

Aus dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der  
Technischen Universität München  
Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher

Vorgelegt über den Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik am  
Institut für Tierzucht der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand Prof. Dr. med. vet. E. Wolf

**Untersuchungen zum Transfer von E1A-deletierten Adenoviren in  
vielfachresistenten Tumorzellen durch Magnetofektion**

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

von  
Elke Harant

aus  
Grafenau

München, 2004

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
Koreferent:	Priv.-Doz. Dr. A. Fischer

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meinen Eltern und Wolfgang

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM.....</b>	<b>2</b>
2.1	Klassifizierung und Struktur der Adenoviren.....	2
2.2	Adenovirale Vektoren in der Genterapie.....	4
2.3	Replikation und Regulation der Genexpression.....	6
2.3.1	Transkription der frühen Gene, Synthese der frühen Proteine.....	7
2.3.2	DNA-Replikation.....	9
2.3.3	Transkription der späten Gene, Synthese der späten Proteine.....	11
2.3.4	Morphogenese.....	12
2.4	Vielfachresistenz von Tumorzellen.....	12
2.4.1	Das Y-Box-Protein YB-1.....	13
2.5	E1A-unabhängige adenovirale Replikation in vielfachresistenten Tumorzellen.....	14
2.6	Magnetofektion.....	15
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>19</b>
3.1	Zielvorstellung.....	19
3.2	Material und Methoden.....	19
3.2.1	Material.....	19
3.2.1.1	Zellen.....	19
3.2.1.2	Virusstämme.....	20
3.2.1.3	Puffer und Lösungen.....	20
3.2.1.4	Chemikalien.....	23
3.2.1.5	Vorgefertigte Systeme.....	25
3.2.1.6	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien.....	25
3.2.2	Methoden.....	27
3.2.2.1	Zellkultur.....	27
3.2.2.2	Verwendete Viren und Virusvermehrung.....	27
3.2.2.2.1	Infektion der 293-Zellen.....	28
3.2.2.2.2	Isolierung der Viren aus den 293-Zellen.....	28
3.2.2.2.3	Präparation der Viren.....	28
3.2.2.3	Zellzahlbestimmung mittels Vitalfärbung.....	30
3.2.2.4	Nachweis der zielgerichteten Infektion durch Magnetofektion mit Hilfe eines LacZ-Adenovirus.....	30
3.2.2.4.1	Magnetofektion.....	30
3.2.2.4.2	x-Gal Färbung.....	31
3.2.2.5	Nachweis der adenoviralen DNA-Replikation durch Southern-Blot.....	32
3.2.2.5.1	Isolierung der viralen DNA.....	32
3.2.2.5.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
3.2.2.5.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	33
3.2.2.5.4	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	34
3.2.2.5.5	Transfer der DNA (Southern Blotting).....	34
3.2.2.5.6	Herstellung einer E2A-Sonde.....	35
3.2.2.5.7	Hybridisierung.....	35
3.2.2.5.8	Autoradiographie.....	36
3.2.2.6	Nachweis des virusvermittelten cytopathogenen Effekts (cpE).....	36
3.2.2.7	Nachweis der Partikelbildung/Partikelzahl mittels Plaque Assay.....	37
3.3	Ergebnisse.....	38
3.3.1	Überprüfung der zielgerichteten Infektion mit AdLacZ via X-Gal Färbung.....	38
3.3.2	Southern-Blot-Analysen.....	40
3.3.3	Virusvermittelter cytopathogener Effekt (cpE).....	42

3.3.4	Auswertung des Plaque Assay.....	46
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
4.1	Diskussion der Magnetofektion.....	50
4.2	Diskussion der Nachweisverfahren .....	51
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	53
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>75</b>

## 1 EINLEITUNG

Erkenntnisse über die Entstehung von Tumoren und die Bekämpfung von Tumorerkrankungen gehören zu den größten Herausforderungen medizinischer Grundlagen- und Therapiefor-

schung. Insbesondere das Auftreten von Tumorzellen, welche das Phänomen der Vielfachresistenz (engl: multidrug resistance) zeigen, stellen in der klinischen Onkologie ein großes Problem bei der Chemotherapie dar.

Durch die Entwicklung der Gentherapie eröffnen sich hier neue Behandlungsperspektiven.

Besonders viel versprechend ist der Einsatz von adenoviralen Vektoren, die selektiv in vielfachresistenten Tumorzellen replizieren können und in vitro die Tumorzellen durch virale Lyse zerstören. Auf Grund der Erkenntnisse, dass diese replikations-defizienten E1A-deletierten adenoviralen Vektoren gerade in vielfachresistenten Zellen eine sehr effiziente adenovirale Replikation, Partikelbildung und Onkolyse durchführen können, ergeben sich bei der Behandlung von Krebserkrankungen völlig neue Therapiestrategien.

Es hat sich gezeigt, dass vielfachresistente Tumorzellen häufig den sonst cytoplasmatisch lokalisierten humanen Transkriptionsfaktor YB-1 im Kern enthalten, der die virale Replikation unabhängig von E1A induzieren kann.

Um mit adenoviralen Vektoren gezielt bestimmte Tumorzellen zu erreichen, wurde in den Versuchen eine in der Gentherapie noch neue Methode - die Magnetofektion - verwendet. Dabei werden Adenovirusvektoren durch elektrostatische Wechselwirkungen an nanokristalline Eisenoxidpartikel gebunden, die dann unter dem Einfluss eines externen Magnetfeldes in den Zielzellen angereichert werden sollen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, zu zeigen, dass unter Anwendung der Magnetofektion im Einflussgebiet des Magneten eine gezielte lokoregionäre, adenovirale Infektion von Tumorzellen erreicht werden kann und dass die gezielte Infektion auch in Tumorzellen möglich ist, welche sonst nur sehr schwer durch Adenoviren infizierbar sind. Weiterhin soll untersucht werden, ob mit Hilfe der Magnetofektion durch die zielgerichtete Infektion eine erhöhte adenovirale Replikation, Partikelbildung und Onkolyse von replikations-defizienten E1A-minus Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen erzielt werden kann.

Die Untersuchungen werden in der Zellkultur an vielfachresistenten (YB-1 kernpositiven) und an nicht resistenten (YB-1 kernnegativen) Tumorzelllinien durchgeführt und miteinander verglichen.

## 2            **SCHRIFTTUM**

### 2.1            **Klassifizierung und Struktur der Adenoviren**

Adenoviren werden in zwei Genera unterteilt, die Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können, und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind (Shenk, 1996).

Es sind 47 verschiedene Serotypen beim Menschen bekannt (Ad1-Ad47), welche in 6 Gruppen gegliedert sind (A-F). Diese Eingruppierung sagt aus, ob die Virustypen in hohem, mittlerem oder geringem Ausmaß Tumoren in Nagetieren erzeugen können (Shenk, 1996; Madrow und Falke, 1997).

Einige der humanen Adenovirustypen (Ad12, Ad18, Ad31), die zu dem hochonkogenen Subgenus A gezählt werden, können nach einer zwei- bis dreimonatigen Inkubationszeit bei Hamstern und anderen Nagetieren in 100 Prozent der Fälle mesenchymale Tumoren hervorrufen. Das Subgenus B (Ad3, Ad7, Ad11) gilt als schwach onkogen, die Inkubationszeit bis zur Tumorbildung beträgt bis zu zwei Jahre. Adenoviren der Subgenera C-F sind nicht onkogen. In vitro können jedoch alle Adenoviren (Subgenera A-F) Nagetierzellen transformieren (Madrow und Falke, 1996). Adenoviren eines bestimmten Subgenus weisen eine Basenhomologie von über 50 Prozent auf (Shenk, 1996; Roberts et al., 1984).

Primär infizieren Adenoviren Epithelzellen. Adenoviren sind pathogene Organismen und können abhängig vom Serotyp verschiedene Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, des Harnapparates (Eck und Wilson, 1996), des Respirationstrakts (Berns und Giraud 1995; Ragot et al., 1998) und der Konjunktiven verursachen (Madrow und Falke, 1997). Die Erkrankungen verlaufen meist mild und nur selten lebensbedrohlich. Nach der Primärinfektion führt die Virämie zu einer asymptomatischen Ausbreitung der Infektion in die Tonsillen oder die Nieren des Patienten und zur protrahierten Ausscheidung des Virus als Tröpfcheninfektion oder als oral-fäkale Schmierinfektionen über Monate bis Jahre (Evans 1958; Fox et al., 1969).

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 80 bis 100 nm. Ihr Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA mit einer Länge von ca. 36.000 bis 38.000 Basenpaaren das mit Proteinen zu einer Core-Struktur komplexiert ist. An die beiden Enden des Genoms ist über einen Serinrest je ein terminales Protein kovalent gebunden (Russell, 2000). Beide terminalen Protein-Komponenten können über nichtkovalente Wechselwirkun-

gen miteinander interagieren und halten so das DNA-Genom in einem quasizirkulären Zustand.

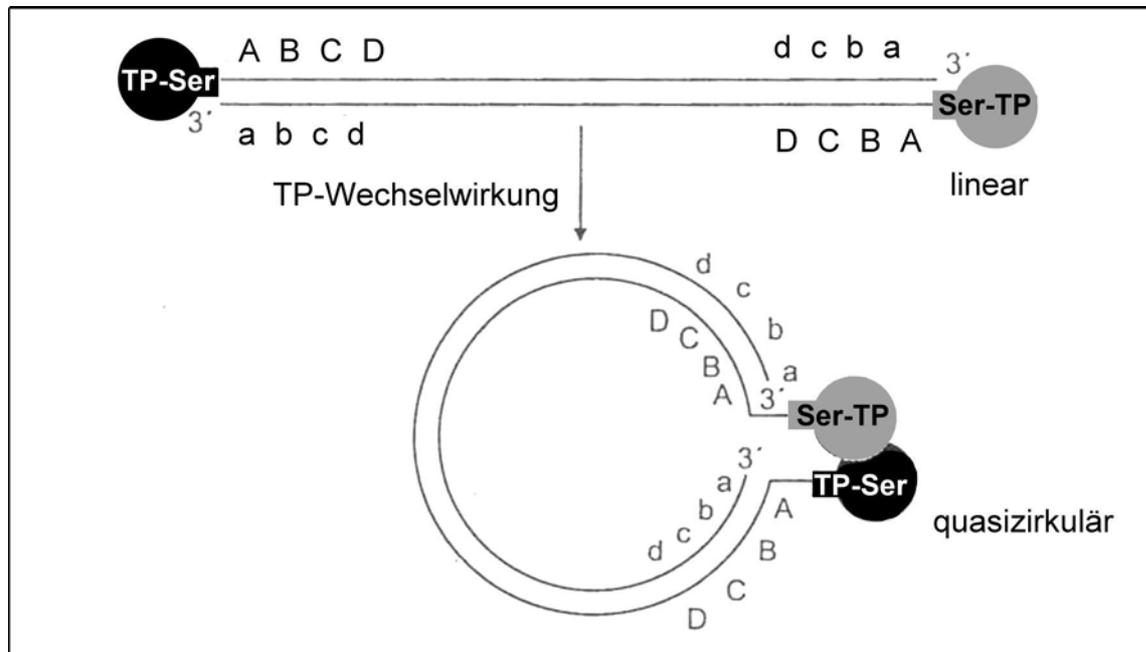


Abbildung 1: Genomaufbau der Adenoviren (nach Modrow und Falke, 1997)

Doppelsträngige, lineare DNA mit endständigen terminalen Proteinen, die kovalent an einen Serinrest gebunden sind; die Proteine halten das Genom in einen quasizirkulären Zustand.

Das Capsid der Adenoviren ist ein Ikosaeder mit 20 Seitenflächen und 12 Ecken. Es besteht aus 252 Capsomeren, nämlich 240 Hexonen und 12 Pentonen. Jede Capsidseitenfläche wird von 12 Hexonproteinen gebildet. An den Ecken des Capsids sitzen die Pentonbasisproteine, welche mit antennenförmigen Fiberproteinen von der Oberfläche aufragen. Diese Proteine sind für die Bindung des Virus an die zu infizierende Zelle verantwortlich (Shenk, 1996; Horwitz, 1990; Chroboczek et al., 1995).

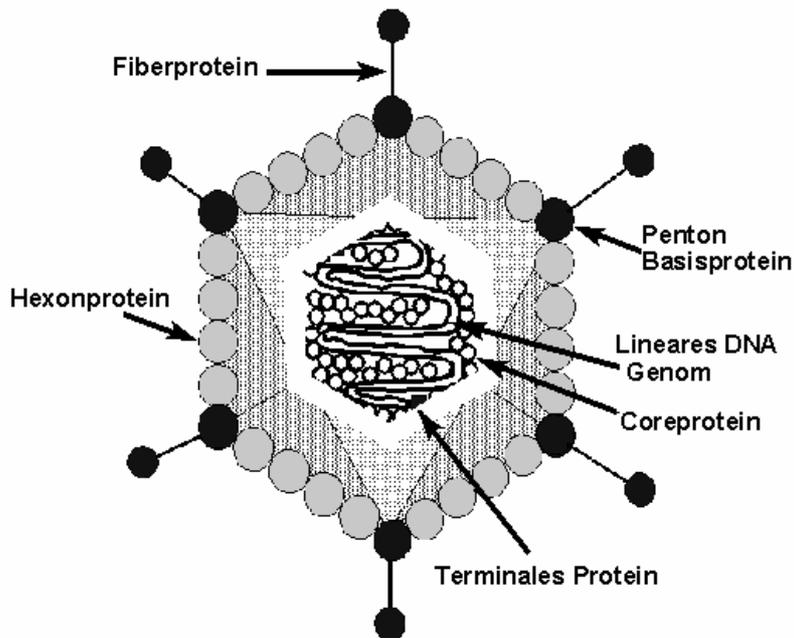


Abbildung 2: Aufbau eines Adenoviruspartikel (modifiziert nach Shenk, 1996)

Im Inneren befindet sich das lineare DNA Genom mit den Coreproteinen; das Capsid wird aus den Strukturproteinen gebildet

## 2.2 Adenovirale Vektoren in der Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen von genetischem Material in die Zellen eines Individuums, mit dem Ziel, therapeutischen Nutzen für das Individuum zu erzielen (Minol, 1996a). Viele erbliche und nichterbliche Krankheiten beruhen auf Defekten an den Erbanlagen. Bei der an einzelnen Körperzellen vorgenommenen Behandlung mit Genen, der so genannten somatischen Gentherapie, wird eine gesunde Erbanlage in die Zellen eines bestimmten Organs eingeschleust. Ein in die Zielzellen eingebrachtes therapeutisches Gen führt zur Produktion des eigentlichen therapeutischen Agens, im Allgemeinen eines Proteins (Avery et al., 1995; Friedmann, 1997). Da die zugeführte Erbanlage nur in bestimmte Körperzellen gelangt, nicht aber in Keimbahnzellen, wird sie nicht an die Nachkommen vererbt. Anwendungsmöglichkeiten der somatischen Gentherapie ergeben sich vor allem auf drei Gebieten, nämlich den klassischen Erbkrankheiten mit isoliertem Einzelgendefekt (z. B. Mukoviszidose), den erworbenen genetischen Erkrankungen (z. B. chronische Infektionskrankheiten) und den multifaktoriellen genetischen Erkrankungen (z. B. Tumoren, Herz- und Kreislaufkrankheiten).

kungen); (Anderson, 1992; Dyer und Herrling, 2000; Graumann, 2000; Miller, 1992; Mulligan, 1993).

Um das genetische Material in die Zielzellen einzuschleusen, werden geeignete Vehikel, so genannte Genvektoren, benötigt. Der Gentransfer kann mit nichtviralen (z. B. nackte Plasmid-DNA, DNA-Liposomenkomplexe), oder mit viralen (z. B. Retroviren, Adenoviren) Vektoren durchgeführt werden (Argyle, 1999; Romano et al., 1998).

Adenovirale Vektoren haben im Vergleich zu anderen Transfersystemen den Vorteil eines hocheffizienten Gentransfers, da sie sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen in praktisch jedem Gewebe infizieren können (Ragot et al., 1998). Adenoviren sind jedoch nicht in der Lage sich ohne die Hilfe der Wirtszelle zu replizieren. Nach dem Transfer ihres Genoms in die Zelle werden zelluläre Funktionen zur viralen Replikation genutzt. Wildtypviren können sich in den Wirtszellen vermehren und die infizierten Zellen zerstören. Beim Einsatz von Adenoviren als Genvektoren wird daher sowohl die Replikationsfähigkeit als auch die Infektion weiterer Zellen im Wirtsorganismus unterbunden, indem die dafür notwendigen viralen Wildtypgene deletiert und durch das therapeutische Gen ersetzt werden (Dyer und Herrling, 2000; Sebestyen und Wolff, 1999; Somia und Verma, 2000). Zur Herstellung von funktionsfähigen Viruspartikeln werden Helferzelllinien mit den für die Vermehrung notwendigen Wildtypgenen transfiziert. Die Übertragung findet z. B. in der humanen Helferzelllinie "293" statt. Diese aus Nieren menschlicher Embryonen isolierten Zellen enthalten die viralen E1-Gene im Genom integriert (Graham et al., 1977). Durch die konstitutive Expression der E1-Gene ist diese Zelllinie in der Lage, Adenoviren mit Deletionen in der für die Replikation essentiellen E1-Region zu komplementieren. Dadurch entstehen in den Helferzellen komplette Viruspartikel, die zur einmaligen Infektion, jedoch nicht zur Vermehrung fähig sind (Somia und Verma, 2000; Argyle, 1999).

Für die Entwicklung replikationsdefizienter Vektoren werden Adenoviren der Serotypen 2 und 5 des Subgenus C verwendet (Ragot et al., 1998).

Bei adenoviralen Vektoren der 1. Generation wurde sowohl die für die Replikation essentielle E1-Region, welche für die unterschiedlichen E1A- und E1B-Proteine kodiert, als auch die E3-Region des Virus, die für die Replikation nicht notwendig ist, entfernt; dadurch wurde eine Aufnahmekapazität von 7 bis 8 kbp für therapeutische DNA geschaffen (Romano et al., 1998). Bei Adenoviren der 2. Generation wurden zusätzlich Teile der E2-Region, deren Gene für die DNA-Replikation codieren, deletiert. Adenoviren der 3. Generation fehlt zudem noch

die E4-Region; die Deletion der E4-Region führt zu einem Defekt in der späten Proteinsynthese, aber nicht zu einer Replikationsinkompetenz (Russell, 2000; Trapnell, 1994; Hitt et al., 1995).

Adenovirusvektoren sind aufgrund ihrer einfachen Handhabung in der Zellkultur, durch die leichte Herstellung hoher Titer und ihres geringen Gefährdungspotentials sehr gut für den Transfer von Genen geeignet (Eck und Wilson, 1996; Russell, 2000).

Die Genome der adenoviralen Vektoren integrieren nicht in das Genom der Wirtszelle und eignen sich daher nur bedingt für die Behandlung somatischer Erkrankungen bei denen eine Langzeitexpression erforderlich ist (Tripathy et al., 1996; Buscher et al., 1999). Adenoviren haben einen weiteren Nachteil: Sie sind hochantigen und führen zu einer unmittelbaren Immunantwort durch zytotoxische T- und B-Zellaktivierung (Yang et al., 1994; Eck und Wilson, 1996) mit der Produktion von neutralisierenden Antikörpern (Schulick et al., 1997; Gilgenkrantz et al., 1995) was möglicherweise eine wiederholte Applikation der Viren verhindert. Zur Unterdrückung dieser Immunantwort wurden adenovirale Vektoren dementsprechend weiterentwickelt (Gorziglia et al., 1999; Quinones et al., 1996; Engelhardt et al., 1994; Russell, 2000).

Adenovirale Vektoren eignen sich vor allem für Therapieverfahren, bei denen eine temporäre (transiente) Expression der transferierten Gene erreicht werden soll, während für die Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine Langzeitexpression erforderlich ist, andere Vektorsysteme, wie z. B. Retroviren (integrieren in das Wirtszellgenom) besser geeignet sind (Tripathy et al., 1996; Romano et al., 1998).

### **2.3 Replikation und Regulation der Genexpression**

Adenoviren benötigen 32 bis 36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Die Bindung des Virus an die Zielzelle kommt durch eine Wechselwirkung der viralen Fiberproteine mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, dem so genannten adenoviralen Coxsackie Rezeptor (CAR) zustande (Shenk, 1996). Nach Anlagerung des Viruspartikels kommt es zu einer weiteren Interaktion, diesmal zwischen den Pentonbasisproteinen und den zellulären Integrinen, die als sekundäre Rezeptoren wirken und die Internalisierung des Partikels in die Zelle vermitteln.

Nach Anlagerung an der Zelloberfläche wandert der Rezeptor mit dem gebundenen Viruspartikel zu clathrinreichen Regionen in der Cytoplasmamembran, die endocytotische Vesikel

bilden und das Virus in das Cytoplasma aufnehmen (Wang et al., 1998). In diesen Vesikeln erfolgt eine Ansäuerung, das Vesikel löst sich auf und das Virus-Core wird unter Verlust der Pentonbasis- und der Fiberproteine ins Cytoplasma freigesetzt (Greber et al., 1996). Im Anschluss bindet sich das virale Restpartikel an Mikrotubuli und wird zum Kern transportiert, die Capside bleiben im Cytoplasma zurück (Leopold et al., 2000).

Im Zellkern erfolgt die Transkription der viralen Gene und die Neusynthese der DNA (Shenk, 1996; Russell, 2000).

