

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

**Konstruktion eines adenoviralen Vektors zur strahleninduzierbaren
Expression der Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase**

Tobias von Lukowicz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. F. Würschmidt
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 27.07.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2005 angenommen.

Diese Arbeit ist Douglas Noel Adams gewidmet,
der am 11. Mai 2001 starb.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Verzeichnis der Abkürzungen	15
3. Material und Methoden	17
3.1. Vektorkonstruktion	17
3.1.1. Restriktionsverdau	17
3.1.2. Gelelektrophorese	17
3.1.3. Präparation der DNA-Fragmente	18
3.1.4. Ligation	19
3.1.5. Transformation	20
3.1.6. Mini-Prep	21
3.1.7. Maxi-Prep	23
3.1.8. CäsiumChlorid-Plasmid-DNA-Präparation	24
3.2. Zellkultur	26
3.2.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen	26
3.2.2. Zelllinie 293	27
3.2.3. Zelllinie R1H	28
3.2.5. Transfektion	29
3.3. Konstruktion und Charakterisierung adenoviraler Vektoren	29
3.3.1. Kotransfektion	29
3.3.2. Amplifikation der Viren	31
3.3.3. Phenolextraktion	32
3.3.4. Virus-Titration	33
3.3.5. Infektion	34
3.4. Bestrahlungsexperimente	35
3.5. Auswertung	35
3.5.1. Fluoreszenz-Mikroskopie	35
3.5.2. Kristallviolett färbung adhärenter Zellen und Bestimmung der Lebendzellzahl	36
3.5.3. Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblau	36

3.6. Statistik	37
4. Ergebnisse	38
4.1. Klonierung der Vektoren	38
4.1.1. Herstellung von Shuttleplasmiden	38
4.1.2. Herstellung der adenoviralen Vektoren	43
4.1.3. Weitere Plasmide und adenovirale Vektoren	45
4.2. <i>Egr-1</i> -Promotor-vermittelte Strahleninduzierbarkeit der EGFP-Expression	46
4.2.1. EGFP-Expression in transient transfizierten 293-Zellen in Gegenwart hoher Serumkonzentrationen	46
4.2.2. EGFP-Expression nach Infektion verschiedener Zellen nach Bestrahlung: Abhängigkeit von Zelllinie und Serumkonzentration	47
4.2.3. Abhängigkeit der EGFP-Expression von der Strahlendosis in AdTvL3-infizierten R1H-Zellen	49
4.2.4. Abhängigkeit der EGFP-Expression von Virus- und Strahlendosis	50
4.2.5. Abhängigkeit der EGFP-Expression von der Strahlendosis und dem Zeitpunkt des Versuchsabbruchs	51
4.2.6. Schlußfolgerung	52
4.3. Strahleninduzierbarkeit der HSV-TK- /Gancyclovir-vermittelten Zytotoxizität	53
4.3.1 Sensitivität von R1H-Zellen auf Gancyclovir	53
4.3.2 Zytotoxizität in AdTvL4-infizierten R1H-Zellen nach Gancyclovir-Gabe und Bestrahlung in Abhängigkeit von Virus-, Gancyclovir- und Strahlendosis	54

4.3.3. Zytotoxizität in AdTvL4-infizierten R1H-Zellen nach Gancyclovir-Gabe und Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis	62
4.3.4. Unabhängige Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau	65
4.4. Isolatoren-Versuche	67
4.4.1. Einfluß der Isolatoren auf die Hintergrundexpression von EGFP im zeitlichen Verlauf	67
4.4.2. Einfluß der Isolatoren auf die basale Aktivität sowie auf die Strahleninduzierbarkeit des <i>Egr-1</i> -Promotors im zeitlichen Verlauf	67
5. Diskussion	69
6. Zusammenfassung	78
7. Literaturverzeichnis	79
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	85
9. Danksagung	87

1. Einleitung

Ca. 30% der tumorbedingten Todesfälle stehen in direktem Zusammenhang mit lokalem Tumorwachstum, z. B. bei Lungentumoren, Tumoren des Zentralnervensystems oder Tumoren im Kopf-Hals-Bereich.

Strahlentherapie ist bei den meisten soliden Tumoren Therapie der Wahl, entweder als alleinige Therapieform oder in Kombination mit Chirurgie und/oder Chemotherapie. Bei Tumoren wie Lungen- oder Hirntumoren sind die Tumorkontrollraten jedoch nach wie vor unbefriedigend, da trotz hochdosierter Radiotherapie Lokalrezidive bzw. eine Metastasierung in andere Organe die Regel sind.

Potentielle Mechanismen der Strahlenresistenz von Tumoren beinhalten die Repopulation der Tumorzellen, Reparatur der Strahlenschäden auf zellulärer Ebene, eine große Population klonogener Tumorzellen sowie primäre Strahlenresistenz des Tumors (Hallahan et al, 1995; 786-91). Auch die Beschaffenheit des Mikromilieus, zum Beispiel die Hypoxie des Tumorgewebes, spielt eine wichtige Rolle bei der Strahlenresistenz des Tumors.

Ionisierende Strahlung schädigt zelluläre DNA sowohl direkt als auch indirekt durch toxische freie Radikale. Diese entstehen durch das Aufeinandertreffen von Strahlung und Wasser innerhalb der Zelle. Die Schädigung der DNA durch freie Radikale verursacht Einzel- und Doppelstrangbrüche, aus deren Akkumulation der Tod der Zelle während der Reproduktion resultiert (Neal et al, 1997).

Im folgenden werden die wichtigsten Mechanismen kurz erwähnt, die für die Strahlenempfindlichkeit von Geweben bedeutsam sind.

1. Reoxygenierung: Die Strahlenempfindlichkeit von Zellen wird maßgeblich durch den Grad der Oxygenierung bestimmt (Neal et al, 1997). Hypoxische Gewebe sind um den Faktor 2 bis 3 strahlenresistenter als gut oxygenierte Gewebe. Fraktionierte Bestrahlung führt zu Reoxygenierung im Intervall zwischen den Einzeldosen, da die Tumormasse schrumpft und die Blutperfusion zunimmt.

2. Repopulation:

Sowohl Tumor- als auch Normalgewebe setzen ihre Zellteilung im Verlauf einer Strahlentherapie fort. Es gibt sogar Hinweise darauf, daß die Repopulation in dieser Zeit mit zunehmendem Zellerfall zunimmt. Mehrtägige Pausen zwischen einzelnen Fraktionen sollten möglichst vermieden werden, um eine signifikante Repopulation zu verhindern, welche den Effekt der vorangegangenen Dosen verringern würde.

3. Reparatur: Ein Großteil der Strahlenschäden verursacht nicht den sofortigen Zelltod, so daß die Zelle durch Reparatur der Schäden ihre Lebensfähigkeit erhalten kann. Auf der höheren Reparaturfähigkeit der (meisten) Normalgewebe beruht die höhere Todesrate bei Tumorzellen im Vergleich zu Zellen des Normalgewebes.

4. Redistribution:

Innerhalb des Zellzyklus variiert die Strahlensensitivität, mit einem Maximum während der aktiven DNA-Synthese im Rahmen der späten G1- und der S-Phase, sowie einem Minimum während der G2- und frühen G1-Phase.

Sowohl Tumorzellen als auch Normalgewebe weisen ein gewisses Spektrum an Radiosensitivität auf. Wenige Tumoren sind gänzlich strahlenresistent, manche Tumorarten benötigen jedoch höhere Dosen als andere, um den gleichen Effekt zu erzielen. Und auch in Normalgeweben besteht ein weites Spektrum an Strahlensensitivität.

Der Erfolg der Strahlentherapie, lokale Heilung eines malignen Tumors zu erreichen, wird hauptsächlich limitiert durch die Notwendigkeit, eine Balance zu finden zwischen der Schädigung des Tumorgewebes und der Schädigung des umgebenden Normalgewebes.

Neuere Ansätze, die unter anderem auf eine verbesserte lokale Tumorkontrolle abzielen, sind dringend erforderlich. Hierzu könnte in Zukunft die Gentherapie zählen. Als Gentherapie bezeichnet man die Modifikation einer Zielzelle durch Einschleusen von DNA. Durch diese vorübergehende oder dauerhafte Änderung des Genotyps der Zielzelle ändert sich auch ihre Funktion bzw. ihr Phänotyp. Handelt es sich beim Zielgewebe um Tumorzellen, so beabsichtigt man durch den Gentransfer, ein Absterben der Krebszellen zu erreichen. Hierzu können entweder unmittelbar zytotoxische Gene transferiert werden, oder Gene, welche einen Angriff des körpereigenen Immunsystems provozieren, oder aber Gene, die die Zielzelle für bestimmte Medikamente sensibilisieren.

Um ein Gen in die Zielzelle einzuschleusen, bedient man sich verschiedener Methoden. *In vitro* hat sich die chemische Transfektion als praktikabel erwiesen. Hierbei werden das therapeutische Gen als linearisiertes Plasmid sowie eine elektrisch geladene Verbindung (z.B. Calciumphosphat) zum Nährmedium hinzugegeben. Die elektrisch geladene Verbindung stört die Struktur der Zellmembran, wodurch die Fremd-DNA ins Zellinnere gelangen kann. Des Weiteren besteht beispielsweise noch die Möglichkeit der physikalischen Elektroporation durch Stromstöße oder die der Mikroinjektion, bei der jedoch jede Zelle einzeln behandelt werden muß. (Verma IM, 1990; 68-72)

Um *in vivo* eine effiziente Genübertragung zu erreichen, bedient man sich für gewöhnlich viraler Vektoren. Viren transportieren ihr Erbgut in einer Schutzhülle und sind in der Lage, dieses gezielt in Zellen einzuschleusen. Retroviren beispielsweise haben ein großes Fassungsvermögen und infizieren viele verschiedene Zelltypen. Allerdings infizieren sie nur teilungsaktive Zellen, und ihr Erbgut wird nach dem Umschreiben durch das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase stabil ins Wirtsgenom integriert. RNA-Viren haben ebenfalls ein großes Fassungsvermögen und befallen eine Vielzahl von Zellen. Ihre RNA wird jedoch, da sie in der Zielzelle nicht in DNA umgeschrieben wird, schnell abgebaut. (Verma IM, 1990; 68-72)

In dieser Arbeit kamen Adenoviren als Vektoren zum Einsatz. Sie gehören zu den gängigsten Vektoren in der Molekularbiologie. Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren mit einer Größe von ca. 36.000 bp. Das Virion ist ein etwa 70 nm großer Icosaeder, bestehend aus einer Proteinhülle und der Virus-DNA. Adenoviren finden sich in einer Vielzahl von Spezies, vor allem in Säugetieren und Geflügel. Es wurden bisher etwa einhundert verschiedene Serotypen beschrieben, wovon die humanen Serotypen 2, 5 und 12 am genauesten charakterisiert wurden und hAd2 und hAd5 als standardisierte Werkzeuge in der Molekularbiologie fungieren (Graham et al, 1991; 109-27).

Humane Adenoviren stellen aus einer Vielzahl von Gründen geeignete Gen-Vektoren dar. Das Viruspartikel ist relativ stabil, und das Virusgenom weist nur eine geringe Spontanmutationsrate auf. Ins Virusgenom integrierte Fremd-DNA bleibt während mehrerer Replikationszyklen unverändert. Das Virus-Genom ist mit gängigen molekularbiologischen Techniken relativ einfach zu manipulieren. In geeigneten Zelllinien läßt sich Fremd-DNA mittels spontaner homologer Rekombination in das Virusgenom integrieren. Dieses wird in der Verpackungszelllinie effizient repliziert, mit einem Ertrag von 10^3 - 10^4 PFU (*plaque-forming unit*) pro infizierter Zelle. Dies vereinfacht die Gewinnung und Konzentration der Viren in der Zellkultur.

