $\psi$  als Verpackungssignal, so dass ein Verpacken in virale Partikel noch stattfinden kann. Dadurch können bis zu 36 kb fremder DNS verpackt werden, aber die Vektoren benötigen ein Helfervirus zur Virussyntese (CAO et al. 2004). Dieses besitzt alle viralen Gene, die für die Replikation benötigt werden, hat aber einen Defekt in der Verpackungsdomäne, der es unwahrscheinlich macht, dass es zu einem Virion verpackt wird. Der Helfer muss nach der Vektorsynthese durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation, entsprechend der unterschiedlichen Dichte der Partikel, aus der Präparation entfernt werden (VOLPERS und KOCHANNEK 2004). In der Regel weisen alle gängigen Methoden der Präparationen der helferabhängigen AdV eine Kontamination von weniger als 1 Prozent mit Helfevirus auf, es können aber auch höhere Kontaminationen auftreten (PARKS et al. 1996, KAY et al. 2001, VOLPERS und KOCHANNEK 2004). Das alles erschwert einerseits die Herstellung, andererseits zeigen diese Vektoren nur geringe Toxizität, da keine virale Genexpression stattfindet.

Onkolytische adenovirale Vektoren sind replikationskompetent und im Idealfall tumorspezifisch und zeichnen sich durch die Lyse infizierter Tumorzellen aus.

Die Strategie, essentielle genetische Regionen des Virus zu deletieren und die fehlenden Funktionen mit Hilfe spezieller Zelllinien oder viraler Helfersysteme zu transkomplementieren, führt zu einer vergrößerten Kapazität für den Einbau des Transgens und zu einer verminderten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von replikationskompetenten

Adenoviren, da zwei oder mehr voneinander unabhängige Rekombinationen auftreten müssen (AdV der 2. Generation und helferabhängige AdV). Weiterhin wird hier die Expression viraler Proteine reduziert bzw. eliminiert, insbesondere die der modulierenden Funktionen in E1 und E4. So wird auch die Antigenität gemindert ((KOVESDI et al. 1997).

Limitationen der Anwendung von adenoviralen Vektoren sind dennoch das Fehlen einer anhaltenden Genexpression aufgrund der fehlenden Integration in das Genom der Wirtszelle (abhängig von der Zielsetzung), die Reaktionen des zellulären Immunsystems auf die viralen Proteine und die mögliche Toxizität der Vektoren bei Verwendung hoher Dosen. Durch die Bildung von adenoviruspezifischen Antikörpern wird die wiederholte Gabe des Vektors behindert (KOVESDI et al. 1997, BENIHOUD et al. 1999).

Die relativ weite Verbreitung des adenoviralen Rezeptors in den verschiedenen Geweben führt zu einem Fehlen von Gewebespezifität. Andererseits kann eine geringe Expression des Rezeptors in bestimmten Geweben eine erfolgreiche Transduktion behindern (KOVESDI et al. 1997).

Es gibt Ansätze, durch die Entwicklung verbesserter Vektoren die Aufnahmen größerer Gene zu ermöglichen, die Stabilität und Kontrolle der Transgenexpression zu verbessern, die zelluläre und humorale Immunantwort zu vermindern und den viralen Tropismus zu modifizieren (KOVESDI et al. 1997, BENIHOUD et al. 1999).

NOUREDDINI et al. (2006) berichteten beispielsweise über den Ersatz des Wildtyp-Fiberproteins des adenoviralen Kapsids, das für die Adsorption an den CAR der Zelle zuständig ist, durch ein chimäres Protein des ursprünglichen Fiberschaftes und Fibrin, eines Bakteriophagenproteins. Dieses gewährte sowohl eine effiziente Inkorporation in das Viruskapsid und damit virale Lebensfähigkeit als auch die Möglichkeit der Ausprägung unterschiedlicher Liganden durch Koppelung an monoklonale Antikörper. Dadurch konnte einerseits Unabhängigkeit von der CAR-Ausbildung der Gewebe und andererseits eine gezielte Ausrichtung auf bestimmte zelluläre Rezeptoren erreicht werden.

### **2.3.3 Anwendungen**

Adenovirale Vektoren finden für eine Vielzahl von Zielsetzungen Verwendung.

Schon SMITH et al. berichteten 1956 über deren Anwendung bei 30 Patientinnen mit Karzinomen der Zervix und einen onkolytischen Effekt auf das Tumorgewebe nach Injektion. Allerdings fand hierbei keine völlige Zerstörung des Tumors statt und ein erneutes Wachstum konnte nicht verhindert werden.

Adenovirale Vektoren finden in präklinischen Studien zur Transduktion von verschiedenen

Gewebe wie Leber, Skelettmuskel, Herz, Gehirn, Lunge, Pankreas und Tumoren Verwendung. Sie werden auch in klinischen Studien zur Krebsbekämpfung angewendet, zum einen wegen der Effizienz des Gentransfers, zum anderen aber auch, weil ihre zelluläre Toxizität und Immunogenität den erzielten Antitumoreffekt verstärken sollen (KAY et al. 2001).

Da Adenoviren leicht zu manipulieren sind, eine große Bandbreite humaner Zellen infizieren können und, im Vergleich mit anderen Vektoren, im Gentransfer hocheffizient sind, hielten sie RELPH et al. (2005) für das Mittel der Wahl für den Gentransfer. Klinische Studien der Phase I zeigten geringe Toxizität, allerdings konnte klinische Effizienz bisher nur mit replikationskompetenten Adenoviren erreicht werden (RELPH et al. 2005). Adenovirale Vektoren fanden Verwendung in klinischen Studien zur Behandlung von Tumorerkrankungen, vaskulären und monogenen Erkrankungen (VOLPERS und KOCHANNEK 2004).

LE GAL LA SALLE et al. (1993) verwendeten adenovirale Vektoren, um die Funktion klonierter Gene zu studieren. Nach der Infektion von Nervenzellen der Ratte konnte ein effizienter Gentransfer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden. Bei den infizierten Tieren wurde kein zytotoxischer Effekt des Vektors festgestellt. Die lokal auftretende Gewebenekrose an der Injektionsstelle wurde auf das durch die Injektion verursachte Trauma zurückgeführt.

ZHANG et al. erreichten 2005 gute Ergebnisse, als sie mit Hilfe adenoviraler Vektoren das Wildtyp p53-Gen, das eine Rolle bei der Apoptose von Zellen spielt, bei Patienten mit unterschiedlichen Tumoren einsetzten und anschließend mit Hyperthermie kombinierten.

Derzeitige Entwicklungen dieser Vektoren umfassen vor allem die Reduktion der Immunstimulanz, die Verbesserung der Selektivität und die Produktion großer Mengen an Viren für klinische Studien.

## **2.4 Reportergene**

Die vektorvermittelte Einbringung von Reportergenen in Zellen oder Gewebe dient dem Nachweis der Genexpression. Durch ihre Expression führen Reportergene zu spezifischen Reaktionen, wie z.B. Akkumulation radioaktiv markierter Isotope, Fluoreszenz oder Biolumineszenz, die quantitativ bestimmt werden können und so eine indirekte Aussage über die Genexpression erlauben.

### **2.4.1 Luciferase**

Bei Luciferase handelt es sich um ein Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, das als Monooxygenase das spezifische Substrat Luciferin in Anwesenheit von Sauerstoff und ATP zu Oxyluciferin oxidiert und dadurch Biolumineszenz erzeugt.

Diese Lumineszenz kann mittels eines Assays quantifiziert werden. Das Gen der Luciferase wird daher vielfach als Reporter gen eingesetzt, das die Darstellung der Effizienz und Dauer des (viralen) Gentransfers erlaubt. Weiterhin kann die Luciferaseaktivität indirekt als Maß für die Proteinbiosynthese von Zellen eingesetzt werden. Umgekehrt kann mit dem Luciferase-Assay auch die biologische Aktivität von Toxinen über die Unterdrückung der Proteinbiosynthese bestimmt werden, indem man die Lumineszenzlevel der behandelten Proben mit denen der unbehandelten vergleicht (HALE 2001). Die Menge der gebildeten Luciferase, gemessen durch die entstandene Lumineszenz, ist der Toxinkonzentration und -wirkung umgekehrt proportional.

## **2.5 Tet-System**

### **2.5.1 Tet-Off- und Tet-On-System**

Grundlage für das in dieser Arbeit verwendete System zur Regulation der Genexpression ist das von Bujard et al. entwickelte Tetrazyklin-induzierbare System (GOSSEN und BUJARD 1992).

Die von BD (BD Biosciences Clontech) vertriebenen Tet-Off<sup>TM</sup> Tet-On<sup>TM</sup> Gene Expression Systeme ermöglichen es, Genexpression präzise, reversibel und dosisabhängig zu regulieren. Sie reagieren auf unterschiedliche Konzentrationen von Tetrazyklin oder eines seiner Derivate, z.B. Doxyzyklin. Beide Systeme basieren auf zwei regulatorischen Elementen, die von dem *E. coli* Tetrazyklin-Resistenz-Operon stammen; aus dem Tet-Repressor-Protein (TetR) und der Tet-Operator-DNS-Sequenz (tetO). Diese können mit Hilfe verschiedener Vektoren in eine Zelllinie eingebracht werden. Diese Zellen reagieren nun auf Tetrazyklin oder Doxyzyklin dosisabhängig und erlauben eine präzise Kontrolle der Expression des Zielgens.

Das Tet-Off-System arbeitet mit dem Tetrazyklin-kontrollierten Trans(kriptionalem)aktivator (tTA), der ein Fusionsprotein aus dem Wildtyp-TetR und der VP16 Aktivierungs-Domäne (AD) des Herpes Simplex Virus darstellt. Das Tetrazyklin-Response-Element (TRE) besteht aus sieben Wiederholungen der tetO-Sequenz, die die Bindung des tTA erlauben, und einem minimalen Promotor, der durch die Bindung der VP16-Untereinheit aktiviert wird und so die

Expression des jeweiligen Zielgens ermöglicht. Der tTA bindet an das TRE und aktiviert damit die Transkription des Zielgens. In Anwesenheit von Tetrazyklin (bzw. eines seiner Derivate) kann der tTA nicht binden und die Genaktivität wird dosisabhängig reduziert bzw. eingestellt (GOSSEN und BUJARD 1992).

Das Tet-On-System benutzt dagegen den reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (rtTA). Hier wandelt der Austausch von vier Aminosäuren das TetR zum reversen TetR (rTetR) und verändert damit die Bindungscharakteristika.

Dieser rtTA bindet sich nur in Anwesenheit von Tetrazyklin (bzw. Doxyzyklin) an das TRE und aktiviert damit die Expression des Zielgens. Ohne das Antibiotikum findet keine Transkription des Gens statt (GOSSEN et al. 1995).

Da das Tet-On-Transaktivatorprotein gegenüber dem Tetrazyklinderivat Doxyzyklin circa hundertmal sensitiver ist, wird für das Tet-On-System entsprechend Doxyzyklin verwendet (LEE et al. 2004).

Die Vorteile dieser beiden Systeme liegen in der dosisabhängigen Regulierbarkeit der Genexpression, der hohen Induktionsrate der Expression (deutlich über der des CMV-Promotors), den schnellen Reaktionszeiten und der Verwendung eines gut charakterisierten, nichttoxischen Induktors (GOSSEN und BUJARD 1992).

Darüber hinaus eignen sie sich für die Expression toxischer Gene.

KISTNER et al. (1996) transferierten beide Tet-Systeme in transgene Mäuse und konnten damit eine quantitative Kontrolle der Genaktivität durch die Gabe von Doxyzyklin über das Trinkwasser erreichen. Die Induktion der Genexpression vollzieht sich rasch, insbesondere bei dem Tet-On-System. Das Tet-Off-System reagiert etwas langsamer, da hier das Doxyzyklin erst abdiffundieren muss und somit die biologische Halbwertszeit des Antibiotikums auch eine Rolle spielt.

### **2.5.2 Kombination von Tet-System und adenoviralen Vektoren**

Eine der Limitationen des Tet-Systems ist die Tatsache, dass für jedes zu exprimierende Gen und jeden Zelltyp eine eigene stabile Zelllinie hergestellt werden muss. Eine Möglichkeit dies zu umgehen, ist die Kombination von adenoviralen Vektoren und dem Tet-System.

HARDING et al. (1997) transfizierten primäre Hippocampuszellen mit einem Zweivektorsystem von Typ-5-Adenoviren (AdTet-On bzw. AdTet-Off und AdTRE mit dem Zielgen) und erreichten damit hohe Transfektionseffizienz und gute Regulierbarkeit der Genexpression.

Vergleichbare Ergebnisse erreichten sie *in vivo* durch Injektion der Vektorsysteme in den

Hippocampus von Ratten (HARDING et al. 1998).

Auch MOLIN et al. (1998) verwendeten Typ-5-Adenoviren, um ein vektorvermitteltes Tet-On-System zu konstruieren. Die Koinfektion der beiden Vektoren ergab eine dosisabhängige Induzierbarkeit der Genexpression und eine hohe Induktionsrate in unterschiedlichen Zelllinien. In einem Mausmodell ließ sich nach intramuskulärer Injektion die Kontrollierbarkeit der Expression des Reportergens ebenfalls nachweisen.

Die Aufteilung der Elemente der Tet-Systeme (tTA bzw. rtTA und TRE plus Zielgen) auf zwei verschiedene Vektoren verhindert, dass der Promotor, der die Expression des tTA bzw. rtTA steuert, auch unspezifisch die Expression des TRE induziert und damit eine unerwünschte Hintergrundexpression im nichtinduzierten Zustand bewirkt. Auch lässt sich so die Ratio von Transaktivatorvirus zum Responsevirus verändern (LEE et al. 2004).

Eine Koinfektion eines Vektors, der den tTA bzw. den rtTA exprimiert, und eines Vektors mit dem Zielgen unter Kontrolle des TRE erlaubt hiermit eine gute Regulierbarkeit des Systems bei verschiedenen Zelltypen von Säugerzellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

### **2.5.3 Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionaler Dämpfer**

Bei dem in dieser Arbeit Verwendung findenden Tet-On-System wird die Genexpression durch Zugabe von Doxzyklin aktiviert.

Es kann hierbei aber auch in Abwesenheit von Doxzyklin zu einer ungewollten Hintergrundexpression des Zielgens kommen. Diese ist im Falle einer transienten, nicht-integrativen Expression durch eine hohe Zahl der integrierten Plasmide und zu geringer Chromatin-Repression bedingt, während sie in stabilen Transfektionen davon abhängt, wo das Zielgen in das Genom integriert ist (KISTNER et al. 1996, FREUNDLIEB et al. 1999). Liegt es zu nahe an einem Enhancer-Element, kann Hintergrundexpression auftreten. Auch das adenovirale Genom enthält verschiedene Enhancer-Elemente, die zu einer erhöhten Hintergrundexpression in Abwesenheit vom Induktor führen können.

Um diese unkontrollierte Genexpression zu verhindern, kann das Tet-On-System mit dem Tetrazyklin-kontrollierten Transkriptionalen Dämpfer (tTS) ergänzt werden. Dieser ist ein Fusionsprotein des Tet-Repressor-Proteins (TetR) und der KRAB-AB-Domäne des Kid-1-Proteins, das aus der Rattenniere stammt. Die KRAB (Krüppel-associated box)-Domäne besteht aus ca. 75 Aminosäuren und ist in A- und B-Domänen unterteilt. Die KRAB-A-Domäne ist ein starker transkriptionaler Repressor (WITZGALL et al. 1994).

In der Abwesenheit von Doxzyklin bindet der tTS an die tetO-Sequenz des Tet-Response-Elementes (TRE) und blockiert damit die Expression des Zielgens. Bei der Zugabe von

Doxyzyklin dissoziiert der tTS von dem TRE, so dass bei genügender Doxyzyklinkonzentration der reverse Transaktivator (rtTA) des Tet-On-Systems binden und die Genexpression aktivieren kann (FREUNDLIEB et al. 1999).

Der tTS bindet an das TRE bei Konzentrationen von 0–10 ng/ml Doxyzyklin und beginnt ab Konzentrationen über 10 ng/ml zu dissoziieren. Bei Konzentrationen ab 100 ng/ml kann der rtTA an das TRE binden. Empfohlen wird von BD Biosciences Clontech eine Konzentration von 1 µg/ml Doxyzyklin.

Die Kombination des Tet-On-Systems mit dem tTS bietet eine erweiterte Kontrolle der Regulation, da ungewollte Hintergrundexpression durch eine Abschirmung des TRE von externen stimulierenden Einflüssen stark reduziert werden kann. Dieses kombinierte Aktivierungs-/Repressionssystem eignet sich für die Expression potentiell toxischer Gene, deren Produkte von den Zellen nicht toleriert werden (FREUNDLIEB et al. 1999).

Die zusätzliche Infektion eines dritten Vektors, der den tTS exprimiert, zum adenovirusvermittelten Tet-On-System reduzierte die Hintergrundexpression und verbesserte dadurch die Induktionsrate (MIZUGUCHI und HAYAKAWA 2001).

Alternativ kann auch ein Zweivektorsystem verwendet werden, wenn das tTS-Gen dem Vektor, der den Code des TRE trägt, zugefügt wird (STROBL und ANTON unveröffentlichte Ergebnisse, STROBL 2006).

#### **2.5.4 Kombination von adenoviral vermittelten Tet-On-System und BS-RNase als Zielgen**

Das Tet-System eignet sich für die Expression toxischer Gene, wie der BS-RNase, da die Expression kontrolliert und nur unter den gewünschten Bedingungen angeschaltet werden kann. So wird verhindert, dass die Synthese des Toxins bereits während der Vektorproduktion einsetzt und die Zellen, die für die Herstellung der Viren benötigt werden, Schaden erleiden.

Durch Koinfektion von Zellen mit dem Transaktivatorvirus des Tet-On-Systems und dem Responsevirus mit dem Gen der BS-RNase (inkl. tTS) kann die Expression des Gens durch Zugabe von Doxyzyklin kontrolliert eingeschaltet werden. Die Zelle synthetisiert nun die RNase und schleust diese aus der Zelle aus. Um ihren zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen ausüben zu können, gelangt die BS-RNase anschließend wieder über den in Punkt 2.2.2 beschriebenen Weg in das Zytoplasma der malignen Zellen (STROBL und ANTON unveröffentlichte Ergebnisse).

### **3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Die gezielte Anwendung der selektiv tumor-zytotoxischen BS-RNase könnte eine neue Strategie zur Therapie verschiedenster Tumorerkrankungen darstellen.

Ihre regulierte Expression mit Hilfe des adenovirusvermittelten Tet-On-Systems wurde bereits von STROBL (2006) untersucht. Dies geschah im Hinblick auf das Prostatakarzinom mit einem prostataspezifischen Promotor, dem PSA-Promotor, der die Expression des reversen Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivators kontrolliert.

Die vorliegende Arbeit verwendet ein vergleichbares Regulationssystem, in dem allerdings der gewebsspezifische Promotor durch den universalen CMV-Promotor ersetzt wurde, um dieses System an unterschiedlichen Tumormodellen anwenden zu können. Es sollten Zellen verschiedener Tumorarten und Spezies auf ihre Eignung zum Einsatz in einem weiterführenden *in vivo*-Experiment untersucht werden.

Hierfür wurden drei Tumorzelllinien sowie zwei Nichttumorzelllinien als Referenz ausgewählt. Die humane Adenokarzinom-Zelllinie HeLa diene zugleich als Referenz zu den Ergebnissen von STROBL.

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Zellbiologische Materialien und Methoden**

#### **4.1.1 Verwendete Zelllinien**

- 293 HEK: Humane embryonale Nieren-Zelllinie (HEK = Human Embryonic Kidney Cells) (GRAHAM et al.1977)  
bezogen von der Firma Microbix, Toronto, Kanada  
Diese Zelllinie ist stabil mit 15 % der DNS des linken Endes des Adenovirusgenoms transduziert und exprimiert die adenoviralen E1A- und E1B-Gene (Transkomplementierung). Sie dient der Vektorproduktion.
- A431: Humane Epidermoid-Karzinom-Zelllinie  
bezogen von der Firma DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nr. ACC 91
- HeLa: Humane Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie  
bezogen von der Firma DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nr. ACC 57
- CMS-5: Murine Fibrosarkom-Zelllinie  
(GÄNSBACHER et al. 1990)  
aus Laborbeständen
- Hs68: Humane Fibroblasten-Zelllinie  
bezogen von der Firma ATCC, Manassas, USA, Nr. CRL-1635
- NIH/3T3: Murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie  
bezogen von der Firma ATCC, Manassas, USA, Nr. CRL-1658

## 4.1.2 Methoden der Zellkultur

### 4.1.2.1 Medium und Zusätze

DMEM: Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g/l d-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-Ananyl-L-Glutamin bezogen von der Firma Biochrom, Berlin

FKS: Foetales Kälberserum Sera Plus bezogen von der Firma Pan Biotech GmbH, Aidenbach

Glutamin: 200 mM Glutaminlösung bezogen von der Firma Biochrom, Berlin

Pyruvat: 100 mM Natrium Pyruvat-Lösung bezogen von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

PBS: Phosphate buffered saline (PBS)-Dulbecco (1x) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> bezogen von der Firma Biochrom, Berlin

Trypsin/EDTA: 0,25 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS bezogen von der Firma Biochrom, Berlin

Citic Saline (10x): 50 g KCl und 22 g NaCitrat werden mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Zur Verwendung in der Zellkultur wird diese Stammlösung 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

DMSO: Dimethylsulfoxid bezogen von der Firma Sigma-Aldrich, München

### 4.1.2.2 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien werden in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 1% Glutamin und 1 % Pyruvat (komplementiertes Medium) in einem Inkubator (Forma Scientific CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Firma Thermo Life Sciences, Staufen) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 96 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hierfür werden Kulturschalen der Firma TPP (Trasadingen,

Schweiz) verwendet, wobei das Kulturvolumen einer 60 mm Schale 5 ml, das einer 100 mm Schale 10 ml und das einer 150 mm Schale 20 ml beträgt.

#### 4.1.2.3 Zellpassage

Die Passage der Zelllinien erfolgt bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Zelllinien geschieht dies zwei- bis dreimal wöchentlich (NIH/3T3: jeden dritten Tag 1:3). Die Zellen werden hierfür mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sie sich von den Kulturschalen lösen. Eine Ausnahme stellen die 293 HEK-Zellen, die mit Citric Saline (1x) sowohl gewaschen als auch gelöst werden. Anschließend wird die Reaktion mit komplementiertem Medium gestoppt und die benötigte Anzahl der Zellen in neuen Kulturschalen ausplattiert.

#### 4.1.2.4 Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer

Die Zellen werden wie beschrieben von der Kulturschale gelöst und in komplementiertem Medium aufgenommen. Eine Kammer des Hämocytometers wird mit 10 µl der Zellsuspension befüllt, wobei Kapillarkräfte die Suspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer saugen. Die Kammer besteht aus neun großen Quadraten, die jeweils eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Tiefe von 0,1 mm haben. Dies ergibt ein Volumen von jeweils 0,1 µl pro Quadrat. Bei einer 100fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop (Axiovert 25 der Firma Zeiss, Jena) werden nun mindestens vier der neun großen Quadrate ausgezählt. Um Doppelzählungen der Zellen auf den Trennlinien zu vermeiden, werden nur Zellen, die oben und links auf den Linien der Quadrate liegen, mitgezählt. Nach Ermittlung des Mittelwertes wird die Zellzahl anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times 10^4 = \text{Zellkonzentration pro Milliliter}$$

Verdünnungsfaktoren sind zu berücksichtigen.

#### 4.1.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Die Zellen werden entsprechend dem Vorgehen beim Passagieren von der Kulturschale gelöst und bei 1200 rpm für drei Minuten bei 23°C zentrifugiert (Megafuge 2.0R der Firma Heraeus, Hanau). Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet in 900 µl FKS resuspendiert und in ein Cryo Tube<sup>TM</sup> Vial der Firma Nunc A/S (Roskilde, Dänemark) überführt. Unmittelbar vor dem Einfrieren werden 100 µl DMSO zugefügt und untergemischt. Unter Verwendung eines Nalgene<sup>R</sup> Qualifreeze Cryo-Einfriergerät (bezogen von der Firma Qualilab Bender & Hobein, Delaware, USA) erfolgt das Einfrieren bei -80°C. Die Abkühlrate

liegt bei 1°C pro Minute. Nach 24 Stunden werden die Zellen zur Langzeitlagerung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff überführt.

Auftauen:

In eine Zellkulturschale (100 mm) wird 10 ml vorgewärmtes komplementiertes Medium vorgelegt. Das Cryo Tube<sup>TM</sup> Vial mit den Zellen wird aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37°C warmen Wasser rasch aufgetaut. Sobald der Inhalt vollkommen aufgetaut ist, werden die Zellen in die Kulturschale überführt. Am folgenden Morgen wird das Medium der Kulturschale gewechselt, um letzte Reste des DMSO zu entfernen.

## **4.2 Adenovirale Materialien und Methoden**

### **4.2.1 Verwendete adenovirale Vektoren**

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren handelt es sich um Adenoviren des Serotyps 5, die der ersten Generation adenoviraler Vektoren angehören. Sie alle weisen eine Deletion der E1- und der E3-Region des Wildtyp-Virus auf und sind in der E1-Region entsprechend der folgenden Liste mit Transgenen/Expressionskassetten substituiert.

Im Einzelnen sind dies (siehe auch Abbildung 1):

**AdEGFP:** Dieser Vektor trägt den Promotor des Cytomegalievirus (CMV) und als zu exprimierendes Gen das Gen des Enhanced Green Fluorescent Proteins (EGFP). Als weitere regulatorische Einheit liegt das Polyadenylierungssignal des SV40 (SV40 pA) vor (ANTON et al. 2005).

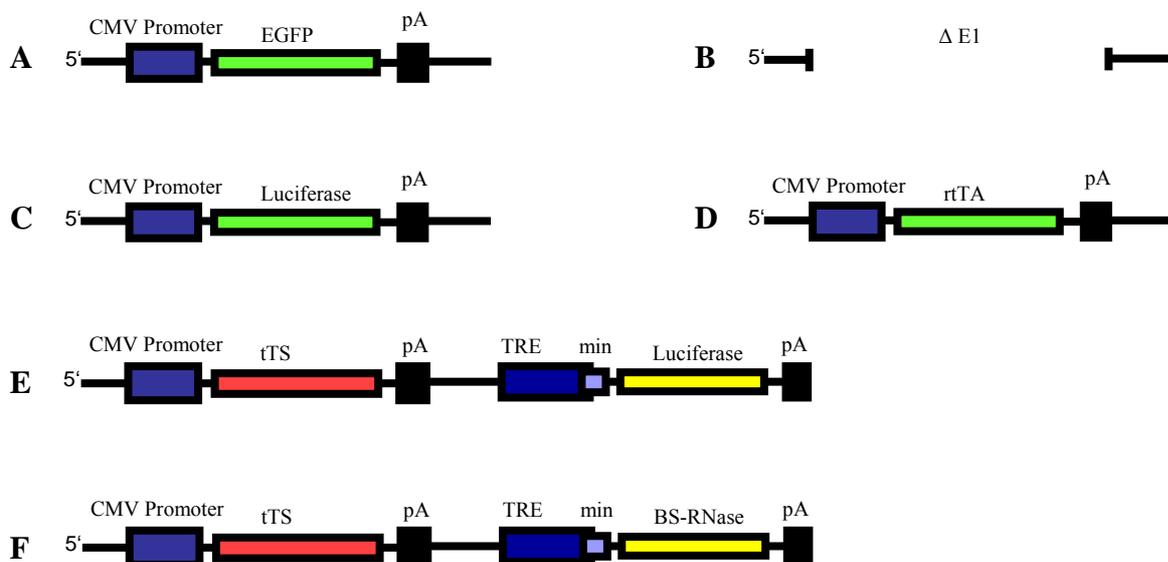
**Add170-3:** Der Vektor wird als Leervirus bezeichnet, da kein Zielgen exprimiert wird (BETT et al. 1994).

**AdCMVluc:** Dem CMV-Promotor folgt bei diesem Vektor das Gen des Enzyms Luciferase (luc) und das SV40 pA (ANTON und GRAHAM 1995).

**AdCMVrtTA:** Der Vektor trägt den Code für den reversen Transaktivator des Tet-On-Systems (rtTA) unter Kontrolle des CMV-Promotors gefolgt von SV40 pA. (ANTON unveröffentlicht).

AdtTSluc: Als Responsevektor des Tet-On-Systems trägt dieser Virus sowohl das Gen des Tetrazyklin Response Element (TRE) als kontrollierbaren Promotor des Luciferase-Zielgens, als auch den Code für den Tetrazyklin-kontrollierten Transkriptionalen Dämpfer (tTS) (ANTON unveröffentlicht).

AdtTSr: Es handelt sich ebenfalls um einen Responsevektor des Tet-On-Systems, der bei Induktion als Zielgen die BS-RNase (r) exprimiert (ANTON unveröffentlicht).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des linken Endes der verwendeten adenoviralen Vektoren (A-F):**

**A:** AdEGFP; **B:** Add170-3; **C:** AdCMVluc; **D:** AdCMVrtTA; **E:** AdtTSluc; **F:** AdtTSr

CMV Promotor: Promotor des Cytomegalievirus; EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein;

rtTA: reverser Tetrazyklin kontrollierter Transaktivator;

tTS: Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionaler Dämpfer/Silencer;

TRE: Tetrazyklin Response Element; min: min. CMV-Promoter; pA: Poly-Adenylierungssignal

Alle verwendeten adenoviralen Vektoren stammen aus Laborbeständen der AG Anton des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung des Klinikums Rechts der Isar, München (ANTON unveröffentlicht). Sie wurden für diese Arbeit neu amplifiziert und aufgereinigt.

#### 4.2.2 Lösungen und Zusätze

PBS<sup>2+</sup>: Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) nach Dulbecco (1x)  
bezogen von der Firma Biochrom, Berlin  
mit zusätzlich 1 % 49 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 % 68 mM CaCl<sub>2</sub>

68 mM CaCl<sub>2</sub>: 1 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in 100 ml ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert

49 mM MgCl<sub>2</sub>: 1 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 100 ml ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert

Doxyzyklin: Für die Verwendung in der Zellkultur wird Doxyzyklin der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München in ddH<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt in 100 µl Aliquots bei -20°C.