Die Genexpression kann in vier Schritte eingeteilt werden, wobei der regulierte, korrekte Ablauf eines jeden Schrittes für den nachfolgenden unerlässlich ist (Hitt et al., 1995):

Beide DNA-Stränge codieren für Proteine. Das Genom besteht aus fünf codierenden Bereichen, von denen vier (E1 bis E4) früh während der Infektion aktiviert werden (early genes). Die Gruppe der spät exprimierten Gene (late genes) ist für die Synthese der viralen Strukturproteine verantwortlich (Shenk, 1996).

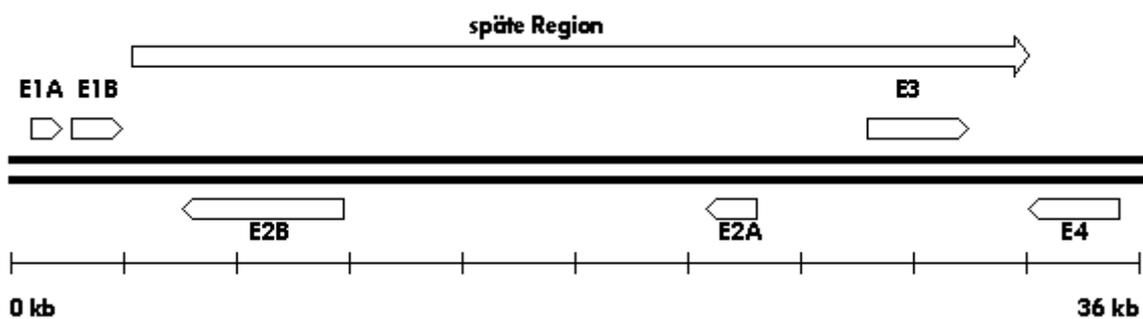


Abbildung 3: Genomkarte von Adenovirus Typ 5 (modifiziert nach Robbins et al., 1998)

Dargestellt sind die frühen Regionen (E) und die späte Region. Die doppelte fettgezeichnete Linie stellt die doppelsträngige Ad5-DNA dar.

### 2.3.1 Transkription der frühen Gene, Synthese der frühen Proteine

Als erstes im Verlauf des viralen Infektionszyklus transkribiert die zelluläre RNA-Polymerase II die E1A- und E1B-Gene (immediate early genes). Die E1-Region enthält zwei aktive Transkriptionseinheiten: Eine codiert für die E1A-, die andere für die E1B-Proteine. Diese beiden Proteine gemeinsam sind für die Transformation von Nagetierzellen verantwortlich. Von den E1A-Genen werden verschiedene mRNA-Transkripte gebildet, die für die beiden frühen For-

men der E1A-Proteine codieren. Die E1A-Proteine wirken transaktivierend für die Induktion der Transkription der E1B-, E2A-, E2B-, E3- und E4-Gene (Jones und Shenk, 1979; Nevins, 1981; Berk et al., 1979). Dabei bindet E1A nicht direkt an die DNA, sondern aktiviert zelluläre, transaktive Proteine (E2F- und E4F-Faktoren), die in Promotorbereichen der DNA gebunden sind. Die E1A-Proteine wirken nicht nur als Transaktivatoren, sondern auch als Transrepressoren, indem sie bei ruhenden Zellen die DNA-Synthese induzieren können. Dabei interagieren die E1A-Proteine mit den zellulären Tumorsuppressoren RB105 und RB107 (Whyte et al., 1988; Boulanger und Blair, 1991; Nevins, 1991; 1992). Die E1B-Genregion codiert für zwei Proteine (20 kD und 55 kD). Das größere E1B-Protein (55kD) ist zusammen mit dem E1A-Protein für die Zelltransformation von Nagetierzellen verantwortlich. Zudem hemmt es die Funktion des Tumor-Suppressor-Gens p53, das in Zellen mit Mutationen und DNA-Schäden in hohen Konzentrationen vorhanden ist und verhindern soll, dass die defekte Erbsubstanz auf die Tochterzellen weitergegeben wird, indem sich die Zelle in einer Ruhephase befindet (Reichel et al., 1989; Marton et al., 1990; Wienzek et al., 2000; Yew und Berk, 1992; Obert et al., 1994; Saranow, 1982). Durch eine Kombination der Genfunktion von E1B (55 kD) und E4orf6 (34 kD) wird die späte virale RNA-Translation beschleunigt, wo hingegen die zelluläre RNA-Translation gehemmt wird (Pildner et al., 1986; Leppard und Shenk, 1989; Babiss et al., 1985; Bridge und Ketner, 1990; Halbert et al., 1985). Die Expression von E1B(20 kD) unterdrückt durch Komplexbildung mit E1A die frühe Genexpression, die sonst kontinuierlich weiterlaufen würde und somit vor Fertigstellung neuer Virionen den Zelltod auslösen würde. Gleichzeitig schützt E1B (19 kD) die virale und zelluläre DNA vor dem Abbau (Halbert et al., 1985).

Die Expression der E2-Proteine ist von der transaktivierenden Aktivität der E1A-Proteine abhängig. Die E2-Region besteht aus zwei codierenden Bereichen, E2A und E2B. Während die E2A-Region ein Einzelstrang-DNA-bindendes Protein (DBP) codiert, das sich bei der Replikation der viralen DNA an die Einzelstränge anlagert und verhindern soll, dass diese doppelsträngige Strukturen ausbilden können (Nevins und Winkler, 1980; Handa et al., 1983), werden in der E2B-Region zwei Proteine codiert: Das eine Protein ist das Vorläuferprotein (pTP) für das an die 5'-Enden des viralen Genoms gebundene terminale Protein (TP), das andere Protein ist die virale DNA-Polymerase (Kelly, 1984; Stillman, 1985). Die Produkte der E2-Gene sind für die Replikation der viralen DNA essentiell.

Die E3-Region codiert für Proteine die dem Virus helfen, dem Abwehrmechanismus des Immunsystems zu entkommen. Die Lyse von Adenovirus infizierten Zellen durch cytotoxische T-Lymphozyten wird durch das E3-Genprodukt (19 kD) blockiert. Dies ist die Folge einer

intrazellulären Komplexbildung, die im endoplasmatischen Retikulum zwischen dem E3-Protein (19 kD) und den MHC-Klasse-1-Histokompatibilitäts-Antigen stattfindet, wodurch der Transport von Klasse-1-Antigenen an die Zelloberfläche gestört wird. MHC-Klasse-I-Moleküle sind bei der Präsentation von Antigenen nötig, um die cytotoxischen T- Lymphozyten zu aktivieren. Zusätzlich spielen die E3-Proteine (14,7 kD, 10,4 kD) eine wichtige Rolle als Antagonisten der E1A-vermittelten Zunahme der Empfindlichkeit von infizierten Zellen gegenüber der durch den Tumornekrosefaktor (TNF) vermittelten Lyse (Shenk, 1996).

Die E4-Region (34 kD), die für mindestens sieben Polypeptide codiert, reguliert zusammen mit dem E1B-Protein (55 kD) die Synthese der viralen Proteine und hemmt gleichzeitig die Proteinsynthese der Wirtszelle. Ein zweites von der E4orf6/7-Region codiertes Protein (19 kD) spielt außerdem eine Rolle in der Regulation der Transkription der E2-Region. Es bindet an E2F-Faktoren und verstärkt die Bindung dieser Transaktivatoren an die viralen E2F-abhängigen Promotoren, was zu einer höheren Transkriptionsrate führt (Hardy und Shenk, 1989; Hardy et al., 1989; Huang und Haring, 1989; Neill et al., 1990; Marton et al., 1990). Die E4-Genprodukte sind darüber hinaus an der Fertigstellung der Virionen beteiligt (Falgout und Ketner, 1987; Halbert et al., 1985; Weinberg und Ketner, 1985; Yoder und Berget, 1986). Obwohl die E4-Region für mindestens sieben Genprodukte codieren kann, sind neben den oben beschriebenen essentiellen Funktionen (E4orf6 = 34kD und E4orf6/7 = 19kD) die Aufgaben der anderen möglichen Genprodukte noch unklar (Trapnell und Pensiero, 1997; Braithwaite und Russell, 2001).

### **2.3.2 DNA-Replikation**

Die E2-Region codiert für Proteine, die vor allem an der viralen Replikation beteiligt sind. Die Replikation des Genoms beginnt etwa sechs bis acht Stunden nach der Infektion und ist nach 24 Stunden beendet. Das adenovirale Genom ist eine lineare, doppelsträngige DNA, die kurze invertierte Nukleinsäurereiterationen (ITRs) von 100-165bp Länge an jedem Ende aufweist (Garon et al., 1972; Wolfson und Dressler, 1972). An die 5'-Enden der ITRs sind kovalent von E2-codierte Terminal Proteine (TP 80kD) gebunden, die als Primer zur Initiation der DNA-Synthese dienen (Kelly, 1984; Stillman, 1985). Die eigentliche Replikation des viralen Genoms erfolgt semikonservativ, ohne die Synthese von DNA in Okazaki-Fragmenten (Madrow und Falke, 1997). Dieser Prozess beginnt mit der Veresterung eines dCMP-Moleküls (Cytosin) mit der OH-Gruppe eines Serins im terminalen Proteinvorläufers pTP

(80kD); (Challberg et al., 1980; Lichy et al., 1981). Der entstandene dCMP-pTP-Komplex hat eine hohe Affinität zu der viralen DNA-Polymerase und interagiert mit den TP-Komponenten (55kD), die kovalent an die 5'-Enden des Genoms gebunden sind. Der resultierende Komplex wirkt über die 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose des dCMP als Primer für die Initiation der DNA-Synthese (Lichy et al., 1981; Tamoi und Stillman, 1982; Challberg et al., 1982). Dazu sind auch die zellulären Kernfaktoren NF-I, NF-II und die DNA-Topoisomerase nötig (Hay et al., 1999). Diese Initiation erfolgt kontinuierlich in 5'-3'-Richtung durch die E2-viruscodierende DNA-Polymerase durch Strang-Displacement. Dabei wird ein Elternstrang (mit dem kovalent gebundenen 55 kD-TP am 5'-Ende) aus dem Doppelstrang verdrängt. Der verdrängte DNA-Strang wird mit E2A-Proteinen komplexiert, die verhindern sollen, dass die einzelsträngige DNA durch zelluläre Nucleasen abgebaut wird (Lindenbaum et al., 1986; Field et al., 1984). Währenddessen wird am anderen Elternstrang die Anlagerung komplementärer Nucleotide bis zum Genomende fortgesetzt. Nach der ersten Syntheserunde liegt ein DNA- Einzelstrang, der mit E2A-Proteinen komplexiert ist und ein Doppelstrang vor. Der Doppelstrang besteht aus einem Strang, der aus dem ursprünglichen Virusgenom stammt, der Gegenstrang wird durch Neusynthese ergänzt (semi-konservative Replikation). Während die doppelsträngige Struktur den selben Verlauf wie oben beschrieben durchmachen kann, bilden die Enden des Einzelstranges, die komplementäre, invertierte Basenfolgen besitzen, eine "Pfannenstielstruktur" aus. Die invertierten terminalen Wiederholungssequenzen des verdrängten Stranges hybridisieren miteinander und bilden einen Doppelstrang aus. Das löst die Anlagerung neuer Initiationskomplexe bestehend aus dCMP-pTP/adenoviraler DNA-Polymerase/NF-I/NF-II aus (Temperley und Hay, 1992). Im weiteren Verlauf wird der "Pfannenstiel" aufgelöst, die an den Einzelstrang gebundenen Proteine lösen sich und der Einzelstrang dient als Matrize für die kontinuierliche Synthese des Doppelstranges. Die Spaltung des terminalen Vorläuferproteins in das TP55kD, das mit dem adenoviralen Genom komplexiert ist, erfolgt erst, wenn die Replikation beendet ist, durch proteolytische Prozessierung des gebundenen TP80kD-Proteins (Rekosh et al., 1977).

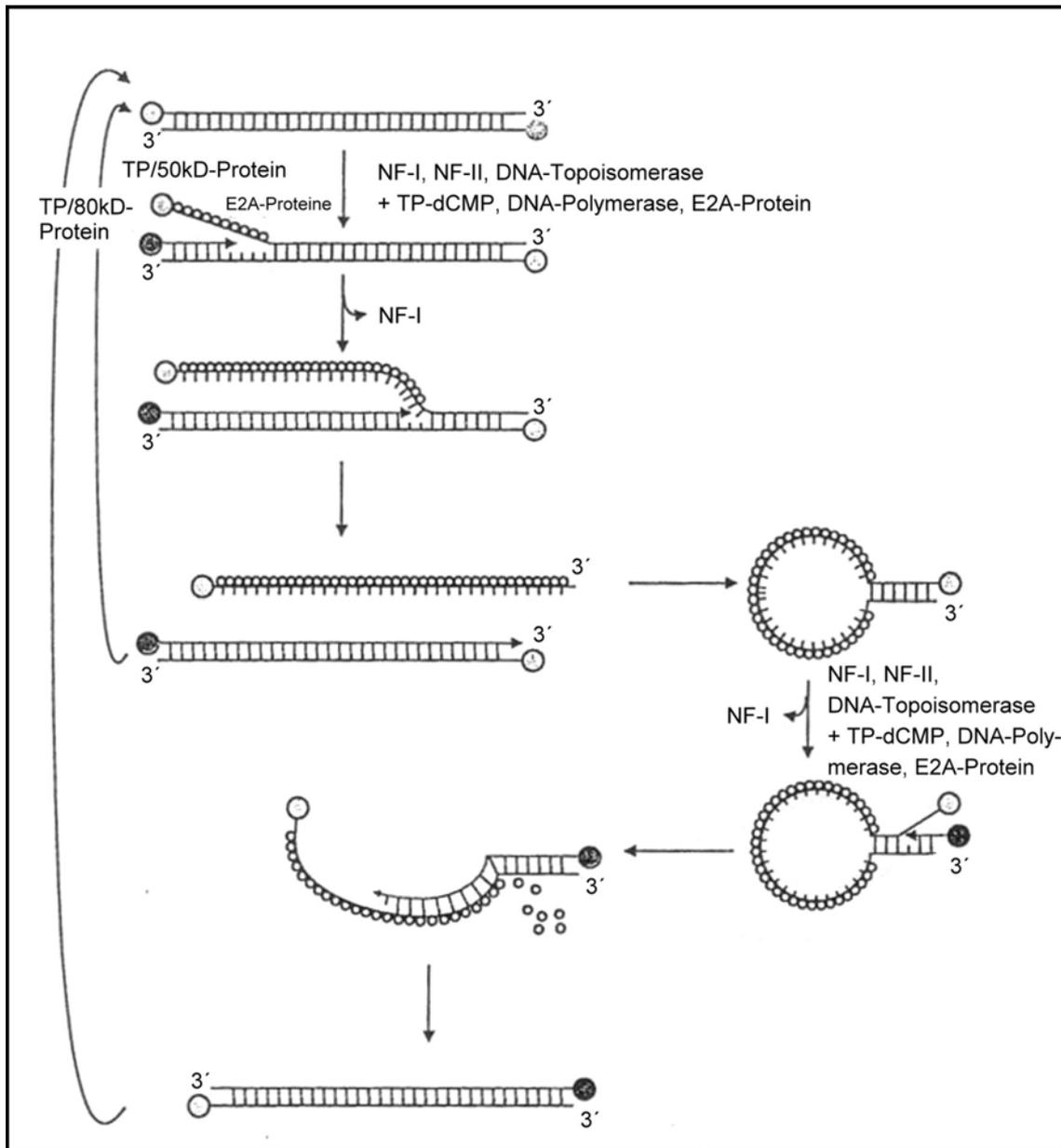


Abbildung 4: Verlängerung und Bildung der Doppelstränge (nach Modrow und Falke, 1997).

Für die Initiation der DNA-Synthese sind zelluläre Faktoren (NF-I, NF-II, DNA-Topoisomerase) und virale Faktoren (TP-dCMP, DNA-Polymerase, E2A-Protein) notwendig.

### 2.3.3 Transkription der späten Gene, Synthese der späten Proteine

Die Aktivierung des Promotors der späten Proteine erfolgt etwa acht Stunden nach der Infektion der Zelle. Die späten Virusproteine sind fast ausnahmslos Strukturproteine, die für den Zusammenbau des Cores und des Capsids nötig sind. Nach der Genomvermehrung werden die meisten der frühen Gene nicht mehr transkribiert, dafür werden die späten Genombereiche

aktiviert. Der Proteinkomplex E1B55kD und E434kD fördert den Export der viralen mRNA-Spezies für die viralen Strukturproteine ins Cytoplasma. Die zelluläre Proteinsynthese wird gestört (Spector und Samaniego, 1995; Minol, 1996a, Wilson, 1996, Trapnell und Pensiero, 1997).

#### **2.3.4 Morphogenese**

Im Cytoplasma entstehen aus den Hexon-, Pentonbasis- und den Fiberproteinen die Capsomere. Hierzu sind Proteinfaltungskatalysoren nötig, die zum Teil vom Virus selbst codiert werden und zum Teil aus der Zelle stammen. Für den Zusammenbau und die Reifung der Vironen sind Proteine der späten Phase, die von der L4-Region codiert werden, erforderlich. Eines dieser Proteine ist an der Bildung einer Gerüstsubstanz beteiligt (100 kD), kommt aber in den reifen Virionen nicht mehr vor. Ein anderes Protein besitzt proteolytische Aktivität (33 kD) und prozessiert die späten Polypeptide sowie das endständige Protein (TP80 kD); (Rekosh et al., 1977), was ebenfalls für die Virusreifung wichtig ist. Es entstehen 104-105 Viren pro Zelle. Während dieses Prozesses blockieren virale Faktoren (E1B und E4) einerseits die Synthese zellulärer Proteine durch die Repression sowohl des RNA-Transports vom Zellkern ins Zytoplasma als auch deren Translation. Andererseits verhindern sie, dass zelluläre Faktoren die Virusproduktion unterdrücken. Infolgedessen ist die Zelle schon zu Beginn der Expression der frühen adenoviralen Gene unterversorgt.

Als Folge der Infektion stirbt die Zelle innerhalb von 30 bis 40 Stunden nach der Infektion ab, wobei die neusynthesierten Vironen freigesetzt werden (Pildner et al., 1986; Leppard und Shenk, 1989; Babiss et al., 1985; Bridge und Ketner, 1990; Halbert et al., 1985).

#### **2.4 Vielfachresistenz von Tumorzellen**

Die Chemoresistenz in Tumorzellen stellt ein großes Problem bei der Behandlung von malignen Tumoren mit Zytostatika dar.

Ein Grund, der die Wirksamkeit einer Chemotherapie limitiert, ist das Vorhandensein einer primären intrinsischen (ohne vorherigen Kontakt zu Zytostatika) oder das Auftreten einer sekundären erworbenen Chemoresistenz, die sich oftmals als Resistenz gegen unterschiedliche

Wirkstoffgruppen äußert. Dieses Phänomen der Vielfachresistenz prägte den Begriff multidrug resistance (MDR), (Dietel, 1991; Gottesman und Pastan, 1993).

Viele Zytostatika sind Substrate für membranständige Proteine, die als auswärtsgerichtete Pumpe das Medikament aus der Zelle transportieren. Davon am längsten bekannt und am besten charakterisiert ist das durch das *mdr1*-Gen codierte P-170-Glykoprotein, dessen Überexpression häufig bei chemoresistenten malignen Tumoren nach der Chemotherapie und Bestrahlung auftritt und mittlerweile als klassische MDR bezeichnet wird (Sukhai und Piquette-Miller, 2000; Roninson, 1992; Ueda et al., 1987; Ohga et al., 1998). Das P-170-Glykoprotein ist ein membran-gebundenes, ATP-abhängiges Transportprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kD. Es hat Medikamenten bindende Eigenschaften und funktioniert als eine Energie-abhängige Pumpe, die chemisch unterschiedliche, klinisch wichtige Arzneimittel vom Zellinneren in den Extrazellulärraum befördert und sie damit wirkungslos macht (Sukhai und Piquette-Miller, 2000; Dietel, 1990). Solche Arzneimittel, gegen die vielfachresistente Tumorzellen Resistenzen entwickeln, sind natürliche, hydrophobe Agentien mit Benzolringen, wie z. B. Doxorubicin, Daunomycin, Vincristin, Vinblastin, Cholchicin, Actinomycin D, Etoposid und noch viele mehr (Dietel, 1991). P-170-Glykoprotein ist nicht nur in Tumorzellen lokalisiert, sondern auch in gesunden Zellen. Man findet hohe Konzentrationen in Organen mit Stoffwechselfunktionen, vor allem in der Nebenniere, in der Darmschleimhaut, in den Nieren sowie in anderen Organen und in der Blut-Hirnschranke (Dietel, 1991). Obwohl ihre physiologische Funktion noch nicht klar definiert ist, vermutet man, dass das P-170-Glykoprotein den Organismus hauptsächlich vor toxischen Substanzen schützen soll.

Aus einer Überexpression in neoplastisch transformierten Zellen resultiert ein gesteigerter Zytostatikaefflux und damit eine Senkung der intrazellulären Zytostatikakonzentration. Das P-170-Glykoprotein wird durch Mitglieder der *mdr*-Supergenfamilie codiert. Sie umfassen beim Menschen zwei Gene, MDR1 und MDR2, bei Nagern drei Gene, nämlich *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2*. *Mdr2*-Gene sind nicht an der Mehrfachresistenz beteiligt (Shrenk, 1994). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression des P-170-Glykoproteins unter anderem durch die Kernlokalisierung des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 reguliert wird.