Adenoviren weisen ein breites Wirtsspektrum *in vivo* und *in vitro* auf; ihre DNA wird nicht in das Wirtsgenom integriert, daraus resultiert eine niedrige Genotoxizität. Humane Ad können sowohl replizierende als auch ruhende Zellen infizieren.

Bei einer Kombination von Strahlen- und Gentherapie ließe sich einerseits die sehr gute lokale Anwendbarkeit der Strahlentherapie nutzbar machen. Mit modernen Bestrahlungstechniken wie der 3D-konformalen Strahlentherapie und stereotaktischen

Techniken kann auf Millimeter genau das Zielvolumen (Tumor) erfaßt werden und umgebendes, gesundes Gewebe weitgehend geschont werden. Andererseits könnte durch die gentherapeutische Komponente eine Schädigung der Tumorzellen erzielt werden, die eine hohe Strahlenresistenz aufweisen. Insbesondere solche Tumoranteile, die aufgrund des für Tumore typischen ungerichteten Gefäßwachstums hypoxisch und somit deutlich strahlenresistenter als gut oxygenierte Tumoranteile sind (Neal et al, 1997), könnten durch den gentherapeutischen Therapieanteil geschädigt werden. So kombinierten Greco et al (Greco et al, 2002; S. 1403-1411) strahleninduzierbare Promotor-Elemente mit Hypoxieempfindlichen Elementen z.B. aus dem Erythropoetin-Gen. Diese kombinierten Promotoren wiesen eine ca. zweifach erhöhte Aktivität nach Bestrahlung oder unter Hypoxie sowie eine bis zu 3,5-fach erhöhte Aktivität unter Bestrahlung und gleichzeitiger Hypoxie auf.

Die lokale Applikation von Vektoren, welche ein therapeutisches Gen enthalten und in die Zielzelle einschleusen, in Kombination mit einer hochpräzisen Bestrahlung könnte also die lokalen Tumorkontrollraten bei niedrigen systemischen Nebenwirkungen verbessern.

Als funktionales Bindeglied zwischen Strahlen- und Gentherapie hat sich die strahleninduzierbare Promotor-/Enhancer-Region des *Egr-1*-Gens erwiesen. Das *Egr-1*-Gen findet sich in einer Vielzahl von Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, Epithelzellen und B-Lymphozyten (Tsai-Morris et al, 1988; 8835-46). Es ist involviert in Zellwachstum ebenso wie in Zelldifferenzierung und kodiert für ein Zink-Finger-Protein, welches als Transkriptionsfaktor mit der DNA-Sequenz CGCCCCGC interagiert. Die Expression des *Egr-1*-Gens läßt sich durch Serumfaktoren wie TPA (Tetradecanoylphorbolacetat), aber auch durch ionisierende Strahlung steigern (Datta et al, 1993; 2419-22). Verantwortlich hierfür sind sogenannte CARG-Sequenzen (CC AT-rich GG), deren Sequenz annähernd identisch ist mit der CCATATTAGG-Sequenz des *c-fos serum responsive element* (Tsai-Morris et al, 1988; 8835-46). Als ROIs (*reactive oxygen intermediates*) bezeichnete Sauerstoffradikale, die intrazellulär durch ionisierende Strahlung entstehen, aktivieren die CARG-Sequenzen. Durch Zugabe des Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein konnte die Induzierbarkeit der *Egr-1*-Transkription durch die CARG-Sequenzen aufgehoben werden (Datta et al, 1993; 2419-22). Die Kombination der *Egr-1*-Promotor-Enhancer-Region mit einem beliebigen, nachgeschalteten Gen ermöglicht durch gezielte Bestrahlung die räumliche und zeitliche Kontrolle der Expression dieses Gens. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, Gene in Zielzellen, z.B. Tumorzellen einzuschleusen, die nach ihrer Aktivierung durch lokale Strahlenapplikation Toxine in der Zielzelle synthetisieren. Außerhalb des bestrahlten

Gewebes verursachen die transfizierten Gene keine oder nur geringe Schäden, da sie nicht oder nur in geringem Maße transkribiert werden.

Datta et al. (Datta et al, 1993; 2419-22) verbanden die sechs CArG-Elemente des *Egr-1*-Gens mit dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyltransferase). Nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 20 Gy zeigte sich eine 3,6-fach höhere CAT-Aktivität.

Joki et al. (Joki et al, 1995; 1507-13) verbanden die *Egr-1*-Promotor/Enhancer-Region mit dem Luciferase-Reporter-Gen. Nach Transfektion in Gliomzellen und Bestrahlung mit 20 Gy zeigte sich bereits nach drei Stunden eine neunfach erhöhte Luciferase-Aktivität; nach 24 Stunden war die Expressionsrate wieder auf das Niveau der unbestrahlten Zellen abgesunken.

Während in diesen früheren Publikationen sehr hohe Strahlendosen zur Anwendung kamen, die im klinischen Alltag eher die Ausnahme darstellen, wiesen Marples et al. (Marples et al, 2002, 231-39) einen Aktivitätsanstieg ihres synthetischen Promotors bereits nach einer Dosis von 3 Gy nach. Sie verbanden vier isolierte CArG-Elemente mit einem basalen Promotor aus dem humanen Cytomegalievirus, der den essentiellen Transkriptionsstartpunkt enthielt, und maßen die Expression des nachgeschalteten Reportergens EGFP. Nach einmaliger Bestrahlung mit 3 Gy stieg die EGFP-Expression um das zwei- bis dreifache.

Eine Kombination von Strahlen- und Genterapie zur verbesserten lokalen Tumorkontrolle scheint also durchführbar. Hieraus könnte auch eine Dosisverringerung der einzelnen Therapieanteile resultieren. Ebenso könnte durch Kombination beider Verfahren der Anteil der Tumorzellen, die gegen eine der beiden Therapiebestandteile resistent sind, dennoch effizient geschädigt werden.

Limitierend für Strategien, die mit *Egr-1* arbeiten, erwies sich jedoch die basale (nicht bestrahlungsinduzierte) Aktivität der Promotor-Enhancer-Region, die einen Einsatz stark zytotoxischer Gene vorerst problematisch erscheinen läßt. Die Reduktion dieser Basalexpression durch Modifikation von *Egr-1* ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Das von uns verwendete *mEGR-1* wurde erstmals von Tsai-Morris et al beschrieben (Tsai-Morris et al, 1988; 8835-46) und uns von Vikas P. Sukhatme (Department of Medicine, Howard Hughes Medical Institute, University of Chicago) zur Verfügung gestellt.

Um die Aktivität einer Promotor/Enhancer-Region experimentell nachzuweisen, werden sogenannte Reportergene verwendet, die einen schnelleren Aufschluß über die Expressionsrate als zytotoxische Gene geben, da deren Expression nur indirekt nachgewiesen werden kann. Mit einem einfach visualisierbaren Reportergen läßt sich rasch eine Aussage

über die Aktivität eines Promotors treffen, welche dann eine Fortführung der Experimente mit dem therapeutischen Gen rechtfertigt.

Ein für den experimentellen Gebrauch geeignetes Reporter-gen muß folgende Ansprüche möglichst gut erfüllen:

- Das Produkt muß biologisch inert sein
- Die Expression darf die Zellpopulation nicht beeinflussen
- Das Gen sollte relativ klein sein, um einfach in den Vektor integriert werden zu können
- Das Produkt sollte einfach direkt oder indirekt visualisierbar sein

GFP wurde erstmals von Prasher et al. aus dem Knidaria *Aequorea victoria* isoliert (Prasher et al, 1992; 229-33). Die Anregung *in vivo* funktioniert entweder über einen Luciferase-Oxyluciferin-Komplex oder über ein Ca^{2+} -aktiviertes Phosphoprotein. Bei Anregung *in vitro* mittels Licht liegt das Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von 395 nm, das Emissionsmaximum bei 510 nm. Die Visualisierung ist mittels Fluoreszenz-Mikroskop möglich, ohne weitere Fixation oder Färbung der Zellen.

Die von Prasher et al. beschriebene GFP10 cDNA kodiert für ein 238 Aminosäuren großes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 26.888 Dalton. GFP hat eine faßähnliche Tertiärstruktur aus elf β -Faltblattstrukturen, die eine zentrale α -Helix umgeben, welche das fluoreszierende Zentrum, Chromophor genannt, enthält; dieses besteht aus dem Tripeptid Ser65-Tyr66-Gly67.

Das von uns verwendete EGFP wurde 1996 von Cormack et al (Cormack et al, 1996; 33-8) vorgestellt. Cormack et al. beziehen sich auf ein 238 Aminosäuren enthaltendes *w(ild)t(ype)*-GFP. Durch den Austausch von Phenylalanin durch Leucin an Position 64 sowie den Austausch von Serin durch Threonin an Position 65 entsteht die als EGFP bezeichnete Mutante GFP-S65T. Deren Exzitationsmaximum ist im Vergleich zum wtGFP von 395nm nach 488nm verschoben. Bei dieser Wellenlänge ist die Emission des EGFP ca. 35-fach stärker als die der Wildtyp-Variante. Auch die Formation des Chromophors bei 37°C ist bei der EGFP-Variante deutlich effektiver. Da in den meisten FACS-Geräten und Fluoreszenzmikroskopen eine Exzitations-Wellenlänge von 488nm zur Anwendung kommt, wurde die Detektion von GFP als EGFP-Mutante deutlich vereinfacht.

Als Suizidgen kam in dieser Arbeit die Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase zur Anwendung. Die Kombination der HSV-TK mit Gancyclovir (GCV) gehört zu den am

weitesten verbreiteten Systemen in der molekularen Chemotherapie. Die für das Herpes-simplex-Virus spezifische Thymidin-Kinase weist ein Molekulargewicht von 42 Kilodalton auf (Cremer et al, 1978; 2333-44; Cremer et al, 1978, 337-45). Im Gegensatz zu zelleigenen Thymidinkinasen akzeptiert HSV-TK GCV als Substrat und phosphoryliert es zu GCV-Monophosphat. Dieses wird anschließend durch zelleigene Kinasen zu GCV-Di- und Triphosphat phosphoryliert. GCV-Tri-P wird als Guanidin-Analogon zur DNA-Synthese herangezogen, führt aber aufgrund der fehlenden zweiten funktionalen OH-Gruppe des GCV zum Strangabbruch. Es kommt daher zum Erliegen der DNA-Replikation, was zum Zelltod der mitotisch aktiven Zellen führt. Somit sind Tumorzellen, die nach Transduktion das HSV-TK-Gen enthalten und exprimieren, einer GCV-Therapie zugänglich. Eine Verabreichung des HSV-TK-Gens oder des GCV allein führt zu keiner signifikanten Schädigung einer Zellpopulation.

Gancyclovir ist ein dem Guanosin sehr ähnliches Molekül, es enthält aber keinen vollständigen Desoxyribose-Ring. Die 2'-Methylgruppe der Desoxyribose fehlt. Daher wird es von zelleigenen Kinasen nicht als Substrat akzeptiert. Die Phosphorylierung erfolgt durch HSV-TK an der Hydroxylgruppe, die im Guanosin derjenigen am 5'-C-Atom entspricht. Nach der Phosphorylierung zum GCV-tri-P wird dieses zwar von DNA- und RNA-Polymerasen verwertet. Eine weitere Phosphorylierung wie bei der Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Guanosins ist aber nicht möglich, da die entsprechende Hydroxylgruppe im GCV Teil eines Aldehyds ist und sich als solches den Polymerasen entzieht.