2x-Medium für Agarüberschichtung:

100 ml DMEM

12 ml 10x MEM Minimum Essential Medium-Eagle (10x)  
mit Earle's Salt  
Invitrogene-Corporation, Paisley, UK

3,2 ml NaHCO<sub>3</sub> (7,5 %)

0,4 ml Amphotericin B (500x) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2 ml Penicillin / Streptomycin 10.000 E/10.000 µg/ml

2 ml Glutamin 200 mM Glutaminlösung,  
Biochrom, Berlin

2 ml Hefeextrakt (5 %) Bacto™ Yeast Extract  
Becton Dickinson, Heidelberg

10 ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert: 20 Minuten bei 56°C)  
Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
München, gelagert bei -20°C

5 % Natriumdeoxycholate: 5 g Natriumdeoxycholate in 100 ml dd H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

2 M MgCl<sub>2</sub>: 40,6 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 100 ml ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert

DNase I Lösung: 20 mM Tris/HCl (mit HCl auf pH 7,5 eingestellt)

50 mM NaCl

10 mM Dithiothreitol

0,1 mg/ml BSA

Bovine Serum Albumine, Fraktion V,  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
München

50 % Glycerol

10 mg/ml DNase I

DNase I Grade II

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

1,35 CsCl-Lösung: 70,4 g CsCl in 129,6 g 10 mM Tris (pH 8,0), sterilfiltriert

1,25 CsCl-Lösung: 54,0 g CsCl in 146,0 g 10 mM Tris (pH 8,0), sterilfiltriert

Soweit nicht anderweitig erwähnt stammen alle Reagentien von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München.

#### **4.2.3 Herstellung eines Adenovirus Crude Stocks**

Zur Amplifizierung werden vier bis acht 150 mm Kulturschalen 293 HEK-Zellen mit einer M.O.I. (Multiplicity of Infection) 10 des gewünschten adenoviralen Vektors infiziert und inkubiert. Die Zellen werden nach circa zwei Tagen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet, wenn der zytopathische Effekt (c.p.e.) fast vollständig eingetreten ist (Zellen runden sich ab, haften der Kulturschale aber noch an), und mit 2700 rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes werden alle Pellets in 4-8 ml PBS<sup>2+</sup> mit 10 % Glycerin vereinigt und bei – 80°C eingefroren.

Der gefrorene Crude Stock wird vor der Titration dreimal aufgetaut und wieder bei – 80°C eingefroren, um das Virus aus den Zellen freizusetzen.

#### **4.2.4 Adenovirus Titration**

Die Titration dient zur Bestimmung des Virustiters, der in pfu (Plaque forming units = Plaque bildende Einheiten) angegeben ist.

293 HEK-Zellen werden am Vortag der Titration in 60 mm Kulturschalen ausgelegt. Am Tag der Titration werden von dem zu bestimmenden adenoviralem Vektor zwei voneinander

unabhängige Verdünnungsreihen mit PBS<sup>2+</sup> in Zehnerschritten hergestellt. Die Infektion erfolgt im Doppelansatz für beide Reihen mit Verdünnungen von 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-10</sup> (je nach erwartetem Titer) mit 200 µl pro Schale. Während der Inkubation der Kulturschalen von 30 Minuten im Inkubator wird ein 2x-Medium mit gleichem Teil 1 % SeaKem<sup>R</sup> LE Agarose (Firma BioWhittaker Molekular Applications, Rockland, USA) vermischt und bei 44°C flüssig gehalten. Anschließend wird mit der Mischung eine Beschichtung für die Kulturschalen gegossen (10 ml pro Schale). Nach Verfestigung dieser Übersichtung bei Raumtemperatur werden die Kulturschalen bei 37° C im Inkubator gelagert.

Nach sieben und zehn Tagen werden die entstandenen Plaques im Zellrasen abgelesen. Die pfu errechnen sich nach zehn Tagen aus der Formel:

$$\text{Plaques} \times 5 \times \text{Verdünnung} = \text{pfu/ml}$$

#### **4.2.5 Cäsiumchlorid-Aufreinigung von Adenoviren**

Zwanzig 150 mm Kulturschalen 293 HEK-Zellen werden mit Crude Stock infiziert (M.O.I: 5–10), nach circa zwei Tagen geerntet und zentrifugiert (2700 rpm, 20 Minuten, RT, Megafuge 2.0R der Firma Heraeus, Hanau). Nach Verwerfen des Überstandes werden die Pellets in

10 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) gelöst und bei – 80°C gelagert.

Der Crude Stock wird nach dem Auftauen mit einem Zehntelvolumen 5 %iger Natriumdeoxycholate-Lösung (in H<sub>2</sub>O) versetzt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden 100 µl 2 M MgCl<sub>2</sub> und 50 µl DNase I-Lösung zugegeben, gut gemischt und wiederum für 30–60 Minuten inkubiert, bis die Viskosität der Probe nur etwas über der von Wasser liegt (alle 10 Minuten schwenken). Nach erneuter Zentrifugation

(15 Minuten bei 5°C und 4000 rpm) werden jeweils 5 ml des Überstandes auf einen Gradienten aus 5 ml 1,35 CsCl-Lösung und 4 ml 1,25 CsCl-Lösung in zwei Beckman Zentrifuge Röhrrchen (5/8 x 4 UC Tube, Firma Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA) gegeben und in der Optima<sup>TM</sup> LE-80K Ultrazentrifuge (Firma Beckman Instruments GmbH, München) bei 35 K und 10°C für circa vier Stunden zentrifugiert (Rotor: SW 32 Ti, Beckman Instruments GmbH, München). Die Virusbanden setzen sich an der Grenze der 1,35 zur 1,25 CsCl-Lösung ab und können mit Hilfe einer Spritze entnommen, gemeinsam in ein neues Beckman Zentrifugenröhrrchen überführt und mit 1,35 CsCl-Lösung bedeckt werden. Es folgt eine erneute Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (35 K, circa 24 Stunden, 10°C). Die hierbei entstandene Virusbande wird in möglichst geringem Volumen entnommen und in eine Dialyse-Kassette (Slide-A-Lyzer<sup>R</sup> 10K Dialysis Cassettes, Firma Pierce, Rockford, USA)

überführt, um darin bei 4°C und dreimaligen Wechsel von PBS für mindestens 24 Stunden dialysiert zu werden. Anschließend wird die Viruslösung der Dialyse-Kassette entnommen und mit je 1 % 49 mM MgCl<sub>2</sub> und 68 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 % Glycerin versetzt. Die Lagerung der Viruslösung erfolgt in kleinen Aliquots bei – 80°C. Der Titer des Virus kann nun bestimmt werden (siehe Punkt 4.2.4).

#### **4.2.6 Infektion**

Für die Infektion von Zellen mit adenoviralen Vektoren sollte die Anzahl der zu infizierenden Zellen bekannt sein (z.B. 150 mm Kulturschale 293 HEK-Zellen = circa  $1 \times 10^7$  Zellen) oder festgestellt werden (Zellzählung im Hämozytometer) und die gewünschte M.O.I. gewählt werden. Die Menge des einzusetzenden Virus errechnet sich nach folgender Formel:

$(\text{Zellzahl pro Kulturschale} \times \text{Zahl der Kulturschalen} \times \text{M.O.I.}) / \text{Virustiter} = \text{ml Viruslösung}$

Virustiter            pfu/ml (siehe Punkt 4.2.4)

M.O.I.                Multiplicity of Infection = Zahl der Viren pro Zelle zum Zeitpunkt der Infektion

Die errechnete Menge der Viruslösung wird mit PBS<sup>2+</sup> auf das benötigte Volumen aufgefüllt. Nach Absaugen des Mediums der Kulturschalen mit den zu infizierenden Zellen erfolgt die Infektion (4 ml pro 150 mm Kulturschale; 200 µl pro 60 mm Kulturschale). Die Schalen werden vorsichtig geschwenkt, um die Viruslösung gut zu verteilen, und im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 96 % Luftfeuchtigkeit) für 30 Minuten inkubiert (nach 15 Minuten erneutes Schwenken). Anschließend wird komplementiertes Medium entsprechend der Größe der Kulturschalen zugegeben und die Schalen weiter inkubiert.

### **4.3 Infizierbarkeit der Zelllinien mit adenoviralen Vektoren**

#### **4.3.1 Prinzip**

Um die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien mit den adenoviralen Vektoren zu bestimmen, werden die Zellen mit dem Vektor AdEGFP infiziert, der EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) als Zielgen unter Kontrolle des CMV-Promoters trägt. Die Infizierbarkeit der verschiedenen Zelllinien lässt sich über den Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen jeder Linie vergleichen. Die Zellen werden hierzu am Vortag (Tag eins) der Infektion in 60 mm Kulturschalen ausgelegt. Die Infektion erfolgt am Tag zwei mit dem Vektor AdEGFP bei unterschiedlichen M.O.I.. Die gebildete Fluoreszenz kann nun mittels verschiedener

Methoden beurteilt und für jede Zelllinie die MOI bestimmt werden, bei der 50 Prozent der Zellen infiziert sind (MOI 50).

#### **4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie und Fotodokumentation**

Am Tag drei werden die Kulturschalen der verschiedenen Zelllinien zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 der Firma Carl Zeiss AG (Göttingen) betrachtet, um die entstandene Fluoreszenz bei variabler M.O.I. zu beurteilen, und anschließend mit Hilfe einer Nikon Cool Pix 990 Digitalkamera, die an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen ist, dokumentiert.

#### **4.3.3 Durchflusszytometrie**

Mit der Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorter/Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer) werden Zellen aufgrund unterschiedlicher physikalischer Charakteristika voneinander getrennt und gemessen. Hierbei können sowohl Zellform, Zellgröße (forward scatter) und Granularität (side scatter) als auch von den Zellen emittiertes Fluoreszenzlicht berücksichtigt werden. Die Zellen befinden sich in Suspension und werden zusätzlich mit einem Puffer verdünnt (Hüllstrom-Flüssigkeit). Die Messung der relativen Fluoreszenzstärke erfolgt in den Kanälen FL1, FL2 oder FL3. Die Zellsuspension passiert einen Argon-Laserstrahl, wodurch vorhandenen Fluorochrome (wie z.B. EGFP) zur Fluoreszenz angeregt werden und das emittierte Fluoreszenzlicht gemessen werden kann. Dies wird durch Umwandlung in elektrische Signale dokumentiert. Gleichzeitig wird die Lichtstreuung registriert und daraus Größe und Gestalt der Zelle errechnet. Die jeweiligen Ausgangszelllinien (nicht-transduziert) werden als Negativkontrolle mitgemessen. Eine Messung umfasst jeweils 20000 im FACS detektierte Ereignisse.

Zur Vorbereitung auf die FACS-Analyse werden die Zellen in den jeweiligen Kulturschalen wie beschrieben trypsiniert, in komplementiertem Medium aufgenommen und bei 1200 rpm für vier Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Varifuge 3.0R der Firma Heraeus, Hanau). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. In einem 5 ml Polystyrene Round-bottom Tube mit Cell-Strainer-Cap (Firma Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) werden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert, um sie zu vereinzeln und anschließend mit dem FACS Vantage<sup>TM</sup> der Firma Becton Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, USA) zu messen (Kanal FL3).

Zur Auswertung wird die zugehörige Software Cell Quest Version 3.1f verwendet.

FACS-Puffer: PBS mit 1 % FKS

#### **4.4 Sensitivität der Zelllinien gegenüber gereinigter BS-RNase**

##### **4.4.1 Prinzip**

Die Bestimmung der Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber BS-RNase erfolgt mit gereinigter BS-RNase, die dem Labor freundlicherweise von Josef Matousek (Tschechische Republik) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Zellen werden am Tag eins in definierter Anzahl in einer 96-Lochplatte (Firma TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgelegt (90 µl/Loch) und inkubiert. Am Tag zwei erfolgt die Zugabe von gereinigter BS-RNase in verschiedenen Konzentrationen, gelöst in PBS (10 µl/Loch, jeweils Dreifachansatz). Als Negativkontrolle dient PBS. Anschließend werden die Zellen für drei Tage weiter inkubiert. Durch Messung der Anzahl der überlebenden Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von BS-RNase kann die individuelle Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber dem Enzym ermittelt werden.

##### **4.4.2 XTT-Assay**

Verwendet wird das Cell Proliferation Kit II (XTT) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

Es handelt sich um einen kolorimetrischen Assay zur nichtradioaktiven Quantifizierung der Zellproliferation und –lebensfähigkeit. Hierbei wandeln metabolisch aktive Zellen durch ihre mitochondriale Dehydrogenase das gelbe Tetrazoliumsalz XTT (Natrium3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonicacidhydrate) in einen orangefarbenen Farbstoff um. Dieser ist wasserlöslich und kann mit Hilfe eines ELISA Readers quantifiziert werden. Die Durchführung des Assays erfolgt am Tag fünf. Zunächst wird als Standard eine serielle Verdünnungsreihe (1:1) der jeweiligen Zelllinie von 20000 bis 0 (entspricht komplementiertem Medium) Zellen mit 100 µl/Loch in der 96-Lochplatte ausgelegt. Entsprechend der Anweisung werden 50 µl des XTT-Reagenz (bestehend aus XTT labeling reagent und Electron-coupling reagent im Verhältnis 50:1) zu jedem Loch des Standards und der jeweiligen BS-RNase-Konzentrationen zugegeben und die Platte weiter inkubiert. Die Messung im GENios der Firma Tecan (Krailsheim) mit Hilfe der Software: XFIUOR4 Version V 4.50 (Absorbance: Wellenlänge 492 nm, Referenzwellenlänge 750 nm zur Messung der Hintergrundabsorption) findet zu den

Zeitpunkten vier, 21 und 24 Stunden statt (Zeitpunkt null entspricht Zugabe der XTT-Reagenz).

Anhand des Standards kann nun die Zahl der überlebenden Zellen für jede Konzentration bestimmt werden. Dreifachansätze werden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

## **4.5 Optimale Ratio zwischen dem Transaktivatorvirus und dem Responsevirus**

### **4.5.1 Prinzip**

Es soll die optimale Ratio zwischen dem Transaktivatorvirus und dem Responsevirus des Tet-On-Systems für die jeweilige Zelllinie ermittelt werden, d.h. die Ratio, bei der nach Infektion und Induktion mit dem Tet-On-System die höchste Biosyntheseaktivität, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, festgestellt werden kann. Verwendung findet dafür der Responsevektor AdtTSluc, der das Gen der Luciferase als zu exprimierendes Gen trägt. Die entstehende Biolumineszenz wird mittels eines Assays gemessen.

Damit kann die unterschiedlich starke Regulation der Expression bei den verschiedenen Ratios zwischen Transaktivatorvirus und Responsevirus beurteilt werden. Der Assay kann unkompliziert als Mikrotiterassay in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden und erlaubt die gleichzeitige Messung multipler Proben.

Hierfür werden am Tag eins die Zellen in einer 24-Loch-Platte der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) ausgelegt.

Am Tag zwei folgt die Infektion mit fünf verschiedenen Ratios von Transaktivatorvirus AdCMVrtTA (TA) zu Responsevirus AdtTSluc (R), bei einer Gesamt-M.O.I. von 10 ( $MOI_{TA} + MOI_R = 10$ ). Pro Ratio werden jeweils sechs Loch der Platte infiziert.

Sechs Loch der 24-Loch-Platte werden als Referenz mit dem Vektor AdCMVluc mit einer MOI. von 10 infiziert.

Nach Ende der Infektion wird zu jeweils drei Loch einer Ratio bzw. der Referenz ausschließlich komplementiertes Medium gegeben, während die restlichen drei Loch komplementiertes Medium mit zusätzlich Doxyzyklin (1 µg/ml) erhalten, um die Genexpression zu induzieren.

Die 24-Loch-Platte wird anschließend weiter inkubiert.

## 4.5.2 Luciferase-Assay

### 4.5.2.1 Lösungen und Puffer

Luciferin-Puffer: 60 mM Dithiothreitol

10 mM Magnesiumsulfat

1 mM ATP

30 µM D (-)-Luciferin Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

25 mM Glycyl-Glycin (pH 7,8)

Lyse-Puffer: 0,1 % Triton X-100

250 mM Tris/HCl (pH 7,8) Tris Base

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### 4.5.2.2 Luciferase-Assay

Am Tag vier wird zunächst das Medium der 24-Loch-Platte abgesaugt und anschließend werden die Zellen mit 200 µl PBS pro Loch gespült. Dann erfolgt die Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer pro Loch.

Die sich darin lösenden Zellen werden innerhalb der nächsten zehn Minuten in eine 96-Loch-Platte überführt und auf Eis gehalten.

Für die Messung der Luciferaseaktivität werden jeweils 50 µl Lysat und 100 µl Luciferin-Puffer je Probe in eine schwarze 96-Loch-Platte überführt und gemischt.

Die Messung der Biolumineszenz in Relativen Lichteinheiten (Relative Light Units = rlu) erfolgt mit dem Top Count: Microplate Scintillation & Luminescence Counter der Firma Canberra-Packard GmbH (Dreieich).

## 4.5.3 BCA Protein-Assay

Zur Ermittlung des Proteingehalts der Proben findet das BCA Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce (Rockfort, USA) Verwendung.

In einer 96-Loch-Platte wird Bovines Serum Albumin (BSA) als Standard mit Lyse-Puffer von 2 mg/ml bis auf 0,002 mg/ml verdünnt. Der Nullwert entspricht dem Lyse-Puffer.

10 µl der jeweiligen Probe werden laut Anweisung mit 200 µl Reagenz (BCA Reagent A und BCA Reagent B im Verhältnis 50:1) in der 96-Loch-Platte gemischt und diese 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgt die Messung im Genios (Firma Tecan, Krailsheim) mit Hilfe der Software XFLUOR4 Version V 4.50 bei einer

Wellenlänge von 560 nm (Absorbance). Der Proteingehalt der einzelnen Proben wird anhand des Standards berechnet.

Für die Auswertung werden die gemessenen Relativen Lichteinheiten des Luciferase-Assays auf den jeweiligen Proteingehalt der Proben bezogen (rlu/mg Gesamtprotein), um die Ergebnisse unter den verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlicher Biosyntheseaktivität vergleichbar zu machen.

## **4.6 Adenoviral induzierte BS-RNase-Produktion und Abtöten der Zellen**

### **4.6.1 Prinzip**

Hierbei wird die Produktion an BS-RNase und die dadurch induzierte Sterblichkeit der Zellen, die mit dem Tet-On-System und der in Punkt 4.5 ermittelten optimalen Ratio infiziert sind, betrachtet.

HeLa- und CMS-5-Zellen werden in jeweils zwei 24-Loch-Platten ausgelegt.

Am Tag zwei folgt die Infektion für jede Zelllinie im Doppelansatz mit der optimalen Ratio von Transaktivatorvirus AdCMVrtTA (TA) zu Responsevirus AdtTSr (R) bei einer Gesamt-M.O.I. von 30. Als Kontrollen werden der sogenannte Leervirus Add170-3 (L) mit Responsevirus (gleiche Ratio) und Leervirus allein infiziert (ebenfalls MOI 30). Die Virusverdünnung wird hierbei in PBS<sup>2+</sup> (mit 1 % Glutamin und 1% Pyruvat) ohne den Zusatz von FKS ausgeführt.

Das Infektionsschema ist nachfolgend aufgeführt (siehe Tabelle 1):

Reihe A:	TA:R
Reihe B:	L:R
Reihe C:	L

Die Infektion erfolgt mit 200 µl pro Loch und jeweils im Sechsfachansatz pro 24-Loch-Platte. Die anschließende Inkubation der Platten wird auf 45 Minuten verlängert, wobei die Platten alle fünf Minuten geschwenkt werden müssen, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach Ende der Infektion wird das Medium auf 500 µl pro Loch aufgefüllt, wobei FKS (zur Endkonzentration von zehn Prozent) zugesetzt wird. Jeweils Triplets der verschiedenen Infektionsgruppen erhalten zusätzlich zum Medium Doxyzyklin (1 µg/ml), um die Genexpression zu induzieren.

Die 24-Loch-Platten werden anschließend weiter inkubiert.

**Tabelle 1: Übersicht über das Infektionsschema einer 24-Loch-Platte**

Reihe A	TA:R	TA:R	TA:R	TA:R Dox	TA:R Dox	TA:R Dox
Reihe B	L:R	L:R	L:R	L:R Dox	L:R Dox	L:R Dox
Reihe C	L	L	L	L Dox	L Dox	L Dox
Reihe D	-	-	-	-	-	-

TA = Transaktivatorvirus; R = Responsevirus; L = Leervirus; Dox = Doxyzyklin

#### 4.6.2 XTT-Assay

Die Anzahl der die gebildete BS-RNase überlebenden Zellen wird an zwei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Dazu wird mit einer der infizierten 24-Loch-Platten 38 Stunden nach Infektion (Tag vier) ein XTT-Assay (Cell Proliferation Kit II der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die überlebenden Zellen der zweiten Platte werden nach 86 Stunden (Tag sechs) ermittelt.

Hierfür müssen die Zellen in eine 96-Loch-Platte überführt werden. Dazu wird zunächst in dieser ein Standard der jeweiligen Zelllinien ausgelegt (0 bis 160 000 Zellen). Anschließend wird der Überstand der 24-Loch-Platte entnommen und die verbliebenen Zellbestandteile abzentrifugiert (1200 rpm, 5 Minuten, RT, Zentrifuge EBA 12 der Firma Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der verbleibende Überstand wird in Eppendorf Rörchen gepoolt (jeweils Dreifachansatz der Infektion/Induktion) und bei minus 80°C für eine spätere Western Blot-Analyse aufbewahrt (siehe Punkt 4.6.3).

Die Zellen werden nun mit Trypsin (200 µl pro Loch) gelöst und in die 96-Loch-Platte überführt. Verdünnung der Zellsuspension erfolgt durch Mischen von jeweils 100 µl mit 100 µl komplementiertem Medium.

Nach Zugabe des XTT-Reagenz (laut Anweisung des Cell Proliferation Kits II) und Inkubation können nach vier Stunden der ausgelegte Standard und verschiedene Verdünnungsreihen im Victor<sup>2</sup><sub>TM</sub> 1420 Multilabel Counter der Firma Wallac Oy (Turku; Finnland) bei den Wellenlängen 490 nm und 630 nm (Referenz) gemessen werden (Absorbance, Software Wallac 1420 Manager). Dreifachansätze werden gemittelt.

### 4.6.3 Western Blot-Analyse

#### 4.6.3.1 Reagenzien, Puffer und Antikörper

4 x-Probenpuffer:        5 ml    0,5 M Tris/HCl pH6.8  
                              0.8 g    SDS  
                              2 ml     $\beta$ -mercaptoethanol  
                              3,2 ml   Glycerol  
                              0,04 g   Bromphenolblau

Marker:                    High-Range Rainbow Molecular Weight Marker  
                              Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Laufpuffer:                29g Tris                    Tris Base  
   Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
  
                              144g Glycin  
                              10g SDS  
                              auffüllen auf einen Liter mit ddH<sub>2</sub>O

Transferpuffer:         6 g Tris  
                              28,8 g Glycin  
                              400 ml Methanol  
                              auffüllen auf zwei Liter mit ddH<sub>2</sub>O

PBST-Puffer:            100 ml PBS (20x)  
                              1900 ml ddH<sub>2</sub>O  
                              2 ml Tween 20            Polyoxyethylensorbitanmonolaurate  
   Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
   München

Primärer AK:            AK gegen BS-RNase (zur Verfügung gestellt von Josef Matousek,  
                              Tschechische Republik)

Sekundärer AK: Anti-Rabbit Ig Horseradish Peroxidase labeld AK (vom Esel)  
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

ECL-Reagenz: ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System  
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

#### 4.6.3.2 Dot Blots

Die Dot Blots werden zur Ermittlung der optimalen Antikörper-Konzentration durchgeführt. Dazu werden 14 kleine Stücke einer Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore Corporation, Bedford, USA) aktiviert (15 Sekunden in Methanol, dann zwei Minuten in Aqua dest.), jeweils 25 ng gereinigte BS-RNase in PBS aufgetropft und die Membranstücke an der Luft getrocknet. Der Block erfolgt in zwei 12-Loch-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) durch PBST-Puffer mit 3 % BSA (Bovines Serum Albumin) bei Raumtemperatur für eine Stunde unter Schwenken. Anschließend werden die Membranstücke zweimal mit PBST-Puffer gewaschen und mit vier verschiedenen Verdünnungen des primären Antikörpers in PBST inkubiert (eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schüttler). Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBST folgt die Inkubation mit unterschiedlichen Verdünnungen des sekundären Antikörpers in PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die Entwicklung der Immobilon-P Transfer Membranstücke wird nach zweimaligem Waschen mit PBST mit dem ECL-System laut Anweisung durchgeführt und auf der Kodak Digital Science TM Image Station 440 CF (Firma Eastman Kodak Company, Rochester, USA) festgehalten. Hierzu wird die zugehörige Software Kodak 1D 3.5 Capture IS 440 CF verwendet.

Anhand der unterschiedlich deutlichen Darstellung der BS-RNase bei unterschiedlichen Antikörperverdünnungen können nun die optimalen Antikörperkonzentrationen für die Western Blot-Analyse festgelegt werden.

#### 4.6.3.3 Western Blot-Analyse

Zur Ermittlung der BS-RNase-Produktion wird eine Western Blot-Analyse mit dem bei der Infektion gewonnenen Überstand (siehe Punkt 4.6.2) durchgeführt. Dieser ist bei minus 80°C gelagert und wird aufgetaut.

Die Proben werden mit 4x-Probenpuffer im Verhältnis 3:1 versetzt (15 µl Probe auf 5 µl Probenpuffer) und gemeinsam mit dem High-Range Rainbow Molecular Weight Marker und der Positivkontrolle (25 ng gereinigte BS-RNase) auf ein Ready Gel (15% Acrylamid-

Trenngel, 4% Sammelgel, 12 wells a 20 µl) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) aufgetragen (20 µl pro Probe). Der Gellauf erfolgt in einer Mini-Protean 3 Cell-Kammer der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) mit Laufpuffer bei 40 mA und 4°C für circa eine Stunde, bis die Bande des Probenpuffers den unteren Rand des Geles erreicht hat. Anschließend folgt der Transfer auf eine aktivierte (15 Sekunden in Methanol, zwei Minuten in ddH<sub>2</sub>O) Immobilon-P Transfer Membran der Firma Millipore Corporation (Bedford, USA) bei 100 V und 4°C unter Rühren und zusätzlicher Wasserkühlung für 30 Minuten. Dazu wird die Transphor Tank Transfer Unit (Hoefel<sup>R</sup> TE 22 Mighty Small<sup>TM</sup>, Hoefel Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA) benutzt. Der folgende Block der Membran wird mit PBST mit 3 % BSA über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Am folgenden Tag wird nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten mit PBST (RT, Schwenken) der primäre Antikörper in der ermittelten optimalen Konzentration (Verdünnung mit PBST) zugegeben und die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Es folgt siebenmaliges Waschen mit PBST (jeweils für 10 Minuten) bevor die Membran mit dem sekundären Antikörper in der optimalen Konzentration inkubiert wird (eine Stunde, RT, Schwenken). Nach erneutem siebenmaligem Waschen (je 10 Minuten mit PBST) wird die Membran mit dem ECL-System laut Anweisung entwickelt und damit ein Röntgenfilm (Fujifilm Super RX, 18 x 24 cm der Firma Fuji Photo Film Co., LTP, Tokyo, Japan) belichtet.

#### **4.7 Statistische Auswertung**

Es werden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Aus den Ergebnissen werden mit Hilfe von Microsoft Office Excel die Mittelwerte und die Standardabweichungen bestimmt. Eine weitere statistische Auswertung erfolgt über den T-Test (ungepaart) von Microsoft Office Excel.

Die Abbildungen 8 und 14 sind mit dem Programm Graph Pad Prism 5 (Version 5.01) erstellt, ebenso wie die IC<sub>50</sub>-Werte für die Sensitivität der einzelnen Zelllinien gegenüber BS-RNase.

## **5 ERGEBNISSE**

### **5.1 Infizierbarkeit der Zelllinien mit adenoviralen Vektoren**

Um einen Eindruck zu erhalten, wie gut sich die unterschiedlichen Zelllinien mit adenoviralen Vektoren infizieren lassen, werden diese mit einem Indikatorvektor infiziert.

Verwendung finden hierbei die humanen Tumorzelllinien A431 und HeLa, die murine Tumorzelllinie CMS-5 und die benigne humane Zelllinie Hs68.

#### **5.1.1 Vorbereitung der Zelllinien**

Die Zelllinien A431, HeLa, CMS-5 und Hs68 werden wie in Punkt 4.3.1 beschrieben mit dem Vektor AdEGFP infiziert, um die Anzahl der infizierten Zellen und die Intensität der Genexpression als gemessene Fluoreszenz mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie zu ermitteln.

Die bei der Infektion verwendeten MOIs liegen im Bereich von 0,01 bis 100.

Im Einzelnen sind dies MOI

0,01 0,03 0,10 0,32 1,00 3,16 10,00 31,62 und 100,00,

wobei zwischen den Zelllinien entsprechend der zu erwartenden Infizierbarkeit, u.A. bedingt durch unterschiedliche Zellverdopplungszeiten, variiert wird.

Als Negativkontrolle (MOI 0) dient PBS<sup>2+</sup>.

Die humane Epidermoid-Karzinom-Zelllinie A431 wird bei MOI

0 0,1 0,32 1,0 3,16 10,00 31,62 und 100,00 infiziert.

Da es sich um eine vergleichsweise langsam wachende Zelllinie handelt, die erfahrungsgemäß relativ schwer infizierbar ist, wird auf eine Infektion mit den niedrigen MOIs 0,01 und 0,03 verzichtet, da hier noch keine Fluoreszenz zu erwarten ist.

Bei der murinen Fibrosarkom-Zelllinie CMS-5 wird auf MOI 100 verzichtet, da bei der schnell wachsenden Zelllinie bereits bei einer MOI von 31,62 sehr starke Fluoreszenzbildung erwartet werden kann.