#### **2.4.1 Das Y-Box-Protein YB-1**

YB-1 gehört zu einer Gruppe Nucleinsäure-bindender Proteine, die an einer invertierten 5'-CCAAT-Sequenz, der so genannten Y-Box, binden (Wolffe, 1993). Sie können sowohl auf

der Ebene der Transkription als auch der Translation regulatorisch wirken (Ladomery und Sommerville, 1995; Wolffe, 1994; Wolffe, 1998). Zudem sind sie bei der Hemmung und Aktivierung Wachstums- und Apoptose-assoziiierter Gene involviert (Swamynathan et al., 1998). So interagiert YB-1 direkt mit p53 (Okamoto et al., 2000) und spielt eine wichtige Rolle bei der Fas-Genexpression (Lasham et al., 2000) sowie bei der Aktivierung von Topoisomerasen und Metalloproteinasen (Mertens et al., 1997; Shibao et al., 1999). Zudem ist YB-1 an der Regulation der mRNA Stabilität und an Reparaturvorgängen beteiligt (Chen et al., 2000). Weiterhin sind Y-Box-Proteine in die Regulation des humanen Poliomavirus (Raj et al., 1996; Safak et al., 1999) und des HIV Typ I (Ansari et al., 1999) involviert und üben eine "Enhancer-Funktion" für das "long terminal repeat" des Rous Sarkoma Virus aus (Faber und Sealy, 1990; Ozer et al., 1990).

Durch verschiedene Stressreize, wie z. B. UV-Bestrahlung, Zytostatikaapplikation (Koike et al., 1997) und Hyperthermie (Stein et al., 2001) wird der sonst cytoplasmatisch lokalisierte humane Transkriptionsfaktor YB-1 vermehrt im Zellkern angehäuft (Ohga, 1997; Miyazaki et al., 1992; Shibahara et al., 2001). Die nucleäre Lokalisation ist Voraussetzung dafür, dass YB-1 als Transkriptionsfaktor wirken kann und die Transkription der *mdr1*-/*MDR1*-Gene reguliert (Bargou et al., 1997). Dabei bindet YB-1 an die invertierten CCAAT-Elemente (*y*-Box) im *MDR1*/*mdr1*-Promotor und reguliert unter anderem dadurch die Expression der P-170-Glykoproteine (Ueda et al., 1987). Dagegen wird YB-1 in normalen und nicht resistenten Zellen hauptsächlich nur im Zytoplasma gefunden (Bargou et al., 1997; Mechetner et al., 1997; Ohga et al., 1998). Neueste Untersuchungen zeigen, dass YB-1 durch den Zellzyklus reguliert wird und in der G1/S-Phase im Zellkern vorkommt (Jurchott et al., 2003).

## **2.5 E1A-unabhängige adenovirale Replikation in vielfachresistenten Tumorzellen**

Für die Aktivierung sowohl der frühen wie auch der späten Gene spielt das 13S E1A-Protein eine entscheidende Rolle, da es die Transkription der E2, E3, E4-Gene induziert (Jones und Shenk, 1979). Für das Einleiten bzw. die Durchführung der Replikation werden die Produkte der E2-Gene benötigt, da sie für drei essentielle Proteine codieren. Die Transkription der E2-Proteine wird durch zwei Promotoren gesteuert, den "Early E2F-abhängigen" (O'Connor und Hearing, 2000) und den "E2-late " Promotor (Swaminathan und Thimmapaya, 1995; Song und Young, 1997; Lu et al., 1996). Die E1A-Proteine interagieren mit den zellulären Tumor-

suppressoren der Rb-Klasse (Whyte et al., 1988). Dabei wird die Bindung von Rb/E2F gespalten und der zelluläre Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt. Die freien E2F-Faktoren können sich dann an die entsprechenden Promotorbereiche von zellulären und viralen Genen binden und die Transkription einleiten (Kovesdi et al., 1987; Nevins, 1992). Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass bei höheren MOIs E1A-deletierte Adenoviren, welche die Bindung von Rb/E2F nicht beeinflussen, trotzdem in der Lage sind in Tumorzellen effizient zu replizieren (Steinwaerder et al., 2000). Diese Form der Replikation wird in der Literatur als "E1A-like activity" bezeichnet. Eine mögliche Erklärung für das Phänomen lieferten Untersuchungen von Holm et al. (2002, 2004). Die Aktivierung der viralen Polymerase wird nicht über den "E2-early Promotor" (E2F-abhängig), sondern über den "E2-late Promotor" erzielt, der von dem Transkriptionsfaktor YB-1 abhängig ist, welcher die virale Replikation unabhängig von E1A induzieren kann (Holm et al., 2002). Voraussetzung für die E1A-unabhängige adenovirale Replikation ist, dass der sonst cytoplasmatisch lokalisierte Transkriptionsfaktor YB-1 in vielfachresistenten Tumorzellen im Kern lokalisiert ist.

Im Zellkern erfolgt die YB-1-vermittelte Transkription der E2-Proteine durch Aktivierung des "E2-late Promotors", der mehrere invertierte CCAAT-Sequenzen aufweist. Die Kernlokalisation des Transkriptionsfaktors YB-1 ist für die Replikation von E1A-deletierten Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen verantwortlich (Holm et al., 2004).

In Tumorzellen, in denen YB-1 nicht im Kern lokalisiert ist, können Replikations-defiziente E1-minus Adenoviren nicht oder nur sehr schwach replizieren und somit keine Zelllyse durchführen. Dagegen führt die Infektion von E1A-deletierten Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen in vitro zur Viruspartikelbildung mit viraler Zelllyse (Holm et al., 2004).

## **2.6 Magnetofektion**

Die Magnetofektion ist eine in der Gentherapie neue Methode, bei der Genvektoren mit magnetischen Nanopartikeln assoziiert werden und unter dem Einfluss eines Magnetfeldes den Gentransfer in ein bestimmtes Zielgebiet vermitteln sollen.

Hierbei werden virale oder nicht-virale Genvektoren an Ferrofluide gebunden und mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes in den Zielzellen angereichert (Florence und Halbert, 1985; Alexiou et al, 2000). Bei den Ferrofluiden handelt es sich um eine wässrige Dispersion, sedimentationsstabiler, nanokristalliner magnetischer Partikel aus Eisenoxid mit einer Größe von 10 bis 1000 nm, die von einer polymeren Hülle umgeben sind. Diese Hüllsubstanz ist

einerseits für die Stabilität des kolloidalen Systems notwendig, andererseits weist sie die zur Bindung notwendigen ionischen Gruppen auf (Lubbe et al., 1996). Durch Anwendung eines starken Magnetfeldes, eines Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagneten, können die Genvektoren in einem Zielgebiet angereichert werden. Die nicht-viralen Genvektoren werden an polykationisch oder auch an polyanionisch beschichtete superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel gebunden. Die magnetischen Nanopartikel werden mit einer Hülle aus Polyethylen (transMAGPEI) umgeben, um eine elektrostatische Bindung der Genvektoren zu ermöglichen. Virale Genvektoren können an polykationisch beschichtete Magnetpartikel gebunden werden. Die bisher erreichten Assoziationseffizienzen sind bis zu siebenzig Prozent der eingesetzten Virusdosis. Es kommt zu einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den polykationisch beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln und den anionisch geladenen Viren, die miteinander Komplexe bilden. Die Bindung erfolgt außerdem durch Salz-induzierte Kolloid-Aggregation (Scherer et al., 2002).

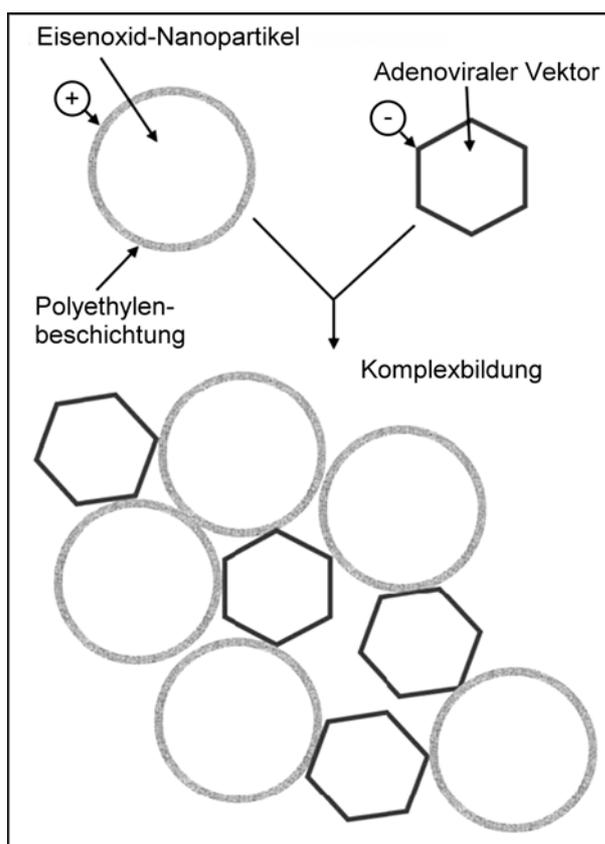


Abbildung 5: Herstellung von Magnetofektinen. Mit Polyethylen-beschichtete, magnetische Eisenoxid-Nanopartikel werden mit Adenoviren inkubiert. Es kommt zu einer Komplexbildung der anionisch geladenen Adenoviren und den polykationisch beschichteten Magnetpartikeln durch elektrostatische Wechselwirkung.

Zum Nachweis der Transfereffizienz werden Reportergene verwendet. Reportergene sind Gene, deren Expression in den Zielzellen durch einfache bio- oder histochemische Methoden nachweisbar ist. Das Reportergen zeigt an, ob und in welchem Ausmaß in den zu untersuchenden Zellen eine Transfektion stattgefunden hat. Auf diese Weise kann die Effektivität der verwendeten Vektorsysteme (Lowy et al., 1978; Kingston 1997) unter dem Einfluss des Magnetfeldes untersucht werden. Reportergene werden nicht endogen in den zu untersuchenden Zellen exprimiert und können in entsprechenden Nachweisverfahren objektiv, quantitativ, schnell, sicher und reproduzierbar nachgewiesen werden. Als Reportergen-Systeme werden z. B. Luciferase, Green Fluorescent Protein (grün leuchtendes Protein) und  $\beta$ -Galaktosidase eingesetzt (Köhler et al., 2000; Groskreutz und Schenborn, 1997). Das in Bakterien der Gattung *Escherichia coli* vorkommende Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, das die Hydrolyse von  $\beta$ -Gal-Zuckern katalysiert, wird durch das *E. coli-lacZ*-Gen kodiert.

Durch den Einbau dieses Gens in Vektoren, kann die  $\beta$ -Galaktosidase in den Zielzellen exprimiert und als Indikator verwendet werden. Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression erfolgt durch Zugabe von X-Gal. X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) ist eine farblose Substanz, bei der eine chromophore Gruppe  $\beta$ -1-4-glykosidisch an Galaktose gebunden wird. Nach der Spaltung von X-Gal durch  $\beta$ -Galaktosidase erfolgt eine Blaufärbung (Minol, 1996a). Vektoren, die  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen enthalten und mit Eisenoxidpartikel versehen werden, transfizieren nur die Zellen, die sich im Einflussgebiet des Magneten befinden. Blaufärbung zeigt die transfizierten Zellen an.

### **Vorteile der Magnetofektion:**

Im Einflussbereich des Magnetfeldes kann eine gezielte lokoregionale Infektion erreicht werden:	Die Infektion begrenzt sich auf einen bestimmten Bereich in der Zellkulturschale, d. h. die transferierten Genvektoren reichern sich nur in Zellen an, die sich im Einflussgebiet des Magnetfeldes befinden.
Kurze Inkubationszeit:	Die Inkubationszeit von infizierten Zellen verringert sich von fünf bis sechs Stunden auf zwanzig Minuten.

Reduktion der eingesetzten Virusdosis:	Es ist eine geringere Dosis nötig, um ein optimales Transfektionsergebnis zu erzielen.
Verbesserung der Transfektionseffizienz:	Unter dem Einfluss eines magnetischen Feldes kann man eine bis zu 500-fache Steigerung der Transfereffizienz bzw. der Genexpression erreichen (Scherer et al., 2002).

### **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

#### **3.1 Zielvorstellung**

Für den Erfolg in der Gentherapie spielt ein effizienter Gentransfer eine wichtige Rolle.

Der Transfer spezifischer Gene und deren Expression durch adenovirale Vektoren hat bis jetzt in vivo noch nicht zu dem erhofften Durchbruch in der Tumorbehandlung geführt. Die Hauptprobleme sind vor allem die geringe Transfektionseffizienz und die Schwierigkeit gezielt Zielzellen zu infizieren. Eine in der Gentherapie erst neu eingesetzten Technologie - der Magnetofektion - eröffnet neue Perspektiven für eine gezielt lokoregionäre Applikation. Bei dieser Technik werden Eisenoxidpartikel an Vektoren gebunden und mit Hilfe eines externen Magnetfeldes in einem Zielgebiet angereichert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu zeigen, dass durch den Einsatz onkolytischer adenoviraler Vektoren in Kombination mit der Magnetofektion eine gezielte Infektion von Tumorzellen im Wirkungsbereich des Magnetfeldes erreicht werden kann. Dadurch soll eine Erhöhung der adenoviralen Replikation und Partikelzahlbildung mit nachfolgender gezielter Lyse von bestimmten Tumorzellen erreicht werden kann.

Der Nachweis der adenoviralen Replikation und der Partikelbildung bzw. Partikelzahl erfolgt durch Southern Blot und Plaque Assay. Die Onkolyse wird anhand des Virus-assoziierten cytopathogenen Effektes dargestellt.

Die Untersuchungen werden in der Zellkultur an vielfachresistenten YB-1 kernpositiv und nicht resistenten YB-1 kernnegativen Tumorzellen durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

#### **3.2 Material und Methoden**

##### **3.2.1 Material**

###### **3.2.1.1 Zellen**

- 293 (humane embryonale Nierenzellen)

- A549 (humane Lungenkarzinomzellen)
- EPP85-181RDB (humane Pankreaskarzinomzellen)
- EPG85-257RDB (humane Magenkarzinomzellen)
- U2OS (humane Osteosarkomzellen)

### 3.2.1.2 Virusstämme

- Ad312 (E1A-deletiertes Adenovirus Serotyp 5)
- AdLacZ (Adenovirus Serotyp 5, E1/E3 deletiert, enthält  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen)
- Wildtyp Ad5 (Wildtyp-Adenovirus Serotyp 5)

### 3.2.1.3 Puffer und Lösungen

- 10 x SSC:  
1,5 M NaCl  
0,15 M Na-Citrat, pH 7,0
- 20 x SSC:  
3M NaCl  
0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
- Antibiotika-Stocklösung für die Zellkultur:  
Penicillin: in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, bei 4°C lagern. 100  $\mu$ g/ml Medium zusetzen.  
Streptomycin: in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst, bei 4°C lagern. 25  $\mu$ g/ml Medium zugeben.  
Penicillin/Streptomycin, der Fa. Biochrom KG Berlin
- Cäsiumchlorid-Lösung zur Virusreinigung:  
1,33 M CsCl  
1,45 M CsCl  
5mM HEPES, pH 7,8
- Denaturierungspuffer für Southern Blot:  
0,5 N NaOH  
1,5 M NaCl
- Dulbeccos DMEM-Medium für die Zellkultur:  
3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>  
4,5 g/l D-Glucose  
1,028 g/l N-Acetyl  
L-ananyl-L-glutamine  
Na-Pyruvat,

Fa. Biochrom KG Berlin:

- Ethidiumbromid:  
10 mg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O bidest.  
Zur Gelelektrophorese 1,2 µl Stocklösung in Agarosegel und Laufpuffer hinzufügen.
- Fetales Kälberserum (FKS) für die Zellkultur:  
10% werden dem Anzuchtmedium der Zelllinien zugesetzt;  
Fetal Bovine Serum der Fa. Biochrom KG, Berlin
- Glutaraldehyd 0,5% in PBS, pH 7,4, zum Fixieren der Zellen vor der X-Gal-Färbung
- Glycerin 70% in sterilem H<sub>2</sub>O zum Konservieren der mit X-Gal gefärbten Zellen
- HBS für die Magnetofektion:  
8 g/l NaCl  
0,27 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0,37 g/l KCl  
1 g/l Dextrose  
in 1000 ml Hepes
- Hepes-Puffer für die Viruspräparation:  
5 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-ethansulfonsäure, pH 7,8
- Hybridisierungslösung:  
0,1% SDS  
0,2 x SSC
- Kristallviolett-Lösung:  
15 g Kristallviolett  
85 ml Ethanol (100%)  
250 ml Formaldehyd  
mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1000 ml auffüllen
- Leibowitz 15- Medium für die Zellkultur, der Fa. Biochrom KG Berlin
- Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel (fl-MAG<sup>PEI</sup>):  
Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (Partikelgröße: 200 nm) mit einer Hülle aus PEI (Polyethylenimin; 800 kDa), der Fa. Chemicell, Berlin
- Neutralisationspuffer für Southern Blot:  
0,5 M Tris HCl, pH 7,0/1,5 M NaCl
- Optimem-Infektionsmedium für das Wachstum der Virus-Stammlösung:  
2,5% FBS  
5ml 200 mM Glutamin, Penizillin, Streptomycin  
2 ml 0,4 M L-Arginin
- PBS (1x)-Dulbecco für die Zellkultur (Phosphate buffered saline), der Fa. Biochrom KG, Berlin
- PBS (Phosphate Buffered Saline):  
140 mM NaCl  
2,7 mM KCl

6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,7 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4

- PBS 2+ für die Magnetofektion:  
68 mM CaCl<sub>2</sub>  
49 mM MgCl  
in 500 ml PBS
- Plaque-Assay-Medium:  
2 x DMEM mit 5% FBS, Glutamin, Penicillin, Streptomycin, L-Arginin
- Proteinase K für die DNA-Präparation:  
20 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest.; 30 min bei 37° C vorinkubieren; bei -20° C in Portionen lagern
- Puffer B, der Fa. Roche, Mannheim
- Qia-Auftragspuffer, für die DNA-Präparation:  
8 M Urea  
0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01 M Tris  
0,01 M Imidazol  
0,002 M 2-Mercaptoethanol  
0,05 M NaCl, pH 8,0
- Qia-Elutionspuffer für die DNA-Präparation:  
8 M Urea  
0,002 M 2- Mercaptoethanol  
0,1-0,4 M Imidazol
- Qia-Waschpuffer, für die DNA-Präparation:  
pH 6,3; s. Qia-Auftragspuffer
- TBE-Puffer:  
1 M Tris  
0,83 M Borsäure  
10 mm EDTA
- Tris-Puffer:  
10 mM Tris-HCl, pH 7,6-7,8
- Trypanblau-Lösung 0,5%:  
0,9 g NaCl  
0,5 g Trypanblaufarbstoff  
in 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.
- Trypsin/EDTA-Solution für die Zellkultur:  
0,25% Trypsin  
0,02% EDTA  
in PBS w/o., der Fa. Biochrom KG, Berlin:

- Viral Preservation Medium:  
1 ml 1 M Tris, pH 8,0  
2 ml 5 M NaCl  
0,1g BSA  
d H<sub>2</sub>O ad 50 ml  
50 ml Glycerin  
steril filtrieren und bei 4° C lagern
- X-Gal-Färbelösung:  
5,3 ml PBS, pH 7,4  
600 µl 10 x PBS/CN  
120 µl X-Gal-Stammlösung
- X-Gal-Stammlösung:  
5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
in 200 ml PBS, pH 7,4 gelöst  
20 mg X-Gal/ml Dimethylformamid  
Aufbewahrung in einem dunklen Gefäß, bei -20° C

#### 3.2.1.4 Chemikalien

- <sup>32</sup>P-Nucleotid (Fa. ICN Biomedicals, Eschwede)
- Agarose (Fa. peq Lab Biotechnologie, Erlangen)
- Borsäure (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- BSA (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Caesium-Chlorid, CsCl (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Calciumchlorid, CaCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- Daunoblastin (Fa. ICN Biomedicals, Eschwede)
- DMF (Dimethylformamid) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- DANN Molekulargewichtsmarker (Fa. Roche, Mannheim)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Ethanol, absolut (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Fa. Boeringer, Mannheim)
- Exoklenow (Fa. Stratagene Europe, Amsterdam, Niederland)

- FKS (fetales Kalberserum) (Fa. Biochrom, Berlin)
- Isopropanol (Fa. Merck, Darmstadt)
- Formaldehyd (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Glutaraldehyd (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Glycerin (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Kaliumferricyanid,  $K_3(FeCN)_6$  (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Kaliumferrocyanid,  $K_4(FeCN)_6$  (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Kb-ladder (Fa. peq Lab Biotechnologie, Erlangen)
- Kristallviolett (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- L-Arginin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- L-Glutamin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Magnesiumchlorid,  $MgCl_2$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid,  $NaCl$  (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Natriumcitrat,  $C_6H_5Na_3O_7$  (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Natriumhydrogenphosphat,  $Na_2HPO_4$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid,  $NaOH$  (Fa. Fluka Chemie, Buchs)
- Nucleotidtriphosphat (dCPT) (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Penicillin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Primer für das E2A-Gen (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)
- Proteinase K (Fa. Qiagen, Hilden)
- Random 9mer Primer (Fa. Stratagene Europe, Amsterdam, Niederland)
- Restriktionsendonukleasen (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Salzsäure,  $HCl$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- SDS (Dodecylsulfat, Na-Salz) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
- Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Tris (Fa. Merck, Darmstadt)

- Trypsin (Fa. Biochrom, Berlin)
- Tryptanblau (Fa. Merck, Darmstadt)
- X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

### 3.2.1.5 Vorgefertigte Systeme

- Qiagen Mini Kit 50 (Fa. Qiagen, Hilden)