Ein weiterer, dem HSV-TK/GCV-System zugute kommender Faktor ist der von Takamiya et al beschriebene „bystander-effect“ (Takamiya et al, 1992; 493-503). Da in Zellverbänden befindliche Zellen Verbindungen zu anderen Zellen, sogenannte gap junctions, ausbilden, kann GCV-P in andere Zellen diffundieren. In diesen kommt es ebenfalls zur Phosphorylierung des GCV-P zu GCV-tri-P und infolgedessen zu DNA-Schädigung und Zelltod, obwohl diese Zellen nicht mit dem HSV-TK-Gen transduziert wurden. Die Auswirkungen interzellulärer Kommunikation über gap junctions sowie die gezielte Erhöhung der gap junctions in Zellverbänden mittels sogenannter Connexine sind Gegenstand aktueller Forschung. Carrio et al untersuchten Pankreastumorzelllinien, welche mittels Retroviren entweder mit dem HSV-TK-Gen allein oder zusätzlich mit dem Connexin23-Gen transduziert wurden. Sie fanden eine deutliche Zunahme der HSV-TK-/GCV-vermittelten Zytotoxizität in den Zellen, in denen aufgrund der Connexin23-Überexpression die interzelluläre Kommunikation mittels gap junctions erhöht war (Carrio et al, 2001; 81-8).

Matono et al berichten über den Verlust der Connexin26- und Connexin43-Expression in bestimmten Ösophaguskarzinom-Zelllinien sowie über eine deutliche Korrelation von „bystander effect“ und interzellulärer Kommunikation über gap junctions. Laut dieser Arbeitsgruppe ist das Ausmaß der interzellulären Kommunikation eines Tumortyps wegweisend dafür, ob dieser Tumor einer Gentherapie mit dem HSV-TK-System zugänglich ist (Matono S, 2003; 1309-15).

In einer Übersichtsarbeit über Studien, die sich mit Connexin-Transduktion befassen, berichten Nicholas et al über die kolorektale Tumorzelllinie HT-29. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine geringe interzelluläre Kommunikation über gap junctions aus. Die durch das HSV-TK/GCV-System verursachte Zytotoxizität konnte durch Transduktion der Zelllinie mit Connexin43 und dem daraus resultierenden „bystander effect“ deutlich erhöht werden (Nicholas et al, 2003; 495-507).

Bereits in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde der Einsatz von Adenoviren in der Tumorthherapie klinisch erprobt. Damals machten sich Smith et al (Smith et al, 1956; 1211-1218) die hohe Infektiosität, Zytotoxizität und Immunogenität der Wildtyp-Adenoviren in der Behandlung von Cervix-Carcinomen zunutze. Seitdem wurden verschiedenartige genterapeutische Strategien entwickelt, mittels adenoviraler Vektoren beispielsweise Tumorsuppressorgene, immunmodulierende Gene oder Suizidgene in Tumorzellen einzuschleusen (Marples et al, 2002; 231-39; Zhang, 1999; 113-138). Die Effizienz dieser Verfahren in der Induktion tumorsupprimierender Effekte wurde in verschiedenen tierexperimentellen Versuchen nachgewiesen.

Die Strategie der Tumorsuppression durch Arzneimittel-sensibilisierende Gene beruht auf dem Konzept, diese Gene beispielsweise mithilfe von Adenoviren in Tumorzellen einzuschleusen. Ein nontoxisches Medikament, welches systemisch appliziert werden kann, wird sodann in der Tumorzelle in seine wirksame Form umgewandelt und führt zum Tod der Zelle. Beispielsweise transfizierten Chen et al (Chen et al, 1994; 3054-7) Hirntumoren von Nacktmäusen mithilfe adenoviraler Vektoren mit HSV-TK. Nach anschließender sechstägiger GCV-Gabe kam es im Verlauf zu einer 500-fachen Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die in dieser Arbeit verwendete Tumorzelllinie R1H entstammt einem Rhabdomyosarkom der Ratte. Diese Zelllinie ist hinsichtlich ihrer Strahlenempfindlichkeit genauestens untersucht und vorbeschrieben (Barendsen et al, 1969; 373-91; Vogler et al, 1988; 317-325; Würschmidt et

al, 1988; 497-502; Würschmidt et al, 1990; 879-882; Beck-Bornholdt et al, 1991; 57-63). Die Handhabung dieser Zelllinie sowie ihre Infizierbarkeit mit Adenoviren sind in unserem Labor etabliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen adenoviralen Vektor zur Transduktion und strahleninduzierten Expression der Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase zu konstruieren und *in vitro* zu charakterisieren. Die Strahleninduzierbarkeit der Promotor/Enhancer-Region des *Egr-1*-Gens sollte nachgewiesen und durch Dosisfindungsversuche optimiert werden. Hierbei war insbesondere die Verwendung von niedrigen Strahlendosen, welche in aktuellen Therapieschemata der humanen Tumorthherapie Anwendung finden, von Interesse. Da die basale Aktivitätsrate der *Egr-1*-Promotor-Enhancer-Region eines der größten Hindernisse hinsichtlich klinischer Anwendbarkeit darstellt, wurde abschließend die Verwendung sogenannter Silencer untersucht. Dies sind kurze DNA-Sequenzen, deren Einfügen vor Anfang und nach Ende einer Expressionskassette die Expression des betreffenden Gens in Abwesenheit von Induktoren verhindern oder reduzieren soll.

2. Verzeichnis der Abkürzungen

AdV	Adenovirale Vektoren
ATP	Adenosintriphosphat
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
BGH-pA	<i>bovine growth hormone</i> -poly-Adenylierungssignal
Bp	Basenpaar (-e)
Ca	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
CArG	CC AT- <i>rich</i> GG
CAT	Chloramphenicyl-Transferase
cDNA	<i>copy</i> DNA
HCMV	humanes Cytomegalievirus
CsCl	Cäsiumchlorid
CTP	Cytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure (- <i>acid</i>)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>Egr-1</i>	<i>Early growth response-1</i>
EtBr	Ethidiumbromid
Ethidiumbromid	5-ethyl-3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
GCV	Gancyclovir
GCV-tri-P	Gancyclovir-tri-Phosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
hAd	humanes Adenovirus
HCl	Salzsäure

HEBS	<i>HEPES-buffered saline</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HRE	Hypoxie-responsible Element
HSV-TK	Herpes-simplex-virus-Thymidinkinase
I	Isolator
kb	Kilobasen (-paare)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
<i>mEgr-1</i>	<i>murine Early growth response-1</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
NAFCS	<i>North American fetal calf serum</i>
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaOH	Natronlauge
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFU	<i>plaque-forming unit</i>
RCA	Replikationskompetente Adenoviren
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Bor-EDTA
TE	Tris-EDTA
TNF(α)	Tumornekrosefaktor alpha
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tyr	Tyrosin
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
wt	Wildtyp

3. Material und Methoden

3.1. Vektorkonstruktion

3.1.1. Restriktionsverdau

Erläuterung am Beispiel eines *SalI/XbaI*-Verdau von p Δ E1sp1A:

Es werden nacheinander in ein 1,5ml- Reaktionsgefäß pipettiert:

- 1 μ l p Δ E1sp1A (c= 1 μ g/ μ l)
- 1 μ l Puffer
- 7 μ l ddH₂O
- 0,5 μ l *SalI* (10 U/ μ l)
- 0,5 μ l *XbaI* (10 U/ μ l)

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Roche, Penzberg oder New England Biolabs, Frankfurt am Main bezogen. Der Verdau erfolgte mit dem vom Hersteller empfohlenen Sure-Cut PufferTM H. Das Reaktionsgefäß wird für 60 Minuten in einen auf 37 °C beheizten Thermoblock verbracht. Um beim Verdau des Vektors eine spätere Religierung zu verhindern, werden nach 30 Minuten 0,5 μ l Alkalische Phosphatase zugegeben (1 U/ μ l), sodann wird der Ansatz weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.1.2. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Für analytische Gele wurde Tris-Bor-EDTA-(TBE)-Puffer verwendet; sollten DNA-Fragmente isoliert werden, wurde Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer verwendet.

Rezept für TBE/TAE-Mini-Gel:

- 0,4 g Agarose (Roche, Penzberg) im 250ml-Erlenmeyerkolben mit 1x-TBE/TAE-Puffer mischen
- Im Mikrowellenherd bei 600 W ca. eine Minute erhitzen, bis Agarose vollständig gelöst ist
- Flüssigkeit auf ca. 60 °C abkühlen lassen
- 1 μ l Ethidiumbromid (5-ethyl-3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridiniumbromid, c= 10 mg/ml) hinzugeben, vorsichtig schwenken

- Flüssigkeit langsam in eine mit einem Gelkamm bestückte Gießkammer gießen, eventuell entstandene Blasen mit einer Pipettenspitze entfernen, Gel aushärten lassen

Rezept für 5x-TBE-Puffer:

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,45 M
- Borsäure 0,45 M
- EDTA 0,01 M, pH 8,3

Rezept für 5x-TAE-Puffer:

- Tris-Acetat 0,04 M
- EDTA 0,1 mM

Zur Elektrophorese wird das Gel samt Träger in eine mit 1x-TBE-Puffer gefüllte Gelkammer (Mini horizontal Gelkammer, Schuett Labortechnik GmbH, Göttingen) gelegt. In eine der Geltaschen werden ca. 10 µl eines Größenstandards (New England Biolabs, Frankfurt am Main) pipettiert, für verdaut DNA-Proben eine 1Kb-DNA-Leiter. Die verdauten Proben werden im Verhältnis 5:1 mit 6x-Probenauftragspuffer (6x-Lösung: 0,25 % Bromphenolblau (C₁₉H₁₀Br₄O₅S), 30 % Glycerin, destilliertes Wasser; nach Maniatis (Sambrook, 1989) versetzt und auf das Gel aufgetragen. An das Gel wird nun eine Spannung von max. 100 V angelegt (Spannungsquelle: Elite 2D, Schuett Labortechnik GmbH, Göttingen), je nach Fragmentgröße für 30 Minuten bis zu einigen Stunden. Das Ergebnis wird unter UV-Licht mittels eines Kamerasystems (LTF-Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg; Modell LTF Bioprint System, Kamera: SR 12575; Software: Biocapt V. 99) dokumentiert und ausgewertet.