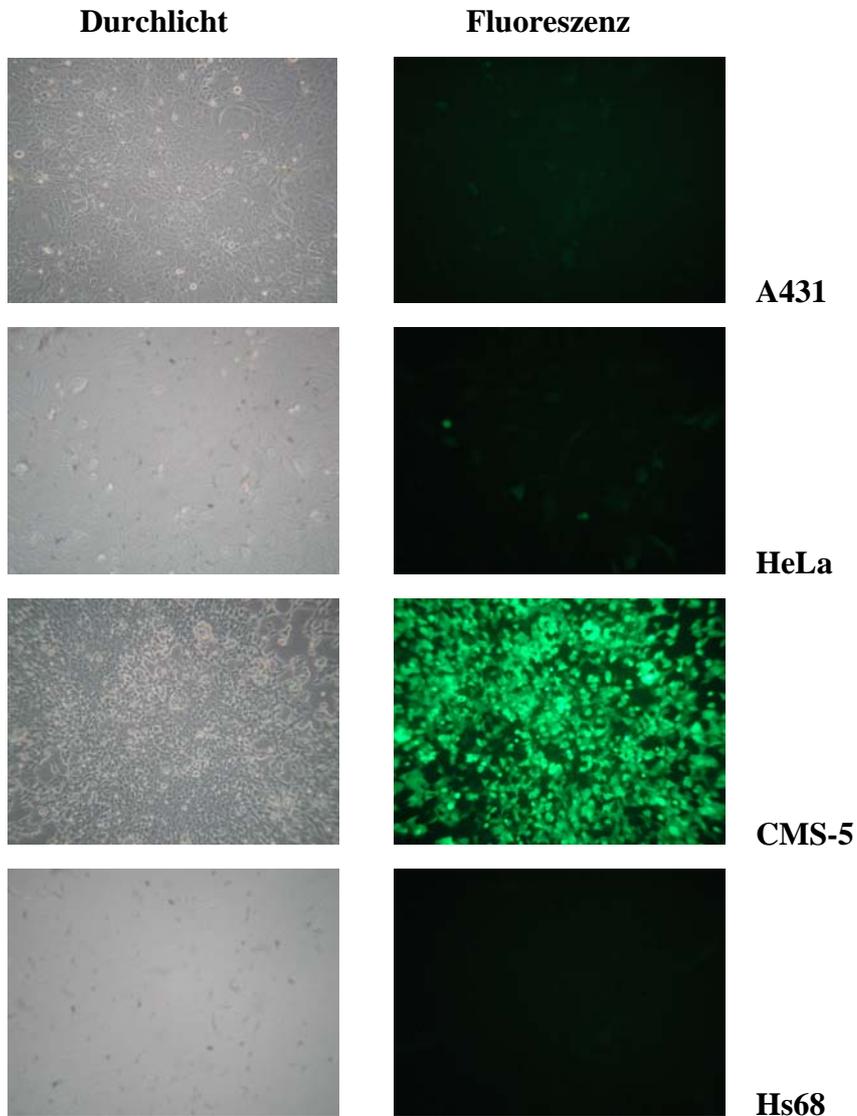
Die Zelllinien HeLa (humanes Zervix-Adenokarzinom) und Hs68 (humane Fibroblasten) werden dagegen mit dem vollen Spektrum der MOIs infiziert.

#### **5.1.2 Fotodokumentation**

Die 24 Stunden nach Infektion in den Zellen entstandene EGFP-Expression wird zunächst mit der Digitalkamera festgehalten.

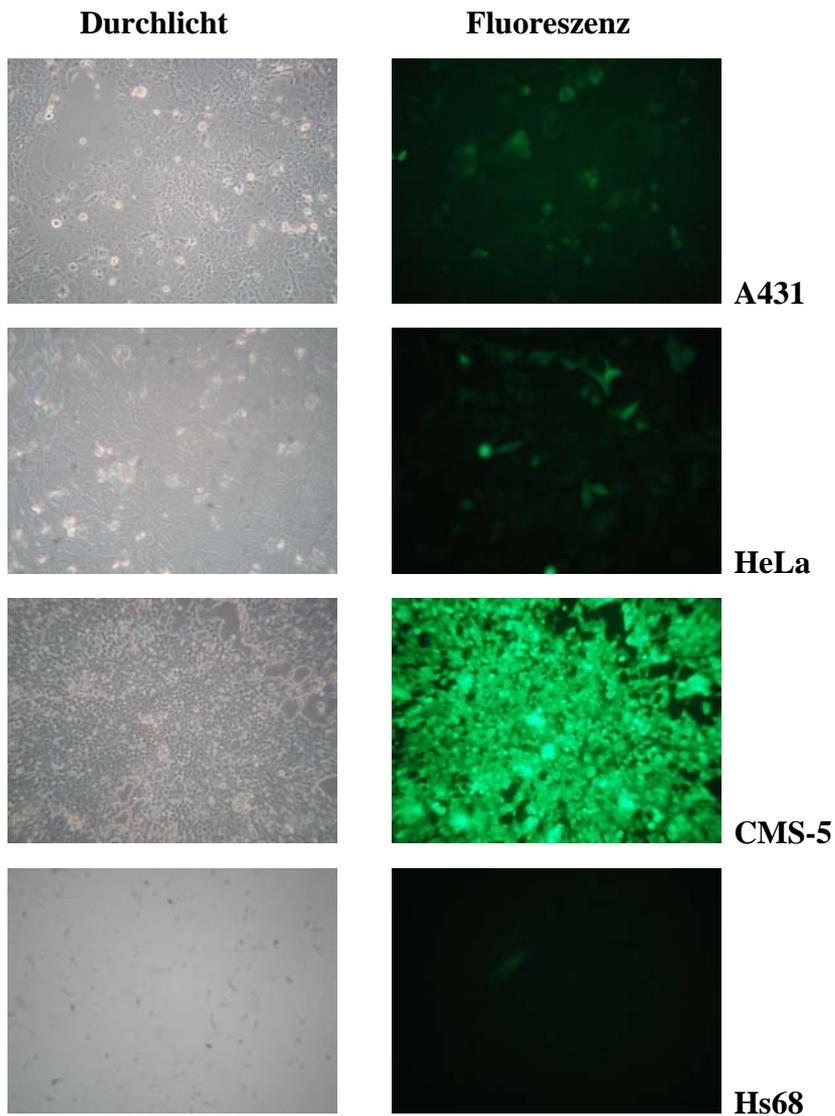
Um die unterschiedliche Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien und damit die jeweilige

Menge des gebildeten EGFP darzustellen, werden die Fluoreszenzbilder bei jeweils gleicher MOI verglichen. Exemplarisch werden hier MOI 3,16, 10,00 und 31,62 dargestellt; Abbildung 2 zeigt die entstandene Fluoreszenz bei MOI 3.16.



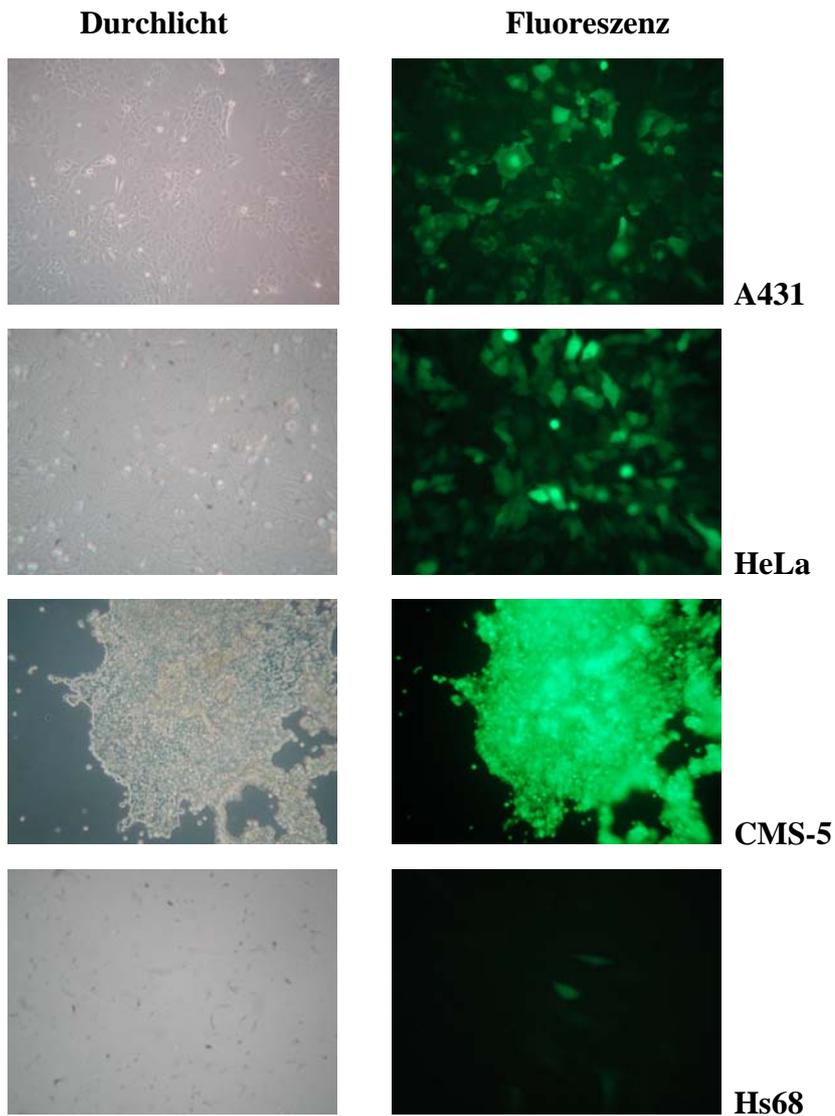
**Abbildung 2: Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 3,16:**  
Originalvergrößerung: 100x

Bereits bei der relativ niedrigen MOI von 3,16 ist bei der Zelllinie CMS-5 eine große Anzahl von Zellen infiziert und zeigt Fluoreszenz. Auch bei der Zelllinie HeLa sind einige infizierte und damit fluoreszierende Zellen zu erkennen, während bei den anderen beiden Zelllinien noch keinerlei Fluoreszenz erkennbar ist.



**Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 10,00:**  
Originalvergrößerung: 100x

Bei Infektion mit MOI 10, dargestellt in Abbildung 3, zeigen nahezu alle CMS-5-Zellen eine starke Fluoreszenz. Auch die Anzahl der infizierten HeLa-Zellen hat zugenommen und ebenso lassen sich bei den Zelllinien A431 und Hs68 einzelne fluoreszierende Zellen deutlich erkennen.



**Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 31,62:**  
Originalvergrößerung: 100x

Die Infektion mit MOI 31,62 wird in Abbildung 4 gezeigt. Hier lässt sich erkennen, dass die Zellen der Linie CMS-5 bereits beginnen, sich von der Kulturschale abzulösen. Es scheinen alle Zellen Fluoreszenz aufzuweisen. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen der anderen Zelllinien hat ebenfalls noch einmal zugenommen, wobei die Linie Hs68 die geringste Fluoreszenz aufweist.

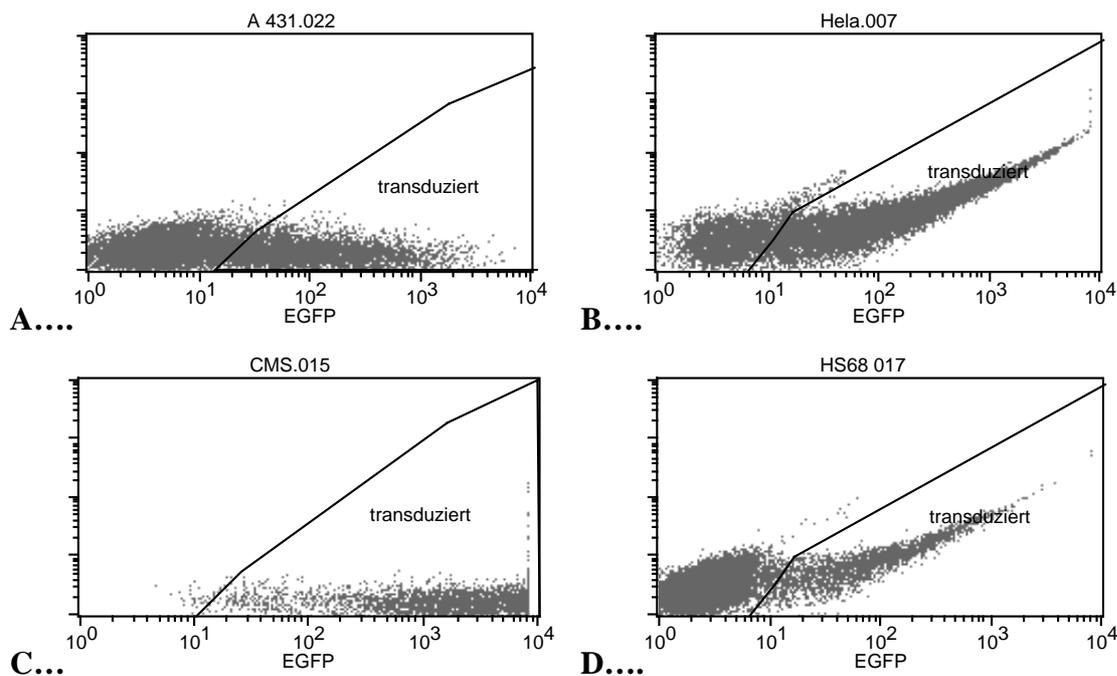
### 5.1.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die anschließende exakte Bestimmung der Anzahl der fluoreszierenden Zellen bei den verschiedenen MOIs erfolgt mit Hilfe der FACS-Analyse. Hierbei werden die Anzahl der infizierten und damit fluoreszierenden Zellen und die Intensität der jeweiligen Fluoreszenz betrachtet. Die gewonnenen Ergebnisse variieren etwas von dem Eindruck, den die Fluoreszenzmikroskopie gibt. Die rein optische Betrachtung der Fluoreszenzmikroskopie wird von der Fluoreszenzstärke jeder einzelnen Zelle beeinflusst, die wiederum von ihrem individuellen Zellstoffwechsel abhängt.

Der erlangte Gesamteindruck bleibt bei beiden Methoden jedoch nahezu erhalten.

Gezeigt werden zunächst die Ergebnisse der FACS-Analyse bei MOI 3,16, 10,00 und 31,62.

Abbildung 5 beinhaltet die Ergebnisse der Infektion mit MOI 3,16, Abbildung 6 und 7 die der Infektionen mit MOI 10 bzw. 31,62.



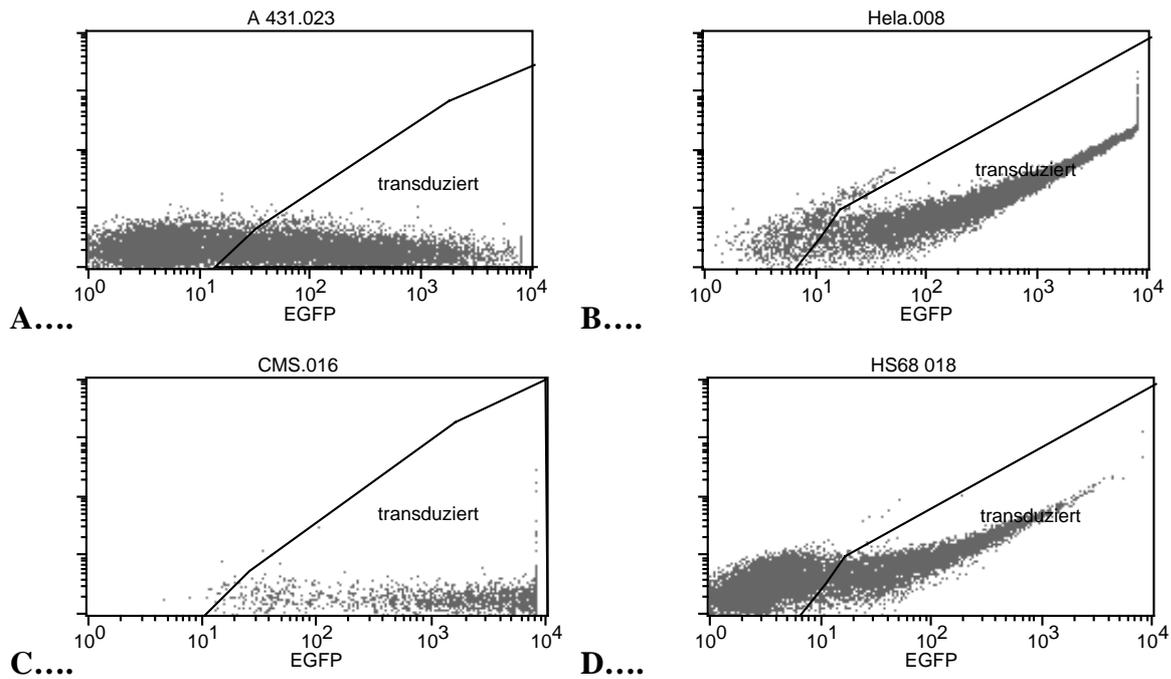
**Abbildung 5: Analyse der Transgenexpression nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 3,16 (A-D):**

**A:** A431; **B:** HeLa; **C:** CMS-5; **D:** Hs68

Gezeigt werden exemplarische Ergebnisse der FACS-Analyse. Als transduziert werden die EGFP-positiven Zellen bezeichnet. Der Anteil Zellen innerhalb dieses Bereiches an der Gesamtpopulation wird als % positiv Zellen (aller gegateten Zellen) angegeben. Die statistischen Daten sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die x-Achse bezeichnet die Fluoreszenzintensität als Maß der Genexpression.

Die y-Achse zeigt den Kanal FL3 als Maß für die Autofluoreszenz der Zellen.



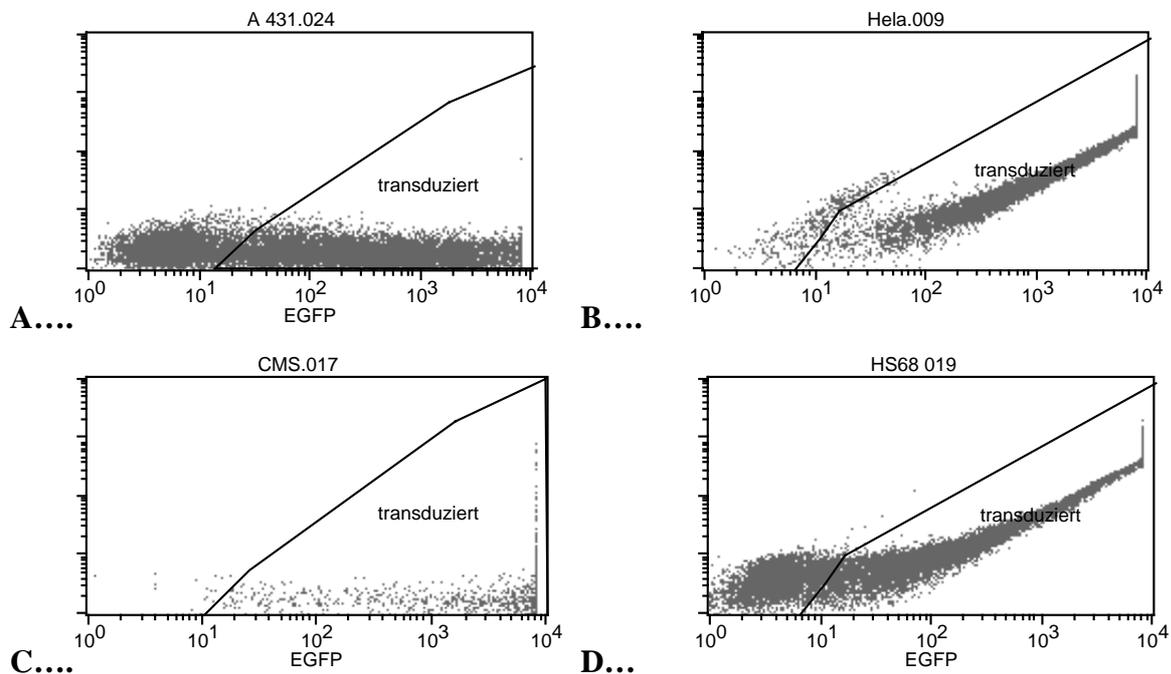
**Abbildung 6: Analyse der Transgenexpression nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 10,00 (A-D):**

**A:** A431; **B:** HeLa; **C:** CMS-5; **D:** Hs68

Gezeigt werden exemplarische Ergebnisse der FACS-Analyse. Als transduziert werden die EGFP-positiven Zellen bezeichnet. Der Anteil Zellen innerhalb dieses Bereiches an der Gesamtpopulation wird als % positiv Zellen (aller gegateten Zellen) angegeben. Die statistischen Daten sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die x-Achse bezeichnet die Fluoreszenzintensität als Maß der Genexpression.

Die y-Achse zeigt den Kanal FL3 als Maß für die Autofluoreszenz der Zellen.



**Abbildung 7: Analyse der Transgenexpression nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 31,62 (A-D):**

**A:** A431; **B:** HeLa; **C:** CMS-5; **D:** Hs68

Gezeigt werden exemplarische Ergebnisse der FACS-Analyse. Als transduziert werden die EGFP-positiven Zellen bezeichnet. Der Anteil Zellen innerhalb dieses Bereiches an der Gesamtpopulation wird als % positiv Zellen (aller gegateten Zellen) angegeben. Die statistischen Daten sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die x-Achse bezeichnet die Fluoreszenzintensität als Maß der Genexpression.

Die y-Achse zeigt den Kanal FL3 als Maß für die Autofluoreszenz der Zellen.

**Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse der FACS-Analyse**

	<b>MOI 0</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,1</b>	<b>0,32</b>	<b>1</b>	<b>3,16</b>	<b>10</b>	<b>31,62</b>	<b>100</b>
<b>A431</b>	0,09	n.d.	n.d.	1,34	3,77	9,89	25,5	44,03	60,05	67,67
<b>HeLa</b>	0,27	0,78	2	8,61	21,54	47,5	78,09	95,02	97,43	98,85
<b>CMS-5</b>	0,49	7,45	37,63	33,22	60,46	73,98	99,61	99,76	99,79	n.d.
<b>Hs68</b>	0,1	0,09	0,21	0,25	1,03	4,59	17,51	37,34	75,83	98,09

Die Zahlen geben den jeweiligen Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen bei entsprechender MOI an, der durch die FACS-Analyse ermittelt werden konnte.

MOI 0 entspricht Infektion mit ausschließlich PBS<sup>2+</sup>. Die hier gemessenen geringen Prozentwerte erklären sich durch Fluoreszenzreste im Messgerät.

Bei der Zelllinie A431 wurden, wie oben bereits erwähnt, die MOIs 0,01 und 0,03 und bei der Linie CMS-5 die MOI 100 ausgelassen (n.d.).

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der FACS-Analyse ist in Tabelle 2 dargestellt.

Weiterhin kann auch die Intensität der erzeugten Fluoreszenz bzw. deren individuelle Zunahme bei den verschiedenen Zelllinien betrachtet werden (siehe Abbildungen 2-4 und Tabelle 3). Hier zeigt sich, dass CMS-5-Zellen bei weitem die höchste Fluoreszenzintensität aufweisen. Diese steigt bereits bei niedrigen MOIs stark an und ist mit den höheren MOIs nur noch verhältnismäßig gering zu steigern.

Bei Hs68-Zellen vollzieht sich der Anstieg der Intensität wesentlich langsamer und es wird auch bei MOI 31,62 nur knapp ein Zehntel der Intensität von CMS-5-Zellen erreicht. A431- und HeLa-Zellen bewegen sich jeweils in den Bereichen zwischen diesen Extremen (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Vergleich der Fluoreszenzintensität**

	<b>A431</b>	<b>HeLa</b>	<b>CMS-5</b>	<b>Hs68</b>
<b>MOI 1</b>	160,89	132,17	2232,06	97,83
<b>MOI 3,16</b>	246,66	328,80	6471,93	141,82
<b>MOI 10</b>	479,21	1227,81	7185,78	156,04
<b>MOI 31,62</b>	1268,22	2941,75	7719,17	715,10

Die Zahlen geben die jeweilige Fluoreszenzintensität (X Mean) bei den MOIs 1, 3,16, 10 und 31,62 an. Ermittelt sind diese mit Hilfe der FACS-Analyse.

#### **5.1.4 Vergleich der Zelllinien**

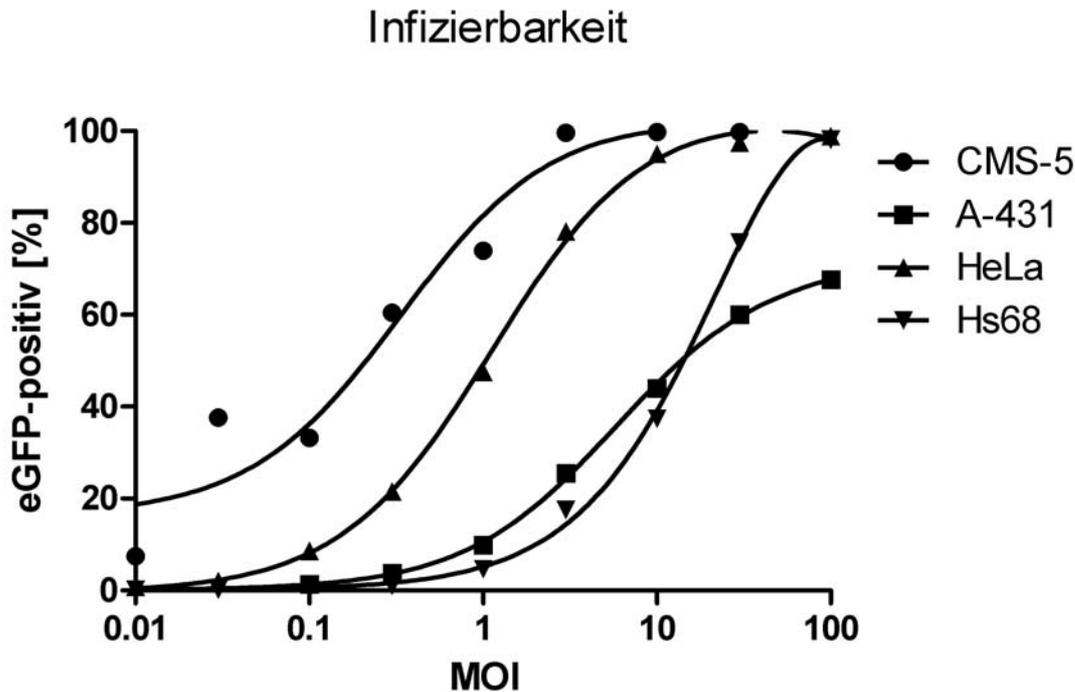
Aus den Daten geht hervor, dass die murine Zelllinie CMS-5 die Rate von fünfzig Prozent infizierter Zellen (MOI 50) schon bei einer MOI von ca. 0,2 erreicht. Bereits bei einer MOI von 0,01 findet sich hier messbare Fluoreszenz und ab MOI 3,16 sind nahezu einhundert Prozent der Zellen infiziert. Im Vergleich stellt sich diese Zelllinie damit als die von den ausgewählten Linien am leichtesten mit adenoviralen Vektoren infizierbare dar. Dies bestätigen die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie.

HeLa-Zellen sind ebenfalls mit relativ geringen Virusmengen zu infizieren und weisen bei MOI 1 ca. fünfzig Prozent EGFP-positive Zellen auf. Messbare Fluoreszenz zeigt sich bei dieser Zelllinie aber erst ab MOI 0,03 und mehr als neunzig Prozent EGFP-positive Zellen werden erst ab MOI 10 gezählt.

Die Zelllinie A431 dagegen erreicht MOI 50 erst bei ca. 20, wobei selbst mit der höchsten MOI von 100 nicht mehr als 67 % infizierte Zellen erzielt werden.

Die MOI 50 der primären Hs68-Zellen liegt ebenfalls bei ca. 20, wobei diese Zelllinie erst ab der MOI von ca. 1 deutlich messbare Fluoreszenz aufweist, aber dann im Gegensatz zu A431 bei MOI 100 nahezu einhundert Prozent EGFP-positive Zellen zeigt (siehe Tabelle 2). Die Abweichung, die sich hier zu den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie ergibt, lässt sich mit der relativ schwachen Fluoreszenz dieser Zellen erklären, die im Mikroskop nicht detektiert wird, durch die höhere Sensitivität der Methode bei der FACS-Analyse aber erfasst wird.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse aller Zelllinien sind in Abbildung 8 noch einmal vergleichend dargestellt.



**Abbildung 8: Vergleich der EGFP-positiven Zellen nach Infektion mit AdEGFP:**  
 Die Grafik beruht auf den Ergebnissen der FACS-Analyse.  
 Die y-Achse zeigt den Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen.  
 Die x-Achse bezeichnet die zunehmende MOI.

## 5.2 Sensitivität der Zelllinien gegenüber gereinigter BS-RNase

### 5.2.1 Vorbereitung der Zellen

Für diesen Versuch wird zusätzlich zu den in Punkt 5.1 verwendeten Zelllinien die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 mitbestimmt, um die Sensitivität einer murinen Nichttumor-Zelllinie mit der der murinen Fibrosarkom-Zellen CMS-5 vergleichen zu können.

Die Zellen werden wie in Punkt 4.4 beschrieben vorbereitet, wobei sich die Anzahl der in die 96-Lochplatten ausgelegten Zellen an der Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Zelllinien orientiert.

BS-RNase wird zu den unten genannten Endkonzentrationen zugegeben (jeweils 10 µl/Loch):

100 10 1 0,1 0,01 50 5 0,5 0,05 0,005 25  
 2,5 0,25 0,025 0,0025 und 0 (= PBS) µg/ml

Die Bestimmung der Lebendzellzahl wird jeweils im Dreifachansatz durchgeführt.