### 3.2.1.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Brutschränke für Zellkultur (Fa. Life Sciences International, Frankfurt)
- Dialyseschläuche (Slide-A-Lyzer 10 K Dialysis Cassetten) (Fa. Pierce Chemical Company, Rockford, USA)
- Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagnete ("NeoDelta"; Reminenz: ca. 1080-1150 mT; Fa. IBS Magnet, Berlin): 1 Kunststoffplatte mit 6 runden (d = 15 mm; h = 5 mm) und eine Kunststoffplatte mit 6 rechteckigen Magneten (20 x 10 x 5mm)
- Eismaschine (Fa. Ziegra, Isernhagen)
- Elektrophoresekammer (Hoefer<sup>TM</sup> HE 33) (Fa. Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
- Gefrierschrank (-80°C) (Hera freeze) (Fa. Heraeus Holding, Hanau)
- Hybridisierbrutschrank (7601) (Fa. GLF, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
- Laboruhr (Fa. Oregon scientific, Villingen)
- Laborwaage (Explorer) (Fa. Ohaus, Giessen)
- Magnetrührer (Variomag) (Fa. H+P Labortechnik, München)
- Megafuge (2,0 R) (Fa. Hereus Instruments, Hanau)
- Micro Spin<sup>TM</sup> 625 Columns (Fa. Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
- Mikropipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Mikroskop (Axiovert 25) (Fa. Zeiss, Jena)
- Mikrowellenherd (Fa. Siemens, München)
- Neubauer-Zählkammer (Fa. Schubert & Weiß, Schwandorf)
- Nylon-Membran (Fa. Bioscience Schleicher & Schuell, Dassel)

- Orbitalschüttler (Heidolph Duomax 2030) (Fa. Heidolph Instruments, Schwabach)
- PCR-Thermocycler (Robo Cycler Gradient 40) (Fa. Stratagene Europe, Amsterdam, Niederland)
- PhosphorImager<sup>TM</sup> (Fa. Fujifilm, Düsseldorf)
- Plexiglasringe (Ø 2 cm) (Fa. Weiß, München)
- Röntgenfilme (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> der Fa. Amersham Biosciences Europe, Freiburg)
- Spektrophotometer DU-600 (Fa. Beckman, Krefeld)
- Sterile Werkbank (Fa. Heraeus Instruments, Hanau)
- Stratalinker<sup>R</sup> UV-Crosslinker (2400) (Fa. Stratagene Europe, Amsterdam, Niederland)
- Stromgerät für die Elektrophorese (EC 105) (Fa. E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida)
- Thermomixer (Compact) (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Turbo Blotter Filterpapier (Fa. Bioscience Schleicher & Schuell, Dassel)
- Ultrazentrifuge (Optima<sup>TM</sup> LE-80 K) (Fa. Beckman, Krefeld)
- UV-Transilluminator (Fa. Biotech Fischer, Reiskirchen)
- Vortexer MS 2 Minishaker IKA<sup>R</sup> (Fa. IKA<sup>R</sup> Werke, Stauffen)
- Wasserbad (Fa. Memmert, Schwabach)
- Zellkulturplastikwaren (Fa. TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz):
  - Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>)
  - 6-Lochplatten
  - Petrischalen (5 cm)
  - Schraubdeckelröhrchen (2 ml, 50 ml)
  - Eppendorfröhrchen (1,5 ml)
  - Zellschaber
  - Pipettenspitzen (10, 100, 500 µl)
- Zentrifuge EBA 12 (Fa. Hettich, Tuttlingen)

### **3.2.2 Methoden**

#### **3.2.2.1 Zellkultur**

Für die Untersuchungen verwendet man die vielfachresistenten EPG85-257RDB- und EPP85-181RDB-Zelllinien. Die Zellen werden in L-15 Medium kultiviert, dem 10% FKS zugesetzt wird.

Um die P-Glykoproteinexpression und somit die Kernlokalisierung von YB-1 zu gewährleisten, erfolgt alle vier Wochen eine Behandlung der Zelllinien mit 100 ng/ml Daunoblastin. Als Kontrolle dienen die nicht resistenten Zelllinien U2OS und A549, die man in DMEM Medium mit 10% FKS kultiviert. Beiden Medien wird L-Glutamin (200 µg/ml), Penicillin (100 µg/ml) und Streptomycin (25 µg/ml) zugesetzt. In regelmäßigen Abständen werden die konfluent gewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Versetzen mit Trypsin von der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen werden dann in frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf in neue Flaschen verteilt. In feuchter Atmosphäre, bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5%, erfolgt die Inkubation der Zellen, die man zur Lagerung trypsiniert und drei Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes werden die Zellen in 4°C gekühltes Einfriermedium (10% FKS, 15% DMSO) portioniert, möglichst rasch bei -80°C für 24 Stunden tiefgefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196°C) verbracht.

Zur Anzucht taut man die tief gefrorenen Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad auf und zentrifugiert diese drei Minuten lang bei 1.200 rpm. Das Zellpellet wird dann im Anzuchtmedium mit 10% FKS, L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin aufgenommen und in einer kleinen Gewebekulturflasche bis zum Erreichen eines Monolayers bei 37°C inkubiert.

#### **3.2.2.2 Verwendete Viren und Virusvermehrung**

Für die Versuche finden die rekombinanten Adenoviren Ad312 und AdLacZ Verwendung. Ad312 ist ein Replikations-inkompetentes Adenovirus, welches kein funktionelles E1A Genprodukt bilden kann (Nevins, 1981). AdLacZ ist ein E1/E3 deletiertes Adenovirus, welches  $\beta$ -Galaktosidase als Transgen expremiert. Die Vermehrung der verwendeten Viren wird in der 293-Zelllinie (Graham et al., 1977; Brough et al., 1996; Amalfitano et al., 1996) durchgeführt.

Die Zellen werden in DMEM Medium kultiviert, dem 10% FKS, L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin zugesetzt ist.

#### **3.2.2.2.1 Infektion der 293-Zellen**

Die Infektion der subkonfluent gewachsenen 293-Zellen erfolgt mit 1-10 pfu/Zelle adenoviraler Vektoren im OPTIMEM-Infektionsmedium (enthält 2% FKS). Anschließend werden die Zellen für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert und alle 15 Minuten geschwenkt. Nach der Infektion wird das Infektionsmedium durch DMEM Erhaltungsmedium, das 10% FKS enthält, ersetzt.

#### **3.2.2.2.2 Isolierung der Viren aus den 293-Zellen**

Die infizierten Zellen werden ca. 36-48 Stunden bis zur Ablösung des Zellrasens (cpE 80-100%) bei 37°C inkubiert. Danach wird die Virus-Zell-Suspension in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei 3.500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 8ml OPTIMEM resuspendiert und in ein Gefrierrohrchen überführt. Die Virusernte erfolgt durch viermaliges Gefrier- und Auftauen (-80°C, 37°C), wodurch intrazellulär liegende Virionen freigesetzt werden.

#### **3.2.2.2.3 Präparation der Viren**

- Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Beseitigung von noch bestehenden Verunreinigungen der Virionen wird ein Cäsiumchlorid-Dichtegradient (CsCl) hergestellt. Zentrifugiert man eine CsCl-Lösung lange genug bei ausreichend hoher Geschwindigkeit, so stellt sich am Boden des Zentrifugenröhrchens eine höhere Konzentration des schweren Salzes ein, während die Konzentration nach oben hin abnimmt. Man erhält dadurch einen kontinuierlichen Dichtegradienten.

Das Viruslysate wird bei 37°C aufgetaut und anschließend bei 3.500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. In ein 50 ml Röhrchen werden 17 ml 1.33 molares CsCl und 9 ml

1.45 molares CsCl vom Röhrchenboden an luftblasenfrei unterschichtet, anschließend gibt man 10 ml Viruslysate vorsichtig zu. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 18.000 rpm wird die untere virushaltige Bande mit einer feinen Kanüle abgesaugt und mit Viral Preparation Medium 1:1 verdünnt, bevor die Dialyse erfolgt:

- Dialyse

Die Dialyse dient der schonenden Entfernung kleiner Moleküle, z. B. Salze und Phenolreste, bei der Präparation der Viren.

Die Virusverdünnung wird in ein "Slide" gespritzt und anschließend in einem Liter sterilen 10 mmolaren Trispuffer (pH 7.6-7.8) bei 4°C für 12-18 Stunden dialysiert, währenddessen rührt ein Magnetrührer den Puffer, den man nach zwei und dann nach vier Stunden wechselt. Bei -80°C erfolgt die Lagerung der Virusisolation bis zur Verwendung.

- Konzentrationsbestimmung durch DNA-Messung

100µl CsCl gereinigte Viruslösung wird in 900µl 1xTE, pH 8.0 aufgelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem Photometer.

Die Viruspartikelzahl pro ml wird unter Verwendung folgender Umwandlung bestimmt:

$$A(260 \text{ nm}) = 1.0 \rightarrow \text{Viruspartikel/ml} = 10^{12}$$

$$\text{also } 1 : 10^{12} = A(260 \text{ nm}) \times (10) : X$$

wobei X = Viruspartikel pro ml und 10 = Virusverdünnung

$$\text{Viruspartikel : pfu (plaque forming units)} = 100 : 1$$

### 3.2.2.3 Zellzahlbestimmung mittels Vitalfärbung

Die adhärennten Zellen werden mit PBS einmal gewaschen, trypsinisiert, in frisches Medium resuspendiert und dann in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Anschließend mischt man 20-30  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0.5% igen Trypanblau-Lösung und inkubiert zwei bis fünf Minuten bei 37°C. In der Zwischenzeit wird die Oberfläche der Neubauer-Zählkammer und das zugehörige Deckblatt mit 70% igem Ethanol gereinigt und die Zählkammer mit 9.8  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension befüllt. Unter dem Mikroskop erfolgt bei 100-facher Vergrößerung die Auszählung aller nicht blau gefärbten (lebenden) Zellen aus den vier Großquadraten. Dabei werden die Zellen, die sich oben und links auf der Begrenzungslinie befinden mitgezählt, während man die unten und rechts auf der Begrenzung liegenden Zellen nicht berücksichtigt.

Die Berechnung der Zellzahl wird folgendermaßen vorgenommen:

Der Mittelwert aus den vier großen Quadraten  $\times 2$  (da zuvor mit Trypanblau 1:1 verdünnt wurde)  $\times 10^4 = \text{Anzahl der Zellen/ml}$

Berechnung des Volumens für X Zellen:

$X \text{ Zellen} \times 1000 \mu\text{l} : \text{gezählte Zellen/ml} = \text{Volumen in } \mu\text{l} \text{ in dem sich X Zellen befinden.}$

Die ausgezählten Zellen werden in 6-Loch-Platten ausgesät und bei 37°C inkubiert.

### 3.2.2.4 Nachweis der zielgerichteten Infektion durch Magnetofektion mit Hilfe eines LacZ-Adenovirus

#### 3.2.2.4.1 Magnetofektion

Bei der Magnetofektion werden adenovirale Vektoren an superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel gebunden und dann unter Einfluss eines externen magnetischen Feldes in den Zielzellen angereichert. Um die zielgerichtete Infektion zu prüfen, erfolgt der Nachweis der

mit dem adenoviralen Vektor AdLacZ (enthält ein LacZ-Gen) infizierten Tumorzellen durch x-Gal Färbung.

Hierbei finden die mehrfachresistenten Zelllinien EPP85-181RDB, EPG85-257RDB und die nicht resistenten Zelllinien A549 sowie U2OS Verwendung, die man in 6-Loch-Gewebekulturplatten aussät, bei 37°C im Brutschrank inkubiert und mit verschiedenen Viruskonzentrationen infiziert.

Die Virusverdünnung wird mit PBS2+, die Partikelverdünnung mit HBS auf jeweils 250 µl Volumen aufgefüllt. Anschließend werden Virusmix und Partikelmix (zusammen 500 µl) durch 20-maliges auf- und abpipettieren miteinander vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich saugt man das Medium der zu infizierenden Zellen ab und ersetzt es durch 1,75 ml frisches Medium. In der Folge werden die auf der Platte ausgesäten Zellen ( $4 \times 10^5$  Zellen/Loch) mit der Virus-Partikelmischung (jeweils 250 µl pro Loch) infiziert und weitere 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dabei befindet sich die 6-Loch-Platte auf einem gleichgroßen Kunststoffträger, mit dem sechs Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagnete unterhalb der einzelnen Vertiefungen mittig angelegt werden. Es werden rechteckige (1 × 2 cm) und runde Magnete (Durchmesser: 1,5 cm) verwendet. Die Magnetenplatte wird dann wieder entfernt.

Es folgt ein zweimaliges Absaugen und Wiederbefüllen mit Medium. Damit wird eine Wäsche der Zellen erreicht, die daraufhin im Brutschrank 24 Stunden bei 37°C inkubiert werden.

Beim Versuchsaufbau variieren Viruskonzentration (10, 50, 100 pfu/Zelle), sowie die magnetgestützte Inkubationszeit (20, 30, 45 Min.). Der Partikelgehalt (1 µg Eisenoxyd in 1µl sterilem Wasser), variiert zwischen 5, 6, 10 und  $12\mu\text{l}/4 \times 10^5$  Zellen.

#### **3.2.2.4.2 x-Gal Färbung**

Durch Insertion des lacZ-Gens von Escheria coli (E.coli), das für die β-Galaktosidase kodiert, können die mit adenoviralen Vektoren infizierten Zellen identifiziert werden. Dazu werden die infizierten Zellen mit einer Lösung überschichtet, die das chromogene Substrat x-Gal enthält. Bei dessen Umsetzung durch die β-Galaktosidase entsteht ein blauer Farbstoff, der schwer löslich ist und nicht aus der Zelle diffundieren kann.

Die Zellen werden einmal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend für zehn Minuten in PBS mit 0,5%igem Glutaraldehyd bei 37°C im Brutschrank fixiert. Nach Zugabe einer frisch angesetzten PBS- Lösung, die 1mg/ml x-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-

Galaktopyranosid) erfolgt eine Inkubation der Zellen für weitere sechs Stunden bei 37°C im Brutschrank. Nach Entfernen der x-Gal Lösung wird zur Asservation 70% iges Glycerin zugesetzt. Die Zellinfektion wird durch Blaufärbung angezeigt und kann somit makroskopisch identifiziert werden.

### **3.2.2.5 Nachweis der adenoviralen DNA-Replikation durch Southern-Blot**

Die Zelllinien EPP85-181RDB, EPG85-257RDB, A549 und U2OS werden in 6-Lochplatten ausgesät ( $2 \times 10^5$  Zellen/Loch) und jeweils mit 50 und 100 pfu/Zelle des E1A-deletierten adenoviralen Vektors Ad312 unter Verwendung der Magnetofektion (Methode wie oben beschrieben durchgeführt) infiziert. Die infizierten Zellkulturen inkubiert man 3 Tage bei 37°C im Brutschrank.

Danach erfolgt die Isolierung der viralen DNA mit Hilfe des Qiagen DNA Mini Kits (50). Dabei wird die DNA über Ionenaustauscher-Säulen präpariert und von Proteinen und RNA gereinigt.

#### **3.2.2.5.1 Isolierung der viralen DNA**

Die infizierten Zellen in den 6-Lochplatten werden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Durch anschließende 5-minütige Zentrifugation bei 20°C und 2.000 rpm wird der Zellkulturüberstand mit den abgelösten Zellen pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes resuspendiert man das Pellet in 200 µl PBS. Dann erfolgt die Zugabe von 20 µl Proteinase-K-Lösung und 200 µl AL-Puffer, woraufhin die Mischung bei 70°C für 15 Minuten im Thermomixer geschüttelt wird. Zum Ausfällen der DNA werden 200 µl 100%iges Ethanol zu-pipetiert und über die Säule gegeben; anschließend wird bei 14.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an der Matrix der Säule. Die aufgefangene Flüssigkeit verwirft man. Nach dem Zusetzen von 500 µl AW1 (Waschpuffer) über die Säule wird nochmals bei 14.000 rpm 1 Minute zentrifugiert, dem schließt sich eine wiederholte Waschung mit 500 µl AW2 und anschließender Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 Minuten an. Das Eluat wird jeweils verworfen. Dann werden 50 µl AE-Puffer (Elutionspuffer) über die Säule gegeben und für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert; dieser Puffer löst die DNA und schwemmt sie aus. Dieser Schritt wird wiederholt und das DNA-haltige Eluat in Eppen-

dorf-Tubes überführt. Die Konzentrationsbestimmung der erhaltenen DNA erfolgt photometrisch.

### **3.2.2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm lässt sich die Konzentration von Nukleinsäuren unter UV-Licht photometrisch bestimmen. Aus dem Verhältnis der OD<sub>260nm</sub> und der OD<sub>280nm</sub> erhält man eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure. Eine Nukleinsäurelösung, die nicht mit Proteinen kontaminiert ist, weist einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 auf.

Die DNA-Lösungen werden 2:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt und gegen H<sub>2</sub>O als Referenz gemessen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors entspricht die OD<sub>260</sub> von 1 einer Nukleinsäuremenge von 50 µg/ml.

### **3.2.2.5.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Restriktionsenzymspaltung werden je 1 µl der Restriktionsnukleasen Xho I und Hind III zu 2 µg gereinigter viraler DNA aus den Tumorzellen gegeben. Man setzt 2µl Reaktionspuffer zu und füllt mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl Gesamtvolumen auf. Als Kontrolle werden 2µg 293/293PMT-DNA und 2 µg Wildtyp-Adenovirus Ad5-DNA jeweils mit 1µl XhoI, 1µl HindIII und 2µl Puffer versetzt und anschließend mit sterilem Wasser ebenfalls auf insgesamt 20 µl aufgefüllt. Die Spaltungsansätze inkubiert man im Thermomixer bei 37°C für 12 Stunden. Nach erfolgter Restriktion wird die DNA durch Elektrophorese im 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird das Ethidiumbromidhaltige Gel mit den DNA-Proben unter UV-Licht betrachtet. Die Kontrolle 293/293PMT dient zur Unterscheidung zwischen "input" und replizierendem Virus. Dabei findet eine von Nelson und Kay (1997) beschriebene Methylierungsstrategie Anwendung, die eine Überprüfung des Replikationsverlaufs von E1A-deletierten adenoviralen Vektoren ermöglicht. Dazu werden Methyl-markierte adenovirale Vektoren, durch Hinzufügen einer Methylgruppe in 293-Zellen, die das Methyltransferasegen (PMT) exprimieren, produziert. Die Methylierung beeinträchtigt weder die Vektorvermehrung, noch die Transgenexpression, verhindert aber die Spaltung der adenoviralen DNA durch das Restriktionsenzym XhoI; die Methylierung hat jedoch keinen Einfluss auf andere Restriktionsenzyme. Findet eine Replikation der adenoviralen DNA statt, kommt es zum Verlust der Methylierung und die Spaltung der adenoviralen DNA durch XhoI und das Auftreten einer

Bande bei 6.5 kb und 1.5 kb; dagegen zeigt die nicht gespaltene adenovirale DNA von 8.0 kb die nicht replizierende "input" Vektor DNA an (Nelson und Kay, 1997).

#### **3.2.2.5.4 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe voneinander getrennt und identifiziert werden. Die Konzentration der Agarosegele beträgt 2%. Dazu kocht man 0,4 g Agarose in 40ml TBE-Laufpuffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) auf, bis eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wird 1,2µl Ethidiumbromid zugesetzt und daraus mit Hilfe eines Kammes ein ca. 5 mm starkes Gel mit Taschen gegossen. Die Kammern des Gels werden mit jeweils 20 µl Probe (enthält 2µg DNA), der zuvor 4 µl Probenpuffer zugesetzt wurde, beladen. Durch die Zugabe des Probenpuffers kann man die Dichte erhöhen, sodass die DNA-Lösung in die Geltasche sinkt. Mit Hilfe von bekannten DNA-Größenmarkern, die parallel im Gel mitlaufen, können die Größen der DNA-Fragmente ermittelt werden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt während ca. 4 Stunden bei einer Stromspannung von 75 Volt. Anschließend photographiert man die Gele unter UV-Licht.

#### **3.2.2.5.5 Transfer der DNA (Southern Blotting)**

Das Gel mit der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wird vor dem Transfer mit Hilfe eines Orbitalschüttlers für 30 Minuten in Denaturierungspuffer (0,5 N NaOH/1,5 M NaCl) leicht geschwenkt und anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O abgespült. Zum Neutralisieren der DNA inkubiert man das Gel 30 Minuten in Neutralisationpuffer (0.5 M Tris HCl pH 7,0/1,5 M NaCl). Beim Blotting wird unter Ausnutzung der Kapillarkräfte ein Hochsalzpuffer (10xSSC-Puffer = 1,5 M NaCl/0,15 M NaCitrat, pH 7,0) durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Dabei wandert die DNA mit und bleibt auf der Membran haften.

Vor Aufbau des Transferstapels wird das vorbehandelte Gel für 30 Minuten in 20xSSC-Puffer inkubiert. Das "Blotsandwich" besteht aus Whatman-Filterpapieren ( mit 20xSSC-Puffer getränkt), den Gel, der Nylonmembran (die vorher kurz in H<sub>2</sub>O und dann 5 Minuten in 20xSSC-Puffer gelegt wurde), mehreren Lagen trockenen Zellstoffpapier und einer Abdeckplatte. Der Transferstapel wird in einer Wanne mit 20xSSC getränkt. Nach 12 Stunden Transfer erfolgt eine kovalente Bindung der DNA an die Nylonmembran durch UV-Licht (UV-Stratalinker).

### 3.2.2.5.6 Herstellung einer E2A-Sonde

Für die virale DNA Analyse stellt man eine mit  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierte E2A-cDNA-Sonde her. Die radioaktiv markierte cDNA-Sonde für den Nachweis des adenoviralen E2A-Gens wird durch PCR generiert (E2-late-Sonde: Position 22734 bp - 24235 bp). Dazu verwendet man Wildtyp Ad5-DNA und spezifische Primer für das E2A-Gen. Für die Amplifikation der cDNA werden die Primer 5'-TGGTGCCGC GCACACCCA-3' und 5'-CCGGACAGGCCGCGTCA-3' eingesetzt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgt in 30 Zyklen für 60 s bei 95°C, 60 s bei 55°C und 60 s bei 72°C.