3.1.3. Präparation der DNA-Fragmente

Falls DNA-Fragmente weiterverarbeitet werden sollen, werden sie auf TAE-Gelen aufgetrennt und aus diesen extrahiert. Hierfür wird nach geeigneter Laufzeit das Gel unter UV-Licht (Lampe: Fa. Schultheiss, München; Wellenlänge: 254/366 nm) niedriger Energie inspiziert und bei möglichst kurzer UV-Exposition die benötigte DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell exzidiert. Das Gel-Fragment, dessen Volumen 100 bis maximal 300 µl betragen sollte, wird in ein Reaktionsgefäß verbracht. Die Elution erfolgt mittels Promega-WizardPCR-Prep Kit (Promega, Madison WI, USA) nach Angaben des Herstellers: Das

Gelfragment wird nach Zugabe von 1 ml der Harz-Lösung (Promega Wizard-Prep Kit) bei 65 °C circa fünf Minuten inkubiert, bis das Gel-Fragment komplett geschmolzen ist. Währenddessen werden vorbereitet:

- 80%ige Isopropanol-Lösung (2 ml pro Gel-Fragment)
- ddH₂O (50 µl pro Gel-Fragment)
- WizardTM-Minicolumn aufgesetzt auf ein Reaktionsgefäß, auf die Minisäule wird eine 2ml-Spritze aufgesetzt

Das Gel-Harz-Gemisch wird langsam in die Hülse pipettiert und mit der Spritze durch die Minisäule gepreßt. Nun wird die Spritze von der Minisäule abgenommen, der Kolben aus der Spritze gezogen und die Spritze wieder auf die Minisäule aufgesetzt. Es werden 2 ml Isopropanol zur Reinigung der DNA durch die Säule gepreßt, sodann wird die Säule samt Reaktionsgefäß zwei Minuten bei 10'000 x g zentrifugiert. Danach werden zur Elution der DNA 50 µl dd H₂O auf die Säule pipettiert und nach einer Minute die im Wasser gelöste DNA für 20 Sekunden bei 10'000 x g in ein frisches Reaktionsgefäß abzentrifugiert.

Fragmente mit einer Größe von über 3 kb werden mit auf 65-80 °C erwärmtem Wasser eluiert, bei Fragmenten mit einer Größe von über 20 kb empfiehlt sich eine Wassertemperatur von 80 °C.

Bei zu erwartendem geringem DNA-Ertrag empfiehlt sich der Einsatz von Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt.

Die DNA wird bei -20 °C aufbewahrt oder direkt zur Ligation verwendet.

3.1.4. Ligation

Um ein neues Plasmid zu erhalten, ligiert man zwei oder mehr linearisierte DNA-Fragmente. Hierbei definiert man das kleinere der beiden Fragmente als Insert, das größere Fragment als Vektor. Die Ligation selbst wird bei einem Teilchenverhältnis von 1:10 zugunsten des Inserts durchgeführt, wobei stets 100 ng des Inserts eingesetzt werden, die einzusetzende Menge der Vektor-DNA errechnet sich aus dem Massenverhältnis. Der Ligationsansatz besteht aus den entsprechenden Mengen Insert und Vektor, 1 µl T4-DNA-Ligase (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Ligase-Puffer (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe Ausgangskonzentration 5x, Endkonzentration 1x), sowie einer individuell zu ermittelnden

Menge ddH₂O, um den Ansatz auf ein rechnerisch leicht zu handhabendes Endvolumen aufzufüllen. Dieses sollte nicht mehr als 30 µl betragen.

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 14 °C inkubiert und kann danach bei 4 °C oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

Falls eines der Fragmente mit einem Restriktionsenzym wie *EcoRV* geschnitten wurde, welches stumpfe Doppelstrangenden erzeugt, so muß das Ende des anderen Fragmentes ebenfalls ein stumpfes Doppelstrangende aufweisen. Hierfür werden circa 0,5 µg des Fragmentes mit Einzelstrangenden mit einem Nukleotidgemisch und einer T4-DNA-Polymerase inkubiert. Der Ansatz, bestehend aus dem DNA-Fragment, dem Inkubationspuffer (Roche, Penzberg, Ausgangskonzentration 5x, Endkonzentration 1x), dem Gemisch aus ATP, GTP, TTP und CTP und der T4-DNA-Polymerase (Roche, Penzberg) wird für 20 Minuten bei 14 °C und anschließend für zehn Minuten bei 75 °C inkubiert. Das Fragment, welches nun stumpfe Enden aufweist, läßt sich wie üblich mit T4-DNA-Ligase ligieren, allerdings ist keine gerichtete Klonierung möglich, so daß ein Kontrollverdau gewählt werden muß, der Aufschluß über die richtige Orientierung von Vektor und Insert zueinander gibt.

3.1.5. Transformation

Plasmide wurden durch Hitzeschock in chemisch kompetente Zellen (Herstellung nach Ausubel et al, 1988) transformiert. Dazu wird ein 100µl-Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Vorsichtig werden 10 ng eines Plasmides bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes hinzupipettiert und behutsam durchmischt. Sodann werden die Zellen 15-30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zwei Minuten einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Unmittelbar danach werden die Zellen wieder auf Eis gestellt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (Rezept s. unten) weitere 15-30 Minuten inkubiert. Nun wird das Reaktionsgefäß noch eine Stunde bei 37 °C bei mittlerer Drehzahl (etwa 110 rpm) leicht geschüttelt. Abschließend werden 50 µl und 300 µl Aliquots auf ampicillinhaltige Agarplatten (50 µg/ml; Antibiotikum entsprechend dem Resistenzgen im Plasmid) aufgebracht, diese werden nach Abtrocknung kopfüber für mindestens acht Stunden bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt.

Rezept für 100 ml Luria-Bertani- (LB) Medium:

- 90 ml ddH₂O
- 1 g Trypton

- 0,5 g Hefeextrakt
- 1 g NaCl
- pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen
- mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen

3.1.6. Mini-Prep

Zur Erfolgskontrolle von Klonierungen wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* Kolonien mittels alkalischer Lyse folgendermaßen isoliert (nach Birnboim Doley, modifiziert)

1. Mit einem autoklavierten Zahnstocher oder einer Impföse werden Teile der Kolonien, die auf den Agarplatten der Transformation wuchsen, in separate Kulturröhrchen oder, bei entsprechender Koloniezahl, in die Vertiefungen einer 24-well-Platte überführt. Diese enthalten 1 ml LB-Medium sowie das dem Resistenzgen des Plasmids (β -Lactamase, bla) entsprechende Antibiotikum in geeigneter Konzentration, in unserem Fall Ampicillin in einer Konzentration von 80 μ g/ml.
2. Die Kulturen werden für mindestens acht Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert.
3. Jede Kultur wird einzeln mit einer jeweils frischen, sterilen Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß überführt.
4. Diese werden bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 14'000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird in die Kulturröhrchen zurückverbracht und kann bei Bedarf erneut wachsen.
5. Das Pellet wird in 200 μ l Lösung 1 durch vortexen resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Es werden 400 μ l Lösung 2 zugegeben und durch 10x invertieren gemischt. Große Plasmide dürfen von nun an nicht mehr geschüttelt werden. Die Reaktionsgefäße werden nun 5-10 Minuten auf Eis gelagert.
7. Es werden 300 μ l eiskalte Lösung 3 zugegeben, durch 10x invertieren gemischt und für 15-30 Minuten auf Eis gelagert.
8. Die Reaktionsgefäße werden bei 4 °C und 14'000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird weiterverarbeitet.
9. Zur Vorbereitung wird für jede Probe ein Reaktionsgefäß mit 700 μ l Isopropanol vorgelegt. Der Überstand aus der letzten Zentrifugation wird vorsichtig in das mit

Isopropanol gefüllte Reaktionsgefäß gekippt oder pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

10. Die Proben werden für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 14'000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen.
11. Zu jedem Pellet werden 1 ml Ethanol (70 %) zugegeben, das Gefäß wird einige Male mit dem Finger angestoßen.
12. Die Proben werden für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 14'000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen.
13. Das am Boden des Reaktionsgefäßes hängende Pellet wird getrocknet, indem die Gefäße geöffnet und kopfüber für etwa 15 Minuten auf ein Zellstofftuch gestellt werden.
14. Das Pellet wird in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Rezepte für Lösung 1-3:

Lösung 1:

- 50 mM Glucose
- 25 mM Tris/HCl pH 8,0
- 10 mM EDTA pH 8,0
- in ddH₂O

Lösung 2:

- 0,2 M NaOH
- 1 % SDS
- in ddH₂O

Lösung 3:

- 3 M Na-5M-Acetat pH 4,8, eiskalt

20ml TE:

- 10 mM Tris/HCl pH 7,5
- 1 mM EDTA pH 8,0
- in ddH₂O

Anschließend wurden die isolierten Plasmide durch Restriktionsenzymverdau analysiert, einer Gelelektrophorese unterzogen und die entstandenen Fragmente mit dem erwarteten Bandenmuster verglichen.

3.1.7. Maxi-Prep (Qiagen #12165; Qiagen GmbH Hilden)

Plasmide, die in der Minipräparation und anschließenden Restriktionsenzymanalyse die erwartete Struktur aufwiesen, wurden zur weiteren Klonierung in DH10B-Zellen amplifiziert und mittels Qiagen-Maxiprep Kits aufgereinigt. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen verwendet.

1. 100-250 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium werden mit etwa einem Milliliter einer *E. coli*-Kultur, die das gewünschte Plasmid enthält, angeimpft und mindestens acht Stunden in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Erlenmeyerkolben schüttelnd inkubiert.
2. Die Kultur wird in einen Beckman-Zentrifugenbecher (Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld) überführt und 15 Minuten bei 6 000 x g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wird in den Erlenmeyer-Kolben zurückdekantiert.
3. Das Pellet wird in 10 ml Resuspensions-Puffer durch Pipettieren resuspendiert und in ein 50 ml Beckman-Zentrifugenglas überführt.
4. Es werden 10 ml des Lyse-Puffers tropfenweise zugegeben, sodann wird der Inhalt des Zentrifugenglases einige Male gekippt und genau fünf Minuten bei 20 °C inkubiert.
5. 10 ml des eisgekühlten Neutralisations-Puffers werden tropfenweise hinzupipettiert, der Ansatz einige Male gekippt und sodann 20 Minuten auf Eis inkubiert.
6. Das Gemisch wird nun 30 Minuten bei 4 °C und 20000 x g abzentrifugiert. Nach diesem Schritt ist ein Einfrieren des Überstandes möglich.
7. Zwischendurch werden Qiagen-Säulen mit 10 ml Äquilibrations-Puffer äquilibriert.
8. Der Überstand aus Schritt 6 wird in ein frisches Beckman-Zentrifugenglas dekantiert und 15 Minuten bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert.
9. 125 µl des Überstandes werden als Probe 1 asserviert, der Überstand wird anschließend auf eine äquilibriertes Säule aufgetragen. Aus dem Eluat werden 125 µl Probe 2 entnommen. Das Eluat wird verworfen.
10. Die Säule wird zweimal mit 30 ml Wasch-Puffer gewaschen. Aus dem Eluat werden 500 µl als Probe 3 entnommen, sodann wird es verworfen.
11. Auf die Säule werden 15 ml Elutions-Puffer pipettiert, das Eluat wird nach Entnahme von 50 µl Probe 4 in einem 30 ml Borosilicat-Zentrifugenröhrchen asserviert.

12. 10,5 ml Isopropanol (100 %, 20 °C) werden durch Pipettieren mit dem Eluat vermischt, das Gemisch wird sofort 30 Minuten lang bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen.
13. Das Pellet wird mit 5 ml Ethanol (70 %, 20 °C) gewaschen und erneut 10 Minuten bei 4° C und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Das Pellet lässt man an der Luft trocknen.
14. Das Pellet wird in 0,2 ml TE oder ddH₂O gelöst, die Konzentration in 100-facher Verdünnung im Photometer (Beckman DU 640 Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld) bestimmt. Die fertige Probe wird in der Datenbank katalogisiert.

Die DNA der Plasmide pTvL1 und pTvL2, aus denen alle weiteren Plasmide dieser Arbeit hervorgingen, wurde von der Firma Toplab, München sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis stimmte mit den in Genbank veröffentlichten Sequenzen (Acc. # X12617) des *mEgr-1*-Promotors überein.