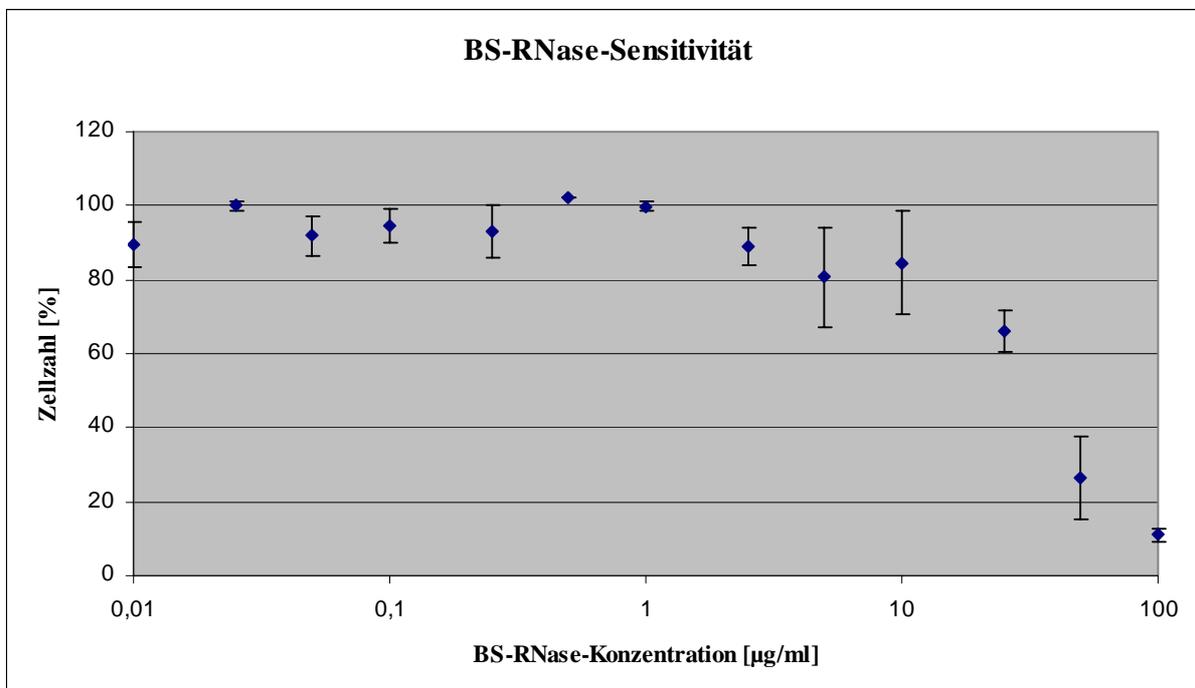
Mit Hilfe des XTT-Assays wird drei Tage nach Zugabe der BS-RNase die Rate der überlebenden Zellen bei den unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Diese Messung wird zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des XTT-Reagenz (vier, 21 und 24 Stunden) durchgeführt, da sich aber für eine Zelllinie jeweils das gleiche Bild ergibt, wird hier nur der

Messzeitraum 24 Stunden dargestellt. Das Überleben wurde nicht mittels OD-Abnahme berechnet, sondern für jede Zelllinie mittels einer Standardkurve mit bekannter Zellzahl bestimmt.

### 5.2.2 Sensitivität von A431-Zellen

Da diese Zellen eine relativ geringe Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen, sind hier jeweils 1000 Zellen pro Loch der 96-Lochplatte ausgelegt.

Ein Rückgang der Zellpopulation gegenüber dem Nullwert zeigt sich erst ab einer BS-RNase-Endkonzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$ . Bei der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  hat sich die Zahl der überlebenden Zellen auf 11,13 % des Nullwertes verringert (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Sensitivität von humanen A431-Zellen gegenüber BS-RNase**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des XTT-Assays drei Tage nach Zugabe der BS-RNase.

Die x-Achse gibt die Endkonzentration an BS-RNase wieder.

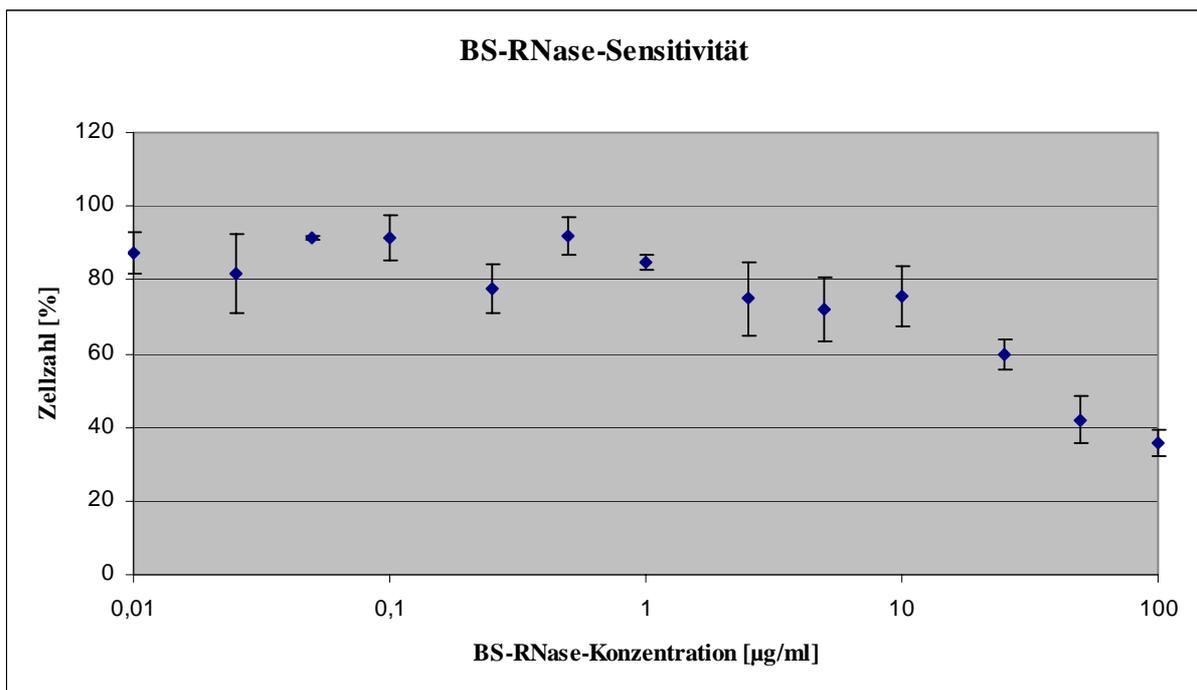
Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz der nach Zugabe von BS-RNase metabolisch aktiven Zellen. 100 Prozent entsprechen dem Nullwert.

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen dafür bestimmt.

### 5.2.3 Sensitivität von HeLa-Zellen

Die humanen Adenokarzinom-Zellen teilen sich unter Zellkulturbedingungen schnell. Es werden daher jeweils nur 500 Zellen pro Loch ausgelegt.

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, ist eine deutliche Reduktion der metabolisch aktiven Zellen auch hier erst ab einer BS-RNase-Endkonzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  zu erkennen. 100  $\mu\text{g/ml}$  reduzieren die Zellzahl auf 35,75 Prozent des Nullwertes.



**Abbildung 10: Sensitivität von humanen HeLa-Zellen gegenüber BS-RNase**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des XTT-Assays drei Tage nach Zugabe der BS-RNase.

Die x-Achse gibt die Endkonzentration an BS-RNase wieder.

Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz der nach Zugabe von BS-RNase metabolisch aktiven Zellen.

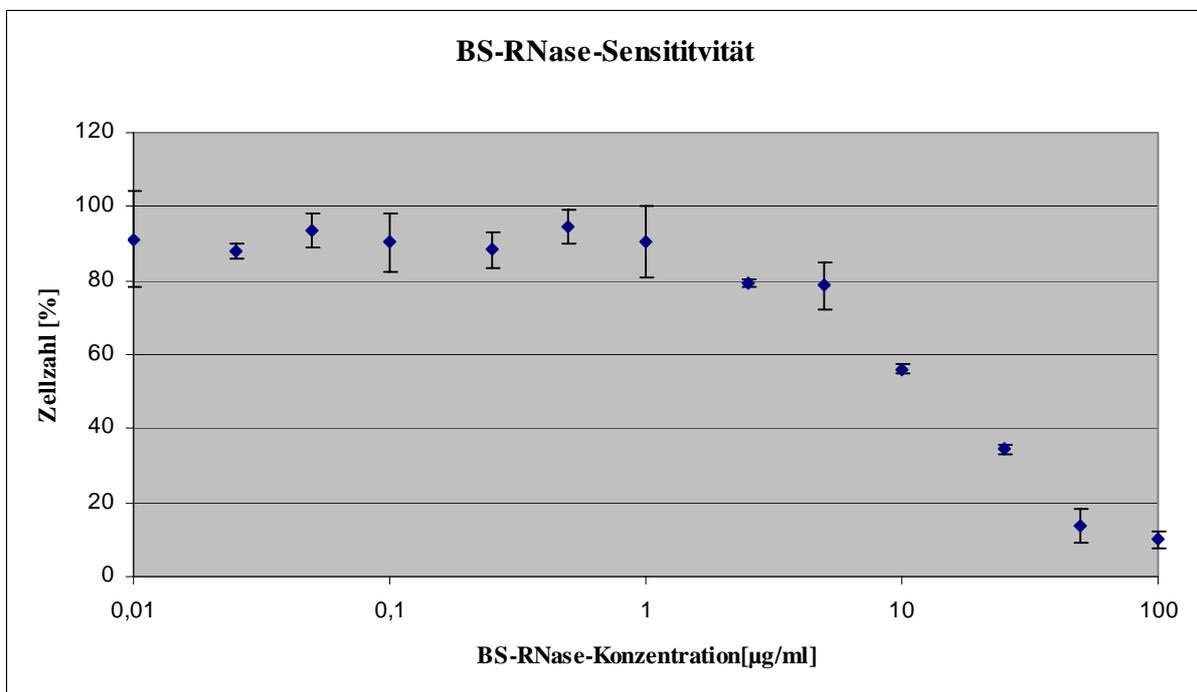
100 Prozent entsprechen dem Nullwert.

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen dafür bestimmt.

#### 5.2.4 Sensitivität von CMS-5-Zellen

Murine Fibrosarkom-Zellen CMS-5 werden ebenfalls zu 500 Zellen pro Loch der 96-Lochplatte ausgelegt, da auch sie ein schnelles Wachstum unter Zellkulturbedingungen aufweisen.

Hier lässt sich eine deutliche Reduktion der lebenden Zellen bereits ab einer Endkonzentration an BS-RNase von 10 µg/ml nachweisen. Die höchste Konzentration von 100 µg/ml bewirkt einen Rückgang auf 10 Prozent der unbehandelten Kultur (dargestellt in Abbildung 11).



**Abbildung 11: Sensitivität von murinen CMS-5-Zellen gegenüber BS-RNase**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des XTT-Assays drei Tage nach Zugabe der BS-RNase.

Die x-Achse gibt die Endkonzentration an BS-RNase wieder.

Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz der nach Zugabe von BS-RNase metabolisch aktiven Zellen.

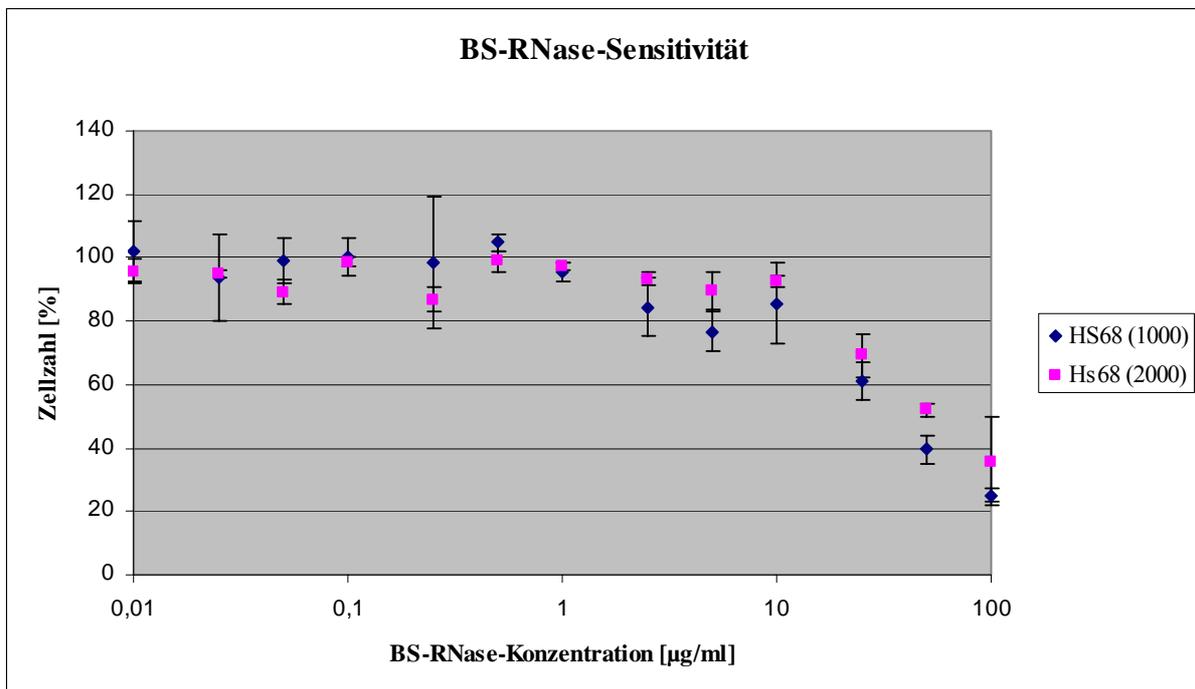
100 Prozent entsprechen dem Nullwert.

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen dafür bestimmt.

### 5.2.5 Sensitivität von Hs68-Zellen

Die primäre Zelllinie Hs68 zeichnet sich durch sehr langsames Wachstum aus. Um festzustellen inwieweit die Zelldichte in den Kulturschalen und, damit verbunden, die Zellzyklusphase Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber BS-RNase haben, werden die Zellen in zwei Ansätzen in jeweils unterschiedlicher Anzahl (1000 bzw. 2000 Zellen pro Loch) ausgelegt. Es zeigt sich, dass Zellen, die in einer geringeren Dichte vorliegen und sich daher eher in einer Wachstumsphase des Zellzyklus befinden, eine größere Sensitivität gegenüber BS-RNase aufweisen, als Zellen, die sich in größerer Dichte und damit eher in einer Ruhephase befinden. Eine deutliche Abnahme der metabolisch aktiven Zellen ist allerdings sowohl bei geringerer als auch bei höher Dichte erst ab einer Endkonzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  BS-RNase erkennbar. Die höchste Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  reduziert dagegen die überlebenden Zellen geringerer Dichte auf 25,19 Prozent, die höherer Dichte nur auf 35,76 Prozent der Negativkontrolle.

Graphisch dargestellt sind diese Ergebnisse in Abbildung 12.



**Abbildung 12: Vergleich der Sensitivität von humanen Hs68-Zellen bei unterschiedlicher Dichte der Zellen in der 96-Lochplatte gegenüber BS-RNase**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des XTT-Assays drei Tage nach Zugabe der BS-RNase.

Die x-Achse gibt die Endkonzentration an BS-RNase wieder.

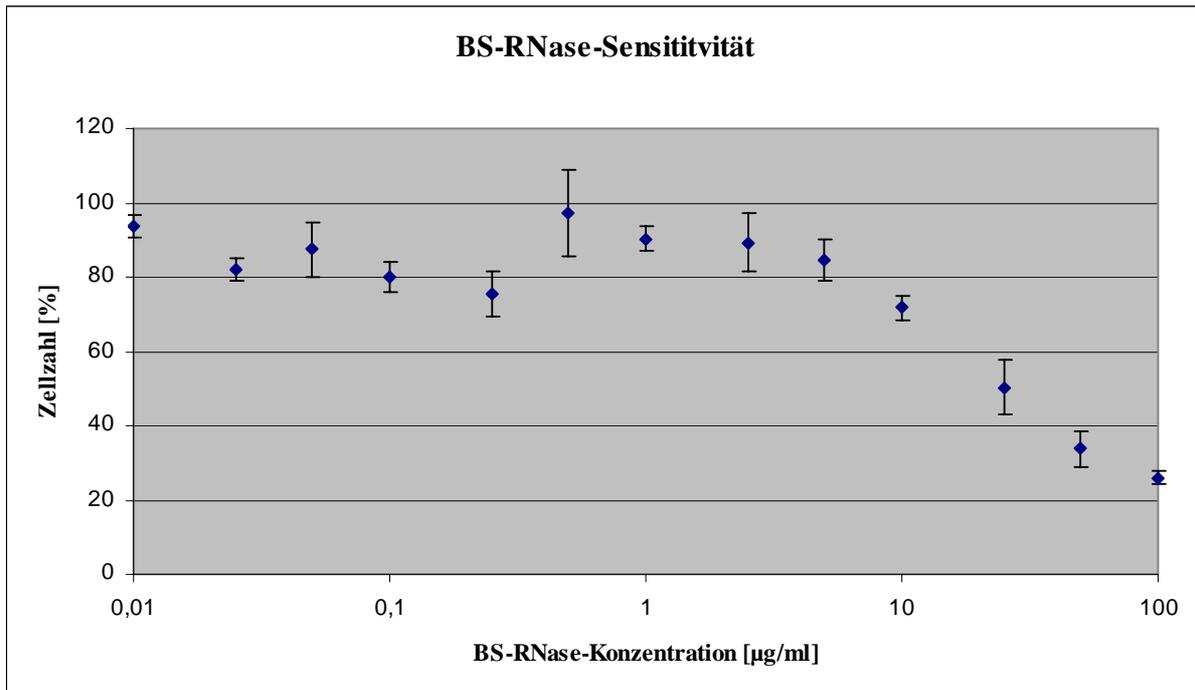
Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz der nach Zugabe von BS-RNase metabolisch aktiven Zellen.

100 Prozent entsprechen dem Nullwert.

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen dafür bestimmt.

### 5.2.6 Sensitivität von NIH/3T3-Zellen

Von der murinen Zelllinie NIH/3T3 werden ebenfalls 500 Zellen pro Loch ausgelegt. Ein nennenswerter Rückgang der Zellzahl ist hier ab einer BS-RNase-Konzentration von 25 µg/ml zu erkennen. Die höchste Konzentration an BS-RNase reduziert die Zellen auf 25,93 Prozent des Nullwertes (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13: Sensitivität von murinen NIH/3T3-Zellen gegenüber BS-RNase**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des XTT-Assays drei Tage nach Zugabe der BS-RNase.

Die x-Achse gibt die Endkonzentration an BS-RNase wieder.

Die Y-Achse zeigt den Prozentsatz der nach Zugabe von BS-RNase metabolisch aktiven Zellen.

100 Prozent entsprechen dem Nullwert.

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen dafür bestimmt.

### 5.2.7 Vergleich der Zelllinien

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich keine der getesteten Zelllinien mit den verwendeten Konzentrationen an BS-RNase vollständig abtöten lässt. Die murinen Fibrosarkom-Zellen CMS-5 weisen die größte Empfindlichkeit gegenüber der RNase auf, da sich bereits ab einer Endkonzentration von 10 µg/ml eine Reduktion der Zellzahl messen lässt. Sie zeigen außerdem bei der höchsten hier verwendeten Konzentration von 100 µg/ml die geringste Anzahl an überlebenden Zellen (10 Prozent). Die übrigen Zelllinien liegen relativ eng beieinander, wobei sich A431-Zellen bei der Endkonzentration von 100 µg/ml auf den zweitniedrigsten Wert von 11,13 Prozent reduzieren lassen, während die Zelllinien Hs68 geringer Dichte und NIH/3T3 auf ca. 25 Prozent des Nullwertes, und HeLa und Hs68 höherer

Dichte nur auf ca. 35 Prozent des Nullwertes zurückgehen. Diesen drei Zelllinien ist gemein, dass sie einen deutlichen Rückgang erst ab einer Endkonzentration von 25 µg/ml aufweisen. Anhand dieser Ergebnisse zeigt sich, dass bei der Zelllinie CMS-5 mit einer Konzentration von ca. 15 µg/ml BS-RNase 50 Prozent der Zellen abgetötet werden. Die Zelllinie NIH/3T3 folgt mit einer Konzentration von ca. 25 µg/ml BS-RNase, A431-Zellen mit ca. 35 µg/ml, während die Linien HeLa und Hs68 (geringere Dichte) erst bei ca. 40 µg/ml BS-RNase 50 Prozent abgetötete Zellen aufweisen. Hs68-Zellen, die in größerer Dichte ausgelegt wurden, erreichen diesen Wert erst bei einer Konzentration von ca. 50 µg/ml und sind damit von den hier getesteten Zelllinien am unempfindlichsten gegenüber BS-RNase.

Die errechneten IC50-Werte hingegen liegen für die Zelllinie CMS-5 bei 5,174 µg/ml, für NIH/3T3-Zellen bei 36,07 µg/ml, für A431-Zellen bei 85,21 µg/ml und für die Linie HeLa bei 29,45 µg/ml BS-RNase. Für Hs68-Zellen errechnet sich ein IC50-Wert von 35,43 µg/ml (geringere Dichte) und 101 µg/ml (höhere Dichte). Da in den mit Graph Pad Prism erstellten Grafiken nicht immer ein Abknicken der Kurve (Bottom) erreicht wird bzw. nicht alle Zellen vollständig abgetötet werden, stimmen 50 % abgetötete Zellen und IC50 per Definitionem nicht überein und weichen daher voneinander ab.

Abbildung 14 stellt die erzielten Ergebnisse vergleichend dar.

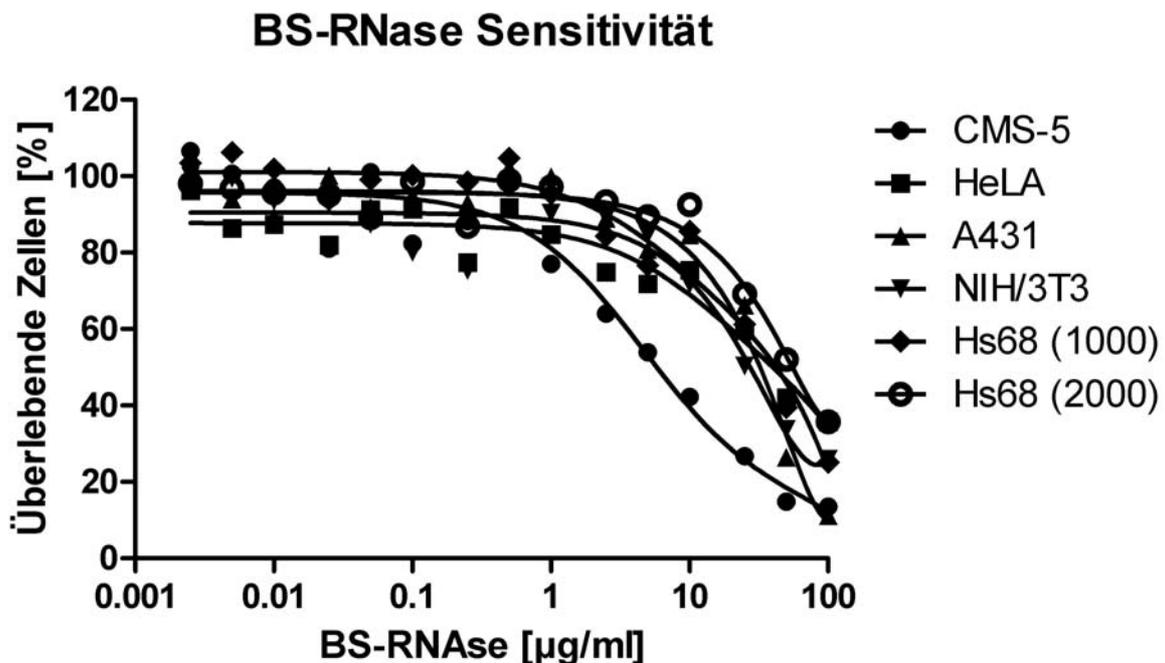


Abbildung 14: Vergleich der verschiedenen Zelllinien in der Sensitivität gegenüber BS-RNase  
Zusammenstellung der Abb. 9 - 13

### 5.3 Optimale Ratio zwischen dem Transaktivatorvirus und dem Responsevirus

#### 5.3.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Zelllinien A431, HeLa, CMS-5 und Hs68 soll die jeweilige Ratio zwischen Transaktivatorvirus und Responsevirus des Tet-On-Systems bestimmt werden, die die größtmögliche Genexpression gewährleistet.

Dafür werden die Zellen mit jeweils fünf unterschiedlichen Ratios der Vektoren AdCMVrtTA (TA) und AdtTSLuc (R) infiziert, um nach zwei Tagen die Biolumineszenz zu bestimmen.

Es handelt sich im Einzelnen um:

Ratio 1:20	=	MOI 0,5 TA : MOI 9,5 R
Ratio 1:10	=	MOI 1 TA : MOI 9 R
Ratio 1:4	=	MOI 2,5 TA : MOI 7,5 R
Ratio 1:1	=	MOI 5 TA : MOI 5 R
Ratio 4:1	=	MOI 7,5 TA : MOI 2,5 R

Die Gesamt-MOI der einzelnen Ratios ergibt jeweils 10. Als Referenz dient die Infektion mit dem Vektor AdCMVLuc ebenfalls mit MOI 10.

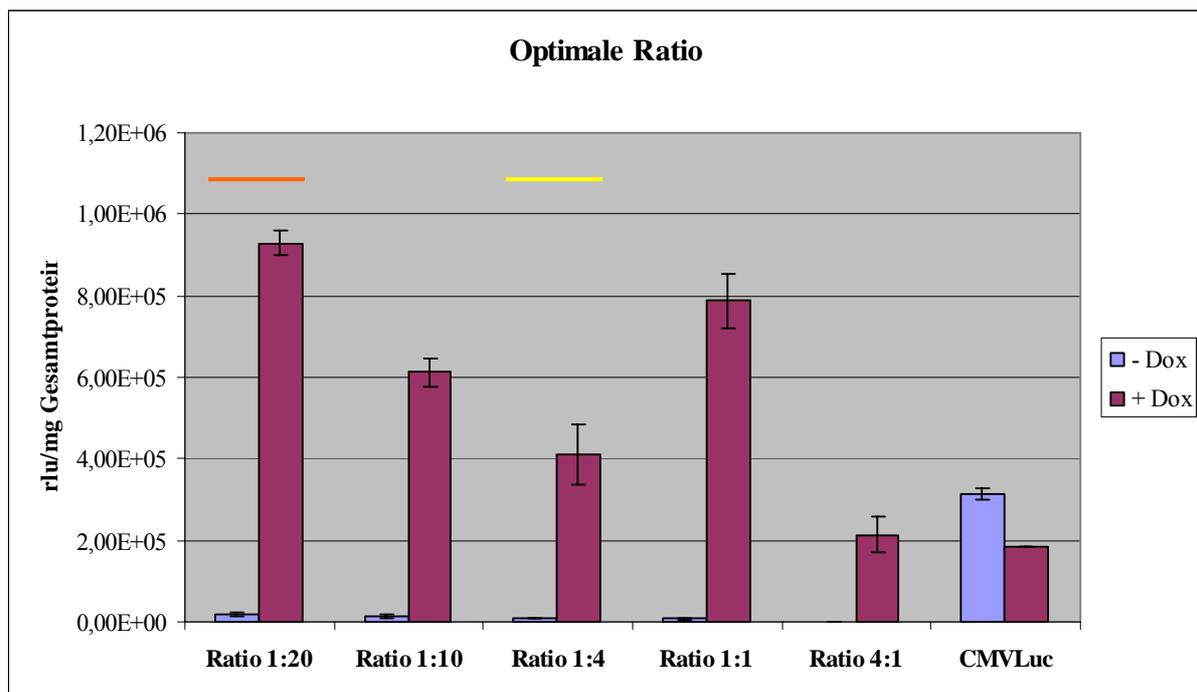
Zur Kontrolle der Hintergrundexpression wird derselbe Versuchsansatz für jede Zelllinie mit dem Leervirus Addl70-3 statt des Transaktivatorvirus durchgeführt.

Die Infektion erfolgt jeweils im Dreifachansatz (mit Zugabe von Doxycyclin bzw. nichtinduziert). Nach Bestimmung der relativen Lumineszenz im Luciferase-Assay und des Proteingehalts der Proben im BCA-Protein-Assay (siehe Punkt 4.5), werden die relativen Lichteinheiten auf das Gesamtprotein bezogen (rlu/mg Gesamtprotein). Dreifachansätze werden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

### 5.3.2 Optimale Ratio für A431-Zellen

Die humane Tumorzelllinie A431 ist sehr deutlich durch das Tet-On-System regulierbar. Die nichtinduzierten Ansätze ohne Doxyzyklin zeigen nur eine minimale Lumineszenz, während im induzierten Zustand sehr hohe Werte erreicht werden. Für Ratio 1:20 von Transaktivator- zu Responsevirus ergibt sich hier eine Erhöhung um den Faktor 51 zwischen nichtinduziertem und induziertem Ansatz. Der höchste Luminiszenzwert wird mit der Ratio 1:20 erzielt (induziert, 930000 rlu/mg Gesamtprotein). Dies entspricht dem ca. Dreifachen des Wertes der Referenzinfektion mit AdCMVLuc (315000 rlu/mg Gesamtprotein). Auch die Werte der induzierten Ansätze der Ratios 1:10, 1:4 und 1:1 liegen deutlich über diesem. Nur die Infektion mit Ratio 4:1 (induziert) weist mit 214000 rlu/mg Gesamtprotein eine etwas niedrigere Biolumineszenz als die Referenz auf.

Graphisch dargestellt ist dies in Abbildung 15.