### 3.2.2.5.7 Hybridisierung

Nach dem Transfer erfolgt der Nachweis spezifischer DNA durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA.

Die Hybridisierungen werden in einem Glasrohr im temperierten Drehofen durchgeführt. Vor der Hybridisierung wird die Nylonmembran eine Stunde bei 58°C in 10 ml 0,1%SDS/0,2xSSC vorbehandelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren (Prähybridisierung).

Für die Herstellung einer markierten Sonde kocht man 25 µl DNA-Probe mit 10 µl Random-Primer und 23 µl H<sub>2</sub>O für 3 Minuten im Wasserbad und zentrifugiert anschließend, wobei die DNA denaturiert und mit Zufallshexameren (random primers) hybridisiert wird, die als Primer für die DNA-Polymerase dienen. Die Markierung erfolgt über den Einbau radioaktiv markierter Nucleotide. Im Radioaktivbereich setzt man unter Einhaltung der vorgeschriebenen Sicherheitsmaßnahmen 10µl dCPT - Primer-Puffer, 5µl Nucleotid  $^{32}\text{P}$  und 1µl Exoklenow (entfernt die normalen dCTPs und baut die radioaktiv markierten ein) zu und inkubiert 15 Minuten bei 37°C im Thermomixer. Um nach der Markierung die markierte DNA von nicht eingebauten markierten Nucleotiden zu reinigen, verwendet man Micro-spin-columns.

Dabei werden die markierten DNA-Proben zweimal über die Säule gegeben und 2 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert, anschließend 2 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und der Nylonmembran zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt für eine Stunde bei 58°C. Nach Abgießen des Überstandes aus dem Hybridisierungsglasrohr wird die Nylonmembran 30 Minuten bei 58°C in 0,1%SDS/0,2xSSC gewaschen; die DNA bleibt an die Membran kovalent gebundenen, so dass nur die radioaktive Sonde im Waschwasser verbleibt.

### 3.2.2.5.8 Autoradiographie

Nach dem Waschen wird die Membran auf einem Whatman Filterpapier kurz angetrocknet und in Haushaltsfolie eingewickelt. In einer Filmkassette mit Verstärkerfolie exponiert man die Membran für eine Dauer von einer Stunde. Als Produkte entstehen Lichtquanten die durch PhosphorImager<sup>TM</sup> detektiert werden können. Die Daten können mit einem Computer erfasst und dann densitometrisch ausgewertet werden.

### 3.2.2.6 Nachweis des virusvermittelten cytopathogenen Effekts (cpE)

E1A-deletierte adenovirale Vektoren können in vielfachresistenten Tumorzellen eine sehr effiziente virale Replikation mit Partikelbildung und viraler Tumolyse (cytopathogener Effekt) durchführen.

Durch den Einsatz der Magnetofektion soll eine gezielte Infektion der Tumorzellen erreicht werden.

EPP85-181RDB, EPG85-257RDB, A549 und U2OS Zellen werden in 6-Lochplatten ausgesät ( $2 \times 10^5$  Zellen/Loch) und bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis ein ca. 80% konfluent gewachsener Zellrasen erreicht ist.

Die resistenten Zelllinien EPP85-181RDB, EPG85-257RDB werden mit einer Infektionsdosis von 20, 30, 50 und 100 pfu/Zelle und die nicht resistenten Zelllinien A549, U2OS mit 50 und 100 pfu/Zelle beimpft. Zur Infektion verwendet man den E1A-deletierten adenoviralen Vektor Ad312.

Zum Vergleich werden die Versuchsreihen jeweils mit und ohne der vorstehend beschriebenen Magnetofektion durchgeführt. Die infizierten Zellen inkubiert man solange bei 37°C im Brutschrank, bis ein Ablösen der Zellen (cytopathogener Effekt) sichtbar ist.

Anschließend wäscht man die Zellen mit PBS und färbt diese 10 Minuten mit Kristallviolett-Lösung (1ml Lösung/Loch). Nach Entfernen der Färbelösung erfolgt eine erneute Waschung mit PBS.

Das Ergebnis wird makroskopisch beurteilt; die gefärbten Zellen erscheinen in einem kräftigen violett.

### 3.2.2.7 Nachweis der Partikelbildung/Partikelzahl mittels Plaque Assay

Um die Zahl der infektiösen Viren ("Plaque- bildende Einheiten"; pfu) pro ml Virussuspension zu ermitteln, titriert man die Viren mit dem Plaque Assay.

Die Zelllinien EPP85-181RDB, EPG85-257RDB, A549 und U2OS werden in 6-Loch-Platten ausgesät ( $2 \times 10^5$  Zellen/Loch) und unter Verwendung der Magnetofektion mit 50 pfu des E1A-deletierten adenoviralen Vektors Ad312 infiziert.

Nach 4-tägiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank isoliert man die infizierten Zellen im Innen- (Einflussbereich des Magneten) und Außenbereich der 6-Loch-Platte getrennt voneinander, um die Wirksamkeit der Magnetofektion zu prüfen. Dazu wird ein Plexiglasring, der dem Durchmesser des vorher verwendeten Magneten entspricht, in die Mitte des Loches gesetzt. Anschließend werden die infizierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach ca. 5 Minuten überführt man die abgelösten Zellen in ein 2 ml Schraubdeckelröhrchen und versetzt diese mit Dulbeccos-Vollmedium. Es erfolgt ein dreimaliges Gefriertauen (-80°C, +37°C) der Virus-Zell-Suspension, bevor 15 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert wird. Der Überstand, in dem das Virusmaterial enthalten ist, wird abgenommen und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Zur Titerbestimmung legt man eine logarithmische Verdünnungsreihe aus Virussuspension und OPTIMEM Infektionsmedium mit 2% FKS an und infiziert einen ca. 90% konfluenten 293-Zellrasen mit 500 µl dieser Verdünnung. Alle Versuchsreihen werden dabei als Doppelbestimmung angesetzt. Danach werden die infizierten Zellen eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert und alle 10 Minuten vorsichtig geschwenkt. Anschließend überschichtet man den Zellrasen mit 8 ml eines auf 42°C vorgewärmten, agarhaltigen Mediums (1% autiklavierter Agarose/Plaque Assay Medium im Verhältnis 1:1) und inkubiert bei 37°C bis zum Auftreten von Plaques. Nach ca. 10 Tagen können die Plaques ausgezählt und der Titer nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Titer (pfu/ml)} = \text{Plaquezahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}^{-1} \times \text{Volumen der Virusverdünnung}^{-1}$$

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Überprüfung der zielgerichteten Infektion mit AdLacZ via X-Gal Färbung

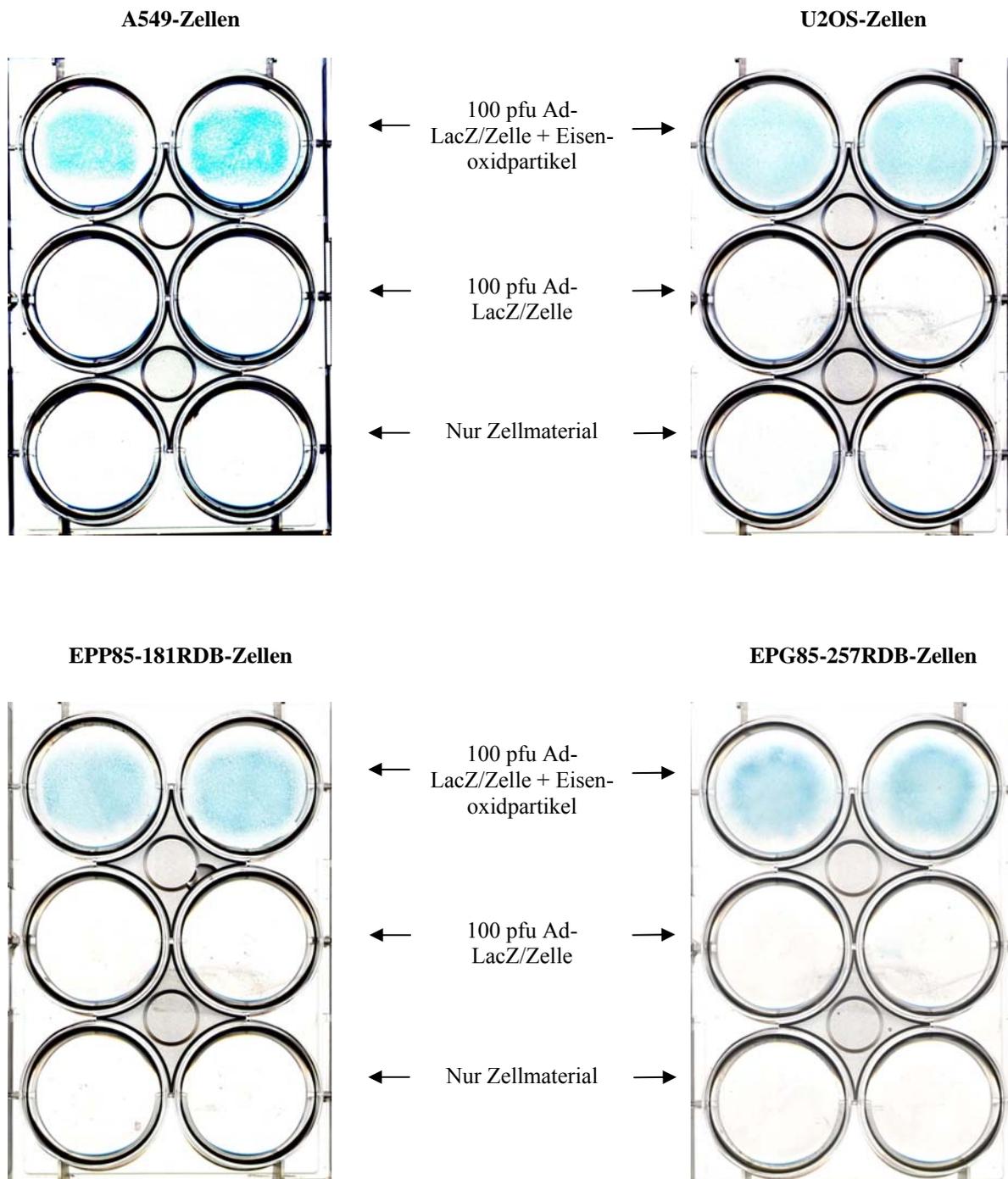
Die mit dem adenoviralen Vektor AdLacZ infizierten Tumorzellen werden via x-Gal Färbung nachgewiesen, um somit die zielgerichtete Infektion zu prüfen. Die Zelllinien EPP85-181RDB, EPG85-257RDB, A549 und U2OS ( $4 \times 10^5$  Zellen/Kavität) werden mit Viruskonzentrationen von 10, 50 und 100 pfu/Zelle unter Verwendung der Magnetofektion infiziert. Zur Etablierung der Methode wird ein unterschiedlicher Magnetpartikelgehalt von 5, 6, 10 und 12  $\mu\text{l}/4 \times 10^5$  Zellen ( $1\mu\text{g}$  Eisenoxid/ $1\mu\text{l}$ ) eingesetzt. Die infizierten Zellen werden unter dem Einfluss des Magnetfeldes 20, 30 und 45 Minuten inkubiert.

Die verwendeten Zelllinien, die mit einer Virusdosis von 50 und 100 pfu/ Zelle infiziert wurden, zeigen alle eine makroskopisch sichtbare Blaufärbung, die sich auf den Einwirkungsbereich des Magneten beschränkt; d. h. der an Eisenoxidpartikel gebundene adenovirale Vektor infiziert nur die Zellen, die sich im Einflussgebiet des Magneten befinden.

Bei einer Infektionsdosis von 10 pfu/Zelle ist makroskopisch keine Infektion feststellbar.

Um ein optimales Infektionsergebnis zu erreichen ist ein Eisenoxidpartikelgehalt von mindestens 6  $\mu\text{l}/4 \times 10^5$  Zellen notwendig; bei einer geringeren Konzentration ist makroskopisch keine Blaufärbung der infizierten Zellen feststellbar.

Eine Inkubationszeit von 20, 30 und 45 Minuten unter dem Einfluss des Magneten führt zu einem gleich guten Infektionsergebnis.



**Abbildung 6: Lokalisation der adenviralen Infektion durch Magnetofektion.** Die Zelllinien A549, U2OS, EPP85-181RDB und EPG85-257RDB werden in einer 6-Lochplatte ausgesät und mit 100 pfu AdLacZ/Zelle infiziert. Das Virus wird mit paramagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln assoziiert und unter Einfluss des Magnetfeldes eines Eisen-Bor-Neodym-Permanentmagneten 20 Minuten inkubiert. Dabei liegt die 6-Lochplatte auf einen gleichgroßen Kunststoffträger, mit dem sechs Magnete mittig unter der Platte angelegt werden. Bei den A549-Zellen erfolgt die Inkubation unter Anwendung eines rechteckigen Magneten, während bei den übrigen Zelllinien ein runder Magnet verwendet wird. Das Reportergen ist  $\beta$ -Galactosidase. Blaufärbung zeigt die infizierten Zellen an (links und rechts oben), die sich auf den Einflussbereich des Magnetfeldes beschränken. Der gleiche adenvirale Vektor AdLacZ ohne Eisenpartikel angewandt, führt zu makroskopisch nicht feststellbarer Infektion (links und rechts Mitte). Der untere Bereich der 6-Lochplatte (links und rechts) dient zur Kontrolle (enthält nur Zellen).

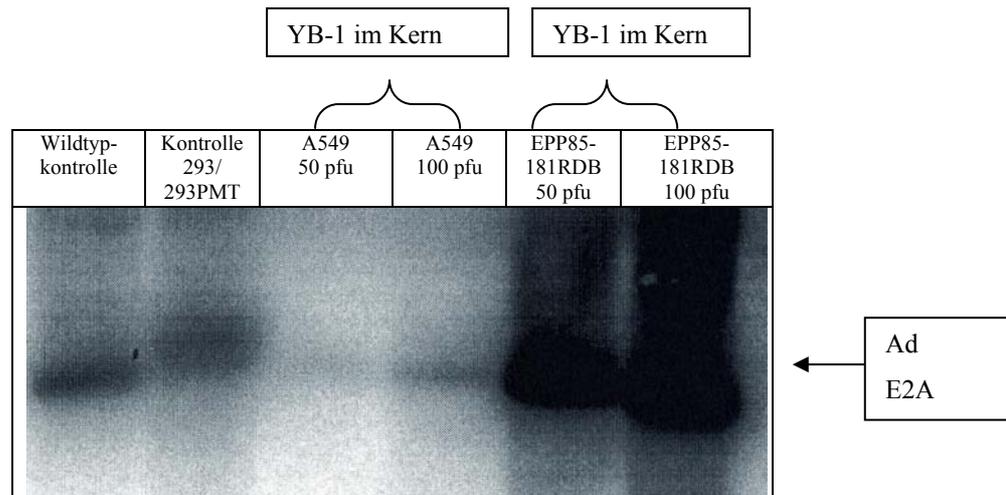
### 3.3.2 Southern-Blot-Analysen

Für das Einleiten bzw. die Durchführung der Replikation werden die Produkte der E2-Gene benötigt. Zunächst werden die E2-Gene über den E2F-abhängigen E2-early-Promotor aktiviert. Sobald YB-1 mit Hilfe des E1B-55kDa Proteins im Kern zur Verfügung steht erfolgt ein Umschalten zum E2-late-Promotor. E1A-deletierte Adenoviren können in vielfachresistenten Tumorzellen (enthalten häufig YB-1 im Kern) eine E1A-unabhängige Replikation durch Aktivierung des E2-late Promotors durchführen. Durch die Magnetofektion soll eine Erhöhung der Replikationsrate erreicht werden. Die Überprüfung der viralen Replikation erfolgt mit der Southern Blot Analyse. Damit lässt sich der Grad der Replikation abschätzen.

Die vielfachresistenten Tumorzellen EPP85-181RDB, RDB252 und die nicht resistenten A549-U2OS-Zellen werden unter Anwendung der Magnetofektion mit jeweils 50 und 100 pfu/Zelle des E1A-deletierten Adenovirus Ad312 infiziert. 3 Tage nach der Infektion wird die DNA mit dem Qiagen DNA Mini Kit (50) aus den Tumorzellen isoliert. Anschließend werden 2µg der viralen DNA mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII gespalten. Nach Auftrennung der Fragmente im 2%igen Agarose-Gel und Transfer auf eine Nylonmembran wird mit einer <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten cDNA Sonde für das adenovirale E2A-Gen hybridisiert. Mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und HindIII verdaute DNA des Wildtypvirus Ad5 und 293/293PMT werden als Kontrolle mitgeführt.

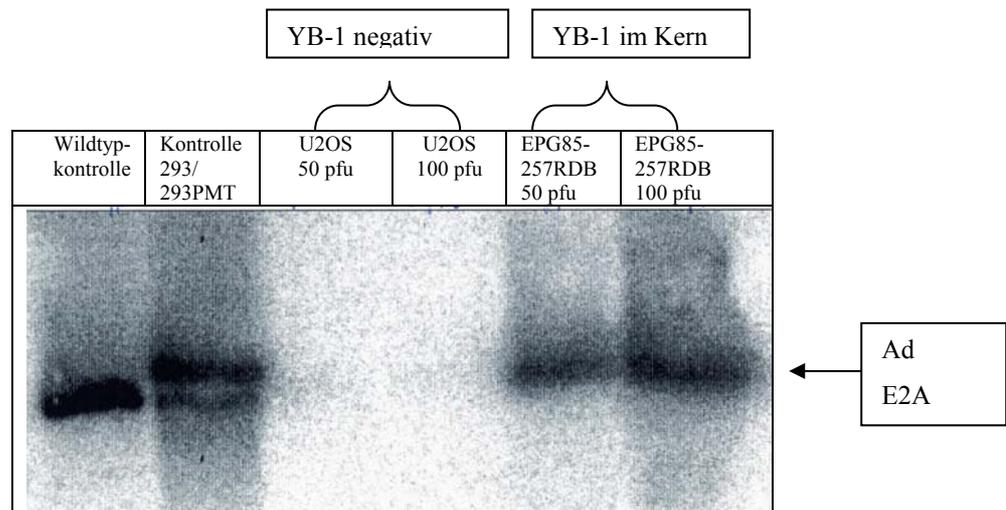


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Schnittstellen von HindIII und XhoI. Die Restriktionsenzyme schneiden an Basenposition 18318 und 26328 bzw. 24796 bp. Die E2A-cDNA Sonde bindet zwischen den Schnittstellen von 24796 bp und 18318 bp.



**Abbildung 8: Southern Blot-Hybridisierung**

Nach Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonde für das E2A-Gen können bei den Virus-DNA-Isolaten aus den A549-Zellen schwache Signale detektiert werden. Die Zelllinie A549 zeigt eine starke "Hintergrundreplikation". Die virale DNA aus den EPP85-181RDB-Zellen und den Kontrollen zeigen starke Signale.



**Abbildung 9: Southern Blot-Hybridisierung**

Nach Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markieren E2A-cDNA-Sonde sind bei den viralen DNA-Fragmenten aus den U2OS-Zellen keine Hybridisierungssignale zu detektieren. Starke Signale können bei der viralen DNA aus EPG85-257RDB und den Kontrollen festgestellt werden.

Bei den viralen DNA-Fragmenten aus den nicht resistenten U2OS-Zellen (YB-1 negativ) können nach Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten E2A-cDNA Sonde keine Signale detektiert werden; d. h. es hat keine Replikation stattgefunden. Ein schwaches Hybridisierungssignal ist bei den viralen DNA-Fragmenten aus den nicht resistenten A549-Zellen zu detektieren. A549-Zellen zeigen eine hohe "Hintergrundreplikation". Starke Signale können bei den viralen DNA-Fragmenten aus den vielfachresistenten EPP85-181RDB- und EPG85-257RDB-Zellen (YB-1 positiv) festgestellt werden.

EPP85-181RDB-Zellen sind durch die geringe Expression des adenoviralen CAR-Rezeptors normalerweise gegenüber einer adenoviralen Infektion relativ resistent. Durch die Anwendung der Magnetofektion kann eine Infektion der Zellen und adenovirale Replikation erreicht und somit eine E1A-unabhängige Replikation induziert werden.

### 3.3.3 Virusvermittelter cytopathogener Effekt (cpE)

Replikations-defiziente E1A-minus Adenoviren können in vielfachresistenten Tumorzellen eine Replikation, Partikelbildung und eine virale Tumorzelllyse durchführen. Mit Hilfe der Magnetofektion sollen gezielt infizierte Tumorzellen aufgelöst werden.

Die vielfachresistenten Zelllinien EPP85-181RDB und EPG85-257RDB werden mit und ohne Magnetofektion mit verschiedenen Konzentrationen des E1A-deletierten adenoviralen Vektors Ad312 infiziert. Bis zum Auftreten eines cytopathogenen Effekts (Abkuglung, Lyse der Zelle) werden die Zellen im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett-Lösung gefärbt. Nach wiederholtem waschen mit PBS erscheinen die gefärbten Zellen in violetter Farbe.

	20	30	50	100 pfu/Zelle
EPP85-181RDB	kein cpE	kein cpE	kein cpE	cpE nach 4 Tagen
EPG85-257RDB	cpE nach 4 Tagen	cpE nach 4 Tagen	cpE nach 3 Tagen	cpE nach 3 Tagen

Tabelle 1: Darstellung des cytopathogenen Effekts nach Infektion der vielfachresistenten Tumorzellen EPP85-181RDB und EPG85-257RDB mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen unter dem Einfluss der Magnetofektion.