3.1.8. Cäsiumchlorid-Plasmid-DNA-Präparation

DNA, die zur Transfektion oder Kotransfektion von Zellen in Zellkultur verwendet werden sollte, wurde durch Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. (nach Hitt et al, 1995)

1. 500 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium werden mit etwa 1 ml einer *E. coli*-Kultur, die das gewünschte Plasmid enthält, beimpft und mindestens acht Stunden in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Erlenmeyerkolben schüttelnd inkubiert.
2. Die Kultur wird in einen Beckman-Zentrifugenbecher überführt und 10 Minuten bei 6000 rpm und RT abzentrifugiert, der Überstand wird in den Erlenmeyer-Kolben zurückdekantiert.
3. Das Pellet wird in 40 ml Lysozymlösung (5 mg/ml in 10 mL EDTA, 50 mM Glucose, 25 mM Tris pH 8, vorher frisch ansetzen, auf Eis stellen) resuspendiert.
4. 20 Minuten Inkubation bei RT.
5. 80 ml alkalisches Sodiumdodecylsulfat (1 % SDS, 0,2 M NaOH, frisch ansetzen) zugeben, vorsichtig mischen; Lysat sollte viskös und annähernd klar sein.
6. fünf bis zehn Minuten auf Eis inkubieren.

7. 60 ml 5 M K-Acetat (nach Maniatis (Sambrook et al, 1989): 60 ml 5M K-Acetat + 11,5 ml Eisessig + 28,5 ml H₂O) zugeben, mischen.
8. 15-30 Minuten auf Eis inkubieren.
9. 20 ml ddH₂O zugeben.
10. 30 Minuten bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugieren.
11. Überstand durch Zellstoff in frisches 500 ml-Zentrifugengefäß filtrieren.
12. 120 ml Isopropanol (RT) zugeben, 30 Minuten bei RT inkubieren; hierbei präzipitiert die DNA, nicht aber die RNA.
13. 30 Minuten bei RT und 10000 rpm zentrifugieren.
14. Überstand abkippen, Pellet bei RT 20-30 Minuten trocknen lassen.
15. Pellet in 8 ml 0,1x SSC (Salz-Sodiumcitratlösung; 20x Lösung nach Maniatis (Sambrook et al, 1989): 175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat, 800 ml ddH₂O; pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen) lösen.
16. 8 g CsCl in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen.
17. gelöstes Pellet in Zentrifugenröhrchen überführen, komplett lösen, 30 Minuten auf Eis inkubieren; RNA und Proteine fällen aus.
18. 15 Minuten bei 3800 rpm in Heraeus Varifuge 3.0R (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) zentrifugieren; Überstand vorsichtig in mit 200 µl EthidiumBromid (10 mg/ml) gefülltes 8,9 ml „opti-seal“ Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld) überführen.
19. Röhrchen mit einem „Tube sealer“ (Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld) nach den Angaben des Herstellers verschweißen, durch Invertieren mischen, für 10-14 Stunden bei 14 °C im Ti80-Rotor in einer Ultrazentrifuge bei 55000 rpm zentrifugieren (Beckman Optima LE-80K; Beckman Coulter GmbH – Biomedical Research, Krefeld)
20. Banden unter UV-Licht visualisieren, obere Bande besteht aus chromosomaler DNA, untere Bande aus Plasmid-DNA.
21. Zentrifugenröhrchen mit einer Kanüle am oberen Ende zur Belüftung punktieren. seitlich mit einer weiteren Kanüle punktieren und die Plasmid-Bande vorsichtig mit einer 2ml-Spritze absaugen, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführen.
22. Zur Extraktion des Ethidiumbromid Isopropanol (mit CsCl in 25 mM Tris, 10 mM EDTA gesättigt) zugeben, mischen und fünf Minuten bei 4000 rpm und RT zentrifugieren (Heraeus Varifuge 3.0R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold).

23. Obere Phase (rosa, EtBr) abpipettieren.
24. Die letzten beiden Schritte wiederholen, bis kein EtBr mehr im Überstand ist.
25. Drei Volumina TE zugeben, mit 8 Volumina Ethanol ausfällen.
26. 30 Minuten bei 4000 rpm zentrifugieren, Überstand dekantieren.
27. Einmal mit 100 % Ethanol, zweimal mit 70 % Ethanol waschen (zwischendurch jeweils fünf Minuten bei 4000 rpm zentrifugieren, Überstand abkippen), bei RT trocknen lassen
28. je nach Pellet-Größe in 200-500 µl 0,1 x SSC lösen, Konzentration im Beckman-Photometer messen

3.2. Zellkultur

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur werden grundsätzlich unter der Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der Zelllinien mit Luftkeimen so gering wie möglich zu halten. Bei Experimenten der Sicherheitsstufe 2, bei denen beispielsweise mit Viren gearbeitet wird, dient das Arbeiten unter der Sterilbank auch dazu, die Kontamination der Laborräume und des Personals zu vermeiden. Bei Arbeiten mit Viren sind grundsätzlich gestopfte Pipettenspitzen zu verwenden, welche gesondert entsorgt werden müssen.

Die Zellen werden in Zellkulturinkubatoren (Forma Scientific Water Jacketed Incubator, ThermoLifeScience, Egelsbach) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

3.2.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Aktuell nicht in Kultur benötigte Zellen können in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Dazu werden die Zellen nach dem für die jeweilige Zelllinie gültigen Protokoll von der Zellkulturschale gelöst, abzentrifugiert und pro $1-2 \times 10^6$ Zellen in 900 µl FCS (Fötales Kälberserum) resuspendiert. Reaktionsgefäße (cryotube vials, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) werden mit dem Namen der Zelllinie, der Passagenummer und dem Datum des Einfrierens beschriftet und mit 100 µl Dimethyl-sulfoxid (DMSO) befüllt. Pro cryotube vial werden 900 µl Zellsuspension zugegeben, anschließend wird das vial mehrfach invertiert und sofort in eine mit Isopropanol befüllte Nalgene^R Kühleinheit verbracht. Diese wird nun in den Gefrierschrank gestellt (-80 °C). Durch das umgebende Isopropanol werden die Zellen um etwa 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Dies verhindert die intra- und extrazelluläre

Kristallbildung. Nach 24 Stunden werden die Reaktionsgefäße in einen Stickstofftank verbracht und bei $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zum Auftauen einer Zellsuspension wird ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml des für die jeweilige Zelllinie benötigten Nährmediums befüllt. Die Zellsuspension wird aus dem Stickstofftank entnommen und zügig durch Schwenken des cryotube vial im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Sobald die Suspension aufgetaut ist, wird in das durch Abwischen mit 70%igem Ethanol dekontaminierte cryotube vial unter der Sterilbank 1 ml Medium pipettiert. Das gesamte Volumen wird nun in das vorbereitete 15ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wird drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt. Das Pellet wird resuspendiert und in ein entsprechend beschriftetes 25 cm^2 großes Zellkultur-Fläschen oder Schälchen überführt. Nachdem sich die Mehrzahl der Zellen abgesetzt hat - dies dauert etwa sechs Stunden - wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um verbleibende Spuren des DMSO zu entfernen.

Generell sollten Zellen, die soeben passagiert wurden, für mindestens sechs Stunden im Inkubator verbleiben, da häufiges Bewegen der Kulturschalen ein gleichmäßiges Absetzen der Zellen verhindert und diese sich dann in stark unterschiedlichen Stadien der Konfluenz befinden, was die Handhabung jeder Zelllinie erschwert.

3.2.2. Zelllinie 293

Die Zelllinie 293 stammt ursprünglich aus menschlichem Nierengewebe und wurde mit viraler DNA aus dem Adenovirus Typ 5 transformiert. Sie enthält DNA aus dem linken Ende des adenoviralen Genoms, unter anderem das virale Verpackungssignal sowie die Region E1. Dadurch können aus E1-deletiertem viralem Genom in dieser Zelllinie Viruspartikel angezüchtet und gewonnen werden (Graham FL et al, 1977; S. 59-74).

293-Zellen werden, wenn sie zu etwa 80 % konfluent sind, in einem Teilungsverhältnis von maximal 1:3 passagiert. Als Nährmedium wird MEM (*Minimal Essential Medium with Earl's salts*; Seromed FG 0325) verwendet, zu dem 1 % Glutamin (Biochrom AG, Berlin) und 10 % NAFCS (Nordamerikanisches Fötale Kälberserum) zugesetzt werden (Prozentangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Medium). Zwischen zwei Passagierungen liegen drei bis fünf Tage, in der Regel ist zwischendurch ein Mediumwechsel¹ vonnöten.

Zum Passagieren wird das Medium am Rand der gekippten Zellkulturschale abgesaugt, anschließend werden die Zellen einmal mit 1x Citrat-gepufferter Salzlösung² (nach Hitt et al,

1995; S. 13-30) gewaschen, welches sofort wieder gänzlich abgesaugt wird. Nun wird erneut Citrat-gepufferte Salzlösung zugegeben und bis auf einen Rest von etwa 0,5 ml aspiriert. Die Schale wird daraufhin für maximal fünf Minuten in den Inkubator verbracht, wobei sich der Großteil der Zellen von der Schale löst. Die restlichen Zellen werden durch dezentes Klopfen gegen die Hand abgelöst, der Inhalt der Schale wird sodann in Nährmedium³ durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, bis eine Einzelzellsuspension vorliegt. Diese wird auf zwei oder drei frische Kulturschalen verteilt und mit der jeweils benötigten Menge Nährmedium aufgefüllt¹.

Falls auf eine größere Anzahl neuer Kulturschalen passagiert werden soll, wird ein Ausgangsvolumen vorbereitet, das dann auf die einzelnen Schalen aliquotiert wird. Hierdurch wird eine annähernd gleiche Zellzahl pro Schale gewährleistet.

Rezept für 10x Citrat-gepufferte Salzlösung:

50 g KCl, 22 g NaCitrat, 500 ml ddH₂O, Sterilisation durch Autoklavieren (20 Minuten bei 120 °C).

einzusetzende Mengen des Nährmediums:

¹: 5 ml/60 mm(-Schale), 10 ml/10 cm, 25 ml/15 cm

²: 3 ml/60 mm, 5 ml/10 cm, 10 ml/15 cm

³: 10 ml/10 cm oder 15 cm

3.2.3. Zelllinie R1H

R1H-Zellen (Barendsen et al, 1969; S. 373-91) können alle zwei bis vier Tage in einem Teilungsverhältnis von bis zu 1:10 passagiert werden. Nach Absaugen des Nährmediums werden die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Biochrom AG, Berlin) pro 10 cm-Schale gewaschen und anschließend mit einem halben Milliliter Trypsinlösung (Biochrom AG, Berlin) für etwa fünf Minuten in den Inkubator verbracht. Nun lassen sich die Zellen durch Klopfen leicht von der Kulturschale ablösen und können in 5 ml Medium (DMEM (Biochrom AG, Berlin) + 10 % FCS (Seraplus FBS, Pan Biotech GmbH, Aidenbach)) resuspendiert werden. Die Resuspension wird entweder anteilig auf die gewünschte Anzahl neuer Schalen verteilt oder mit einem Ausgangsvolumen vermischt, welches sodann aliquotiert wird.

Das Originalprotokoll sieht vor, die Zellen nach der Resuspension im Medium zu zentrifugieren und erneut zu resuspendieren. Da die R1H-Zelllinie jedoch geringe Mengen Trypsin problemlos toleriert, wurde auf diesen Schritt verzichtet.