**Abbildung 15: Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie A431**

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

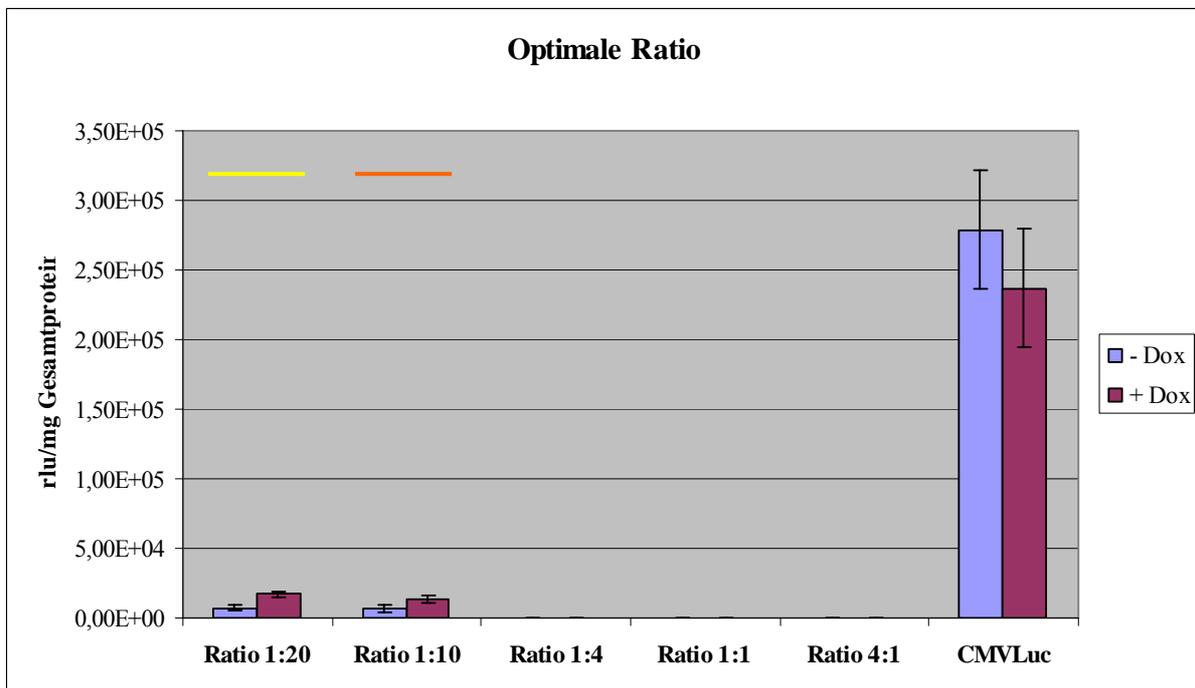
Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Beim Vergleich der nichtinduzierten und induzierten Ansätze der jeweiligen Ratios ergibt sich für Ratio 1:4 ein p-Wert, der als signifikant zu bewerten ist (gelb:  $p=0,0162$ ). Die p-Werte der restlichen Ratios zeigen sich  $< 0,001$  und damit hoch signifikant (orange:  $p<0,0001$ ).

Die Differenz zwischen den Referenzansätzen CMVLuc mit und ohne Doxyzyklin ist mit  $p=0,006$  signifikant.

Bei der Kontrollinfektion mit dem Leervirus Addl70-3 statt des Transaktivatorvirus (siehe Abbildung 16), zeigt sich bei dieser Zelllinie kaum Hintergrundexpression. Nur die Ratios 1:20 und 1:10 zeigen, v.a. in Anwesenheit von Doxyzyklin, mit 16900 rlu/mg Gesamtprotein bzw. 13800 rlu/mg Gesamtprotein etwas Lumineszenz, die aber im Verhältnis zur Referenzinfektion mit 279000 bzw 237000 rlu/mg Gesamtprotein (Infektion ohne bzw. mit Doxyzyklin) und v.a. zu dem induzierten Level (Infektion mit Transaktivator- und Responsevirus mit Doxyzyklin: max. 930000 rlu/mg Gesamtprotein, siehe Abbildung 15) sehr gering ausfällt.



**Abbildung 16: Optimale Ratio zwischen Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdfTSLuc) bei der humanen Zelllinie A431**

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

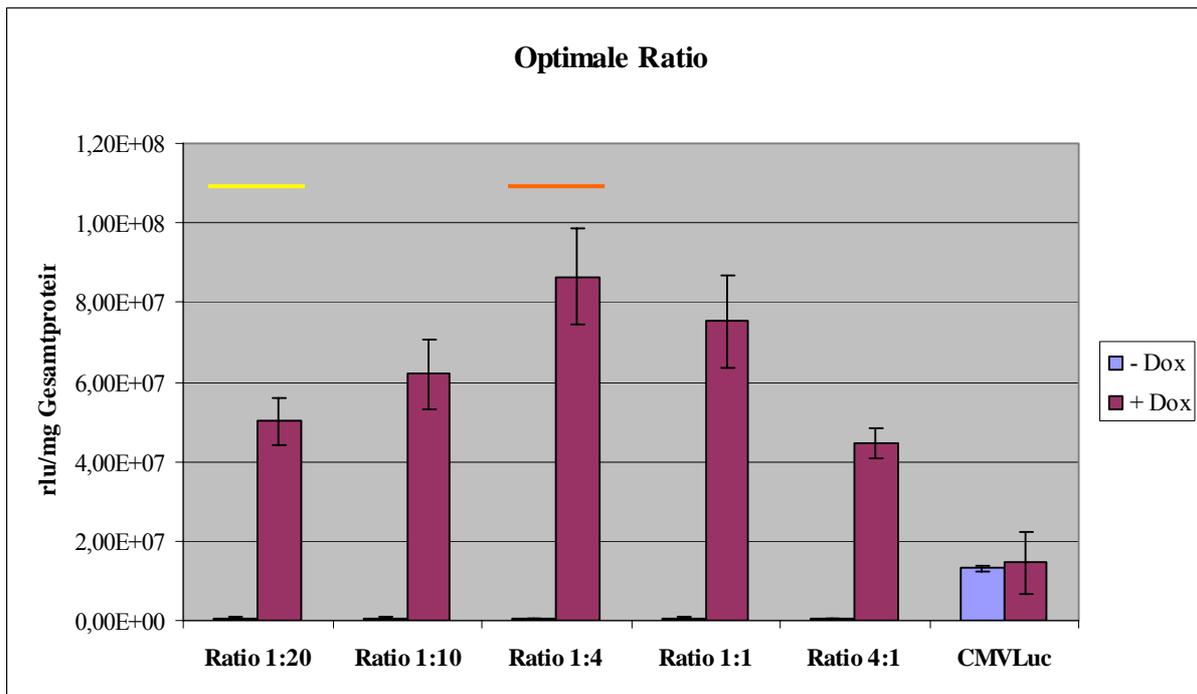
Die Differenz der nichtinduzierten und induzierten Ansätze ist für Ratio 1:20 signifikant (gelb:  $p=0,0134$ ) und für Ratio 1:10 ist nicht signifikant (orange:  $p=0,1168$ ).

Stellt man den höchsten erzielten Wert an Biolumineszenz zwischen Transaktivator- und Responsevirus bei Ratio 1:20 (induziert) der entsprechenden Ratio des Ansatzes Leervirus- und Responsevirus gegenüber, ergibt sich ein p-Wert von  $<0,0001$ , also hoch signifikant.

### **5.3.3 Optimale Ratio für HeLa-Zellen**

Für die Adenokarzinom-Zelllinie HeLa liefert die Ratio 1:4 die stärkste Biolumineszenz, die im induzierten Ansatz bei ca. 86,5 Millionen relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein liegt. Das entspricht ca. dem sechsfachen Wert, der für die Referenzinfektion mit AdCMVLuc gemessen wurde (14,6 Mio rlu/mg Gesamtprotein) und einem Faktor von 151 im Vergleich zum nichtinduzierten Ansatz (570000 rlu/mg Gesamtprotein). Auch die Ratios 1:20, 1:10, 1:1 und 4:1 des Tet-On-Systems liefern im induzierten Zustand ein deutlich besseres Ergebnis als die Infektion mit dem CMV-Promotor. Dagegen zeigt sich, dass die uninduzierten Ansätze ohne Doxyzyklin nur eine vergleichsweise geringe Biolumineszenz aufweisen (von 347000 rlu/mg Gesamtprotein bei Ratio 4:1 bis ca. 704000 rlu/mg Gesamtprotein bei Ratio 1:20), die deutlich unter der Referenz liegt. Für den Referenzansatz selber ergibt sich nahezu kein Unterschied zwischen induziert und nichtinduziert (14,6 Mio rlu/mg Gesamtprotein bzw. 13,1 Mio rlu/mg Gesamtprotein).

Abbildung 17 zeigt diese Ergebnisse.



**Abbildung 17: Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdTSLuc) bei der humanen Zelllinie HeLa**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA Protein-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

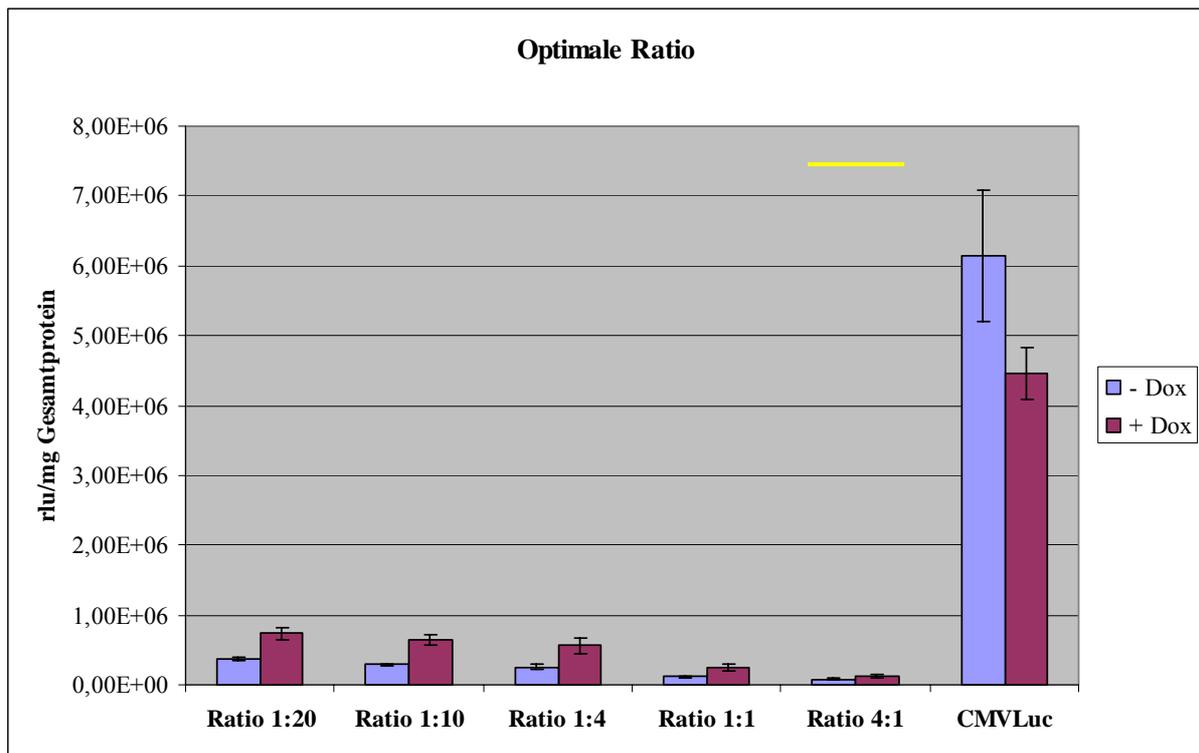
Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Beim Vergleich der nichtinduzierten und induzierten Ansätze der jeweiligen Ratios ergibt sich für die Ratios 1:20 und 1:4 ein p-Wert, der als signifikant zu bewerten ist (gelb:  $p=0,0069$ , orange:  $p=0,0024$ ). Die p-Werte der Ratios 1:10, 1:1 und 4:1 zeigen sich  $< 0,001$  und damit hoch signifikant. Die Differenz zwischen den Referenzansätzen CMVLuc mit und ohne Doxyzyklin ist mit  $p=0,8137$  nicht signifikant.

Die Infektion mit Leervirus Adl70-3 und Referenzvirus AdfTSLuc zeigt, dass auch hier eine Hintergrundexpression besteht, vor allem in Anwesenheit von Doxyzyklin (siehe Abbildung 18). Diese liegt aber mit maximal 732000 rlu/mg Gesamtprotein ca. sechsfach unter dem Wert, der für den Referenzansatz (4,46 Mio rlu/mg Gesamtprotein bei Zugabe von Doxyzyklin) bestimmt wird.



**Abbildung 18: Optimale Ratio zwischen Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdfTSLuc) bei der humanen Zelllinie HeLa**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA Protein-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

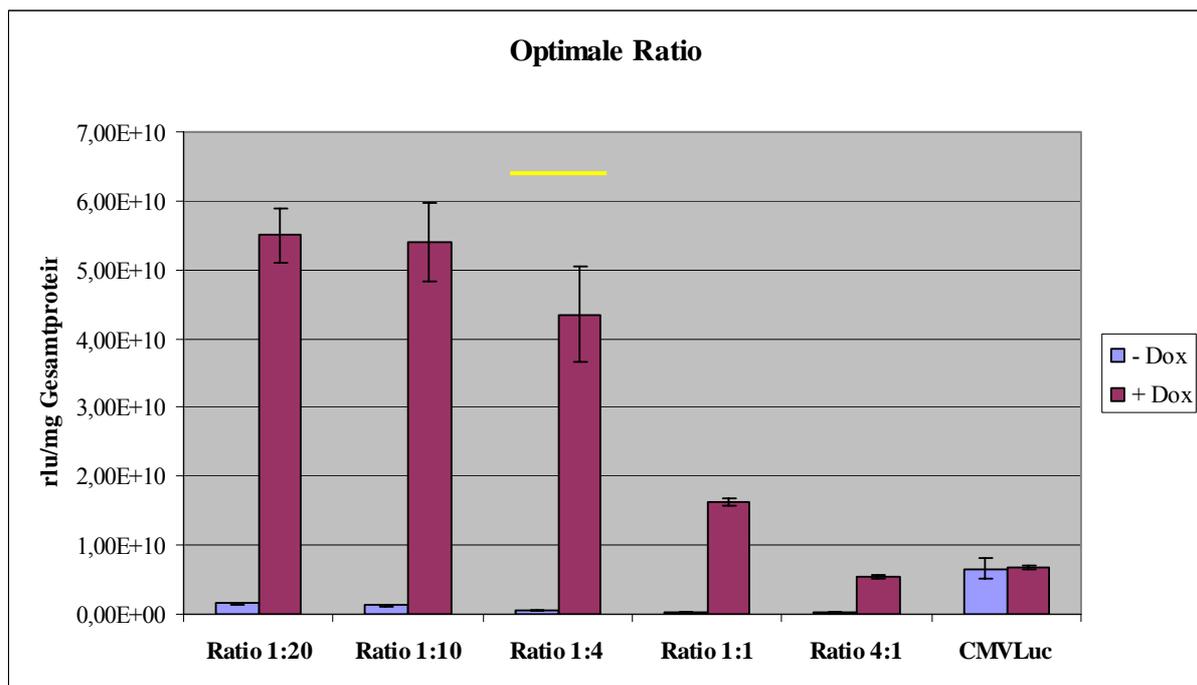
Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Die Differenz der nichtinduzierten und induzierten Ansätze ist für die Ratios 1:20, 1:10, 1:4 und 1:1 signifikant und für Ratio 4:1 hingegen nicht signifikant (gelb:  $p=0,0623$ ).

Beim Vergleich des höchsten erzielten Wertes an Biolumineszenz zwischen Transaktivator- und Responsevirus mit dem von Leervirus- und Responsevirus bei Ratio 1:4 (induziert) ergibt sich ein p-Wert von 0,0003, also hoch signifikant.

### 5.3.4 Optimale Ratio für CMS-5-Zellen

Wie in Abbildung 19 ersichtlich, zeigt die Zelllinie CMS-5 ebenfalls eine deutliche Regulation des Tet-On-Systems durch die Zugabe von Doxyzyklin, da in Abwesenheit von Doxyzyklin nur eine geringe Lumineszenz gemessen wird, während die Werte für die induzierten Ansätze sehr hoch sind. Das beste Ergebnis weist die Ratio 1:20 (induziert) mit 55 Milliarden relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein auf, was dem Achtfachen des Referenzansatzes (6,7 Milliarden rlu/mg Gesamtprotein, mit Doxyzyklin) und dem 34fachen des nichtinduzierten Ansatzes (1,6 Milliarden rlu/mg Gesamtprotein) entspricht. Der Wert der Ratio 1:10 liegt nur knapp darunter (54 Milliarden rlu/mg Gesamtprotein, induziert). Danach folgen die Werte der Ratios 1:4 und 1:1 (induziert), die immer noch über den des Referenzansatzes liegen. Nur die Ratio 4:1 liegt im induzierten Zustand mit 5,4 Milliarden relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein unter dem Wert der Referenz.



**Abbildung 19: Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der murinen Zelllinie CMS-5**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA Protein-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

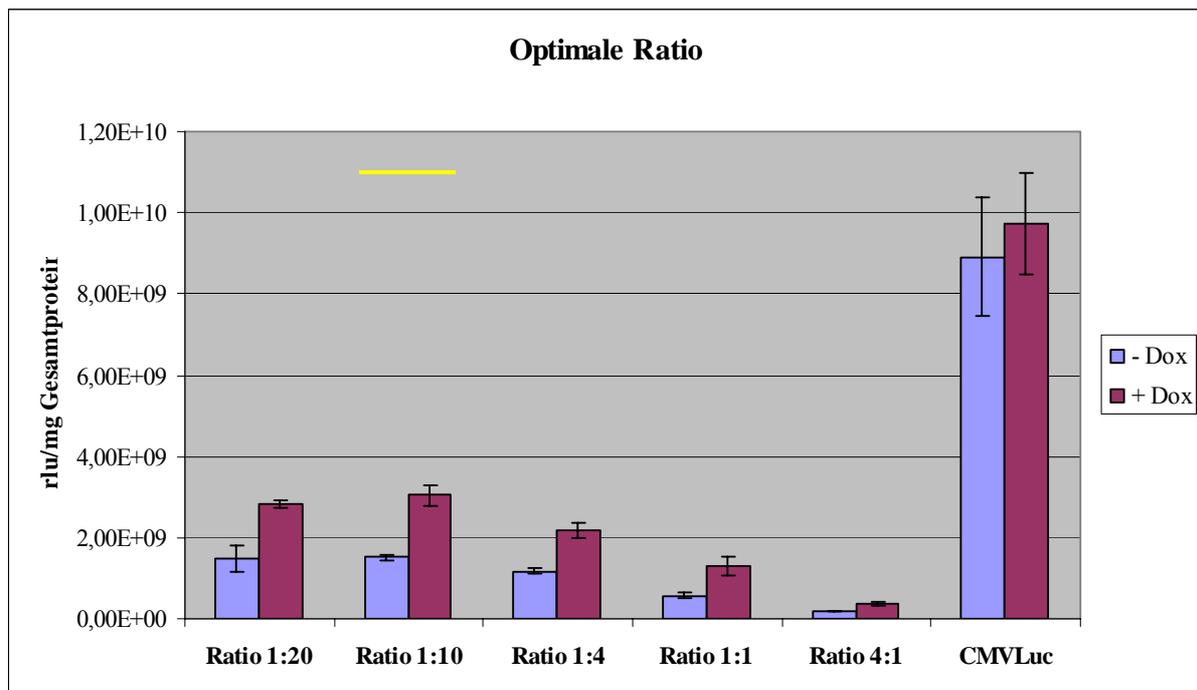
Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Beim Vergleich der nichtinduzierten und induzierten Ansätze zeigen sich alle verwendeten Ratios hoch signifikant (gelb:  $p=0,0004$ , sonst  $<0,0001$ ). Die Differenz zwischen den Referenzansätzen CMVLuc mit und ohne Doxyzyklin ist mit  $p=0,9134$  als nicht signifikant zu bewerten.

Auch hier zeigt sich bei Infektion mit dem Leervirus statt des Transaktivatorvirus eine Hintergrundexpression, die aber nur ca. ein Drittel der Stärke der Referenzinfektion mit AdCMVLuc (9,8 Milliarden rlu/mg Gesamtprotein) erreicht (siehe Abbildung 20). Ebenfalls kann man erkennen, dass die Hintergrundexpression in Anwesenheit von Doxyzyklin etwas stärker ist.



**Abbildung 20: Optimale Ratio zwischen Leervirus (Add170-3) und Responsevirus (AdfTSLuc) bei der murinen Zelllinie CMS-5**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA Protein-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Die Differenz der nichtinduzierten und induzierten Ansätze ist für die Ratios 1:20, 1:4, 1:1 und 4:1 signifikant und für Ratio 1:10 hingegen hoch signifikant (gelb:  $p=0,0005$ ).

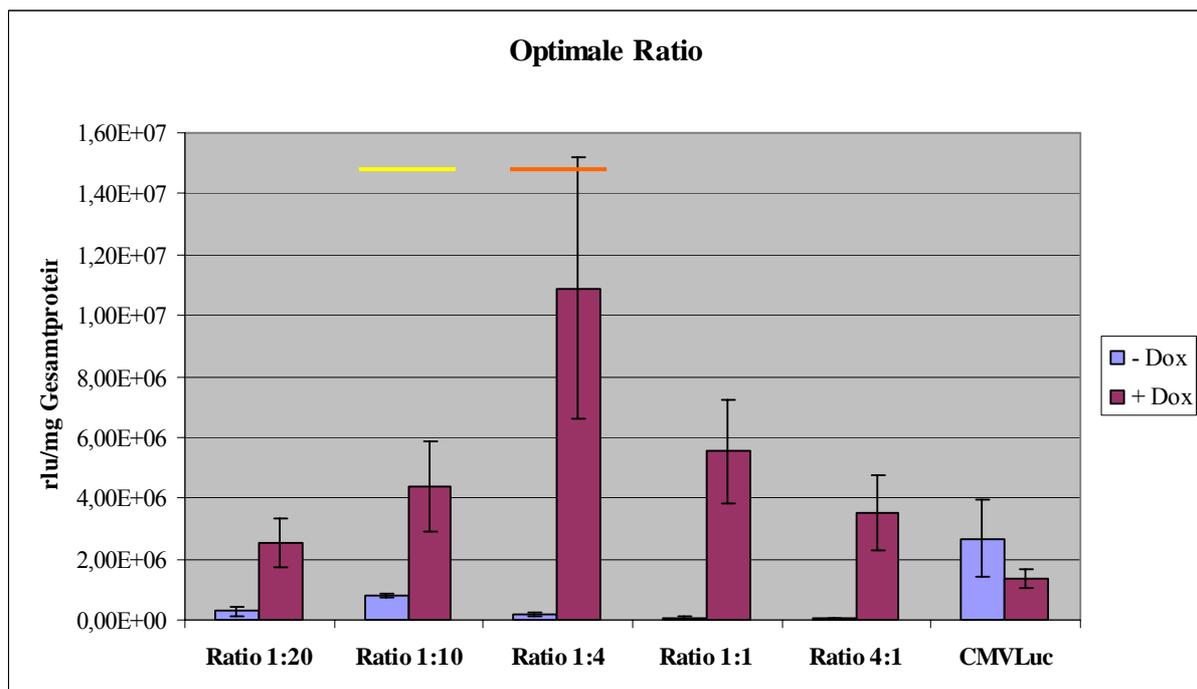
Der Vergleich des höchsten erzielten Wert an Biolumineszenz zwischen Transaktivator- und Responsevirus bei Ratio 1:20 (induziert) mit der entsprechenden Ratio des Ansatzes Leervirus- und Responsevirus, ergibt  $p<0,0001$ , also hoch signifikant.

### 5.3.5 Optimale Ratio für Hs68-Zellen

Auch bei der Zelllinie Hs68 ist eine deutliche Regulierbarkeit durch Doxozyklin zu erkennen. Die Ansätze ohne Doxozyklin weisen eine deutlich geringere Lumineszenz als die induzierten Ansätze auf (bei Ratio 1:4 ergibt sich eine Differenz um den Faktor 61). Der höchste Wert wird mit der Ratio 1:4 mit Doxozyklin erreicht (10,9 Mio rlu/mg Gesamtprotein, nichtinduziert 178000 rlu/mg Gesamtprotein) und liegt damit ca. viermal höher als der Referenzwert der Infektion AdCMVLuc (2,7 Mio rlu/mg Gesamtprotein, in Abwesenheit von Doxozyklin).

Auch die Ratios 1:1, 1:10 und 4:1 liefern im induzierten Zustand höhere Werte als die Referenzinfektion, nur die Ratio 1:20 liegt mit 2,5 Millionen relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein etwas darunter.

In Abbildung 21 wird dies grafisch dargestellt.



**Abbildung 21: Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdTSLuc) bei der humanen Zelllinie Hs68**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA Protein-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxozyklin), die roten für die induzierten (mit Doxozyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

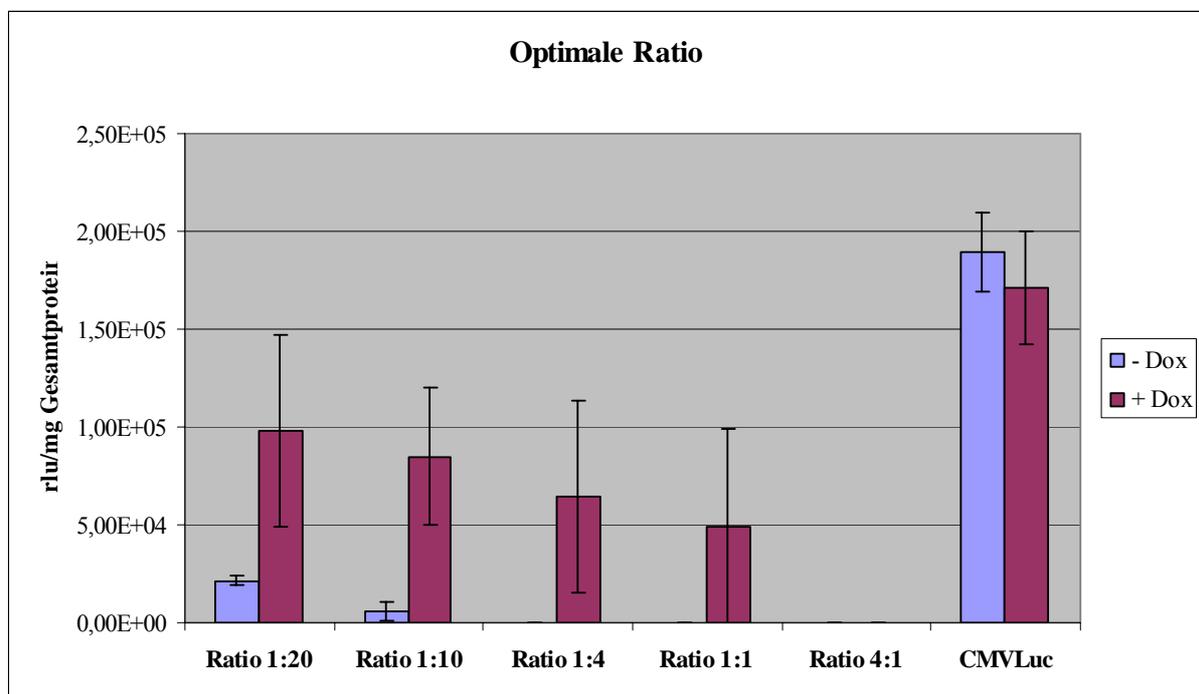
Beim Vergleich der nichtinduzierten und induzierten Ansätze ergibt sich für Ratio 1:10 ein Wert von  $p=0,0761$

(gelb), d.h. nicht signifikant, die restlichen Ratios sind als signifikant zu bewerten (Ratio 1:4:  $p=0,0451$ , orange).

Die Differenz zwischen den Referenzansätzen CMVLuc mit und ohne Doxozyklin ist mit  $p=0,2698$  nicht signifikant.

Hs68-Zellen weisen ebenfalls eine geringe Hintergrundexpression auf, die durch Zugabe von Doxyzyklin noch verstärkt wird, die mit maximal 97900 rlu/mg Gesamtprotein (1:20) aber nur gut die Hälfte des Wertes der Referenzinfektion mit AdCMVLuc (171000 rlu/mg Gesamtprotein bei Zugabe von Doxyzyklin) erreicht (siehe Abbildung 22).

Im Vergleich zu den anderen Zelllinien zeigt Hs68 die geringste absolute Expressionsrate. Dies kann durch ihren vergleichsweise langsameren Stoffwechsel erklärt werden, der sich auch in den Ergebnissen der FACS-Analyse bei der Expression von EGFP gezeigt hat (siehe Tabellen 2 und 3).



**Abbildung 22: Optimale Ratio zwischen Leervirus (Add170-3) und Responsevirus (AdfTSLuc) bei der humanen Zelllinie Hs68**

Die Grafik beruht auf den Ergebnissen des Luciferase-Assays und des BCA Protein-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Ratios.

Die Y-Achse gibt die Relativen Lichteinheiten pro mg Gesamtprotein wieder (rlu/mg Gesamtprotein).

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin).

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Die Differenz der nichtinduzierten und induzierten Ansätze ist für alle Ratios als nicht signifikant zu bewerten.

Im Vergleich des höchsten erzielten Wert an Biolumineszenz zwischen Transaktivator- und Responsevirus bei Ratio 1:4 (induziert) und dem entsprechenden Wert des Ansatzes Leervirus- und Responsevirus, ergibt  $p=0,0124$ , was als signifikant zu werten ist.

### **5.3.6 Gemeinsame Optimale Ratio**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Genexpression aller getesteten Zelllinien gut durch das Tet-On-System regulierbar ist. Die Werte der Ansätze mit Doxyzyklin liegen deutlich über den nichtinduzierten und meist auch deutlich über denen des Referenzansatzes. Die murine Zelllinie CMS-5 zeigt hier die stärkste Genexpression, die achtmal höher als die des Referenzansatzes ist. Bei der Zelllinie A431 ist dieser Unterschied mit dem Dreifachen am geringsten. Allgemein sind mit den Ratios 1:20, 1:10 und 1:4 die besten Ergebnisse erzielt worden. Um für die weiteren Versuche eine gemeinsame Ratio zu verwenden, mit der bei allen Zelllinien ein möglichst gutes Ergebnis erzielt werden kann, wird die Ratio 1:10 gewählt. Diese wurde auch von Strobl für eine Prostatakarzinom-Zelllinie gewählt (STROBL 2006 Dissertation), was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht.

### **5.4 Adenoviral induzierte BS-RNase-Produktion der infizierten Zellen**

Hierbei soll die BS-RNase, die sich nach Infektion der Zelllinien mit Transaktivatorvirus und dem entsprechenden Responsevirus gebildet hat, mittels der Western Blot-Analyse nachgewiesen und deren Funktionalität mit Hilfe des XTT-Assays bestimmt werden.