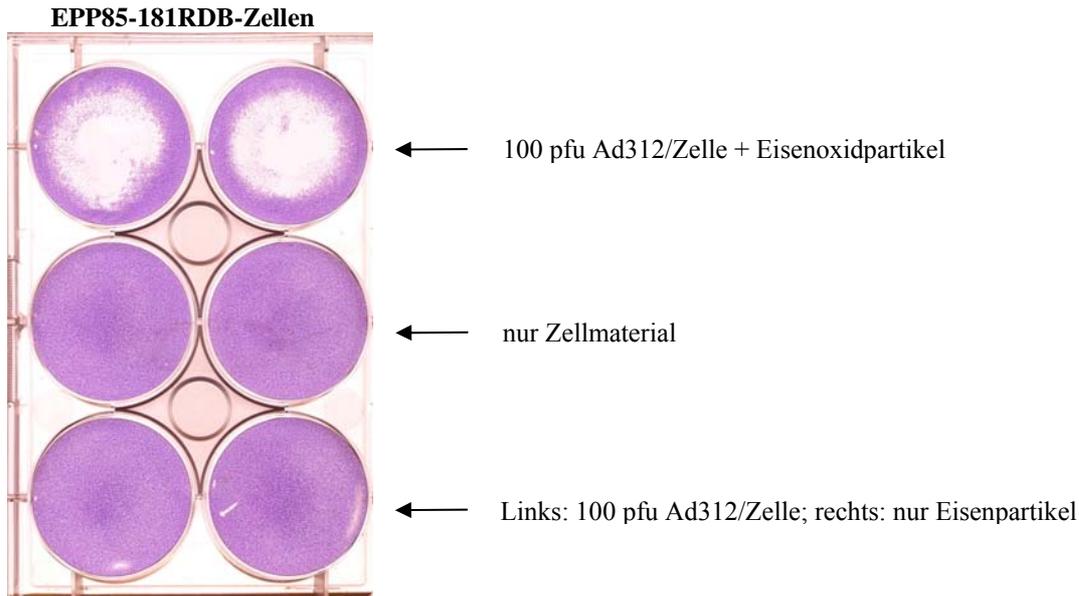


Abbildung 10: Nachweis von cpE in EPP85-181RDB-Zellen. EPP85-181RDB-Zellen werden mit 100 pfu Ad312/ Zelle unter Anwendung der Magnetofektion infiziert. Es wird ein runder Magnet verwendet. Nach 4 Tagen ist in der Mitte der Zellkulturplatte deutlich cpE sichtbar (links und rechts oben). Die mittleren Kavitäten (links und rechts) dienen der Kontrolle und enthalten nur Zellen. Zum Vergleich wird die Magnetofektion ohne Eisenpartikel (links unten) und ohne Virus (rechts unten) durchgeführt.



Abbildung 11: Nachweis von cpE in EPP85-181RDB- Zellen. EPP85-181RDB-Zellen werden mit 100 pfu Ad312/Zelle und Eisenoxidpartikel unter dem Einfluss eines rechteckigen Magneten infiziert. Nach 4 Tagen ist makroskopisch cpE im Zentrum der Plattenkavität sichtbar (links und rechts Mitte). In den beiden oberen Kavitäten sind nur Zellen vorhanden. Im unteren Bereich der 6-Lochplatte werden bei der Magnetofektion keine Eisenpartikel (links unten) und kein Virus(rechts unten) verwendet.

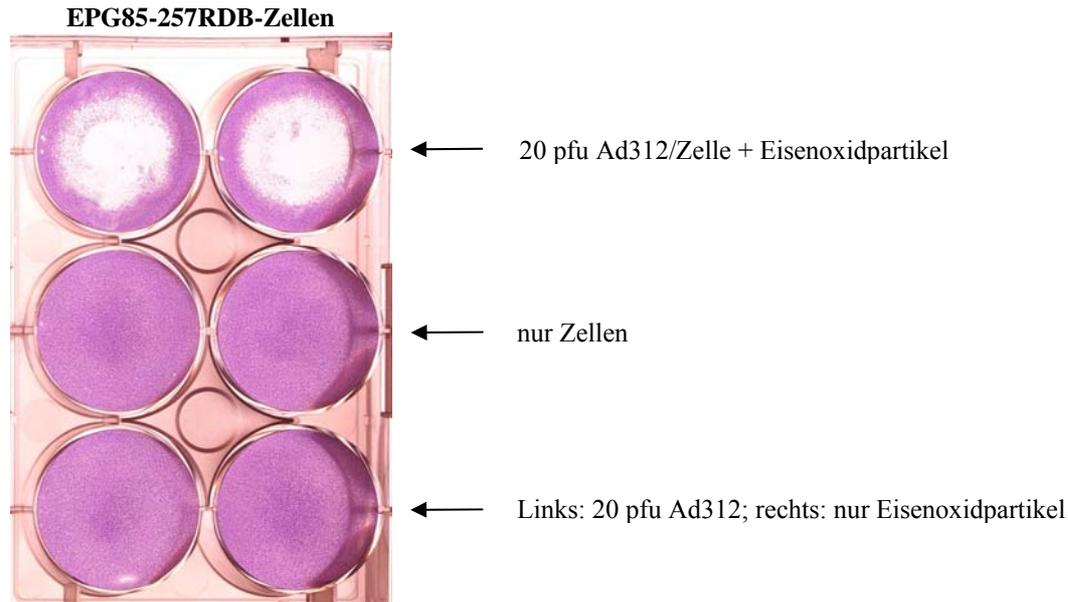


Abbildung 12: Nachweis von cpE in EPG85-257RDB-Zellen. EPG85-257RDB-Zellen werden mit 20 pfu-Ad312/Zelle infiziert. Die Infektion erfolgt mit Hilfe der Magnetofektion unter dem Einfluss eines runden Magneten. Bereits 4 Tage nach der Infektion ist cpE feststellbar (links und rechts oben). Zur Kontrolle wird in der Mitte (links und rechts) die Magnetofektion ohne Magnetpartikel und ohne Virus angewendet. Unten links werden keine Eisenpartikel und unten rechts kein Virus bei der Magnetofektion eingesetzt.

Die EPG85-257RDB-Zellen zeigen bereits bei einer Infektionsdosis von 20 pfu/Zelle einen deutlichen cytopathogenen Effekt 4 Tage nach der Infektion. Bei den EPP85-181RDB-Zellen wird erst bei einer Viruskonzentration von 100 pfu/Zelle nach 4 Tagen cpE sichtbar. Die infizierten Zellen zeigen eine abgerundete Form und beginnen ihre Adhärenz zu verlieren.

Zugleich werden die vielfachresistenten Zelllinien EPP85-181RDB und EPG85-257RDB ohne Magnetofektion mit den selben Virusdosierungen infiziert, anschließend inkubiert und nach 4 Tagen mit Kristallviolett-Lösung gefärbt.

	20	30	50	100 pfu/Zelle
EPP85-181RDB	kein cpE	kein cpE	kein cpE	kein cpE
EPG85-257RDB	kein cpE	kein cpE	kein cpE	kein cpE

Tabelle 2: Darstellung des cytopathogener Effekts 4 Tage nach Infektion der vielfachresistenten EPP85-181RDB-und EPG85-257RDB-Zellen mit verschiedenen Viruskonzentrationen ohne Verwendung der Magnetofektion.

Weder die EPP85-181RDB noch die EPG85-257RDB-Zellen weisen nach 4 Tagen einen adenoviralen cpE auf. EPP85-181RDB-Zellen sind resistent gegenüber einer normalen adenoviralen Infektion. Hier kann gezeigt werden, dass diese Zelllinie mit Hilfe der Magnetofektion sehr gut infizierbar ist.

Zum Vergleich werden die nicht resistenten Zelllinien A549 und U2OS jeweils mit einer Virusdosis von 50 und 100 pfu/Zelle infiziert. Die Versuche werden mit und ohne der Magnetofektion durchgeführt.

	50	100 pfu/Zelle
A549	kein cpE	kein cpE
U2OS	kein cpE	kein cpE

Tabelle 3: Dargestellt wird der cytopathogene Effekt nach Infektion der resistenten Zelllinien A549 und U2OS mit und ohne Anwendung der Magnetofektion. Es werden Viruskonzentration von 50 und 100 pfu/Zelle verwendet.

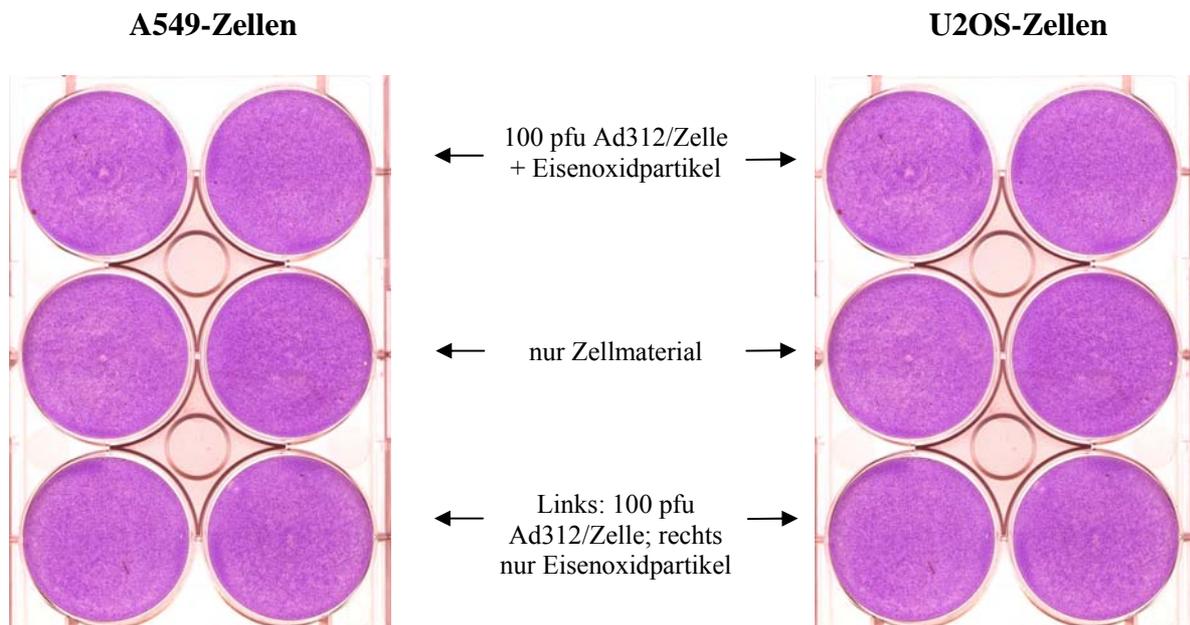


Abbildung 13: Kein Nachweis von cpE in A549- und U2OS-Zellen. A549- und U2OS-Zellen werden unter Anwendung der Magnetofektion mit 100 pfu Ad312/Zelle infiziert (links und rechts oben). Die Zellen zeigen makroskopisch eine gleichmäßige, intensiv violette Färbung; cpE ist nicht sichtbar. In der Mitte der Platte (links und rechts) wird die Magnetofektion ohne Virus und ohne Eisenpartikel durchgeführt; die Kavität unten links enthält nur Virus und unten rechts nur Eisenpartikeln.

Bei den nicht resistenten A549 und U2OS-Zellen ist weder mit noch ohne Magnetofektion ein cpE feststellbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass der E1A-deletierte adenovirale Vektor Ad312 unter Anwendung der Magnetofektion in den vielfachresistenten Tumorzellen im Einflussgebiet des Magneten, einen cytopathogenen Effekt induziert. Im Gegensatz dazu entwickeln die nicht resistenten Tumorzellen, die mit Ad312 infiziert wurden kein Zeichen eines adenoviralen cytopathogenen Effekts.

### 3.3.4 Auswertung des Plaque Assay

In folgenden Versuchen soll die Effektivität der Magnetofektion auf die adenovirale Replikation und die Partikelzahlbildung mit dem Plaque Assay untersucht werden.

EPP85-181RDB-, EPG85-257RDB-, A549- und U2OS-Zellen werden unter Anwendung der Magnetofektion mit 50 pfu des E1A-deletierten Adenovirus Ad312 infiziert. Nach 4-tägiger Inkubation wird das Virus aus den infizierten Zellen im Innen- (Wirkungsbereich des Magnetfeldes) und Außenbereich der 6-Loch-Platten-Kavität, getrennt voneinander isoliert.

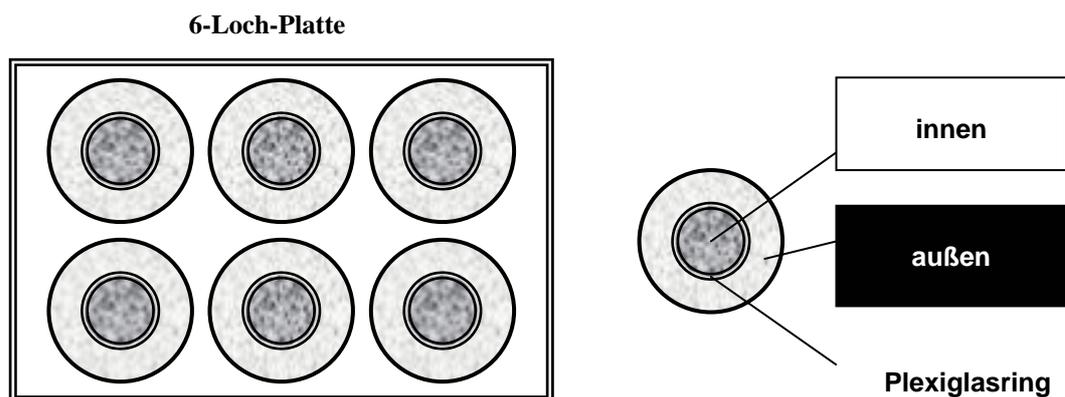


Abbildung 14: Wirkungsbereich des Magnetfeldes in der Zellkulturschale. Das Virus Ad312 wird nach 4-tägiger Inkubation aus den Kavitäten der 6-Loch-Gewebekulturplatte isoliert. Die Isolierung erfolgt getrennt voneinander aus der Mitte und dem Randbereich der Kavität; d. h. aus dem Einflussbereich des Magnetfeldes und aus dem Bereich ohne Magnetfeldeinwirkung.

Aus den Virusisolaten werden logarithmische Verdünnungsreihen angelegt und 293-Zellen damit infiziert. Nach 10-tägiger Inkubation der infizierten 293-Zellen werden die Plaques ausgezählt und der Virustiter errechnet.

Virusisolat		Virustiter
A549	innen	$10^4$
	außen	$10^4$
U2OS	innen	$6 \times 10^1$
	außen	$6 \times 10^1$
EPG85-257RDB	innen	$10^6$
	außen	$6 \times 10^4$
EPP85-181RDB	innen	$10^6$
	außen	$6 \times 10^4$

Tabelle 4: Durchschnittliche Virustiter von 2 unabhängigen Versuchsreihen  
293-Zellen werden mit Verdünnungen der Virusisolate infiziert. Nach 10 Tagen werden die Plaques ausgezählt und der Virustiter wird berechnet. Aus 2 unabhängigen Versuchsreihen wird der durchschnittliche Virustiter gebildet.

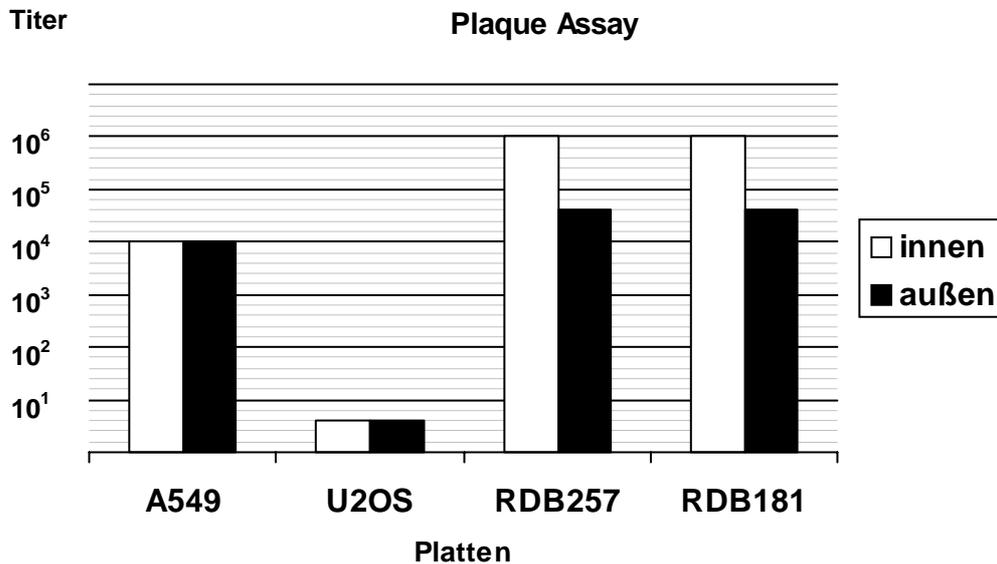


Abbildung 15: Virustiter nach Produktion auf 293-Zellen. Schematisch dargestellt sind die Titer der Virusisolate aus resistenten und nicht resistenten Tumorzellen nach einer Inkubation auf 293-Zellen. Die Viren wurden separat aus dem Innen- und Außenbereich der infizierten Zellenkulturen isoliert, um die Effektivität der Magnetofektion auf die Replikation und Viruspartikelbildung von Ad312 in vielfachresistenten Tumorzellen zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der adenovirale Vektor Ad312 in den vielfachresistenten Tumorzelllinien EPG85-257RDB und EPP85-181RDB im Einflussgebiet des Magnetfeldes zu einem fast 20-fach höheren Titer repliziert als außerhalb des Magnetfeldes. Damit kann gezeigt werden, dass durch die Magnetofektion die Infektionsrate deutlich steigt und dadurch auch die Replikation bzw. die Partikelbildung in den vielfachresistenten Tumorzellen erhöht werden kann.

Im Gegensatz dazu kann in den resistenten A549- und U2OS-Zellen keine Erhöhung der viralen Replikation durch die Magnetofektion festgestellt werden; Ad312 repliziert in den nicht resistenten Zellen mit Hilfe der Magnetofektion innerhalb und außerhalb des Magnetfeldes zu praktisch identischen Titern. Die Zelllinie A549 zeigt eine hohe "Hintergrundreplikation". Untersuchungen zur YB-1 Lokalisation wären angezeigt.

## 4 DISKUSSION

Die Behandlung von Tumorerkrankungen hat bisher noch nicht zu dem gewünschten Erfolg geführt. Dabei stellen besonders gegen Zytostatika vielfachresistente Tumorzellen ein großes Problem bei der Chemotherapie dar. Auch die bisher in klinischen Studien eingesetzten Stoffe, die als Inhibitoren der multidrug resistance bekannt sind und die Sensitivität von chemoresistenten Zellen steigern (Bradley et al., 1988; Shustik et al., 1995) konnten bisher die Erwartungen nicht erfüllen. Hinzu kommen noch die wenigen Gentherapieversuche, die auf Grund der geringen Transfereffizienz in vivo nicht zu einem Durchbruch in der Krebsbehandlung geführt haben. Onkolytische Adenoviren stellen eine neue Therapieplattform in der Krebsbehandlung dar. Die Entdeckung, dass adenovirale Vektoren in vielfachresistenten Tumorzellen eine sehr effiziente Replikation durchführen eröffnet neue Perspektiven in der Behandlung von vielfachresistenten Tumorzellen. Insbesondere der in vorausgegangenen Studien beobachtete synergistische Effekt der adenoviralen Onkolyse in Verbindung mit der Chemotherapie zeigen in präklinischen Mausmodellen sehr positive Daten (Li et al., 2001; Yu et al., 2001).

Jedoch besteht weiterhin das Problem genügend Tumorzellen in vivo zu infizieren. Ein Grund besteht darin, dass viele Tumore den so genannten adenoviralen Rezeptor CAR nicht exprimieren (Lee et al., 2003; Fueyo et al., 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, dass eine Erhöhung der replikativen und onkolytischen Eigenschaften von E1A-deletierten Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen mit Hilfe der Magnetofektion erreicht werden kann. Durch die Bindung von adenoviralen Vektoren an nanokristalline Eisenoxidpartikel können unter Einfluss eines Magnetfeldes zielgerichtet bestimmte Tumorzellen infiziert werden; dieses Verfahren wurde in der Zellkultur an vielfachresistenten und nicht resistenten Tumorzellen angewandt. Um untersuchen zu können, ob überhaupt und wo eine Infektion stattfindet, kam das Reporterogen LacZ zum Einsatz. Dies ermöglicht den Nachweis der viralen Infektion via x-Gal Färbung. Um den Grad der adenoviralen Replikation abschätzen zu können wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Dazu wurde eine radioaktiv markierte cDNA-Sonde für den Nachweis des adenoviralen E2A-Gens hergestellt. Anschließend wurde die Tumorzelllyse anhand des Virus-assoziierten cythopathogenen Effektes dargestellt. Weiterhin wurde mit dem Plaque Assay der Einfluss des Magnetfeldes auf die adenovirale Replikation und die Partikelbildung untersucht.