3.2.4. Transfektion

Plasmid-DNA wurde durch die zuerst von Graham und van der Eb beschriebene Methode der Calciumphosphatkopprazipitation (Graham et al, 1973; 536-539) in Zellen eingeführt. Die Methode wurde wie bei Hitt et al. beschrieben durchgeführt (Hitt et al, 1995; S. 13-30). Zur Transfektion eines Plasmides in eine geeignete Zelllinie, in unserem Fall 293, werden die Zellen auf 6cm-Schälchen oder 25cm²-Fläschchen ausgelegt und in annähernd konfluentem Zustand, meist einen Tag nach der Aussaat, verarbeitet. Zum Auslegen der Zellen verwendet man F11-Medium, dem Glutamin und NAFCS in einer Endkonzentration von je 10 % zugesetzt wurden.

Pro Schälchen werden etwa 5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Hierzu wird ein Ansatz aus 0,5 ml HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsaure)-gepufferter Salzlösung (HEBS) und 5 µl Träger-DNA (aus Lachssperma) in einem Polystyrol-Reaktionsgefäß vorgelegt, in den die Plasmid-DNA verbracht wird. Zu diesem Ansatz von 0,5 ml werden tropfenweise 25 µl CaCl zugegeben, dabei wird das Röhrchen sanft geschüttelt. Bei diesem Schritt präzipitiert die DNA, das Präzipitat lässt sich in den durchsichtigen Röhrchen nach 10-15 Minuten gut erkennen. Anschließend wird der gesamte Ansatz vorsichtig auf das jeweilige Schälchen pipettiert, wobei eine gleichmäßige Verteilung anzustreben ist. Da meist mehrere Proben transfiziert werden, empfiehlt sich die Vorbereitung eines Ausgangsvolumens aus HEBS, Träger-DNA und Plasmid-DNA, zu der die entsprechende Menge CaCl zugegeben wird.

Am Tag nach der Transfektion wird ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.3 Konstruktion und Charakterisierung adenoviraler Vektoren (AdV)

3.3.1. Kotransfektion

Zur Konstruktion adenoviraler Vektoren wurde das Ruckgratplasmid pBHG10 mit verschiedenen, unter 4.1. beschriebenen Shuttleplasmiden kotransfiziert. Das Ruckgratplasmid enthält den Groteilst des adenoviralen Genoms, ist jedoch E1- und E3-deletiert und enthält kein Verpackungssignal. Shuttle-Plasmide bestehen aus dem linken Ende des Ad-Genoms (L-ITR, *inverted terminal repeats*; Ψ, Verpackungssignal; E1-Deletion). Sie

enthalten eine ca. 3 kb lange homologe Sequenz zu pBHG10; die E1-Region wurde durch eine Expressionskassette für Fremdgene ersetzt. Replikationsdefiziente, rekombinante AdV entstehen durch spontane homologe Rekombination der kotransfizierten Vektoren.

Bei der Kotransfektion werden zwei oder mehrere verschiedene Plasmide in eine geeignete Zelllinie transfiziert, wobei durch Rekombination im beschriebenen Fall lineare AdV-Genome entstehen. Da das von uns verwendete Adenovirus replikationsdefizient ist, können Viruspartikel nur bei Kotransfektion der Plasmide in bestimmte Zelllinien, z.B. 293, entstehen. Diese Zelllinie enthält die zur Replikation der E1-deletierten AdV notwendigen E1-Region.

Die Kotransfektion mehrerer Plasmide verläuft analog zur Transfektion (s. 3.2.4.), jedoch muß CsCl-gereinigte DNA verwendet werden. Des weiteren wird als Positivkontrolle das Plasmid pFG140 (Graham FL et al, 1991; S. 109-127) transfiziert, das ohne spontane homologe Rekombination Virus-Plaques (makro- und mikroskopisch erkennbar als lytische Bezirke im Zellrasen) hervorruft, da es das gesamte Genom des Adenovirus Typ 5 enthält. Nach homologer Rekombination entstehen innerhalb von ca. zwei Wochen Virusplaques. Um die Isolation von einzelnen Viren zu ermöglichen, werden die Zellen am Tag nach der Kotransfektion mit einem Medium-Agarosegemisch überschichtet. Hierzu werden benötigt (am Beispiel eines 130ml-Ansatzes):

- 1 % Agarose (Roche, Penzberg) (steril), die im Mikrowellenherd geschmolzen und dann im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt wird, dabei jedoch flüssig bleibt
- 2x-F11-Ansatz, bestehend aus: 50 ml 1x F11 (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 6 ml 10x F11, 1,6 ml NaHCO₃ (Trockensubstanz von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) 7,5 %, 0,2 ml Fungizone (Amphotericin B, Biochrom AG, Berlin, 250 µg/ml (500x)), 1 ml Penicillin/Streptomycin (10 000 IE/10.000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin), 0,5 ml Glutamin (200 mM, Biochrom AG, Berlin), 1 ml Hefeextrakt 5 % (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 5 ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert, Biochrom AG, Berlin)

Der F11-Ansatz wird ebenfalls im Wasserbad auf 45 °C erwärmt, anschließend werden an der Sterilbank 65 ml 1x Agarose und 65 ml 2x-F11-Ansatz in eine 250ml-Glasflasche zusammen pipettiert und durchmischt. Diese wird in ein mit 45 °C warmem Wasser befülltes Becherglas gestellt, um ein vorzeitiges Aushärten der Agarose zu vermeiden.

Nun werden die Schälchen oder Flaschen mit den kotransfizierten Zellen unter die Sterilbank gestellt und das Medium wird zügig abgesaugt. Pro 6cm-Schälchen bzw. 25cm²-Flaschen werden 10 ml des Medium-Agarose-Gemisches hinzupipettiert. Um die Vibrationen des

Inkubators zu umgehen, läßt man die Agarose außerhalb des Inkubators aushärten, dies dauert etwa 15-30 Minuten. Danach werden die Proben in den Inkubator verbracht.

3.3.2. Amplifikation der Viren

Um einen größeren Virus-Bestand anzuzüchten, müssen zunächst die in der Kotransfektion entstandenen Plaques geerntet und weiterverarbeitet werden. Hierzu wird pro Plaque ein cryotube Reaktionsgefäß mit etwa 1 ml PBS²⁺/10 % Glycerin vorbereitet. Die Plaque wird mit einer gestopften Pasteurpipette ausgestochen, die Gelschicht-Fragmente werden in das cryotube Reaktionsgefäß überführt. Die Ausstichstelle der Plaque auf der Kulturschale wird, falls nicht mehrere Plaques dicht beieinander liegen, mit etwas PBS²⁺/Glycerin-Lösung gespült, die Lösung wird zurück ins cryotube Reaktionsgefäß verbracht. Das Reaktionsgefäß muß nun dreimal eingefroren und wiederaufgetaut werden, hierbei werden intrazelluläre Viruspartikel freigesetzt.

Im nächsten Schritt wird mit jedem geernteten Plaque ein 6cm-Schälchen 293-Zellen infiziert. Die Zellen sollten hierfür zu 60-80 % konfluent sein. Zuerst wird das Nährmedium abgesaugt, 200 µl der Virussuspension werden auf das Schälchen pipettiert, dieses wird einige Male geschwenkt und für 15 Minuten in den Inkubator verbracht. Anschließend wird es erneut geschwenkt und nochmals für 15 Minuten inkubiert. Nun werden die Zellen mit 5 ml MEM + 5 % Pferdeserum gefüttert und für 3-5 Tage im Inkubator belassen.

Nach dieser Zeit ist der Großteil der Zellen infiziert und lysiert worden. Der Überstand, der freie Viren sowie Virus enthaltende Zellvesikel enthält, wird nun abpipettiert und in ein cryotube Reaktionsgefäß verbracht. Zum Einfrieren wird diese Probe noch mit 100 % Glycerin auf eine Endkonzentration von 10 % Glycerin aufgefüllt.

Auf das Kulturschälchen, das noch Viruspartikel in nicht abgelösten Zellen enthält, wird eine SDS/Pronase-Lösung (Hitt et al, 1995; S. 13-30) gegeben, und zwar 450 µl SDS-Lösung + 50 µl Pronase (5 U/µl).

So vorbehandelt wird es erneut eine Nacht bei Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert, bevor die Zellen am nächsten Tag der Phenolextraktion (s. 3.3.3.) zugeführt werden.

Falls die Ergebnisse der Virus-Analyse (s. 3.3.3.) das gewünschte Ergebnis bringen, so wird nun mit der im letzten Schritt gewonnenen Virus-Suspension ein größerer Virusbestand angezüchtet. Hierzu werden 2 ml der Suspension mit 14 ml PBS²⁺ verdünnt. Mit je 2 ml

dieser Verdünnung werden insgesamt acht 15cm-Schalen 293-Zellen auf üblichem Wege infiziert.

Je nach Virustiter wird das Lysat nach 3-5 Tagen geerntet. Hierzu wird ein Großteil des Mediums von den Schalen abpipettiert und auf insgesamt vier 50ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Die noch auf den Schalen haftenden Zellen werden mit einem Zellschaber gelöst und im verbliebenen Medium in die Zentrifugenröhrchen verbracht. Diese werden nun bei 1200 rpm für drei Minuten zentrifugiert, anschließend wird der Überstand abgesaugt. Das Pellet eines Zentrifugenröhrchens wird in 2 ml PBS²⁺ resuspendiert. Dieses Volumen wird, nachdem auch die anderen Pellets darin gelöst wurden, in ein 6ml-Röhrchen überführt. Die Zentrifugenröhrchen werden erneut mit 1,5 ml PBS²⁺ gespült, dieses Volumen wird in dasselbe 6ml-Röhrchen verbracht, welches dann bei -80 °C eingefroren wird. Vor der Titration (s. 3.3.4.) muß die Viruslösung dreimal eingefroren und wiederaufgetaut werden.

3.3.3. Phenolextraktion

Um die Virus-DNA, die bei der Infektion des 6cm-Schälchens in hierfür ausreichender Menge anfällt, durch Restriktionsenzyme und Gelelektrophorese analysieren zu können, muß die DNA zuerst mittels Phenolextraktion gereinigt werden. Die einzelnen Arbeitsschritte sollen hier stichpunktartig wiedergegeben werden.

Alle Arbeitsschritte mit Phenol müssen unter einem Abzug durchgeführt werden, Kittel, Handschuhe und Schutzbrille sind obligat.

- die SDS/Pronase-Mischung (s. 3.3.2.) wird in zwei 2ml-Reaktionsgefäße überführt
- mit gleichem Volumen Tris/HCl-gepuffertem Phenol (Rotit^R-Phenol, Carl Roth, Karlsruhe) auffüllen (untere Phase in der Flasche), 5 Minuten durch invertieren mischen
- 15 Minuten bei 15 °C und 14000 rpm zentrifugieren
- obere Phase abpipettieren, in neues 2ml-Reaktionsgefäß überführen
- ~ 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat zugeben, mit 100 % Ethanol auffüllen
- invertieren, bis DNA-Faden sichtbar wird
- 20-30 Minuten unter obigen Bedingungen zentrifugieren
- Überstand in ein Reaktionsgefäß kippen, später als Phenolabfall entsorgen
- 1 ml 100 % Ethanol zu den Pellets geben
- 5-7 Minuten zentrifugieren (s.o.)