#### **5.4.1 Optimale Antikörper-Konzentration**

Um die optimale Konzentration der Antikörper für die folgende Western Blot-Analyse zu ermitteln, werden 14 Membranstücke, wie in Punkt 4.6.3.2 beschrieben, mit jeweils 25 ng gereinigter BS-RNase (in PBS) präpariert. Der erste Antikörper gegen BS-RNase wird in Verdünnungen von

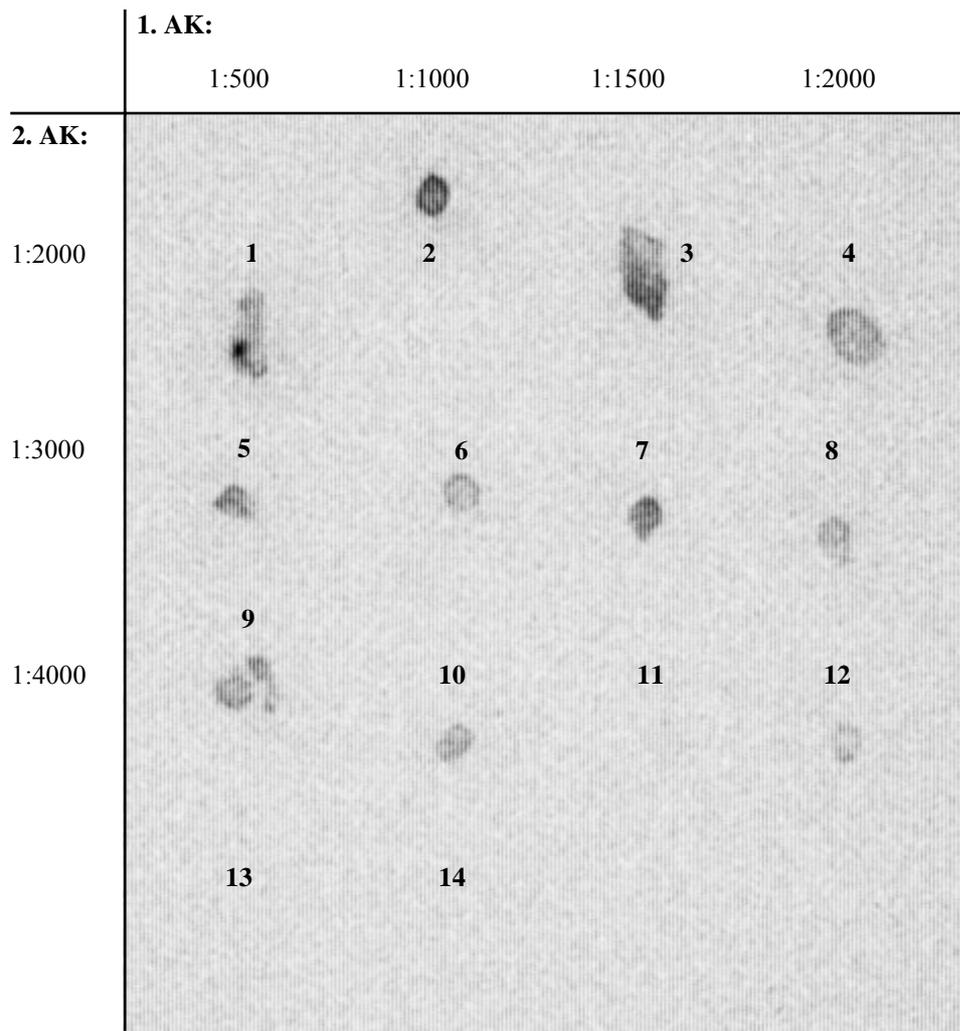
1:500 1:1000 1:1500 und 1:2000

in PBST verwendet. Jede der verwendeten Verdünnungen wird mit folgenden Verdünnungen des zweiten Antikörpers kombiniert:

1:2000 1:3000 und 1:4000 (in PBST).

Zusätzlich wird jeweils eine Membranprobe nur mit dem ersten bzw. dem zweiten Antikörper behandelt.

Nach der Entwicklung dieser Dot Blots zeigen sich deutliche Unterschiede in der Darstellung der BS-RNase-Proben bei den verschiedenen Antikörperkonzentrationen (siehe Abbildung 23). Das beste Ergebnis wird mit dem Membranstück Nummer zwei erzielt, bei dem für den 1. Antikörper die Verdünnung 1:1000 und für den 2. Antikörper die Verdünnung 1:2000 verwendet wurde. Diese Verdünnungen werden daher für die Western Blot-Analyse übernommen.



**Abbildung 23: Dot Blots zur Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration**

Gezeigt werden die einzelnen Membranstücke mit gereinigter BS-RNase und jeweils unterschiedlichen Kombinationen der Antikörper-Verdünnung. Sie sind fortlaufend nummeriert.

2. Antikörper: Anti-Rabbit Ig Horseradish Peroxidase labeld AK in verschiedenen Verdünnungen in PBST (von oben nach unten)

1. Antikörper: AK gegen BS-RNase in verschiedenen Verdünnungen in PBST (von links nach rechts)

Die Membran mit der Nummer 13 ist nur mit dem 1. Antikörper behandelt; Nummer 14 nur mit dem 2. Antikörper.

Das Membranstück Nummer 2 mit der Verdünnung des 1. Antikörpers von 1:1000 und des 2. Antikörpers von 1:2000 zeigt das beste Ergebnis.

### 5.4.2 Vorbereitung der Zellen

Hela- und CMS-5-Zellen werden wie in Punkt 4.6.1 beschrieben mit dem Tet-On-System aus Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSr) infiziert. Als Ratio zwischen dem Transaktivatorvirus und dem Responsevirus wird die im Punkt 5.3 ermittelte gemeinsame optimale Ratio 1:10 verwendet, d.h. TA:R entspricht MOI 3 TA zu MOI 27 R bei einer verwendeten Gesamt-MOI von 30.

Für die Kontrollen wird der Transaktivatorvirus durch Leervirus ersetzt bzw. die Infektion nur mit Leervirus bei MOI 30 durchgeführt. Alle Ansätze werden dreifach und jeweils ohne und

mit Zugabe von Doxyzyklin durchgeführt.

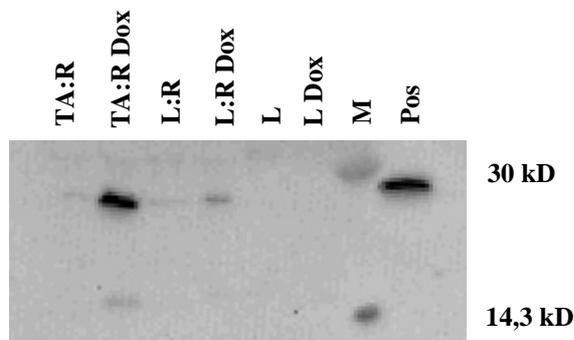
### 5.4.3 BS-RNase-Produktion und -Sekernierung von HeLa-Zellen

Die durch die Induktion des Tet-On-Systems von HeLa-Zellen gebildete BS-RNase soll nun dargestellt werden. Hierzu wird eine Western Blot-Analyse mit den Überständen der infizierten 24-Lochplatte durchgeführt. Die Überstände werden 86 Stunden nach der Infektion entnommen und Proben von drei identischen Ansätzen jeweils gemischt.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse dieser Analyse:

Die Positivkontrolle mit 25 ng gereinigter BS-RNase ist als Dimer deutlich zu erkennen. Die Infektion mit Transaktivatorvirus und Responsevirus des Tet-On-Systems zeigt im induzierten Zustand mit Doxyzyklin ebenfalls deutlich erkennbar im Überstand das Dimer der BS-RNase bei ca. 28 kD. Es lassen sich aber auch geringe Mengen des Monomers bei einem Molekulargewicht von ca. 14 kD erkennen. Der Überstand der nichtinduzierten Ansätze weist dagegen nur geringe Spuren der RNase (in Form des Dimers) auf.

Die Überstände der Kontrollinfektion mit Leervirus und Responsevirus zeigen ebenfalls Spuren des Dimers, die in Gegenwart von Doxyzyklin noch etwas verstärkt werden, während diejenigen der Kontrollansätze mit ausschließlich Leervirus keinerlei BS-RNase aufweisen, unabhängig von der Zugabe von Doxyzyklin. Das Monomer ist bei beiden Ansätzen nicht zu erkennen.



**Abbildung 24: Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von HeLa-Zellen mit dem Tet-On-System (86 Stunden nach Infektion entnommen)**

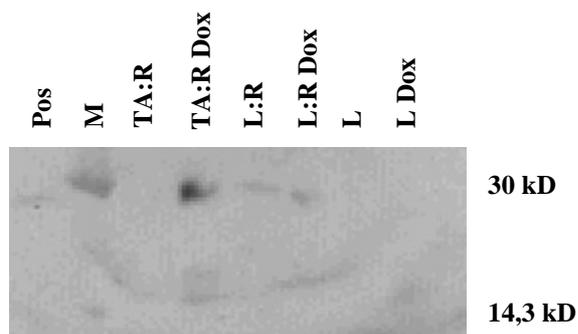
TA:R: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdfTSr), L:R: Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Addl70-3), Dox: Doxyzyklin, M: High Range Rainbow Molecular Weight Marker, Pos: Positivkontrolle mit 25 ng gereinigter BS-RNase, 30 kD: 30 Kilodalton

Die Masse des Dimers der BS-RNase entspricht ca. 28 kD, die des Monomers ca. 14 kD.

#### 5.4.4 BS-RNase-Produktion und -Sezernierung von CMS-5-Zellen

Um die BS-RNase-Synthese der CMS-5-Zellen darzustellen, werden die Infektionsüberstände jeweils einer 24-Lochplatte nach 38 und 86 Stunden entnommen und für die Western Blot-Analyse verwendet.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, zeigt sich bereits in den Überständen, die 38 Stunden nach Infektion entnommen werden, dass CMS-5-Zellen durch Induktion des Tet-On-Systems mit Doxyzyklin das Dimer der BS-RNase synthetisiert haben. Auch geringe Mengen des Monomers sind sichtbar. Im nichtinduzierten Zustand lässt sich dies nicht nachweisen. Bei den Überständen der Kontrollinfektionen mit Leervirus und Responsevirus lassen sich Spuren der RNase (als Dimer) erkennen, die wiederum bei Zugabe von Doxyzyklin etwas deutlicher sind. Nicht nachweisen lässt sich BS-RNase mit der Kontrollinfektion mit ausschließlich Leervirus. Hier spielt es, wie schon bei der Zelllinie HeLa, keine Rolle, ob die Zugabe von Doxyzyklin erfolgt oder nicht.

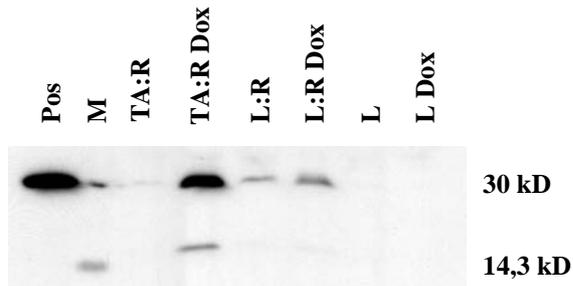


**Abbildung 25: Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von CMS-5-Zellen mit dem Tet-On-System (38 Stunden nach Infektion entnommen)**

TA:R: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSr), L:R: Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdtTSr), L: Leervirus (Addl70-3), Dox: Doxyzyklin, M: High Range Rainbow Molecular Weight Marker, Pos: Positivkontrolle mit 25 ng gereinigter BS-RNase, 30 kD: 30 Kilodalton

Die Masse des Dimers der BS-RNase entspricht ca. 28 kD, die des Monomers ca. 14 kD.

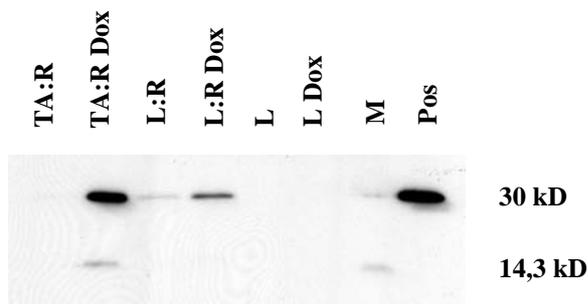
Die Überstände, die 86 Stunden nach Infektion gewonnen wurden, ergeben bei der Western Blot-Analyse ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 26). Neben der Positivkontrolle lässt sich in den Überständen der induzierten Ansätze des Tet-On-Systems das Dimer (und in geringerer Menge das Monomer) der BS-RNase deutlich erkennen. Die nichtinduzierten Ansätze dagegen zeigen nur Spuren des Dimers, ebenso wie die Kontrollansätze (Leervirus/Responsevirus), wobei auch hier die Zugabe von Doxyzyklin die Synthese der RNase geringfügig verstärkt. Mit Leervirus allein lässt sich keinerlei BS-RNase-Produktion nachweisen.



**Abbildung 26: Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von CMS-5-Zellen mit dem Tet-On-System (86 Stunden nach Infektion entnommen)**

TA:R: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdfTSr), L:R: Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Addl70-3), Dox: Doxyzyklin, M: High Range Rainbow Molecular Weight Marker, Pos: Positivkontrolle mit 25 ng gereinigter BS-RNase, 30 kD: 30 Kilodalton  
Die Masse des Dimers der BS-RNase entspricht ca. 28 kD, die des Monomers ca. 14 kD.

Dieselben Infektionen werden mit jeweils ein Prozent FKS im Medium der Infektion (statt zehn Prozent; siehe Punkt 4.6.1) ausgeführt, um eine eventuelle bessere Sichtbarkeit der BS-RNase in der Western Blot-Analyse zu erreichen. 86 Stunden nach Infektion lässt sich mittels der Western Blot-Analyse in den Überständen ein identisches Bild der BS-RNase-Synthese nachweisen, wie in den Ansätzen mit zehn Prozent FKS im Medium beschrieben (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von CMS-5-Zellen mit dem Tet-On-System (86 Stunden nach Infektion entnommen; 1 Prozent FKS im Kulturmedium)**

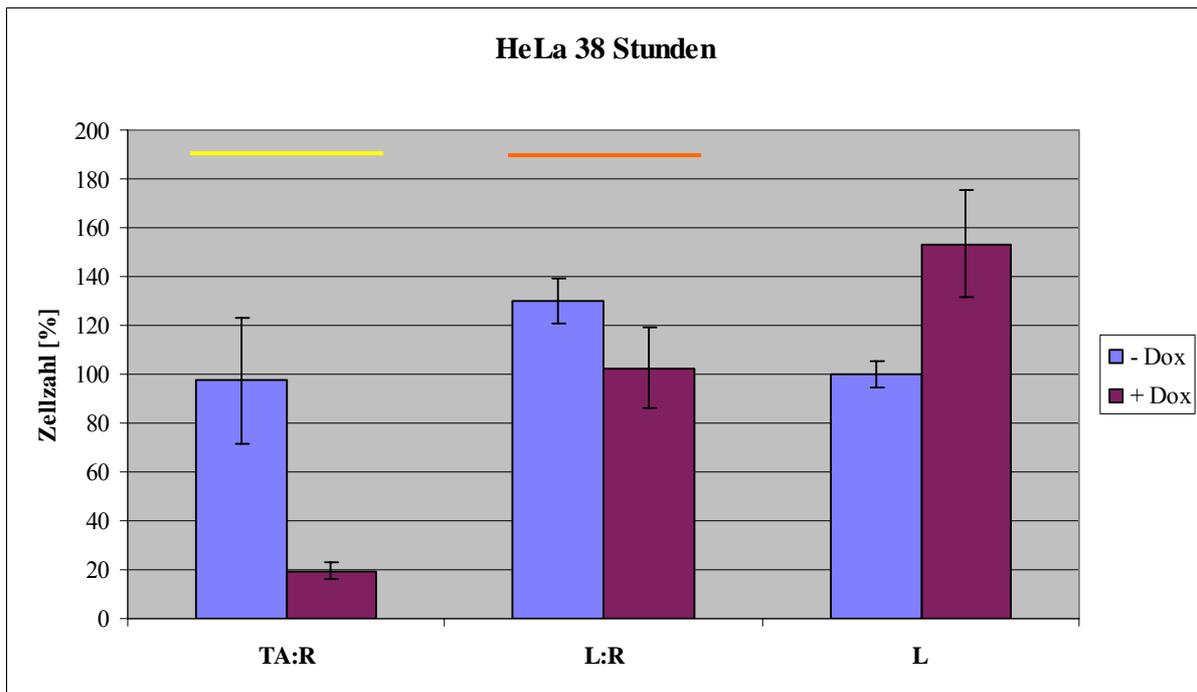
TA:R: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdfTSr), L:R: Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Addl70-3), Dox: Doxyzyklin, M: High Range Rainbow Molecular Weight Marker, Pos: Positivkontrolle mit 25 ng gereinigter BS-RNase, 30 kD: 30 Kilodalton  
Die Masse des Dimers der BS-RNase entspricht ca. 28 kD, die des Monomers ca. 14 kD.

## **5.5 Abtöten der Zellen durch die gebildete BS-RNase**

Es soll geprüft werden, ob die von den Zellen produzierte BS-RNase funktionell ist, d.h. ob Zellen abgetötet werden. Der Prozentsatz der überlebenden Zellen der Infektionsansätze wird wie in Punkt 4.6.2 beschrieben mit Hilfe eines XTT-Assays ermittelt. Dabei wird jeweils eine der 24-Lochplatten 38 Stunden nach der Infektion gemessen, der zweite identische Ansatz 86 Stunden nach Infektion.

### **5.5.1 Absterben von HeLa-Zellen**

38 Stunden nach Infektion zeigt der XTT-Assay eine Reduktion der HeLa-Zellen auf ca. 20 Prozent der Referenzwertes (Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin) in den induzierten Ansätzen des Tet-On-Systems (TA:R mit Doxyzyklin). Die Zellen in den nichtinduzierten Ansätzen (TA:R ohne Doxyzyklin) zeigen dagegen mit ca. 97 Prozent des Referenzwertes kaum eine Beeinträchtigung, ebenso wie die Kontrollansätze mit Leervirus und Responsevirus (L:R mit und ohne Doxyzyklin) ) bzw. Leervirus alleine (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28: Prozentsatz der überlebenden HeLa-Zellen 38 Stunden nach Infektion**

Die Grafik basiert auf den Ergebnissen des XTT-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Viruskombinationen:

TA: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA), R: Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Add170-3)

Die Gesamt-MOI beträgt jeweils 30.

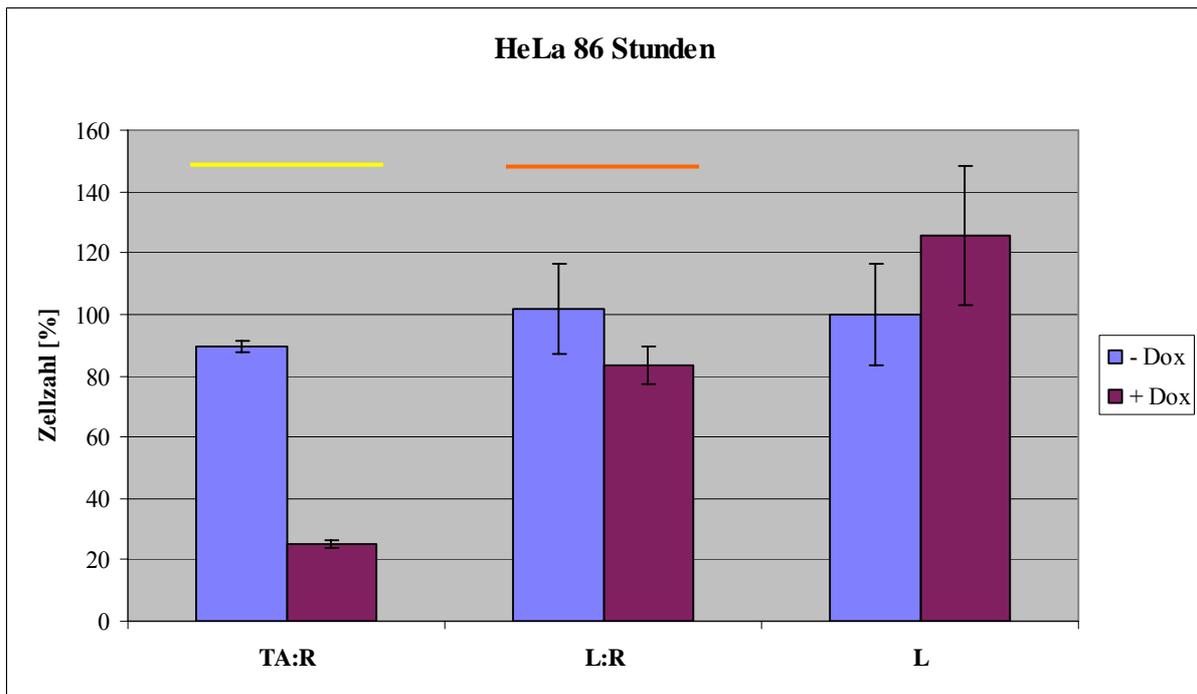
Die Y-Achse gibt den Prozentsatz der überlebenden Zellen an. Als 100 Prozent wird der Wert der Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin angenommen.

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin). Dox: Doxyzyklin

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Der Vergleich des nichtinduzierten mit dem induzierten Ansatz zeigt sich für TA:R signifikant (gelb:  $p=0,0112$ ), während der für L:R nicht signifikant ist (orange:  $p=0,0654$ ). Stellt man den induzierten Ansatz TA:R dem induzierten L:R gegenüber, so ergibt sich  $p=0,00103$ , also Signifikanz.

86 Stunden nach Infektion lassen sich ca. 25 Prozent lebende Zellen in den induzierten Ansätzen messen. Die Zellzahl ist durch die gebildete BS-RNase deutlich reduziert, aber es konnten durch die Induktion des Tet-On-Systems und die hierdurch gebildete BS-RNase nicht alle Zellen abgetötet werden. Die nichtinduzierten Ansätze liegen bei ca. 90 Prozent des Referenzwertes und die Kontrollansätze nahe dem Referenzwert (Leervirus ohne Doxyzyklin) und zeigen kaum bzw. keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen, bzw. eine erhöhte Zellzahl, die aber vermutlich durch den relativ hohen Messfehler begründet ist (siehe Abbildung 29).



**Abbildung 29: Prozentsatz der überlebenden HeLa-Zellen 86 Stunden nach Infektion**

Die Grafik basiert auf den Ergebnissen des XTT-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Viruskombinationen:

TA: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA), R: Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Add170-3)

Die Gesamt-MOI beträgt jeweils 30.

Die Y-Achse gibt den Prozentsatz der überlebenden Zellen an. Als 100 Prozent wird der Wert der Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin angenommen.

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin). Dox: Doxyzyklin

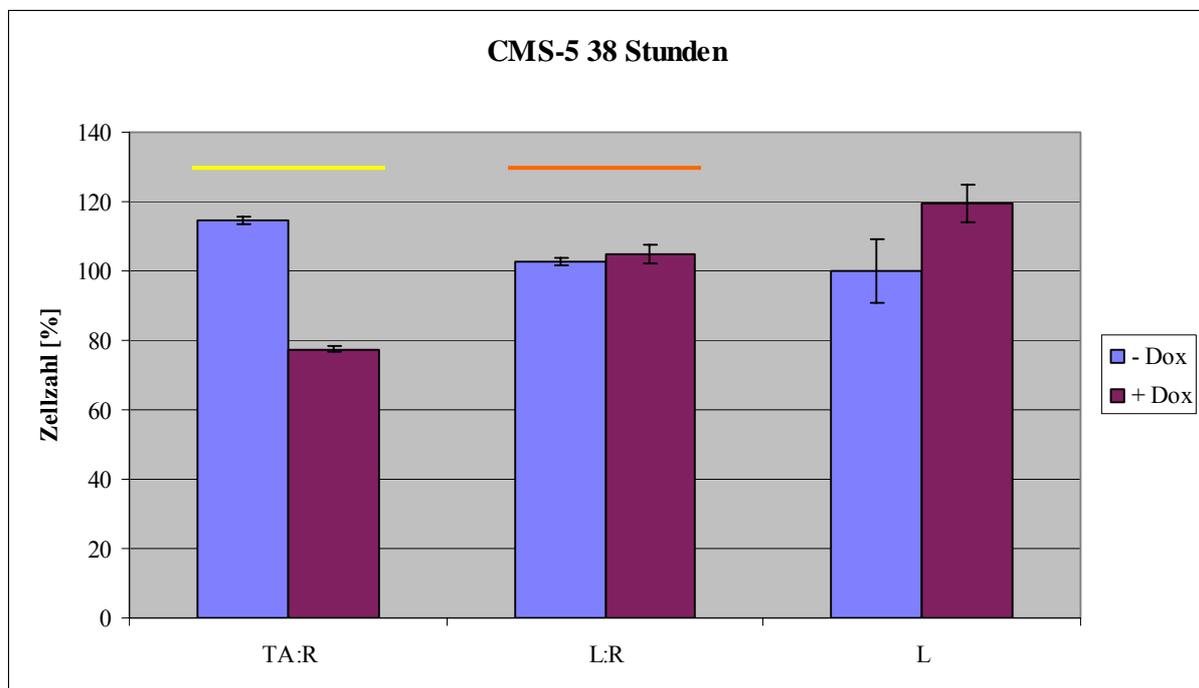
Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Der Vergleich des nichtinduzierten mit dem induzierten Ansatz zeigt sich für TA:R hoch signifikant (gelb:  $p=0,0005$ ), während der für L:R nicht signifikant ist (orange:  $p=0,117$ ). Stellt man den induzierten Ansatz TA:R dem induzierten L:R gegenüber, so ergibt sich  $p=0,000996$ , also noch hohe Signifikanz.

### 5.5.2 Absterben von CMS-5-Zellen

Die Ergebnisse des XTT-Assays der CMS-5-Zellen lassen für die induzierten Ansätze (TA:R mit Doxyzyklin) ebenfalls einen Rückgang der lebenden Zellen durch die gebildete BS-RNase erkennen, der aber 38 Stunden nach Infektion mit ca. 78 Prozent des Referenzwertes (Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin) deutlich geringer ausfällt als bei der Zelllinie HeLa. Die nichtinduzierten Ansätze (TA:R ohne Doxyzyklin) und die Kontrollansätze mit Leervirus und Responsevirus liegen mit der Anzahl an lebenden Zellen im Bereich der Referenz.

Abbildung 30 veranschaulicht dies.



**Abbildung 30: Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 38 Stunden nach Infektion**

Die Grafik basiert auf den Ergebnissen des XTT-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Viruskombinationen:

TA: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA), R: Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Add170-3)

Die Gesamt-MOI beträgt jeweils 30.

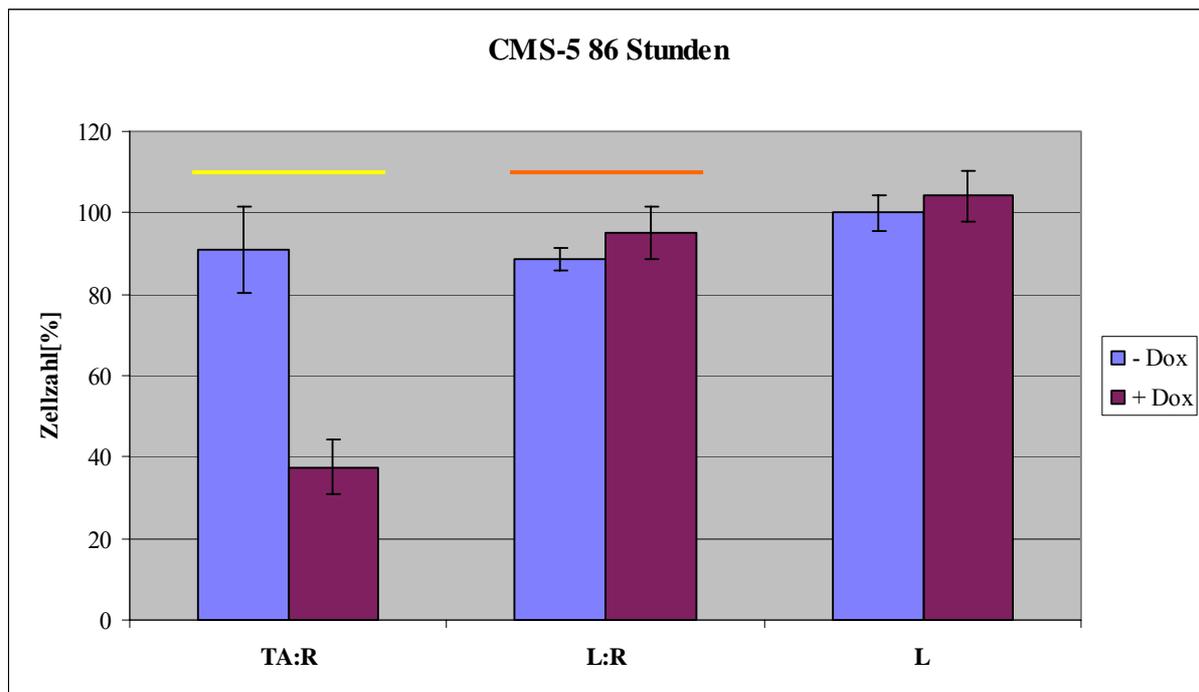
Die Y-Achse gibt den Prozentsatz der überlebenden Zellen an. Als 100 Prozent wird der Wert der Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin angenommen.

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin). Dox: Doxyzyklin

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Der Vergleich des nichtinduzierten mit dem induzierten Ansatz zeigt sich für TA:R hoch signifikant (gelb:  $p < 0,0001$ ), während der für L:R nicht signifikant ist (orange:  $p = 0,2444$ ). Stellt man den induzierten Ansatz TA:R dem induzierten L:R gegenüber, so ergibt sich  $p < 0,0001$ , also hohe Signifikanz.