#### 4.1 Diskussion der Magnetofektion

Es konnte unter Beweis gestellt werden, dass unter Anwendung der Magnetofektion eine gezielte adenovirale Infektion von Tumorzellen erreicht werden kann; d. h. es werden nur die Zellen im Einflussgebiet des Magneten infiziert. Für die Etablierung der Magnetofektion wurden verschiedene Virus- und Magnetpartikeldosierungen und unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt. Dabei wurde auf Vergleichsdaten in der Literatur zurückgegriffen (Scherer et al., 2002). Bereits eine Viruskonzentration von 50 pfu/Zelle des adenoviralen Vektors Ad-LacZ führte zu einem hohen Anstieg der Reportergeringprodukte in den infizierten Zellen; dies zeigte sich an der intensiven x-Gal Färbung der Zellen. Um ein optimales Infektionsergebnis zu erzielen, war im Gegensatz zu publizierten Daten von Scherer et al. (2002), die in ihren Studien eine Magnetpartikelkonzentration von  $3 \mu\text{g}/3 \times 10^5$  Zellen einsetzten eine weitaus höhere Dosis von  $6 \mu\text{g}/4 \times 10^5$  Zellen notwendig. Möglicherweise variieren die Eisenoxidpartikel, die speziell für die Magnetofektion entwickelt werden und für die es noch keine standardisierten Herstellungsverfahren gibt, in den einzelnen Chargen. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten der infizierten Zellen unter der Einwirkung des Magneten zeigten ein gleich gutes Infektionsergebnis; d. h. mit Hilfe der Magnetofektion kann die Inkubationszeit von normalerweise 2 bis 4 Stunden auf 20 Minuten verkürzt werden.

Die Transduktionseffizienz von adenoviralen Vektoren ist stark abhängig davon, ob die Zielzellen den adenoviralen CAR-Rezeptor exprimieren. Viele Tumorzellen exprimieren nur wenig oder kein CAR (Dmitriev et al., 1998). Deshalb wurde die Wirkung der Magnetofektion auch an Zellen getestet, die vermutlich kein CAR produzieren (EPP85-181RDB-Zellen; Holm, persönliche Mitteilung). Die Zelllinie EPP85-181RDB ist im Gegensatz zu den anderen verwendeten Zellen gegenüber einer adenoviralen Infektion resistent; d. h. es ist nur eine Infektion bei höheren Virusdosen und einer längeren Inkubationszeit möglich. In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter Einwirkung eines Magnetfeldes eine CAR unabhängige Infektion möglich ist.

Der Einsatz der Magnetofektion eröffnet neue Perspektiven für eine gezielte lokoregionäre Tumorthherapie. Für die Anwendung in der Zellkultur bietet die Magnetofektion 3 wichtige Vorteile: (1) Die Vektordosis kann erheblich reduziert werden; (2) die Inkubationszeit verringert sich; und (3) der Wirtszelltropismus kann deutlich erhöht werden.

Aufgrund der sehr guten Ergebnisse in der Zellkultur ist die Magnetofektion eine viel versprechende Methode für die Therapie von Tumorerkrankungen. In Tiermodellversuchen

konnten bereits positive Ergebnisse verzeichnet werden (Scherer et al., 2002): Unter der Einwirkung eines Magnetfeldes wurde die an Eisenoxidpartikel gebundene DNA in die Ohrvene von Schweinen injiziert und führte dort zu einer lokalen Genexpression.

Wada et al. (2003) zeigten, dass es durch lokale Injektion von Magnetpartikeln in Zungenkarzinomen von Hamstern unter Einwirkung eines Magnetfeldes, wodurch eine Hyperthermie erzeugt wird, das Tumorstadium gehemmt wird (Wada et al., 2003).

Studien über die Stärke des Magnetfeldes in Bezug auf die Magnetofektion und somit die Charakterisierung des Wirkungsbereiches der Magnete in vivo liegen noch nicht vor.

Eine Optimierung der Parameter könnte durch den Einsatz stärkerer Magnete wie z. B. Elektromagnete erreicht werden.

## 4.2 Diskussion der Nachweisverfahren

Für alle Versuche wurden die vielfachresistenten Tumorzellen EPP85-181RDB und EPG85-257RDB, in denen der humane Transkriptionsfaktor YB-1 im Kern lokalisiert ist, verwendet. Als Kontrolle dienten die nicht resistenten Tumorzellen A549 (enthalten YB-1 im Kern) und U2OS (YB-1 negativ). Die Infektion der Zellen erfolgte mit dem E1A-deletierten adenoviralen Vektor Ad312 unter Einsatz der Magnetofektion.

Mit der Southern-Blot-Analyse sollte die virale Replikation untersucht werden. Dazu wurde 3 Tage nach der Infektion die virale DNA isoliert und mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII gespalten. Nach Auftrennung der Fragmente im Agarose-Gel und Transfer auf eine Nylonmembran wurde mit einer  $^{32}\text{P}$ -radioaktiv markierten cDNA-Sonde für das adenovirale E2A-Gen hybridisiert. In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass E1A-deletierte Adenoviren in den vielfachresistenten Tumorzellen nahezu gleichstark replizieren wie das Wildtyp-Adenovirus. Bereits bei einer geringen Virusdosis von 50 pfu/Zelle konnten in der Southern Blot-Hybridisierung bei den adenoviralen DNA-Fragmenten aus den vielfachresistenten EPP85-181RDB- und EPG85-257RDB-Zellen starke Signale detektiert werden; im Gegensatz dazu konnten bei den nicht resistenten U2OS-Zellen keine Hybridisierungssignale festgestellt werden; die nicht resistenten A549-Zellen zeigten schwache Signale. Die Auswahl der A549-Zellen für die Southern-Blot-Analyse erwies sich nicht als sehr günstig, da diese Zelllinie eine extrem hohe "Hintergrundreplikation" zeigte. Immunologische Untersuchungen wären angezeigt, um somit die Lokalisation von YB-1 zu bestimmen.

Mit Hilfe der Southern-Blot-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass E1A-deletierte Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen, die YB-1 im Kern enthalten, eine E1A-unabhängige Replikation durchführen können. Die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktor YB-1 ist für die Replikation der Adenoviren in diesen Zellen offensichtlich verantwortlich. YB-1 übernimmt die Funktion der E1A-Region durch Aktivierung des E2-late-Promotors (Holm et al., 2002; 2004). Bei einer Vielzahl von vielfachresistenten Tumoren, wie z. B. Brustkrebs (Bargou et., al 1997), Osteosarkom (Oda et., al 1998) und Kolonkarzinomen (Shi-bao et., al 1999) zeigt sich eine Lokalisation von YB-1 im Kern. Für die Therapie dieser Tumore könnten replikationsdefiziente adenovirale Vektoren in Zukunft zum Einsatz kommen. Anhand des Auftretens eines cytopathogenen Effektes sollte die virusvermittelte Tumorlyse nachgewiesen werden. Zur makroskopischen Darstellung wurden die infizierten Zellen mit Kristallviolett-Stammlösung angefärbt. Um den Einfluss des Magnetfeldes zu untersuchen wurden die Versuche mit und ohne Magnetofektion durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigten, dass Replikations-defiziente E1A-minus Adenoviren unter Anwendung der Magnetofektion in vielfachresistenten Tumorzellen im Einflussgebiet des Magnetfeldes eine gezielte Tumorlyse durchführen können.

Die vielfachresistenten EPG85-257RDB-Zellen zeigten unter der Magnetofektion bereits bei einer sehr geringen Virusdosis von 20 pfu/Zelle 4 Tage nach der Infektion einen cytopathogenen Effekt; bei den EPP85-181RDB-Zellen wurde erst ab einer Virusdosis von 100 pfu/Zelle cpE sichtbar. EPP85-181RDB-Zellen sind normalerweise resistent gegenüber einer normalen adenoviralen Infektion; d. h. eine Infektion ist erst möglich nach einem mehrstündigen Kontakt zwischen Virus und den zu infizierenden Zellen und entsprechend hohe Viruskonzentrationen sind notwendig. In den Versuchen wurden die EPP85-181RDB-Zellen nach Anwendung der Magnetofektion mit einer Virusverdünnung von 2ml (250 µl Virus-Partikelmixverdünnung und 1,75 ml Medium) für nur 20 Minuten inkubiert. Damit konnte gezeigt werden, dass durch das Magnetfeld eine adenovirale Replikation in den EPP85-181RDB-Zellen möglich ist.

Ohne Magnetofektion konnte 4 Tage nach Infektion der vielfachresistenten Tumorzellen kein cpE festgestellt werden. Wie erwartet, war auch bei den nicht resistenten Zellen, auch mit der Magnetofektion, kein cpE sichtbar. Dies bedeutet, dass E1A-deletierte adenovirale Vektoren in der Lage sind vielfachresistente Tumorzellen selektiv zu eliminieren.

Um die Effektivität der Magnetofektion auf die adenovirale Replikation und Partikelbildung von E1A-deletierten Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein Plaque Assay durchgeführt. Dazu wurden die verwendeten vielfachresistenten und zur

Kontrolle die nicht resistenten Tumorzellen unter Anwendung der Magnetofektion infiziert und das Virus aus dem Einflussgebiet und außerhalb des Magnetfeldes getrennt isoliert. Zur Titerbestimmung wurden logarithmische Verdünnungsreihen des isolierten Virus hergestellt und 293-Zellen, die eine E1A-unabhängige Replikation ermöglichen, damit infiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Wirkungsbereich des Magnetfeldes die Replikationsrate in den vielfachresistenten Tumorzellen deutlich erhöht werden konnte. E1A-defiziente Adenoviren replizierten in den vielfachresistenten Tumorzellen im Einflussgebiet des Magnetfeldes zu einem fast 20-fach höheren Titer als außerhalb des Magnetfeldes. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht resistenten Tumorzellen praktisch identische Titer; die Magnetofektion brachte keine Verbesserung der viralen Replikation. Bei den nicht resistenten A549-Zellen war insgesamt ein verhältnismäßig hoher Virustiter zu erkennen, da diese Zelllinie eine extrem hohe "Hintergrundreplikation" aufweist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmals, dass E1A-deletierte Adenoviren unter Anwendung der Magnetofektion selektiv infizieren und in vielfachresistenten Tumorzellen eine sehr effiziente Replikation mit darauf folgender zielgerichteter Tumorlyse durchführen können.

### **4.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die in den letzten Jahren entwickelte Virustherapie ist eine neue und erfolgversprechende Therapiestrategie zur Bekämpfung von malignen Erkrankungen. So zeigt der bereits in klinischer Phase III befindliche adenovirale Vektor ONYX-015 (E1B-deletiert) vielversprechende Ergebnisse. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse stellt ein effizienter adenoviraler Gentransfer einen limitierenden Faktor dar, welcher noch verbessert werden muss. Hindernisse dabei sind die niedrige Transfektionseffizienz und die Unfähigkeit, gezielt Targetzellen zu infizieren. Um das "Targeting" zu verbessern, ist es notwendig, neue Ansätze bzw. Strategien zu entwickeln. Dazu werden vor allem genetische (Austausch der adenoviralen Fiberproteine gegen Proteine anderer Serotypen, bzw. Zugabe von Fremdproteinen in die Fiber-Knob-Domäne) und konjugierte basierende (z. B. biospezifische Fusionsproteine werden an einen Liganten gebunden) Strategien verfolgt, um auch Zielzellen zu erreichen, die den adenoviralen CAR-Rezeptor nicht oder nur in geringen Mengen exprimieren. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch Modifizierung der adenoviralen Fiberproteine der adenovirale

Tropismus und somit der Gentransfer auch in Tumorzellen deutlich gesteigert werden kann (Koizumi et al., 2003).

Möglicherweise bietet sich auch ein Weg durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Magnetofektion diese Barrieren zu überwinden. Die Verknüpfung der Technologie der Magnetofektion mit dem Einsatz von Replikations-spezifischen adenoviralen Vektoren stellt einen bisher noch nicht verfolgten Forschungsansatz in der Tumorthherapie dar und könnte neue Perspektiven in der Behandlung von bösartigen Tumoren eröffnen. Es konnte in Studien bereits ein lokaler Gentransfer unter Anwendung der Magnetofektion an Ohrgefäßen von Schweinen erfolgreich durchgeführt werden (Scherer et al., 2002).

Bevor jedoch diese Form der Genthherapie als Behandlung von malignen Tumorerkrankungen klinische Anwendung finden kann, ist in Zukunft neben der Entwicklung von verbesserten Vektoren eine Überprüfung des hier vorgestellten Versuchskonzeptes auf Effektivität zuerst im Tiermodell notwendig. Untersuchungen in einem Mausmodell mit einem verbesserten adenoviralen Vektor in Kombination mit der Magnetofektion werden zurzeit durchgeführt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### **Untersuchungen zum Transfer von E1A-deletierten Adenoviren in vielfachresistenten Tumorzellen durch Magnetofektion**

Besonders Zytostatika-vielfachresistente Tumorzellen stellen bei der Chemotherapie ein großes Problem dar. Mit der Entwicklung der Gentherapie ergibt sich eine neue erfolgversprechende Perspektive für die Bekämpfung von malignen Tumorerkrankungen. Sehr viel versprechend ist die Entdeckung von E1A-deletierten Adenoviren, die in vielfachresistenten Tumorzellen, welche häufig den humanen Transkriptionsfaktor YB-1 im Kern enthalten, eine E1A-unabhängige adenovirale Replikation und virale Tumorzelllyse durchführen können. In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Einsatz einer in der Gentherapie erst neuen Technologie - der Magnetofektion - eine gezielte lokoregionäre Applikation dieser onkolytischen adenoviralen Vektoren in die vielfachresistenten Tumorzellen erreicht werden. Bei der Magnetofektion werden die adenoviralen Vektoren durch elektrostatische Wechselwirkungen an nanokristalline Eisenoxidpartikel gebunden und mit Hilfe eines externen magnetischen Feldes in den Zielzellen angereichert. Die Studien wurden in der Zellkultur an vielfachresistenten und nicht resistenten Tumorzellen durchgeführt.

Zur Feststellung der zielgerichteten adenoviralen Infektion wurde das Reportergen LacZ eingesetzt; mit Hilfe der x-Gal Färbung konnte durch Blaufärbung der infizierten Zellen nachgewiesen werden, dass im Einflussgebiet des Magnetfeldes eine effiziente Infektion stattgefunden hat, sowohl in CAR-positiven wie auch in CAR-negativen vielfachresistenten Tumorzellen.

Um den Grad der adenoviralen Replikation abschätzen zu können, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass E1A-deletierte adenovirale Vektoren in den vielfachresistenten Tumorzellen eine sehr effiziente E1A-unabhängige Replikation durchführen können.

Weiterhin konnte der Nachweis der adenoviralen Replikation und der darauf folgenden Tumorzelllyse anhand des Virus-assoziierten cytopathogenen Effektes in den vielfachresistenten Tumorzellen mit der Kristallviolett-Färbung erbracht werden.

Die adenovirale Replikation und Partikelzahlbildung in vielfachresistenten Tumorzellen konnte anhand eines Plaque-Assay bestimmt werden. Dazu wurden E1A-deletierte Adenoviren nach Infektion von resistenten und nicht resistenten Tumorzellen getrennt aus dem Einflussbereich und außerhalb des Einflussbereiches des Magnetfeldes isoliert. Es zeigte sich,

dass die adenovirale Replikation/Partikelbildung im Wirkungsbereich des Magneten deutlich erhöht war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Magnetofektion eine zielgerichtete adenovirale Infektion und eine Erhöhung der Transfereffizienz im Wirkungsbereich des Magnetfeldes erreicht werden kann. Somit können E1A-deletierte Adenoviren im Einflussgebiet des Magneten vielfachresistente Tumorzellen, die YB-1 im Kern enthalten sehr effizient infizieren und eine gezielte Tumorzelllyse durchführen.

## 6 SUMMARY

### **Studies about transfer of E1A-deleted adenoviruses in multidrug resistant tumour cells by magnetofection**

Especially multidrug resistant cancer cells represent a major problem for effective cancer chemotherapy. The development of gene therapy is a new promising perspective for the fight against malignant tumour diseases.

Very promising is the discovery of E1A-defective adenovirus vectors, which perform an E1A-independent replication and viral cancer cell lysis in multidrug resistant cancer cells, in which YB-1 is predominantly localized in the nucleus. The present study indicates, that magnetofection - a new technology in gene therapy- offers new perspectives for target local application of oncolytic adenoviral vectors in multidrug resistant tumour cells. With magnetofection adenoviral vectors are bound to ferric oxid nanoparticles by electrostatic interactions and an external magnetic field concentrates them in the target cells.

The studies were carried out in tissue culture on multidrug resistant and drug sensitive cells. In order to investigate the target adenoviral infection the reporter gene LacZ was used. Efficient viral infection of CAR-positiv and CAR-negativ multidrug resistant tumour cells in the magnetic field could be demonstrated through the blue colour of the infected cells by means of x-gal staining.

Southern blot analysis as performed in order to estimate the adenoviral replication efficiency. The results show that E1A-deficient adenoviral vectors effectively replicated E1A independently in multidrug resistant cancer cells.

Further more the adenoviral replication and host cell lysis could be identified causing an adenovirus mediated cythopathic effect in multidrug resistant tumour cells through crystal violet staining.

Adenoviral replication and infectious virus particle formation in multidrug resistant cancer cells was determined by plaque assay; therefore the E1A-defective adenovirus were separatley isolated from inside and outside of the magnetic field after infection of multidrug resistant and chemosensitive cancer cells. The data demonstrated that adenoviral replication and the amount of infectious virus progeny particles is clearly increased in the influence of the magnetic field.

The results of the studies show that by using magnetofection a target local adenoviral infection and an increase of the transfer efficiency can be reached in the magnetic field. Therefore

in the magnetic field E1A-defective adenoviruses can effectively infect multidrug resistant cancer cells, which contain YB-1 in the nucleus and eliminate these target cells.

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Alexiou C., Arnold W., Klein R. J., Parak F. G., Hulin P., Bergemann C., Erhardt W., Wagenpfeil S., Lubbe A. S. (2000). Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res.* 60, 6641-6648.
2. Amalfitano, A., Begy, C. R., Chamberlain, J. S. (1996). Improved adenovirus packing cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3352-3356.
3. Anderson, W. F. (1992). Human gene therapy. *Science* 256, 808-813.
4. Ansari, S. A., Safak, M., Gallia, G. L., Sawaya, B. E., Amini, S., and Khalili, K. (1999). Interaction of YB-1 with the human immunodeficiency virus type 1 Tat and TAR RNA modulates viral promoter activity. *J. Gen. Virol.* 80, 2629-2638.
5. Argyle, D. J. (1999). Gene therapy in veterinary medicine. *Vet. Rec.* 144, 369-376.
6. Avery, O. T., MacLeod C. M., McCarty, M. (1995). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. 1944. *Mol. Med.* 1, 344-65.
7. Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., Darnell, J. E. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2552-2558.
8. Bargou, R. C., Jürchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dörken, B., Royer, H. D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancer are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature Med.* 3, 447-450.
9. Berk, A. J., Lee, F., Harrison, T., Williams, J., Sharp, P. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 17, 935-944.
10. Berns, K. L., Giraud, C. (1995). Adenovirus and adeno-associated virus as vectors for gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772, 95-104.
11. Holm, P. S., Lage, H., Bergmann, S., Jürchott, K., Glockzin, G., Berenshausen, A., Mantwill, K., Ladhoff, A., Wichert, A., Mymryk, J. S., Ritter, T., Dietel, M., Gänsbacher, B., Royer, H. D. (2004). Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1A-independent adenoviral replication: Impact for cancer gene Therapy. *Cancer Research* 64, 322-328.
12. Boulanger, P. A., Blair, G. E. (1991). Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem. J.* 275, 281-299.
13. Braithwaite, A. W., Russell, I. A. (2001). Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis* 6, 359-370.

14. Bridge, E., Ketner, G. (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1B products in late gene expression. *J. Virology* 174, 345-353.
15. Brough, D. E., Lizonova, A., Hsu, C., kulesa, V. A., Kovesdi, I. (1996). *J. Virol.*, 70, 6497-6501.
16. Buscher, U., Brill, T., Erhardt, W., Hirschberger, J. (1999). Gentherapie in der Kleintiermedizin. *Tierärztl. Prax.* 27, 288-290.
17. Challberg, M. D., Desiderio, S. V., Kelly, T. J., Jr. (1980). Adenovirus DNA replication in vitro: characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5105-5109.
18. Challberg, M. D., Ostrove, J. M., Kelly, T. J., Jr. (1982). Initiation of adenovirus DNA replication: detection of covalent complexes between nucleotide and the 80-kilodalton terminal protein. *J. Virol.* 41, 265-270.
19. Chen, C. Y., Gherzi, R., Anderson, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., Karin, M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes and Dev.* 15, 1236-1248.
20. Chroboczek, J., Ruigrok, R. W. H., Cusack, S. (1995). Adenovirus fiber. In *The Molecular Repertoire of Adenoviruses*, pp. 163-200. Edited by W. Doerfler & P. Bohm. Berlin: Springer.
21. Dietel, M. (1991). What's new in cytostatic drug resistance and pathology. *Path. Res. Pract.* 187, 892-905.
22. Dietel, M., Arps, H., Lage, H., Niendorf, A. (1990). Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257. *Cancer Res.* 50, 6100-6106.
23. Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C. R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., Curiel, D. T. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J. Virol.* 72, 9706-9713.
24. Dyer, M. R., Herrling, P. L. (2000). Progress and potential for gene-based medicines. *Mol. Ther.* 1, 213-224.
25. Eck, S. L., Wilson, J. (1996). Gene-based therapy. In: Goodman Gilman, A., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics*. 9. Aufl., McGraw-Hill, Inc., New York, 77-101.
26. Engelhardt, J. F., Ye, X., Doranx, B., Wilson, J. M. (1994). Ablation of E2a in recombinant adenovirus improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6196-6200.