- die letzten drei Schritte wiederholen
- Überstand abkippen, es sollte kein Phenolgeruch mehr wahrnehmbar sein
- 1 ml 70 % Ethanol zugeben
- 5-7 Minuten zentrifugieren
- Überstand abkippen, Pellets trocknen lassen, erstes Pellet in 50 µl TE-Puffer lösen, mit diesem Volumen auch zweites Pellet lösen; die so erhaltene DNA kann bei 4 °C oder bei -20 °C aufbewahrt werden

Die so erhaltene Virus-DNA wird mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese analysiert. Der Verdau setzt sich typischerweise folgendermaßen zusammen:

- 5 µl DNA
- 4 µl One-Phor-All-Buffer (10x, Endkonzentration 2x; Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg)
- 8 µl ddH₂O
- 2 µl *PvuI* (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg)
- 1 µl RNase, DNase-frei

Nach 60-120 Minuten Inkubation bei 37 °C werden noch 1 µl Pronase (5 U/µl) hinzugegeben. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur fügt man Probenauftragspuffer (s. 3.1.2) hinzu und erhitzt für fünf Minuten auf 65 °C.

Den Ansatz trägt man nun zusammen mit dem Größenstandard auf ein großes 0,8%iges TBE-Gel auf (2 g Agarose, 250 ml 1x TBE-Puffer, 12 µl EthidiumBromid) und legt daran über Nacht eine Spannung von 30 V an. Am nächsten Tag erhöht man die Spannung für etwa eine Stunde auf 100 V und beurteilt dann die verschiedenen Fragmente unter UV-Licht. Zeigen sich die erwarteten Banden, wird das Virus amplifiziert (s. 3.3.2.).

3.3.4. Virus-Titration

Durch die Titration läßt sich die Konzentration des Virusbestandes bestimmen, die in „Plaque Forming Units“/ml (PFU/ml) angegeben wird. Hierzu werden je zwei 10⁻⁷- und 10⁻⁸-Verdünnungen des Bestandes erstellt, und zwar in Zehnerschritten und zwei unabhängigen Verdünnungsreihen. Vorgelegt werden hierfür 2x1 Reaktionsgefäß mit 90 µl sowie 2x7 Reaktionsgefäße mit 540 µl PBS²⁺. Aus dem Virusbestand werden 10 µl in das erste

Reaktionsgefäß mit 90 µl PBS²⁺ überführt, dies entspricht einer 10⁻¹-Verdünnung. Nach dreimaligem vortexen werden mit einer frischen Pipettenspitze 60 µl in das nächste Reaktionsgefäß mit 540 µl überführt, dies entspricht der 10⁻²-Verdünnung. Dies wiederholt man bis zur 10⁻⁸-Verdünnung, von dieser und der vorherigen werden je zweimal 200 µl auf 6cm-Schälchen mit subkonfluenten 293-Zellen (Nährmedium vorher absaugen) pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation werden die Zellen mit einem F11-Agarose-Gemisch überschichtet (s. 3.3.1.). Wegen der zwei unabhängigen Verdünnungsreihen und der zwei Verdünnungen, mit denen je zweimal infiziert wird, erhält man also acht infizierte Schalen 293.

Nach dem siebten und dem zehnten Tag werden die im Zellrasen entstandenen Plaques gezählt. Die Werte des zehnten Tages werden gemittelt und ergeben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration des Virusbestandes. Anzustreben sind Werte zwischen 10⁹ und 10¹¹ PFU/ml.

3.3.5. Infektion

Bei Infektionen im Rahmen eines Versuchs muß die Zellzahl pro Schale bekannt sein, um die gewünschte Anzahl PFU einsetzen zu können. Das Verhältnis zwischen der Zahl der zu infizierenden Zellen und der eingesetzten Virusmenge wird als „Multiplicity Of Infection“ (MOI) ausgedrückt, nach der Formel $MOI = PFU/Zellzahl$.

Um die Zellzahl pro Schale zu bestimmen, zählt man entweder unmittelbar vor der Infektion die Zellen einer Schale mittels NeubauerTM-Zählkammer, oder man rechnet mit der eingesetzten Zellzahl. Um verschiedene Experimente miteinander vergleichen zu können, muß jedoch eine Methode beibehalten werden. In unserem Fall wurde mit der eingesetzten Zellzahl gerechnet.

Generell wird anhand der vorher festgelegten MOI sowie anhand der Zellzahl pro Schale die einzusetzende PFU errechnet. Für alle gleich zu behandelnden Schalen wird ein Ansatz vorbereitet, aus dem Aliquots für die einzelnen Schalen entnommen werden. Für die einzelnen, zu dem Ansatz zu pipettierenden Volumina gilt mindestens n (Anzahl der Schalen) + 1, um sicherzustellen, daß jede Probe das volle Volumen ihres Aliquots erhält.

Die für die jeweilige Infektion benötigte Virusmenge wird mit PBS²⁺ auf ein größeres Volumen aufgefüllt, da sich einerseits sehr kleine Volumina schlechter pipettieren lassen und andererseits ein Mindestvolumen zur Benetzung des Zellrasens gewährleistet sein muß. Im Falle der 6cm-Schälchen werden üblicherweise nach Absaugen des Nährmediums 200 µl der

verdünnten Virussuspension auf das Schälchen pipettiert und dieses für 30 Minuten in den Inkubator gestellt. Anschließend wird mit dem für den jeweiligen Versuchsaufbau nötigen Nährmedium nachgefüttert. Für gewöhnlich erfolgt tags darauf erneut ein Mediumwechsel, dieser wurde aber teilweise als Modifikation des Versuchsaufbaus unterlassen.

3.4. Bestrahlungsexperimente

Die Bestrahlungsversuche wurden an der Klinik & Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt. Dosimetrische Messungen wurden durchgeführt um sicherzustellen, daß die Proben die vorgesehenen Strahlendosen erhalten. Die Röntgenstrahlung wurde mit einem Dosimeter (Modell SN4, PTW-Freiburg GmbH, Freiburg, Deutschland) mithilfe einer für weiche Röntgenstrahlung kalibrierten Ionisierungskammer (M23342) vermessen. Die Kammer wurde in einem zwei Zentimeter dicken Kunststoffbehälter positioniert, der den Acrylplatten entsprach, in denen die Zellen bestrahlt wurden. Die Zellen wurden unter Raumluft und Raumtemperatur in einem Bestrahlungsgerät mit 70kV-Röntgenstrahlung bestrahlt (Modell RT100, Philips Medizin Systeme, Hamburg, Deutschland). Es kamen 1,25 mm dicke Aluminiumfilter und eine Dosisrate von 0,79 Gy/min zur Anwendung. Die Proben wurden auf Acrylplatten positioniert, um rückwärtige Streustrahlung zu gewährleisten. Die unbestrahlten Proben wurden während der Bestrahlung identischen Umgebungsbedingungen ausgesetzt.

3.5. Auswertung

3.5.1. Fluoreszenz-Mikroskopie

Mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Inverses Mikroskop Axiovert 25, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) wurde durch Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm die EGFP-Expression der transfizierten bzw. infizierten Zellen visualisiert und fotografiert.

3.5.2. Kristallviolettfärbung adhärenter Zellen und Bestimmung der Lebendzellzahl

Um Zellen auf dem Boden der Kulturschale zu fixieren und gleichzeitig zu färben, verwendet man Kristallviolettlösung (Hexamethylenpararosanilinchlorid, $C_{25}H_{30}ClN_3$; Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Frankfurt). Hierzu wird das Nährmedium vollständig abgesaugt und der Boden der Schale vollständig mit Kristallviolettlösung bedeckt. Nach fünf bis zehn Minuten wird die Kristallviolettlösung über einen Papierfilter zurück in die Flasche verbracht. Die Schalen werden in einem mit kaltem Wasser gefüllten Waschbecken ausgewaschen und kopfüber für 12-24 Stunden getrocknet. Die Zahl der adhärenter Zellen wurde durch Auszählen von 10 Gesichtsfeldern bei einer 200-fachen Vergrößerung im Mikroskop bestimmt.

3.5.3. Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblau

Vitalitätstests werden verwendet, um den Anteil vitaler Zellen nach einer zytotoxischen Prozedur zu bestimmen. Die meisten Vitalitätstests beruhen auf der veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen. Vitale Zellen nehmen Farbstoffe wie Trypanblau aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht ins Cytosol auf oder schleusen sie wieder aus. Vitale Zellen erscheinen daher unter dem Mikroskop farblos, während tote Zellen blau angefärbt werden.

Vorgehensweise:

1. 20 μ l der Zellsuspension (mindestens 2×10^5 , höchstens 4×10^7 Zellen/ml) werden mit 80 μ l einer 0,5%igen Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) gemischt.
2. Ein Hämozytometer (z.B. Neubauer^R-Zählkammer) wird angehaucht und mit einem Deckglas versehen. Das Auftreten der sogenannten Newton'schen Ringe zeigt das richtige Anbringen des Deckglases an.
3. Die Zählkammer wird mit der angefärbten Suspension vollständig befüllt. Ein Über- bzw. Unterfüllen sollte vermieden werden.
4. Bis zur Auswertung ein bis zwei Minuten warten, damit sich die Zellen am Boden absetzen können.
5. Zur Auswertung wird die Zählkammer unter ein Mikroskop mit 10-40-fach vergrößerndem Objektiv gelegt und die Einteilungslinien der Kammer ins Blickfeld geschoben.

6. Es wird die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der blau gefärbten Zellen bestimmt. Der Prozentsatz der ungefärbten Zellen entspricht dem Anteil vitaler Zellen.

3.6. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde Microsoft Excel 2000TM (Microsoft Corporation, Redmond, WA) verwendet. Bei der Auswertung der mit Kristallviolett gefärbten Proben wurden je Probe zehn Gesichtsfelder ausgezählt, hieraus wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler der Mittelwertes errechnet. Die einzelnen Werte wurden mittels zweiseitigem Fischer-t-Test auf Signifikanz überprüft, ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant definiert. Bei der Auswertung mittels Trypanblau wurden je Probe 10 große Quadrate des Hämocytometers ausgezählt.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung der Vektoren

Zur Herstellung replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren müssen zunächst die DNA-Abschnitte, die die Promotorregion *Egr-1* und das Reportergen EGFP oder das Suizidgen HSV-TK enthalten, in sogenannten „Shuttlevektoren“ konstruiert werden. Die dazu notwendigen Subklonierungsschritte sind in Abb. 1-3 schematisch dargestellt und im Folgenden genau beschrieben.

4.1.1. Herstellung von Shuttleplasmiden

pTvL1

Im ersten Klonierungsschritt wurde die *Egr-1*-Promotor/Enhancer-Region aus dem Plasmid pE425 (Tsai-Morris et al, 1988; S. 8835-46) in das Plasmid pΔE1sp1A (Bett et al, 1994; S. 8802-8806) subkloniert, welches aus dem linken Ende des adenoviralen Genoms besteht. Das entstandene Plasmid wurde pTvL1 genannt (Abb. 1).

Dazu wurde das den *Egr-1*-Promotor enthaltende, ca. 500 Basenpaare (bp) große Fragment mittels *SalI/XbaI*-Verdau aus pE425 gewonnen und ebenso wie das 6,4 Kilobasenpaare (kb) große *SalI/XbaI*-verdaute, dephosphorylierte pΔE1sp1A in der Gelelektrophorese identifiziert. Nach Elution aus *low-melting* Agarose wurden die Fragmente ligiert, in DH10B-Zellen transformiert und die entstandenen Kolonien in LB-Medium inkubiert. Nach Präparation der DNA wurde ein Kontroll-Verdau mit *SalI/XbaI* und RNase (5 U/μl; Roche, Penzberg) durchgeführt. Eine Probe wies das erwartete Bandenmuster von 6,4 kb und 500 bp auf und wurde zur DNA-Gewinnung verwendet.