86 Stunden nach Infektion hat sich die Zahl der, die durch Induktion des Tet-ON-Systems gebildeten BS-RNase, überlebenden Zellen auf ca. 38 Prozent des Referenzwertes reduziert. Aber auch hier konnten nicht alle Zellen abgetötet werden. Die nichtinduzierten Ansätze zeigen ebenso wie die Kontrollansätze keinerlei Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31: Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 86 Stunden nach Infektion**

Die Grafik basiert auf den Ergebnissen des XTT-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Viruskombinationen:

TA: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA), R: Responsevirus (AdtTSr), L: Leervirus (Addl70-3)

Die Gesamt-MOI beträgt jeweils 30.

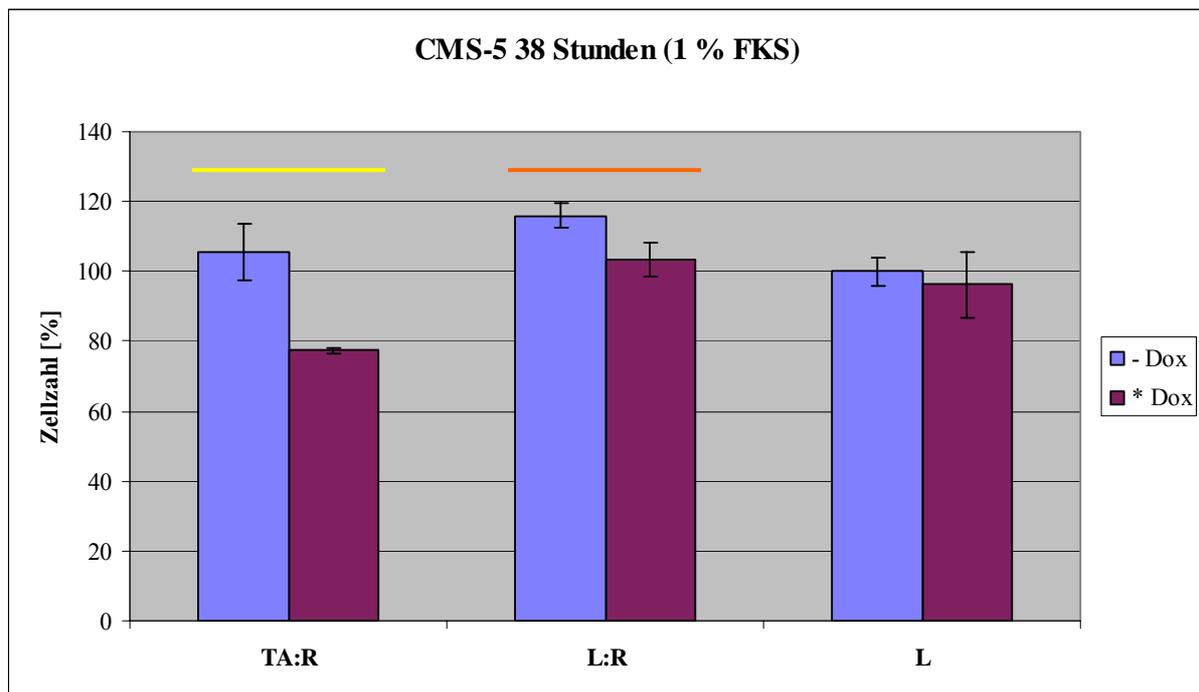
Die Y-Achse gibt den Prozentsatz der überlebenden Zellen an. Als 100 Prozent wird der Wert der Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin angenommen.

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin). Dox: Doxyzyklin

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Der Vergleich des nichtinduzierten mit dem induzierten Ansatz zeigt sich für TA:R signifikant (gelb:  $p=0,0018$ ), während der für L:R nicht signifikant ist (orange:  $p=0,172$ ). Stellt man den induzierten Ansatz TA:R dem induzierten L:R gegenüber, so ergibt sich  $p=0,0004$ , also hohe Signifikanz.

Die Versuchsreihe, die mit nur einem Prozent FKS im Medium (statt 10 Prozent) durchgeführt wird, zeigt nach Auswertung des XTT-Assays mit ca. 78 Prozent (38 Stunden, Abbildung 32) und ca. 34 Prozent (86 Stunden, Abbildung 33) vitalen CMS-5-Zellen in den induzierten Ansätzen (jeweils bezogen auf den Referenzwert Leervirus ohne Doxyzyklin) nahezu identische Ergebnisse wie die oben dargestellten. Auch hier gelingt es nicht, die CMS-5-Zellen durch Induktion der Genexpression und die damit synthetisierte BS-RNase vollständig abzutöten.



**Abbildung 32: Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 38 Stunden nach Infektion Infektionsansatz mit einem Prozent FKS im Medium**

Die Grafik basiert auf den Ergebnissen des XTT-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Viruskombinationen:

TA: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA), R: Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Add170-3)

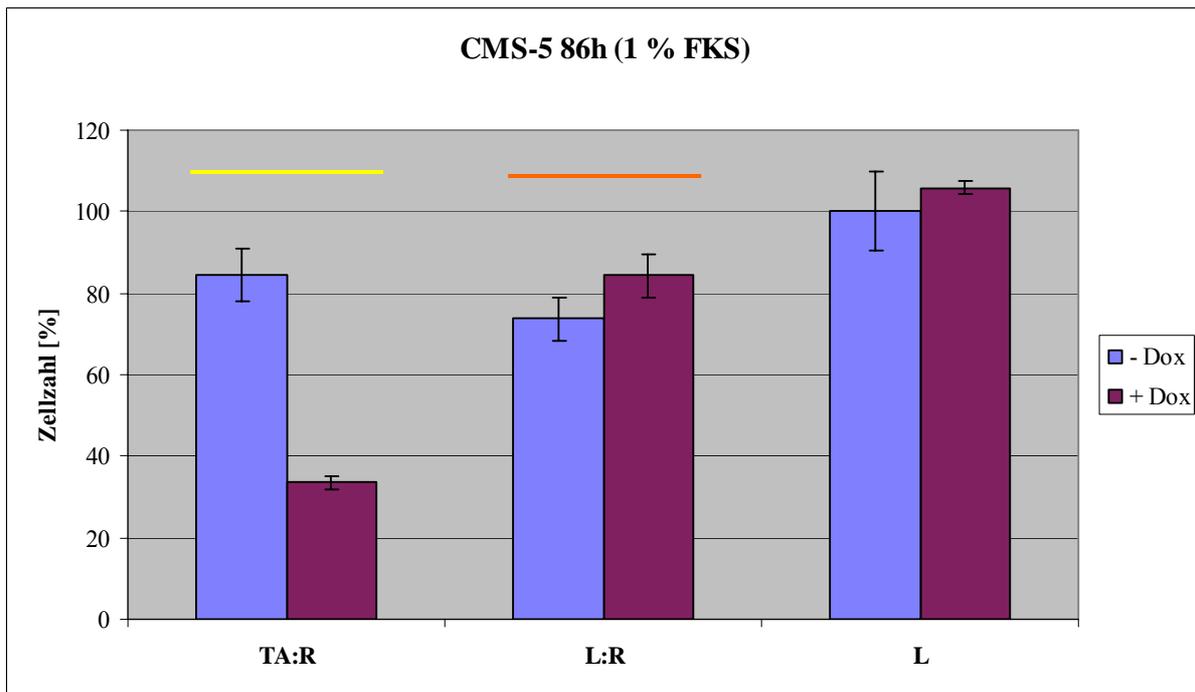
Die Gesamt-MOI beträgt jeweils 30.

Die Y-Achse gibt den Prozentsatz der überlebenden Zellen an. Als 100 Prozent wird der Wert der Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin angenommen.

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin). Dox: Doxyzyklin

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Der Vergleich des nichtinduzierten mit dem induzierten Ansatz zeigt sich für TA:R signifikant (gelb:  $p=0,0039$ ), während der für L:R ebenfalls signifikant ist (orange:  $p=0,0221$ ). Stellt man den induzierten Ansatz TA:R dem induzierten L:R gegenüber, so ergibt sich  $p=0,0008$ , also hohe Signifikanz.



**Abbildung 33: Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 86 Stunden nach Infektion Infektionsansatz mit einem Prozent FKS im Medium**

Die Grafik basiert auf den Ergebnissen des XTT-Assays.

Die x-Achse zeigt die verwendeten Viruskombinationen:

TA: Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA), R: Responsevirus (AdfTSr), L: Leervirus (Add170-3)

Die Gesamt-MOI beträgt jeweils 30.

Die Y-Achse gibt den Prozentsatz der überlebenden Zellen an. Als 100 Prozent wird der Wert der Infektion Leervirus ohne Doxyzyklin angenommen.

Die blauen Balken stehen für die nichtinduzierten Ansätze (ohne Doxyzyklin), die roten für die induzierten (mit Doxyzyklin). Dox: Doxyzyklin

Dreifachansätze sind gemittelt und die Standardabweichungen angegeben.

Der Vergleich des nichtinduzierten mit dem induzierten Ansatz zeigt sich für TA:R hoch signifikant (gelb:  $p=0,0002$ ), während der für L:R nicht signifikant ist (orange:  $p=0,0695$ ). Stellt man den induzierten Ansatz TA:R dem induzierten L:R gegenüber, so ergibt sich  $p<0,0001$ , also hohe Signifikanz.

### 5.5.3 Vergleich der Zelllinien

Abschließend kann gesagt werden, dass sich sowohl bei HeLa als auch bei CMS-5-Zellen eine deutliche Bildung von BS-RNase durch das Tet-On-System mittels Western Blot-Analyse nachweisen läßt, es allerdings in keinem der Versuche gelungen ist, die malignen Zellen dadurch vollständig abzutöten.

Es wurde nur eine maximale Reduktion der Zellen auf 25 (HeLa) bzw. 34 (CMS-5) Prozent des Referenzwertes erreicht (Messungen 86 Stunden nach Infektion).

## **6 DISKUSSION**

Es war Ziel dieser Arbeit, im Hinblick auf eine neue Therapiemöglichkeit von Tumorerkrankungen, ein funktionierendes System adenoviraler Vektoren für bestimmte Tumorzelllinien zu etablieren, mit dem die Tumorzellen durch die Expression der zytotoxischen BS-RNase zuverlässig abgetötet werden können. Die Wirkung dieses zytotoxischen Proteins wird hierbei durch die gezielte Regulation der Expression mit dem Tet-On-System gesteuert. Es sollte eine Zelllinie gefunden werden, die geeignet ist, später im Tiermodell eingesetzt zu werden. Hierzu wurde mit den Tumorzelllinien A431, HeLa und CMS-5 gearbeitet. Anhand der Nichttumorzelllinien Hs68 und NIH/3T3 sollte die Spezifität der Toxizität der BS-RNase für Tumorzellen bestätigt werden.

### **6.1 Diskussion der erzielten Ergebnisse**

Zunächst wurde die Infizierbarkeit der Zelllinien A431, HeLa, CMS-5 und Hs68 durch die Infektion mit einem adenoviralen Vektor, der EGFP als zu exprimierendes Gen trägt, und die hierdurch entstandene Fluoreszenz bestimmt. Dabei stellten sich CMS-5-Zellen als am leichtesten mit adenoviralen Vektoren zu infizieren heraus, denn hier zeigten sich bereits bei einer MOI von circa 0,2 fünfzig Prozent infizierte Zellen (MOI 50). HeLa-Zellen erreichten diesen Wert erst mit einer MOI 1. Am schwersten infizierbar zeigten sich die Zelllinien A431 und Hs68 (MOI 50 bzw. 20). Die Aufnahme des adenoviralen Vektors wird durch das Vorhandensein von CAR-Rezeptoren und Integrinen auf der Zelloberfläche, an denen die Adsorption des Adenovirus bzw. adenoviralen Vektors als erster Schritt stattfindet, limitiert. Daraus kann man ableiten, dass eine hohe Anzahl dieser Strukturen auf der Zelloberfläche die Aufnahme des adenoviralen Vektors erleichtert und somit bei leicht zu infizierenden Zelllinien vorhanden sein muss. Umgekehrt weisen schwer infizierbare Zelllinien nur wenige dieser Strukturen auf. BERGELSON et al. (1997) konnten zeigen, dass CAR-transfizierte Hamsterzellen 100mal empfänglicher für adenovirusmedierten Gentransfer waren als unveränderte.

Anschließend wurde die Sensitivität der Zelllinien A431, HeLa, CMS-5, Hs68 und NIH/3T3 gegenüber gereinigter BS-RNase gemessen. Dabei stellte sich ebenfalls die Zelllinie CMS-5 als die empfindlichste heraus, da sie bereits ab einer Endkonzentration von 10 µg/ml BS-RNase eine Reduktion der Zellzahl erkennen ließ und mit der höchsten Endkonzentration von 100 µg/ml der stärkste Abtötungseffekt von allen Zelllinien erreicht wurde (ca. 10 Prozent überlebende Zellen). 50 Prozent abgetötete Zellen wurden bei ca. 15 µg/ml BS-RNase

erreicht. Die Zelllinien A431 und HeLa zeigten sich weniger empfindlich und wiesen diese Zahl abgetöteter Zellen erst bei ca. 35 bzw. 40 µg/ml BS-RNase vor.

Ein überraschendes Bild ergab sich für die Nichttumorzelllinien NIH/3T3 und Hs68 (in geringerer/höherer Dichte), da sie sich gegenüber der BS-RNase ebenfalls empfindlich zeigten (50 Prozent abgestorbene Zellen bei ca. 25 bzw. 40/50 µg/ml), was nur bei den verwendeten malignen Zelllinien zu erwarten gewesen wäre. Die murine Tumorzelllinie CMS-5 zeigte sich somit gegenüber ihrer murinen benignen Vergleichszelllinie NIH/3T3 um etwa 1,7x sensitiver, die humanen malignen A431- und HeLa-Zellen gegenüber der humanen benignen Zelllinie Hs68 (in geringerer Dichte) nur etwa 1,1x bzw. genauso sensitiv. Das Absterben dieser Nichttumorzelllinien widerspricht der dokumentierten Eigenschaft der BS-RNase ihren zytotoxischen Effekt nur gegenüber malignen Zellen zu entfalten (LACCETTI et al. 1992, LACCETTI et al. 1994). Aber auch SMITH et al. (1999) war es bereits gelungen, mit der, der BS-RNase verwandten, Onconase NIH/3T3-Zellen abzutöten, obwohl auch diese nur eine selektive Antitumor-Aktivität aufweisen sollte.

Desweiteren fällt bei den Ergebnissen der Fibroblasten-Zelllinie Hs68 auf, dass diejenigen Zellen, die in geringerer Dichte ausgelegt wurden, und sich damit eher in einer Wachstumsphase des Zellzyklus befanden, auch eine größere Sensitivität gegenüber der RNase zeigten (25 Prozent überlebende Zellen bei einer Konzentration von 100 µg/ml BS-RNase; 50 Prozent abgestötete Zellen bei ca. 40 µg/ml), als die Hs68-Zellen größerer Dichte (35 Prozent überlebende Zellen bei 100 µg/ml; 50 Prozent abgestötete Zellen bei ca. 50 µg/ml). Es scheint, dass der Zellzyklus für die zytotoxische Aktivität der BS-RNase eine wichtige Rolle spielt. SMITH et al. (1999) stellten fest, dass aktive, wachsende NIH/3T3-Zellen sensitiver auf die amphibische Onconase, ebenfalls Mitglied der RNase A-Superfamilie mit Antitumor-Aktivität, reagierten als ruhende Zellen. Onconase tötete die Zellen abhängig vom Stadium des Zellzyklus, in dem sich diese befanden. Ähnliches ist auch für Hs68-Zellen und BS-RNase vorstellbar und würde damit eine Erklärung für die hier erzielten Ergebnisse darstellen. Zur genaueren Analyse müssten die Zellen allerdings synchronisiert werden und eine Zellzyklusanalyse müsste durchgeführt werden.

Auch VIOLA et al. (2005) zeigten, dass BS-RNase in der Lage war, sowohl bei malignen als auch bei normal proliferierende Zellen Apoptose auszulösen, während bei nichtproliferierenden Zellen kein Effekt beobachtet werden konnte. Sie bringen diesen selektiv zytotoxischen Effekt der BS-RNase in Zusammenhang mit der Telomeraseaktivität proliferierender Zellen. Das Enzym Telomerase ist bei den meisten Eukaryoten verantwortlich für die komplette Replikation der Chromosomenenden (Telomere). Der fortschreitende

Verlust der Telomere ist verantwortlich für die begrenzte Lebensspanne normaler Zellen. Während in den meisten somatischen Zellen des Menschen keine Telomeraseaktivität festzustellen ist, und deren Lebensspanne somit begrenzt ist, findet man sie in den meisten Tumorzellen. Die von VIOLA et al. (2005) aufgestellte Hypothese besagt, dass eine direkte Wirkung der BS-RNase auf eine Telomeraseuntereinheit ein möglicher Mechanismus deren proapoptotischer Wirkung auf ausschließlich proliferierende Zellen sein könnte. Um weitere Schlüsse auf die in dieser Arbeit verwendeten Hs68-Zellen ziehen zu können, müsste ihre Telomeraseaktivität bei den verwendeten unterschiedlichen Populationsdichten bestimmt werden. Möglich wäre dies mit Hilfe des TRAP-Assays, einem photometrischen Enzym-Immunoassays.

Weiterhin fiel bei der Feststellung der Sensitivität der einzelnen Zelllinien auf, dass HeLa-Zellen mit der Höchstkonzentration von 100 µg/ml gereinigter BS-RNase hier nur auf circa 35 Prozent des Referenzwertes reduziert werden konnten, wohingegen es Matthias Strobl in einem vergleichbaren Versuchsansatz mit dieser Konzentration ein Ergebnis von circa 19 Prozent überlebenden HeLa-Zellen erreicht hat. Bei einer Endkonzentration von 1000 µg/ml überlebten nur circa 6 Prozent der HeLa-Zellen (STROBL 2006).

SPINNLER (2006) konnte die Zahl der überlebenden HeLa-Zellen nach identischer Inkubation mit BS-RNase bei einer Konzentration von 100 µg/ml auf circa 12 Prozent des Referenzwertes, bei einer Konzentration von 1000 µg/ml sogar auf nur 1 Prozent reduzieren. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Tatsache sein, dass es sich bei den verwendeten HeLa-Zellen um Populationen aus unterschiedlichen Quellen handelt. Es wäre denkbar, dass die in dieser Arbeit verwendete Population Zellen enthält, die sich gegenüber der BS-RNase resistenter zeigen, als diejenigen, die von STROBL und SPINNLER verwendet wurden.

Ein bekanntes Problem der Regulation der Genexpression mit Hilfe des Tet-On-Systems ist die entstehende unerwünschte Hintergrundexpression des Zielgens im „nicht-angeschalteten“ Zustand (KISTNER et al. 1996, FREUNDLIEB et al. 1999). Gerade bei der Verwendung von zytotoxischen Genen wie der BS-RNase kann es hier durch unkontrollierte Expression zum unerwünschtem Absterben von Zellen kommen, beispielsweise bei der Produktion der Vektoren. FREUNDLIEB et al. (1999) arbeiteten erfolgreich mit dem Tetrazyklin-kontrollierten Transkriptionalen Dämpfer (tTS), um die Hintergrundexpression zu reduzieren und halten dieses System als speziell für den Transfer zytotoxischer Gene geeignet.

Das in dieser Arbeit verwendete adenovirale Zweivektorsystem bestand aus einem Transaktivatorvirus (rtTA) und einem Responsevirus mit dem Transkriptionalen Dämpfer und

dem zu exprimierenden Gen (tTS und TRE). Um das optimale Verhältnis (Ratio) dieser beiden Vektoren zueinander, mit dem die besten Expressionswerte zu erreichen sind, bestimmen zu können, wurden verschiedene Ratios für die jeweiligen Zelllinien verglichen. Dazu wurde im Responsevektor Luciferase als Reportergen verwendet. Gemessen wurde hierbei die, durch die Expression des Zielgens Luciferase, entstehende Lichtmenge, womit die Proteinbiosyntheseleistung der Zellen beurteilt werden kann. Gleichzeitig konnte die Hintergrundexpression im „nicht-angeschaltetem“ Zustand beurteilt werden.

Auffallend bei der Bestimmung der optimalen Ratio waren die großen Unterschiede in den absolut erreichten Expressionswerten zwischen den Zelllinien A431, HeLa, CMS-5 und Hs68. Sie lassen sich zum einen mit der grundsätzlich unterschiedlich Infizierbarkeit der Zellen mit adenoviralen Vektoren, hervorgerufen durch unterschiedliche Dichte von CAR bzw.  $\alpha_v$  Integrinen auf der Oberfläche, aber auch mit dem unterschiedlichen Zellstoffwechsel erklären. Die unterschiedlichen Verdopplungszeiten der einzelnen Zelllinien lassen auf einen eher hohen bzw. niedrigen Zellstoffwechsel schließen. So zeigen beispielsweise CMS-5-Zellen durch schnelle Verdopplungen einen eher hohen Stoffwechsel, während Hs68-Zellen für die Verdopplung wesentlich mehr Zeit benötigen und somit einen niedrigeren Zellstoffwechsel aufweisen. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zur Ermittlung der optimalen Ratio erreichte die leicht zu infizierende und schnell wachsende Zelllinie CMS-5 maximale Expressionswerte von circa 55 Milliarden rlu/mg Gesamtprotein (Ratio 1:20, induziert), was einer achtfachen Induktion im Vergleich zum Referenzwert (AdCMVLuc) entspricht, während Zelllinien wie Hs68 und A431, die schwerer infizierbar sind und längere Verdopplungszeiten aufweisen, eine deutlich geringere Expression im selben Versuchsansatz aufwiesen (circa 10 Mio rlu/mg Gesamtprotein bei Ratio 1:4, entspricht Induktionsfaktor 4 im Vergleich zur Referenz bzw. 930000 rlu/mg Gesamtprotein bei Ratio 1:20, entspricht Induktionsfaktor 3). HeLa-Zellen konnten bei der Ratio 1:4 mit 86,5 Millionen rlu/mg Gesamtprotein ihren höchsten Wert erreichen (Induktionsfaktor 6 im Vergleich zur Referenz). Die Ratio 1:10 wurde schließlich für die weitere Verwendung gewählt, weil sie für alle Zelllinien gute Expressionswerte erzielt hat. Dieses Verhältnis stimmt außerdem mit den sowohl von STROBL (2006) als auch von SPINLER (2006) als optimal für ihre Zelllinien bestimmten Verhältnis überein.

Nach Ermittlung der Infizierbarkeit der Zelllinien mit adenoviralen Vektoren, ihrer Sensitivität gegenüber der gereinigten BS-RNase, sowie der Festlegung der optimalen Ratio für das Tet-On-System, stellten sich die Tumorzelllinien HeLa und CMS-5 als die, für ein eventuelles *in vivo*-Experiment am besten geeignetsten heraus, da sie einerseits nach

subkutaner Applikation solide Tumoren in Nacktmäusen bilden und sich andererseits beide gut mit adenoviralen Vektoren infizieren ließen, sich empfindlich gegenüber der BS-RNase zeigten und mit dem Tet-On-System hohe Expressionswerte erreichten. Zudem wären beide relativ leicht in ein Tiermodell übertragbar. Die Produktion der BS-RNase durch mit dem Tet-On-System infizierten Zellen und das dadurch erreichte Absterben dieser Zellen, wurden daher weiter an der humanen Adenokarzinom-Zelllinie HeLa und der murinen Fibrosarkom-Zelllinie CMS-5 untersucht.

Bei beiden Zelllinien ließ sich 86 Stunden nach Infektion mit dem Tet-On-System und Induktion durch Doxyzyklin mit Hilfe der Western Blot-Analyse das Vorhandensein der BS-RNase im Überstand nachweisen. Hierbei konnte bei beiden Zelllinien hauptsächlich das Dimer der BS-RNase gefunden, das Monomer jedoch in geringerer Menge ebenfalls nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass v.a. die aktive Form der BS-RNase im Überstand der Infektion dedektiert werden konnte, spricht für einen effizienten Vorgang der Produktion und auch Sezernierung des Proteins. Es gelang allerdings in keinem der Fälle, hierdurch alle Tumorzellen abzutöten.

HeLa-Zellen waren 38 Stunden nach der Infektion auf 20 Prozent des Referenzwertes reduziert, wohingegen nach 86 Stunden 25 Prozent lebende Zellen gemessen werden konnten. Die Zahl der lebenden Zellen nahm also wieder zu. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass sich in der hier verwendeten Population von HeLa-Zellen ein bestimmter Prozentsatz an Zellen befand, die Resistenzen gegen die BS-RNase aufwiesen. Diese konnten sich trotz weiterer Einwirkung der BS-RNase vermehren und somit stieg mit fortschreitender Zeit auch die Zellzahl wieder an. Die Möglichkeit eines Vorhandenseins resistenter Zellen wurde schon im Zusammenhang mit differierenden Sensitivitätsergebnissen von STROBL (2006) und SPINNLER (2006) diskutiert. Weiterhin ist nicht auszuschließen, da u.a. die produzierenden Zellen abgetötet werden, dass bei schnellem Wachstum nicht genügend BS-RNase zur Verfügung steht bzw. produziert wird, um alle Zellen abzutöten.

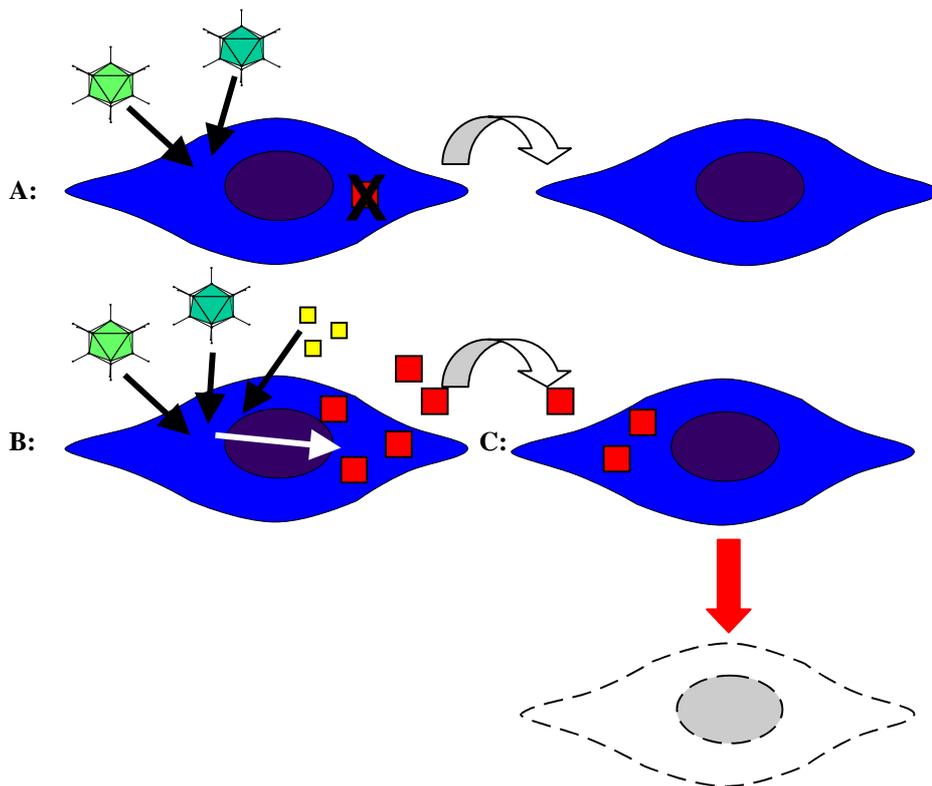
CMS-5-Zellen dagegen zeigten 38 Stunden nach Infektion noch 78 Prozent und nach 86 Stunden 38 Prozent überlebende Zellen (bzw. 78 und 34 Prozent bei Verwendung von nur einem Prozent FKS). Diese Ergebnisse überraschen, da anhand der im Vorfeld ermittelten Daten ein effizienteres Absterben dieser Zellen zu erwarten gewesen wäre. CMS-5-Zellen stellten sich sowohl als von allen getesteten Zelllinien am leichtesten mit adenoviralen Vektoren infizierbar als auch am sensitivsten gegenüber der gereinigten BS-RNase heraus. Im Luciferase-Assay wiesen sie mit Abstand die höchsten Expressionswerte auf. Da die Bildung der BS-RNase anhand der Western Blot-Analyse belegt wurde, müssen weitere Faktoren zur

Erklärung der geringen Absterberate berücksichtigt werden.

Auch VESCIA et al. (1980) berichteten über eine bestimmte Anzahl an Tumorzellen, die die Behandlung mit BS-RNase unter experimentellen Bedingungen überleben. Sie beschrieben weiterhin, dass nur die dimere Variante der BS-RNase ihre zytotoxische Aktivität entwickeln kann. Die monomeren Anteile der BS-RNase, die hier im Western Blot ebenfalls nachgewiesen werden konnten, würden demzufolge keine zytotoxische Aktivität aufweisen. KIM et al. (1995) beschreiben, dass sich die zwei natürlich vorkommenden Quartärstrukturen der BS-RNase (MxM und M=M) in der reduzierenden Umgebung des Zytosols unterschiedlich verhalten: Während MxM als intaktes Dimer bestehen bleibt, wird M=M zum Monomer reduziert. Nur das nichtreduzierbare Dimer kann seine Zytotoxizität entfalten. Das monomere Derivat wird vom RNase-Inhibitor (RI) des Zytosols abgefangen. Es ist nicht auszuschließen, dass je nach Zelltyp variierende Anteile der nicht zytotoxisch aktiven M=M-Form produziert werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre somit die Verteilung der beiden Quartärstrukturen des Enzyms, wobei die reduzierte M=M-Form der BS-RNase in der Zelle durch den RNase-Inhibitor des Zytosols blockiert wird, und dadurch nicht seine volle zytotoxische Aktivität entfalten kann.

Vorstellbar wäre auch, dass die *in situ* produzierte BS-RNase aus anderen Gründen ihre Stabilität in der Zelle verliert und als Monomer für den RNase-Inhibitor angreifbar wird bzw. ihre zytotoxische Aktivität nicht mehr entfalten kann.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Produktion von BS-RNase nach adenoviralem Gentransfer und Induktion der Expression möglich ist. Die Zellen wurden dabei je nach Suszeptibilität gegenüber adenoviraler Infektion und BS-RNase effizient, wenn auch nicht vollständig, abgetötet.