27. Evans, A. S. (1958). Latent adenovirus infections of the human respiratory tract. *Am. J. Hyg.* 67, 256-266.
28. Faber, M., and Sealy, L. (1990). Rous sarcoma virus enhancer factor I is a ubiquitous CCAAT transcription factor highly related to CBF and NF-Y. *J. Biol. Chem.* 265, 22243-22254.
29. Falgout, B., Ketner, G. (1987). Adenovirus early region 4 is required for efficient virus particle assembly. *J. Virol.* 61, 3759-3768.
30. Field, J., Gronostajski, R. M., Hurwitz, J. (1984). Properties of the adenovirus polymerase. *J. Biol. Chem.* 259, 9487-9495.
31. Florence, A. T., Halbert, G. W., (1985). Drug delivery and targeting. *Phys. Technol.* 16, 164-192.
32. Fox, J. P., Brandt, C. D., Wassermann, F. E. (1969). The virus watch program: A continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. V I. Observations of adenoviral infections: Virus excretion pattern, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infection and relation to illness. *Am. J. Epidemiol.* 89, 25-50.
33. Friedmann, T. (1997). Overcoming the obstacles to gene therapy. *Scientific American* 276, 79-85.
34. Fueyo, J., Alemany, R., Gomez-Manzano, C., Fuller, G. N., Khan, A., Conrad, C. A., Lui, T. J., Jiang, H., Lemoine, M. G., Suzuki, K., Sawaya, K., Curiel, D. T., Yung, W. K., Lang, F. F. (2003). Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastom pathway. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95, 652-660.
35. Ganly, I., Kim, Y. T., Hann, B., Balmain, A., and Brown, R. (2001). Replication and cytolysis of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant ovarian tumour cells is associated with reduced apoptosis. *Gene Therapy* 8, 369-375.
36. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., Royer, H. D. (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 27988-27996.
37. Garon, C. F., Berry, K. W., Rose, J. A. (1972). A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2391-95.
38. Gilgenkrantz, H., Duboc, D., Juillard, V. (1995). Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Human Gene Therapy* 6, 1265-1274.

39. Gorziglia, M. I., Lapcevich, C., Roy, S., Kang, Q., Kadan, M., Wu, V., Pechnan, P., Kaleko, M. (1999). Generation of an adenovirus vector lacking E1, E2a, E3 and all of E4 except open reading frame 3. *J. Virol.* 7, 6048-6055.
40. Gottesman, M. M., Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 385-427.
41. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
42. Graumann, S. (2000). Heilen mit Genen? *Gen-ethischer Informationsdienst* 141, 3-7.
43. Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* 15, 1766-1777.
44. Groskreutz, D., Schenborn, E. T. (1997). Reporter systems. *Methods Mol. Biol.* 63, 11-30.
45. Halbert, D. N., Cutt, J. R., Shenk, T. (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell Shut-off. *J. Virol.* 56, 250-257.
46. Handa, H., Kingston, R. E. Sharp, P. A. (1983). Inhibition of adenovirus early region IV transcription in vitro by a purified DNA binding protein. *Nature* 302, 545-547.
47. Hardy, S., Shenk, T. (1989). E2F from adenovirus- infected cells binds cooperatively to DNA containing two properly oriented and spaced recognition sites. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4495-4506.
48. Hardy, S., Engel, D., Shenk, T. (1989). An adenoviral early region 4 gene product is required for induction of the infection-specific form of cellular E2F activity. *Genes Dev.* 3, 1063-1074.
49. Hay, J. G., Shapiro, N., Sauthoff, H., Heitner, S., Phupakdi, W., Rom, W. N. (1999). Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: the importance of the adenoviral E1b-55kD gene. *Human Gene Therapy* 10, 579-590.
50. Hitt, M., Bett, A. J., Addison, C. L., Prevec, L., Graham, F. (1995). Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In: Adolph, K. W. (Ed.), *viral gene techniques*. Academic Press, San Diego, pp 13-30.
51. Holm, P. S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, h., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D. T., Dobbstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B., Royer, H. D. (2002). YB-1 relocated to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J. Biol. Chem.* 277,10427-10434.

52. Horwitz, M. S. (1990). Adenoviridae and their replication, adenoviruses. In: Field, B. N., Knipe, D. M., Virology. Raven Press, New York, 1679-1740.
53. Huang, M. M., Hearing, P. (1989). The adenovirus early region 4 open reading frame 6/7 protein regulates the DNA binding activity of cellular transcription factor, E2F, through a direct complex. *Genes Dev.* 3, 1699-1710.
54. Jones, N., Shenk, T. (1979). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 3665-3669.
55. Kelly, T. J. (1984). Adenovirus DNA replication. In: *The Adenoviruses*. Ginsberg, H. S. (ed.). New York: Plenum Press, 271-308.
56. Kingston, R. E. (1997). Introduction of DNA into mammalian cells. In Ausubel FM (Hrsg.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA, 9.6.5-9.6.11.
57. Köhler, S., Shimshon, B., Schmid, R. D. (2000). Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 769-779.
58. Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., Kuwano, M. (1997). Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.* 17, 390-394.
59. Koizumi, N., Mizuguchi, H., Utoguchi, N., Watanabe, Y., Hayakawa, T. (2003). Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J. Gene Med.* 5, 267-276.
60. Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J. R. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 2180-2184.
61. Lodomery, M., Sommerville, J. (1995). A role for Y-box proteins in cell proliferation. *BioEssays* 17, 9-11.
62. Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R., Watson, J. (2000). Regulation of the human fas promoter YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* 11, 1-13.
63. Lee, E. M., Hong, S. H., Lee, Y. J., Kang, Y. H., Choi, S. H., Kim, I. H., Li, S. J. (2003). Liposome-complexed adenoviral gene transfer in cancer cell expressing various levels of coxsackievirus and adenovirus receptor. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* Eingereicht Dezember 2003.
64. Leopold, P., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K. K., Rodriguez-Boulan, E., Crystal, R. G. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Human Gene Therapy* 11, 151-165.

65. Leppard, K. N., Shenk, T.(1989). The adenovirus E1B-55k KD protein influences mRNA transport via intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J.* 8, 2329-2336.
66. Li, Y., Yu, D.-C., Chen, Y., Amin, P., Zhang, H., Nguyen, N., Henderson, D. R. (2001). A hepatocellular Carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.* 61, 6428-6436.
67. Lichy, J. H., Horwitz, M. S., Hurwitz, J. (1981). Formation of a covalent complex between the 80,000 dalton adenovirus terminal protein and 5`dCMP in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2678-2682.
68. Lindenbaum, J. O., Field, J., Hurwitz, J. (1986). The adenovirus DNA binding protein and adenovirus DNA polymerase interact to catalyze elongation of primed DNA templates. *J. Biol. Chem.* 261, 10218-10227.
69. Lowy, D. R., Rands, E., Scolnick, E. M. (1978). Helper-independent transformation by unintegrated Harvey sarcoma virus DNA. *J. Virol.* 26, 291-298.
70. Lu, H., Reach, M. D., Minaya, E., Young, C. S. H. (1996). The initiator element of the adenovirus major late promotor has an important role in transcription initiation in vivo. *J. Virol.* 71, 102-109.
71. Lubbe, A. S., Bergemann, C., Riess, H., Schriever, F., Reichardt, P., Possinger, K., Matthias, M., Dorken, B., Herrmann, F., Gurtler, R., Hohenberger, P., Haas, N., Sohr, R., Sander, B., Lemke, A. J., Ohlendorf, D., Huhnt, W., Huhn, D. (1996). Clinical experiences with magnetic drug targeting: a Phase I study with 4`-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 56, 4686-4693.
72. Madrow, S., Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 391-411.
73. Marton, M. J., Baim, S. B., Ornelles, D. A., Shenk, T.(1990). The adenovirus E4 17 kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2mRNA. *J. Virol.* 64, 2345-2359.
74. Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R. J., Fruehauf, J. P. (1997). Levels of multidrug resistance (MDR1) P-Glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vivo resistance to taxol and doxorubicin. *Cancer Res.* 4, 389-398.
75. Mertens, P. R., Harendza, S., Pollock, A. S., Lovett, D. H. (1997). Glomular meaan-gial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J. Biol. Chem.*, 272, 22905-22912.
76. Miller, A. D. (1992). Human gene therapy comes of age. *Nature* 357, 455.
77. Minol, K. (1996a). Genterapie. In: Gassen, H. G., Minol, K. (Eda.), *Gentechnik*. 4. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, 341-371.

78. Miyazaki, M., Kohno, K., Uchiumi, T., Tanimura, H., Matsuo, K., Nasu, M., Kuwano, M. (1992). Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 187, 677-684.
79. Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.
80. Neill, S. D., Hemstrom, C., Virtanen, A. (1990). An adenovirus E4 gene product trans-activates E2 transcription and stimulates stable E2F binding through a direct association with E2F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2008-2012.
81. Nelson, J. E. , Kay, M. A. (1997). Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J. Virol.* 71, 8902-8907.
82. Nevins, J. R. (1991). Transcriptional activation by viral regulatory proteins. *TIBS.* 16, 435-439.
83. Nevins, J. R., (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene products. *Cell* 26, 213-220.
84. Nevins, J. R., (1992). E2F: A link between the Rb tumour suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424-429.
85. Nevins, J. R., Winkler, J. J. (1980). Regulation of early adenovirus transcription protein product of early region 2 specifically repress region 4 transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1893-1897.
86. O'Connor, R. J., Hearing, P. (2000). The E4-6/7 protein functionally compensates for the loss of E1A expression in adenovirus infection. *J. Virol.* 74, 5819-5824.
87. Obert, S., O'Connor, R. J., Hearing, P. (1994). The adenovirus E4-6/7 protein transactivate the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1333-1346.
88. Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., Iwamoto, Y. (1998). Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 3373-3377.
89. Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., Kohno, K. (1998). Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J. Biol. Chem.* 273, 5997-6000.
90. Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K. (2000). Direkt interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 14, 6194-6202.
91. Ozer, J., Faber, M., Chalkley, R. and Sealy, L. (1990). Isolation and characterization of a cDNA clone for the CCAAT transcription factor EF1A reveals a novel structural motif. *J. Biol. Chem.* 265, 22143-22152.

92. Pildner, S., Moore, M., Logan, J., Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B-55k transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 6, 470-476.
93. Quinones, M. J., Leor, J., Kloner, R. A., Ito, M., Patterson, M., Witke, W. F., Kedes, L. (1996). Avoidance of immune response prolongs expression of genes delivered to the adult rat myocardium by replication-defective adenovirus. *Circulation* 94, 1394-1401.
94. Ragot, T., Opolon, P., Perricaudet, M. (1998), Adenoviral gene delivery. In: *Methods in cell biology*. Academic press, New York, 229-269.
95. Raj, G. V., Safak, M., MacDonald, G. H. and Khalili, K. (1996). Transcriptional regulation of human polyomavirus JJC: Evidence for a functional interaction between ReIA (p65) and the Y-box binding protein, YB-1. *J. Virol.* 70, 5944-5953.
96. Reichel, R., Neill, S. D., Kovesdi, I., Simon, M. C., Raychaudhuri, P., Nevins, J. R. (1989). The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for transactivation of E2 transcription and for E2F activation. *J. Virol.* 63, 3643-3650.
97. Rekosh, D. M. K., Russell, W. C., Bellet, A. J. D., Robinson A. J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11- 283-295.
98. Robbins, P. D., Tahara, H., Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Tib. Tech.* 16, 35-40.
99. Roberts, R. J., O'Neill, K. E., Yen, C. T. (1984). DNA sequences from the adenovirus 2 genome. *J. Bio. Chem.* 259, 13968-13975.
100. Romano, G., Pacilio, C., Giordano, A. (1998). Gene transfer technology in therapy: Current applications and future goals. *The Oncologist* 3, 225-236.
101. Roninson, I. B. (1992). The role of the MDR1 (P-Glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem. Pharm.* 43, 95-102.
102. Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Vir.* 81, 2573-2604.
103. Safak, M., Gallia, G. L., Ansari, S. A., and Khalili, K. (1999). Physical and functional interaction between Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* 73, 10146-10157.
104. Saranow, P., Ho, Y. S., Williams, J., Levine, A. J. (1982). Adenovirus E1B-58kd tumour antigen and SV40 large tumour antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell.* 28, 387-94.
105. Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Bergemann, C., Gänsbacher, B., Krüger, A., Plank, C. (2002). Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force. *Gene Therapy* 9, 102-107.

106. Scherer, F., Schillinger, U., Putz, U., Stemberger, A., Plank, C. (2002). Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J. Gene Med.* 4, 634-643.
107. Schrenk, D. (1994). P-Glycoprotein: ein Mediator der Mehrfachresistenz von Tumorzellen. *Deutsch. Ärzteblatt* 91, Heft 36, A-2330-2333.
108. Schulick, A. h., Vassalli, G., Dunn, P. F., Dong, G., Rade, J. J. , Zamarron, C., Dichek, D. A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat caroid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J. Clin. Invest.* 99, 209-219.
109. Sebestyen, M. G., Wolff, J. A. (1999). Nuclear transport of exogenous DNA. In Huang, L., Hung, M. C., Wagner, E. (Hrsg.). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. Academic Press, San Diego, London, Boston 139-169.
110. Shenk, T. (1996). Adenoviridae: The viruses and their replication (Chapter 67). In: *Fields Virology, Third Edition*, edited by B. N. Knipe, P. M. Howley et al. Raven Publishers, Philadelphia, 2111-2148.
111. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K., Kuwano, M. (2001). Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 3151-3155.
112. Shibao, K., Takano, H., Nakayama, Y. et al. (1999). Enhanced co expression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer*, 10, 732-737.
113. Shustik, C., Dalton, W., Gros, P. (1995). P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumour cells: biochemistry, clinical relevance and modulation. *Mol. Aspects Med.*, 16, 1-78.
114. Somia, N. S., Verma, I. M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Rev/Genetics* 1, 91-99.
115. Song, B., Young, C. S. (1997). Functional analysis of the CAAT box in the major late promotor of the subgroup C human adenovirus. *J. Virol.* 72, 3213-3220.
116. Spector, D. J., Samaniego, L. A. (1995). Construction and isolation of recombinant adenoviruses with gene replacements. In: Adolph, K. W. (Ed.), *Viral gene techniques*. Academic Press, San Diego, 31-44.
117. Stein, U., Juerchott, K., Wather, W., Bergmann, S., Schlag, P. M., and Royer, H. D. (2001). Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J. Biol. Chem.* 276, 28563-28569.
118. Steinwaerder, D. S., Carlson, C. A., Lieber, A. (2000). DNA replication of first generation adenovirus vectors in tumour cells. *Human Gene Therapy*, 11, 1933-1948.

119. Stillman, B. W. (1985). Biochemical and genetic analysis of adenoviral DNA replication in vitro. In: Genetic Engineering: Principles and Method. Setlow, J. K., Hikkaender, A. (eds.) New York: Plenum Press, 1-27.
120. Sukhai, M., Piquette-Miller, M. (2000). Regulation of the multidrug resistance genes by stress signals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3, 268-280.
121. Zhao, T., Rao, X. M., Xie, X., Li, L., Thompson, T. C., McMasters, K. M., Zhou, H. S. (2003). Adenovirus with insertion-mutated E1A selectively propagates in liver cancer cells and destroy tumors in vivo. *Cancer Res.* 63, 3073-3078.
122. Swaminathan, S. and Thimmapaya, B. (1995). Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199, 177-194.
123. Swamynathan, S. K., Nambiar, A., Guntaka, R. V. (1998). Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB* 12, 515-522.
124. Tamanoi, F., Stillman, B. W. (1982). Function of adenovirus terminal protein at the initiation of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2221-2225.
125. Temperley, S. M., Hay, R. T. (1992). Recognition of the adenovirus type 2 of DNA replication by the virally encoded DNA polymerase and preterminal proteins. *EMBO J.* 11, 761-768.
126. Trapnell, B. C. (1994). Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv. Drug Del. Rev.* 12, 185-199.
127. Trapnell, B. C., Pensiero, M.N. (1997). Development of viral vectors for human gene therapy: retrovirus and adenovirus (Part I). In: March, K. L. (Ed.), *Gene transfer in the cardiovascular system*. Kluwer Academic Publisher, Boston, Dordrecht, London, pp.3-24.
128. Tripathy, S. K., Black, H. B., Goldwasser, E., Leiden, J. M. (1996). Immune responses to transgen-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat. Med.* 2, 545-550.
129. Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1987). Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene. *J. Biol. Chem.* 262, 17432-17436.
130. Wada, S. Tazawa, K., Furuta, I., Nagae, H. (2003). Antitumor effect of new local hyperthermia using dextran magnetite complex in hamster tongue carcinoma. *Oral Dis.* 9, 218-223.
131. Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A., Nemerow, G. (1998). Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J. Virol.* 72, 3455-3458.
132. Weinberg, D. H., Ketner, G. (1985). Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J. Virol.* 57, 833-838.

133. Whyte, P., Buchkovish, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an antioncogen: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334, 124-129.
134. Wienzek, S., Roth, J., and Dobbelstein, M. (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J. Virol.* 74, 193-202.
135. Wilson, J. M. (1996). Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl. J. Med.* 334, 1185-1187.
136. Wolffe, A. P. (1994). Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bio Essays* 16, 245-251.
137. Wolffe, A. P. (1998). Gene regulation by Y-box proteins: Coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* 8, 318-323.
138. Wolfson, J., Dressler, D. (1972). Adenovirus DNA contains an inverted terminal repetition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3054-3057.
139. Yang, Y., Nunes, F. A., berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E., Wilson, J. M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4407-4411.
140. Yew, P., R. Berk, A. J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357, 82-85.
141. Yoder, S. S., Berget, M. (1986). Role of adenovirus type 2 early region 4 in the early-to-late switch during productive infection. *J. Virol.* 60, 779-781.
142. Yu, D. C., Chen, Y., Dilley, J., Li, Y., Embry, M., Zhang, H., Nguyen, N., Amin, P., Oh, J., Henderson, D. R. (2001). Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res.* 61, 517-525.

**8 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Darstellung des cytopathogenen Effekts nach Infektion der vielfachresistenten Tumorzellen EPP85-181RDB und EPG85-257RDB mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen unter dem Einfluss der Magnetofektion. ....	42
Tabelle 2:	Darstellung des cytopathogener Effekts 4 Tage nach Infektion der vielfachresistenten EPP85-181RDB-und EPG85-257RDB-Zellen mit verschiedenen Viruskonzentrationen ohne Verwendung der Magnetofektion. ....	44
Tabelle 3:	Dargestellt wird der cytopathogene Effekt nach Infektion der resistenten Zelllinien A549 und U2OS mit und ohne Anwendung der Magnetofektion. Es werden Viruskonzentration von 50 und 100 pfu/Zelle verwendet. ....	45
Tabelle 4:	Durchschnittliche Virustiter von 2 unabhängigen Versuchsreihen 293-Zellen werden mit Verdünnungen der Virusisolate infiziert. Nach 10 Tagen werden die Plaques ausgezählt und der Virustiter wird berechnet. Aus 2 unabhängigen Versuchsreihen wird der durchschnittliche Virustiter gebildet. ....	47

**9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Genomaufbau der Adenoviren .....	3
Abbildung 2: Aufbau eines Adenoviruspartikel.....	4
Abbildung 3: Genomkarte von Adenovirus Typ 5 .....	7
Abbildung 4: Verlängerung und Bildung der Doppelstränge.....	11
Abbildung 5: Herstellung von Magnetofektinen.....	16
Abbildung 6: Lokalisation der adenoviralen Infektion durch Magnetofektion .....	39
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Schnittstellen von HindIII und XhoI .....	40
Abbildung 8: Southern Blot-Hybridisierung.....	41
Abbildung 9: Southern Blot-Hybridisierung.....	41
Abbildung 10.: Nachweis von cpE in EPP85-181RDB-Zellen.....	43
Abbildung 11.: Nachweis von cpE in EPP85-181RDB- Zellen.....	43
Abbildung 12.: Nachweis von cpE in EPG85-257RDB-Zellen .....	44
Abbildung 13: Kein Nachweis von cpE in A549- und U2OS-Zellen .....	45
Abbildung 14: Wirkungsbereich des Magnetfeldes in der Zellkulturschale .....	46
Abbildung 15: Virustiter nach Produktion auf 293-Zellen.....	47

**10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

%	Prozent
:	dividiert
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A. dest.	Aqua destillata
A549	humane Lungenkarzinomzellen
Ad312	E1A-deletierter adenoviraler Vektor
Ad5	Adenovirus Serotyp5
AdLacZ	Adenovirus mit integriertem β-Galaktosidasegen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpE	Cytopathogener Effekt
CsCl	Cäsiumchlorid
d. h.	das heißt
dCMP	Desoxy-Cytidinmonophosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s Zellkultur-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EPG85-257RDB	humane Magenkarzinomzellen
EPP85-181RDB	humane Pankreaskarzinomzellen
et al.	und andere Autoren
Fa.	Firma

---

FKS	Fetales Kälberserum
HBS	Hepes-gepufferte Saline
ITR	inverted terminal repeat
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilo-Dalton
L15	Leibowitz Zellkultur-Medium
lacZ	$\beta$ -Galaktosidasegen
MDR	multidrug resistance (Vielfachresistenz)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmolar	Millimolar
MOI	multiplicity of infectio
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pfu	Plaque-bildende Einheiten
pH	pH-Wert = negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	so genannte
SSC	Standard saline citrate
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
TBE	Tris Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TP	terminales Protein
U2OS	humane Osteosarkomzellen

---

usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
x	multipliziert
x-gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
YB-1	humaner Transkriptionsfaktor
z. B.	zum Beispiel

## 11 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.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die fachliche und sachliche Beratung und Unterstützung.

Bei Herrn Dr. rer. nat. P. S. Holm bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, für seine stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Betreuung des Projektes, sowie bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für seine freundliche Hilfe und die Durchsicht des Manuskriptes.

Zu dem angenehmen Arbeitsklima und der guten Zusammenarbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, haben alle Mitarbeiter beigetragen. Ihnen allen ein herzliches Dankeschön für ihre Unterstützung.