**Abbildung 34: Schema des Mechanismus des hier verwendeten Tet-On-Systems zur Expression der BS-RNase**

**A: nichtinduzierter Zustand ohne Doxzyklin:**

Infektion der Zelle (blau) mit Transaktivator- und Responsevirus (hell- und dunkelgrün: AdCMVrtTA bzw. AdfTSr)

In Abwesenheit von Doxzyklin wird keine BS-RNase gebildet.

**B: induzierter Zustand mit Doxzyklin:**

Infektion der Zelle (blau) mit Transaktivator- und Responsevirus (hell- und dunkelgrün: AdCMVrtTA bzw. AdfTSr)

Durch Zugabe von Doxzyklin (gelb) wird das Tet-On-System aktiviert, BS-RNase (rot) wird produziert und freigesetzt.

**C:** Endozytose der BS-RNase (rot) durch Nachbarzelle (blau), Entfaltung der zytotoxischen Aktivität und Zelltod

Anhand des Schemas des hier verwendeten Wirkungsmechanismus (Abbildung 34) ist ersichtlich, dass es mehrere Ansatzpunkte zur Verbesserung des hier verwendeten Systems geben könnte. Die Überlegungen hierzu sollten Wege finden, das erreichte, aber relativ geringe Absterben der Tumorzellen zu verbessern. In Hinblick auf eine eventuelle klinische Anwendung dieses Systems wäre es von Bedeutung, dass durch die erste Administration der Vektoren optimalerweise alle Tumorzellen abgetötet würden, um das Risiko einer Immunantwort bei notwendiger erneuter Gabe zu vermeiden. Obwohl klinische Studien generell eine geringe Toxizität und nur wenige ernste Nebenwirkungen gezeigt haben, gab es 1999 einen Todesfall eines jungen Mannes mit Ornithin-Cytosin-Transferase-Defizienz als direkte Konsequenz der adenoviralen Gentherapie. Ein adenoviraler Vektor der ersten Generation, der die Ornithin-Cytosin-Transferase exprimiert, wurde mit hohem Titer durch die Leberarterie injiziert. Auf die systemische Aktivierung der Immunantwort folgte

schließlich ein Multiorganversagen. Dies war der erste Todesfall in zehn Jahren klinischer Studien der Gentherapie mit mehr als 3500 Patienten (RELPH et al. 2005). Dies belegt die Notwendigkeit, das Risiko für den Patienten bei der Verwendung von adenoviralen Vektoren so gering wie möglich zu halten.

Ein grundsätzliches Problem des hier verwendeten Tet-On-Systems waren die vergleichsweise niedrigen Titer, die für den Transaktivatorvirus erreicht wurden. Bei verschiedenen Cäsiumchloridaufreinigungen wurden für diesen Virus nur Titer um  $1 \times 10^9$  pfu/ml erzielt. Ziel könnte hier sein, einen neuen Transaktivatorvirus zu konstruieren, der über höhere Titer verfügt. Auch bei *in vivo*-Experimenten wäre dies insofern von Vorteil, als dass für dieselbe Virusmenge geringere Volumina verabreicht werden müssten. Ein weiterer Nachteil des verwendeten Tet-On-Systems könnte außerdem die Tatsache sein, dass zwei virale Vektoren gleichzeitig die gleiche Zelle erreichen müssen, um ihre Wirksamkeit zu entfalten (siehe Abbildung 34). RUBINCHIK et al. (2005) berichten von der Entwicklung eines einzigen adenoviralen Vektors, der sowohl den TRE-Promotor mit dem zu exprimierenden Gen (hier GFP), als auch den reversen Transaktivator (rtTA) gekoppelt mit dem Transkriptionalen Dämpfer (tTS) enthält. Dieser Vektor trägt einen CMV-Promotor, dem der reverse Transaktivator folgt, und weist Deletionen in der E1-, E3- und E4-Regionen auf. Sie erhielten damit ebenfalls eine reduzierte Hintergrundexpression und damit ein effektives Transgen-Regulationssystem. Es wäre somit denkbar ein Einvektorsystem zu konstruieren, ähnlich dem von RUBINCHIK et al. 2005 entwickelten, das alle benötigten Elemente des Tet-On-Systems in einem Adenovirus vereint. Vorteil hierbei wäre, dass nur ein Virus die Tumorzelle erreichen muss, was die Belastung des Organismus durch eine geringere Anzahl an Vektoren verringern würde. Bei Zelllinien, die adenovirale Vektoren nur in begrenzter Anzahl aufnehmen, könnte so leichter ein größerer Prozentsatz der Zellen erreicht werden.

Weiterhin sollte auch über die Verwendung anderer Regulationssysteme als des Tet-Systems nachgedacht werden. In einem direkten Vergleich von fünf Regulationssystemen durch XU et al. (2003) stellte sich das Dimerizer-System als den anderen (u.a. auch dem Tet-System) überlegen heraus, da es sowohl die höchste Induktion der Expression, als auch die geringste basale Expression erreichte. MIZUGUCHI und HAYAKAWA (2001) allerdings sehen die Kombination von adenoviralen Vektoren und dem Tet-System als ein attraktives Werkzeug der Gentherapie und der Analyse der Genfunktion, das mit einer Vielzahl von Genen und Zelltypen verwendet werden kann.

Die Verwendung anderer Tumorzelllinien oder der Ersatz der BS-RNase durch Onconase, die MATOUSEK et al. (2003) als das potentere Zytotoxin bezeichneten, oder eine Verbesserung

der Stabilität der BS-RNase, um zu verhindern, dass das Enzym in die nicht zytotoxischen Monomere dissoziiert, könnten ebenfalls in Erwägung gezogen werden. KIM et al. (2004) konnten mit einem glykosyliertem Derivat der Onconase eine höhere Toxizität gegenüber Tumorzellen erreichen. Sie führen diese größere Toxizität auf eine verbesserte Stabilität des Proteins zurück. LEE und RAINES (2005) berichten von der Konstruktion einer monomeren Variante der BS-RNase, die in der Lage ist, dem RNase-Inhibitor (RI) zu entkommen und eine bis zu 30 mal höhere zytotoxische Aktivität zu entwickeln als die Wildtyp-BS-RNase. Diese Toxizität ist höher als die aller anderen Varianten der RNase A-Familie, inklusive derer der Onconase. DEONARAIN und EPENETOS (1998) gelang es die BS-RNase an einen einsträngigen Antikörper (scFv) zu koppeln, der gegen das tumorassoziierte Antigen humane placentale alkalische Phosphatase (PLAP) gerichtet ist. Dieses Antigen wird in vielen Tumoren exprimiert, so z.B. in denen des Ovars oder der Testikel. Durch Ankopplung zusätzlicher Peptide an das scFv-BS-RNase-Fusionsprotein konnte eine Verbesserung des intrazellulären Transports erreicht werden. Alle hergestellten Derivate waren *in vitro* toxischer gegen PALP-exprimierende Tumorzellen als die Wildtyp-BS-RNase. All dies könnten interessante Ansätze sein, das bestehende System zu verbessern und effektiver zu machen.

## **6.2 Ausblick**

Dass mit Hilfe des hier verwendeten adenoviralen Tet-On-Systems in Kombination mit der BS-RNase Tumorzellen abgetötet werden können, konnte in dieser Arbeit bewiesen werden. Jetzt kommt es für die Zukunft darauf an, das bestehende System so zu optimieren, dass die bestmögliche Wirkung mit gleichzeitig geringstmöglichen Risiken erzielt werden kann, um so den Grundstein für klinische Untersuchungen am Menschen zu legen.

Hierfür sollte v.a. über die Weiterentwicklung des verwendeten Transaktivator-Systems nachgedacht werden. Möglich wären ein Ersatz des Transaktivatorvirus durch einen effizienteren oder die Entwicklung eines Einvektorsystems, um die Zellen möglichst optimal zu erreichen. Da die Zellzyklen der verwendeten Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen, sollten auch diese weiter untersucht werden. Auch der Einsatz anderer Primärzellen ist denkbar.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Krebserkrankungen sind bis heute trotz einer Vielzahl von Therapieansätzen nicht zufriedenstellend therapierbar. Eine neue gentherapeutische Strategie zur Behandlung von Tumoren wäre der Einsatz der zytotoxischen BS-RNase mit Hilfe des adenoviralvermittelten Tet-On-Regulationssystems. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Einsatz dieses Regulationssystems in Kombination mit der BS-RNase in Zelllinien unterschiedlicher Tumorarten und Spezies, um diese auf ihre eventuelle Eignung in einem weiterführenden *in vivo*-Experiment beurteilen zu können. Hierzu wurden die humane Epidermoid-Karzinom-Zelllinie A431, die humane Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie HeLa, die murine Fibrosarkom-Zelllinie CMS-5 und, als benigne Referenz, die humane Fibroblasten-Zelllinie Hs68 ausgewählt. Diese wurden zunächst mit Hilfe des adenoviralen Vektors AdEGFP und der durch diesen erzeugten Fluoreszenz auf ihre Infizierbarkeit mit adenoviralen Vektoren getestet. Die Sensitivität der Zellen gegenüber gereinigter BS-RNase wurde im XTT-Assay bestimmt. Die optimale Ratio zwischen dem Transaktivator- und dem Responsevirus, bei der die größten Expressionswerte erreicht werden, konnte mit Hilfe des Luciferase-Assays ermittelt werden. CMS-5-Zellen zeigten sich von allen Zelllinien am leichtesten infizierbar, am sensitivsten gegenüber der BS-RNase und wiesen auch die größten Expressionswerte auf. Für den Einsatz des Tet-On-Systems zur regulierten Expression der BS-RNase wurden aufgrund der vorherigen Ergebnisse die Tumorzelllinien HeLa und CMS-5 gewählt. Diese wurden mit den adenoviralen Vektoren AdCMVrtTA (Transaktivator) und AdtTSr (Responsevirus) infiziert und die Genexpression durch Zugabe von Doxyzyklin induziert. Bei beiden Zelllinien ließ sich in den Überständen der Infektion das gebildete aktive Dimer der BS-RNase mit Hilfe der Western Blot-Analyse nachweisen. Die Tumorzellen konnten durch das entstandene Toxin zwar effizient, aber nicht vollständig abgetötet werden. HeLa-Zellen ließen sich auf circa 25 Prozent und CMS-5-Zellen auf nur circa 34 Prozent des Referenzwertes reduzieren. Ursache für das unvollständige Absterben der Zellen könnte eine beeinträchtigte Stabilität der gebildeten BS-RNase sein, so das ein Teil des Enzyms in die inaktiven Monomere dissoziiert und seine zytotoxische Aktivität nicht entfalten kann. Auch das Vorhandensein resistenter Zellpopulationen wäre vorstellbar. Die Herausforderung für die Zukunft wird nun sein, das bestehende System so zu optimieren, dass das Abtöten der Tumorzellen noch effektiver und möglichst vollständig erreicht werden kann, um damit eine effiziente und sichere klinische Anwendung gewährleisten zu können. Wege hierzu wären eine weitere Verbesserung des adenoviralen Regulationssystems und eine Verstärkung der

zytotoxischen Potenz der BS-RNase, eventuell auch ihr Ersatz durch ein potenteres Toxin.

## 8 SUMMARY

Despite numerous different types of tumor therapies the actual outcome is not satisfactory. A potential new strategy of gene therapy for tumor treatment could be adenovirally mediated Tet-On regulated expression of the cytotoxic BS-RNase. Aim of this paper was testing this specific regulation system in combination with BS-RNase in cell lines of different tumor types and species in order to assess its suitability for *in vivo* experiments. Therefore the following cell lines were selected: human epidermoid-carcinoma cells A431, human cervix adenocarcinoma cells HeLa, murine fibrosarcoma cells CMS-5 and, as a benign reference, the human fibroblast cells Hs68. At first these cells were tested for their susceptibility to infection with adenoviral vectors using AdEGFP and its produced fluorescence. The sensitivity of these cells against purified BS-RNase was determined in the XTT-assay. The optimum ratio between the transactivator- and responsevirus with the best expression rates could be found with the help of the Luciferase-assay. CMS-5 cells appeared to be the easiest cells to infect, most sensitive against BS-RNase showing the largest rates of expression out of all cell lines. Based on these results the tumor cell lines HeLa and CMS-5 were chosen for the use with the Tet-On-system for regulated expression of BS-RNase. These cells were infected with AdCMVrtTA (transactivator) and AdtTSr (responsevirus) and the expression of the gene was induced by addition of Doxycycline. Western blot analysis demonstrated dimers – the active form- of BS-RNase in the supernatant of infected, induced cell lines. The tumor cells were killed efficiently, but not completely by the produced cytotoxin. HeLa cells were reduced to about 25 percent of the reference value, and CMS-5 to about 34 percent only. The reason for incomplete cell killing could be explained by a reduced stability of the BS-RNase. As a result parts of the enzyme dissolve in inactive monomers and can not develop their cytotoxic activity. Alternatively the existence of resistant cell populations is conceivable. The future challenge will be to optimize the existing system in order to gain an efficient and complete killing of tumor cells, so that an efficient and safe clinical application of it could be envisaged. Strategies to reach that goal could be a further improvement of the adenoviral regulation system and the increase of the cytotoxic potency of BS-RNase or, eventually, its substitution by a more potent enzyme.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

BENIHOUD K., YEH P., PERRICAUDET M.

Adenovirus vectors for gene transfer

Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10: 440-447

BERGELSON J. M., CUNNINGHAM J. A., DROGUETT G., KURT-JONES E. A.,  
KRITHIVAS A., HONG J. S., HORWITZ M. S., CROWELL R. L., FINBERG R. W.

Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5

Science, 1997, 275: 1320-1323

BRACALE A., SPALLETTI-CERNIA D., MASTRONICOLA M., CASTALDI F.,  
MANNUCCI R., NITSCH L., D'ALESSIO G.

Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease

The Biochemical Journal, 2002, 362: 553-560

BRACALE A., CASTALDI F., NITSCH L., D'ALESSIO G.

A role for the intersubunit disulfides of seminal RNase in the mechanism of its antitumor  
action

European Journal of Biochemistry, 2003, 270: 1980-1987

CINATL J. Jr., CINATL J., KOTCHETKOV R., VOGEL J.-U., WOODCOCK B. G.,  
MATOUSEK J., POUCKOVA P., KORNHUBER B.

Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells  
via induction of apoptosis

International Journal of Oncology, 1999, 15: 1001-1009

CINATL J. Jr., CINATL J., KOTCHETKOV R., MATOUSEK J., WOODCOCK B. G.,  
KOEHL U., VOGEL J.-U., KORNHUBER B., SCHWABE D.

Bovine seminal ribonuclease exerts selective cytotoxicity toward neuroblastoma cells both  
sensitive and resistant to chemotherapeutic drugs

Anticancer Research, 2000, 20: 853-860

D'ALESSIO G., LEONE E.

The action of seminal enzymes on ribonucleic acid

Proceedings of the Biochemical Society, 1963, 7

DEONARAIN MP., EPEMETOS AA.

Design, characterization and anti-tumor cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian  
ribonuclease-based immunotoxins

British Journal of Cancer, 1998, 77: 537-546

DOSTAL J., MATOUSEK J.

Isolation and some chemical properties of aspermatogenic substance from bull seminal vesicle  
fluid

Journal of Reproduktion and Fertility, 1973, 33: 263-274

EDELSTEIN M. L., ABEDI M. R., WIXON J., EDELSTEIN R. M.

Gene therapy clinical trials worldwide

1989 – 2004 – an overview“

The Journal of Gene Medicine, 2004, 6: 597-602

FREUNDLIEB S., SCHIRRA-MÜLER C., BUJARD H.

A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells

The Journal of Gene Medicine, 1999, 1: 4-12

GÄNSBACHER B., ZIER K., DANIELS B., CRONIN K., BANNERJI R., GILBOA E.

Interleukin 2 Gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity,

Journal of Experimental Medicine, 1990, 172: 1217-1224

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID)

Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends

2006

in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, [www.rki.de](http://www.rki.de)

GOSSEN M., BUJARD H.

Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89: 5547-5551

GOSSEN M., FREUNDLIEB S., BENDER G., MÜLLER G., HILLEN W., BUJARD H.

Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells

Science, 1995, 268: 1766-1769

GRAHAM F. L., SMILEY J., RUSSELL W. C., NAIRN R.

Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5

Journal of General Virology, 1977, 36(1): 59-71

HALE M. L.

Microtiter-based assay for evaluating the biological activity of ribosome-inactivating proteins

Pharmacology & Toxicology, 2001, 88: 255-260

HARDING T. C., GEDDES B. J., NOEL J. D., MURPHY D., UNEY J. B.

Tetracycline-regulated transgene expression in hippocampal neurones following transfection with adenoviral vectors

Journal of Neurochemistry, 1997, 69: 2620-2623

HARDING T. C., GEDDES B. J., MURPHY D., KNIGHT D., UNEY J. B.

Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system

Nature Biotechnology, 1998, 16: 553-555

HONG S. S., KARAYAN L., TOURNIER J., CURIEL D. T., BOULANGER P. A.

Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I  $\alpha 2$  domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells

The EMBO Journal, 1997, 16(9): 2294-2306

KAY M. A., GLORIOSO J. C., NALDINI L.

Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics  
Nature Medicine, 2001, 7(1): 33-40

KISTNER A., GOSSEN M., ZIMMERMANN F., JERECIC J., ULLMER C., LÜBBERT H., BUJARD H.

Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93: 10933-10938

KOVESDI I., BROUGH D. E., BRUDER J. T., WICKHAM T. J.

Adenoviral vectors or gene transfer

Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8: 583-589

LANCETTI P., PORTELLA G., MASTRONICOLA M. R., RUSSO A., PICCOLI R., D'ALESSIO G., VECCHIO G.

In vivo and in vitro growth-inhibitory effect of bovine seminal ribonuclease on a system of rat thyroid epithelial transformed cells and tumors

Cancer Research, 1992, 52: 4582-4586

LANCETTI P., SPALLETTI-CERNIA D., PORTELLA G., DE CORATO P., D'ALESSIO G., VECCHIO G.

Seminal ribonuclease inhibits tumor growth and reduces the metastatic potential of lewis lung carcinoma

Cancer Research, 1994, 54: 4253-4256

LEE Y.-B., GLOVER C. P. J., COSGRAVE A. S., BIENEMANN A., UNEY J. B.

Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors

Experimental Physiology, 2004, 90(1): 33-37

LEE J. E., RAINES R. T.

Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer

Biochemistry, 2005, 44: 15760-15767

LE GAL LA SALLE G., ROBERT J. J., BERRARD S., RIDOUX V., STRATFORD-PERRICAUDET L. D., PERRICAUDET M., MALLET J.

An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain

Science, 1993, 259: 988-990

MATOUSEK J.

The effect of bovine seminal ribonuclease (AS RNase) on cells of crocker tumour in mice

Experientia, 1973, 29(7): 858- 859

MATOUSEK J.

Embryotoxic effect of bull seminal ribonuclease and tissue absorption studies in rats

Journal of Reproduction and Fertility, 1975, 43: 171-174

- MATOUSEK J., STANEK R.  
Action of bull seminal vesicle ribonuclease on mouse leukaemic cells BP-8 and EL-4  
*Folia Biologica*, 1977, Volume 23, 56-64
- MATOUSEK J.  
Ribonucleases and their antitumor activity  
*Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2001, 129: 175-191
- MATOUSEK J., SOUCEK J., SLAVIK T., TOMANEK M., LEE J. E., RAINES R. T.  
Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease  
*Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2003, 136: 343-356
- MIZUGUCHI H., HAYAKAWA T.  
Characteristics of adenoviral-mediated tetracycline-controllable expression system  
*Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1568: 21-29
- MOLIN M., SHOSHAN M. C., ÖHMAN-FORSLUND K., LINDNER S., AKUSJÄRVI G.  
Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments  
*Journal of Virology*, 1998, 8358-8361
- NOUREDDINI S. C., KRENDELCHIKOV A., SIMONENKO V., HEDLEY S. J., DOUGLAS J. T., CURIEL D. T., KOROKHOV N.  
Generation and selection of targeted adenoviruses embodying optimized vector properties  
*Virus Research*, 2006, 116: 185-195
- PARKS R. J., CHEN L., ANTON M., SANKAR U., RUTNICKI M. A., GRAHAM F. L.  
A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 13565-13570
- RELPH K. L., HARRINGTON K. J., PANDHA H.  
Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer  
*Seminars in Oncology*, 2005, 32: 573-582
- ROWE W. P., HUEBNER R. J., GILMORE L. K., PARROTT R. H., WARD T. G.  
Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture  
*Proceedings of the society for experimental Biology and medicine*, 1953, 84: 570-573
- SLAVIK T., MATOUSEK J., FULKA J., RAINES R. T.  
Effect of bovine seminal ribonuclease and bovine pancreatic ribonuclease A on bovine oocyte maturation  
*Journal of Experimental Zoology*, 2000, 287: 394-399
- SMITH R. R., HUEBNER R. J., ROWE W. P., SCHATTEN W. E., THOMAS L. B.  
Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix  
*Cancer*, 1956, 9: 1211-1218

SOUCEK J., HRUBA A., PALUSKA E., CHUDOMEL V., DOSTAL J., MATOUSEK J.  
Immunosuppressive effects of bovine seminal fluid fractions with ribonuclease activity  
*Folia Biologica*, 1983, 29: 250-260

SPINNLER C.  
Efficient killing of glioma cells by adenoviral transfer of the BS-RNase gene  
Masterarbeit, 2006

STROBL M.  
Strategien zur regulierten adenoviral vermittelten Krebsgentherapie  
Dissertation, 2006

TAMBURRINI M., SCALA G., VERDE C., RUOCCO. M. R., PARENTE A., VENUTA S.,  
D'ALESSIO G.  
Immunosuppressive activity of bovine seminal RNase on T-cell proliferation  
*European Journal of Biochemistry*, 1990, 190: 145-148

TOMKO R. P., XU R., PHILIPSON L.  
HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses  
and group B coxsackieviruses  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997,  
94: 3352-3356

VERMA I. M., WEITZMANN M. D.  
Gene Therapy: Twenty-first century medicine  
*Annual Reviews of Biochemistry*, 2005, 74: 711-38

VESICIA S., TRAMONTANO D., AUGUSTI-TOCCO G., D'ALESSIO G.  
In vitro studies on selective inhibition of tumor cell growth by seminal ribonuclease  
*Cancer Research*, 1980, 40: 3740-3744

VESICA S., TRAMONTANO D.  
Antitumoral action of bovine seminal ribonuclease  
*Molecular and Cellular Biochemistry*, 1981, 36: 125-128

WICKHAM T. J., MATHIAS P., CHERESH D. A., NEMEROW G. R.  
Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment  
*Cell*, 1993, 73: 309-319

WITZGALL R., O'LEARY E., LEAF A., ÖNALDI D., BONVENTRE J.  
The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates  
transcriptional repression  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994,  
91: 4514-4518

XU Z.L., MIZUGUCHI H., MAYUMI T., HAYAKAWA T.  
Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various  
inducible systems  
*Gene*, 2003, 309: 145-151

ZHANG S., XU G., LIU C., XIAO S., SUN Y., SU X., CAI Y., LI D., XU B.  
Clinical study of recombinant adenovirus-p53 (Adp53) combined with hyperthermia in  
advanced cancer (a report of 15 cases)  
International Journal of Hyperthermia, 2005, 21/7: 631-636

## **10 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Übersicht über das Infektionsschema einer 24-Loch-Platte .....	35
Tabelle 2:	Vergleich der Ergebnisse der FACS-Analyse .....	45
Tabelle 3:	Vergleich der Fluoreszenzintensität .....	45

## 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der verwendeten adenoviralen Vektoren ....	25
Abbildung 2:	Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 3,16 .....	40
Abbildung 3:	Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 10 .....	41
Abbildung 4:	Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 31,62 .....	42
Abbildung 5:	Analyse der Transgenexpression nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 3,16 .....	43
Abbildung 6:	Analyse der Transgenexpression nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 10 .....	44
Abbildung 7:	Analyse der Transgenexpression nach Infektion mit AdEGFP bei MOI 31,62 .....	44
Abbildung 8:	Vergleich der EGFP-positiven Zellen nach Infektion mit AdEGFP .....	47
Abbildung 9:	Sensitivität von humanen A431-Zellen gegenüber BS-RNase .....	48
Abbildung 10:	Sensitivität von humanen HeLa-Zellen gegenüber BS-RNase .....	49
Abbildung 11:	Sensitivität von murinen CMS-5-Zellen gegenüber BS-RNase .....	50
Abbildung 12:	Vergleich der Sensitivität von humanen Hs68-Zellen bei unterschiedlicher Dichte der Zellen in der 96-Lochplatte gegenüber BS-RNase .....	51
Abbildung 13:	Sensitivität von murinen NIH/3T3-Zellen gegenüber BS-RNase .....	52
Abbildung 14:	Vergleich der verschiedenen Zelllinien in der Sensitivität gegenüber BS-RNase .....	53
Abbildung 15:	Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie A431 .....	55
Abbildung 16:	Optimale Ratio zwischen Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie A431 .....	56
Abbildung 17:	Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie HeLa .....	58
Abbildung 18:	Optimale Ratio zwischen Leervirus (Addl70-3) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie HeLa .....	59

Abbildung 19:	Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der murinen Zelllinie CMS-5 .....	60
Abbildung 20:	Optimale Ratio zwischen Leervirus (Add170-3) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der murinen Zelllinie CMS-5 .....	61
Abbildung 21:	Optimale Ratio zwischen Transaktivatorvirus (AdCMVrtTA) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie Hs68 .....	62
Abbildung 22:	Optimale Ratio zwischen Leervirus (Add170-3) und Responsevirus (AdtTSLuc) bei der humanen Zelllinie Hs68 .....	63
Abbildung 23:	Dot Blots zur Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration ..	65
Abbildung 24:	Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von HeLa-Zellen mit dem Tet-On-System (86 Stunden nach Infektion entnommen) .....	66
Abbildung 25:	Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von CMS-5-Zellen mit dem Tet-On-System (38 Stunden nach Infektion entnommen) .....	67
Abbildung 26:	Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von CMS-5-Zellen mit dem Tet-On-System (86 Stunden nach Infektion entnommen) .....	68
Abbildung 27:	Western Blot-Analyse mit Überständen der Infektion von CMS-5-Zellen mit dem Tet-On-System (86 Stunden nach Infektion entnommen, ein Prozent FKS im Kulturmedium) .....	68
Abbildung 28:	Prozentsatz der überlebenden HeLa-Zellen 38 Stunden nach Infektion .....	70
Abbildung 29:	Prozentsatz der überlebenden HeLa-Zellen 86 Stunden nach Infektion .....	71
Abbildung 30:	Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 38 Stunden nach Infektion .....	72
Abbildung 31:	Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 86 Stunden nach Infektion .....	73
Abbildung 32:	Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 38 Stunden nach Infektion, Infektionsansatz mit einem Prozent FKS im Medium .....	74
Abbildung 33:	Prozentsatz der überlebenden CMS-5-Zellen 86 Stunden nach Infektion, Infektionsansatz mit einem Prozent FKS im Medium .....	75

Abbildung 34: Schema des Mechanismus des hier verwendeten Tet-On-Systems zur  
Expression der BS-RNase ..... 82

## 12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	adeno-assoziiertes Virus
Ad	Adenovirus
AD	VP16 activation domain (VP16 Aktivierungsdomäne)
AdV	adenoviraler Vektor
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum-Albumin
BS-RNase	bovine seminal RNase (aus der Samenflüssigkeit des Bullen)
CAR	Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
c.p.e.	Cytopathischer Effekt
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FKS	Foetales Kälberserum
HC AdV	High capacity AdV (Helferabhängige adenovirale Vektoren)
HIV	Humanes Immunschwächevirus
HEK	Human Embryonic Kidney Cells (Humane Embryonale Nierenzellen)
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
IC 50	Inhibitory concentration 50 (Konzentration, bei der 50 % der Aktivität gehemmt sind)
ITR	Inverted Terminal Repeats (Verpackungssignal)
kB	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
MDR	multidrug resistance (multiple Arzneimittelresistenz)
M.O.I.	Multiplicity of Infection (Zahl der Viren pro Zelle zum Zeitpunkt der Infektion)
PALP	placental-like alkaline phosphatase (Plazenta-ähnliche alkalische Phosphatase)

PSB	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFU	Plaque Forming Units (Plaque-bildende Einheiten im Zellrasen)
R	Responsevirus
RI	RNase-Inhibitor
rlu	relativ light units (relative Lichteinheiten)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverse tetracycline-controlled transactivator (reverser Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator)
TA	Transaktivator
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tet operator sequence (Tet-Operator-Sequenz)
TetR	Tet repressor protein (Tet-Repressor-Protein)
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRE	tetracycline response element (Tetrazyklin-Response-Element)
tTA	tetracycline-controlled transactivator (Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator)
tTS	tetracycline-controlled transcriptional silencer (Tetrazyklin-kontrollierter Transkriptionaler Dämpfer)

### **13 DANKSAGUNG**

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Wolf danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. rer. nat. M. Anton, Gruppenleiterin am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München, für die gute Betreuung des experimentellen Teils dieser Arbeit, die wissenschaftliche Unterstützung, sowie für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Dr. Matthias Strobl danke ich für seine Unterstützung und den Erfahrungsaustausch.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die gute und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken.

Frau Edelburga Hammerschmidt danke ich für die Durchführung der FACS-Analysen.

Bei Bryan Essien und Katja Dummler möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft innerhalb unserer Arbeitsgruppe bedanken.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Vater, der mich immer unterstützt hat, und bei meinem Mann Jürgen, der mich unterstützt und alle meine Launen ertragen hat, bedanken.

...und natürlich bei meinem Bruder und allen meinen Freunden, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben.

Teile dieser Arbeit wurden auf dem 13. ESGT Meeting in Prag, Tschechische Republik, veröffentlicht:

STROBL M., WIRTH B., AHRENS K., GÄNSBACHER B., ANTON M.

Adenovirally mediated expression of a cytotoxic ribonuclease leads to effective tumor cell killing

13<sup>th</sup> Annual ESGT-Meeting Prague, Czech Republic, 2005, Abstract book