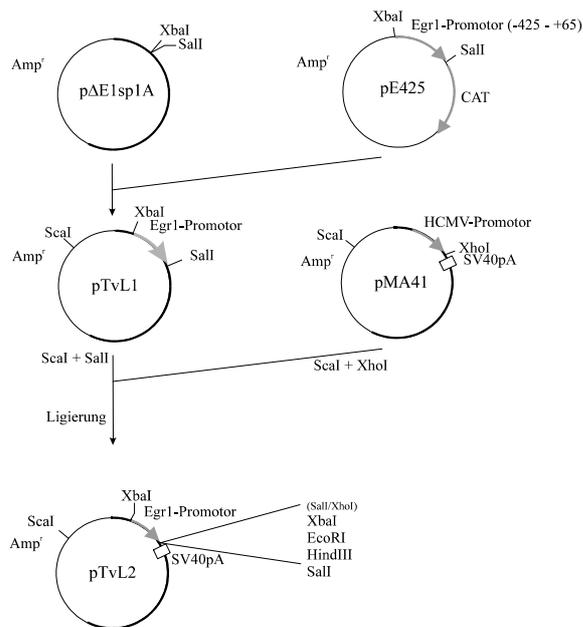


Abbildung 1: Klonierungsschema von pTvL1 und pTvL2

pTvL2

Um einen Ausgangsvektor herzustellen, der die Insertion verschiedener Transgene erlaubt, wurde unter Beibehaltung von Teilen der multiplen Klonierungsstelle in 3'-Position vom *mEgr-1*-Promotor das aus dem Simianvirus 40 stammende Polyadenylierungssignal (SV40pA) inseriert. Dazu wurde pMA41 (Martina Anton, persönliche Mitteilung) mit *ScaI* und *XhoI* verdaut, pTvL1 mit *ScaI* und *SalI*. Das 5,6kb-Fragment aus pMA41, welches das Ampicillin-Resistenz-Gen (beta-Lactamase (*bla*)) sowie das SV40pA-Fragment enthielt, wurde mit dem 1,3kb-Fragment aus pTvL1, in welchem die *Egr-1*-Promotor-Region enthalten war, ligiert (Abb. 1). Der nach Transformation und DNA-Präparation durchgeführte *XbaI*-Verdau ergab die erwarteten Fragmente und bestätigte die Klonierung von pTvL2.

pTvL3

Um die Aktivität des *Egr-1*-Promotors einfach visualisieren zu können, wurde das Reporter-gen EGFP aus pEGFP (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) in pTvL2 subkloniert. Die durch Restriktion mit *EcoRV* entstandenen DNA-Enden von pTvL2 weisen keinen 3-6bp langen Einzelstrang auf, sondern enden als stumpfer Doppelstrang. Daher wurden die Einzelstrang-Enden des mit *XbaI* geschnittenen EGFP-Fragments mithilfe eines Nukleotidgemisches und einer T4-DNA-Polymerase zu Doppelsträngen aufgefüllt. Nach

Ligation der Fragmente, Transformation in DH10B und nachfolgender Plasmidisolierung erfolgte ein *Bam*HI-Kontrollverdau, um die richtige Orientierung des Inserts zu überprüfen: Bei Auftreten eines 7300 bp- und eines 476 bp-Fragmentes ist eine Expression des dem *mEgr-1*-Promotor nachgeschalteten Gens möglich, bei invertierter Orientierung (6549 bp und 1227 bp) hingegen nicht. Das Plasmid mit der gewünschten Orientierung wurde pTvL3 bzw. pEgr-1.EGFP genannt (Abb. 2).

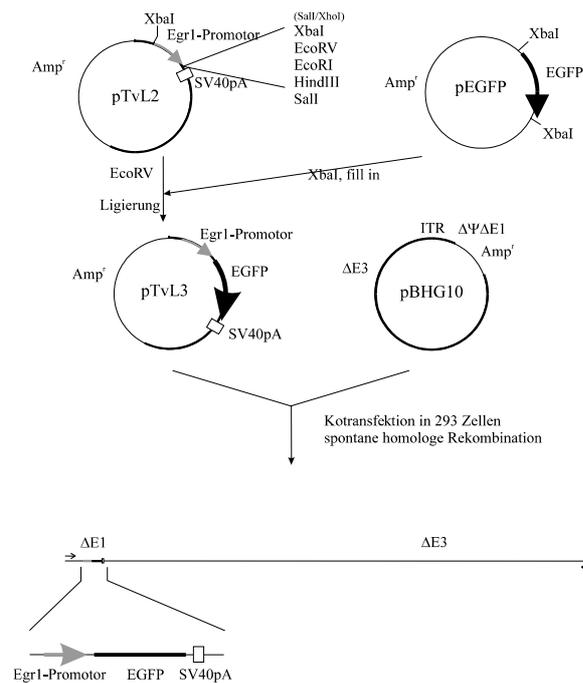


Abbildung 2: Klonierschema pTvL3; Rekombination zu AdTvL3

pTvL4

pEgr-1.HSV-TK (Synonym pTvL4) entstand durch Subklonierung des 1200 bp großen, das HSV-TK-Gen tragenden Fragmentes, welches mittels *Eco*RI- und *Hind*III-Verdau aus pSW15 (Martina Anton, persönliche Mitteilung) gewonnen wurde, in das mit *Eco*RI und *Hind*III verdaute pTvL2 (Abb. 3). Der Kontrollverdau mit *Eco*RI/*Hind*III bestätigte die Fragmentvorhersage für pTvL4 von 7 kb und 1,2 kb.

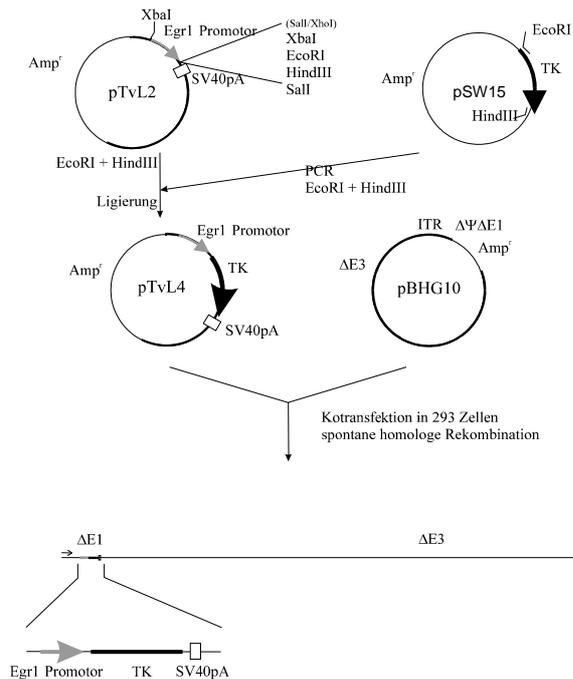


Abbildung 3: Klonierungsschema pTvL4; Rekombination zu AdTvL4

pTvL6

pBGH-pA.Egr-1.EGFP (Synonym pTvL6) entstand durch den Einbau des aus pRc/RSV (Vassaux et al, 1999; S. 1192-1197) gewonnenen Silencers BGH (siehe Einleitung) in pTvL3. Nach *Xho*I-Verdau und Dephosphorylierung beider Plasmide wurde die BGH (*bovine growth hormone*)-pA-Region aus pRc/RSV als Insert in pTvL3 subkloniert, in 5'-Position zur Expressionskassette (Abb. 4). Im Kontrollverdau mit *Xho*I wiesen mehrere Klone den Vektor pTvL3 (7,83 kb) sowie das Insert BGH-pA (290 Bp) auf. Da es sich bei pTvL6 um eine ungerichtete Klonierung handelte, wurde noch ein Kontrollverdau mit *Sac*I durchgeführt. Die Fragmentvorhersage für pTvL6 mit richtig orientiertem Insert (4,2 kb, 2,0 kb, 1,9 kb) erfüllten mehrere Klone. Die anderen Klone wiesen die vorhergesagten Banden für pTvL6 mit revers orientiertem Insert auf (4,5 kb, 2,0 kb, 1,6 kb).

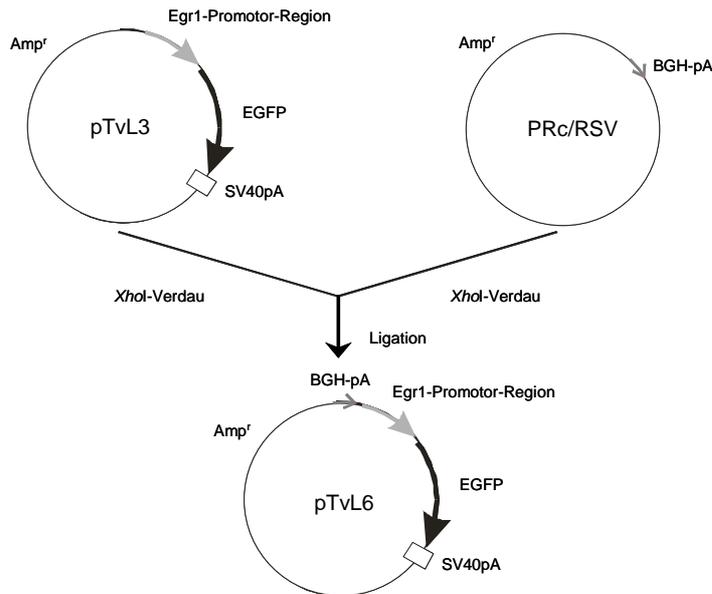


Abbildung 4: Klonierungsschema pTvL6

pTvL7

pTvL7 (pBGH-pA.Egr-1.EGFP.BGH-pA) entstand aus pTvL6 und pRc/RSV. Das mit *Bam*HI aus pRc/RSV ausgeschnittene BGH-pA-Fragment (363 bp) wurde in das mit *Bg*III verdaute pTvL6 subkloniert (Abb. 5). Da pTvL6 zwei *Bg*III-Schnittstellen enthält (an Position 1172 und 2118), wurde ein Partialverdau durchgeführt. Die Fragmentvorhersage ließ ein 8120bp-Fragment für einen partiellen Verdau sowie zwei Fragmente von 7174 bp und 946 bp für den Totalverdau erwarten. Nach Verdau und Gelelektrophorese wurde das 8120bp-Fragment ausgeschnitten und nach Präparation zur Ligation mit dem BGH-pA-Fragment aus pRc/RSV verwendet. Nach Transformation, Amplifikation in DH10B-Zellen und Präparation der DNA wurde ein Kontrollverdau mit *Sac*I durchgeführt. Ein Klon erfüllte die Fragmentvorhersage für pTvL7 (Tab. 1).

pTvL7 (gewünschtes Plasmid)	pTvL6 (Vektor ohne Insert)	pTvL7r (Insert revers orientiert)	pTvL7a (Insert am falschen Ort)	pTvL7ar (Insert am falschen Ort, falsch orientiert)
4261	4261	4261	4261	4261
2018	2003	2003	2003	2003
2003	1856	1815	1350	1147
201		404	869	1072

Tabelle 1: Fragmentvorhersage für *Sac*I-Verdau der pTvL7-Ligation. (Fragmentgrößen in bp).

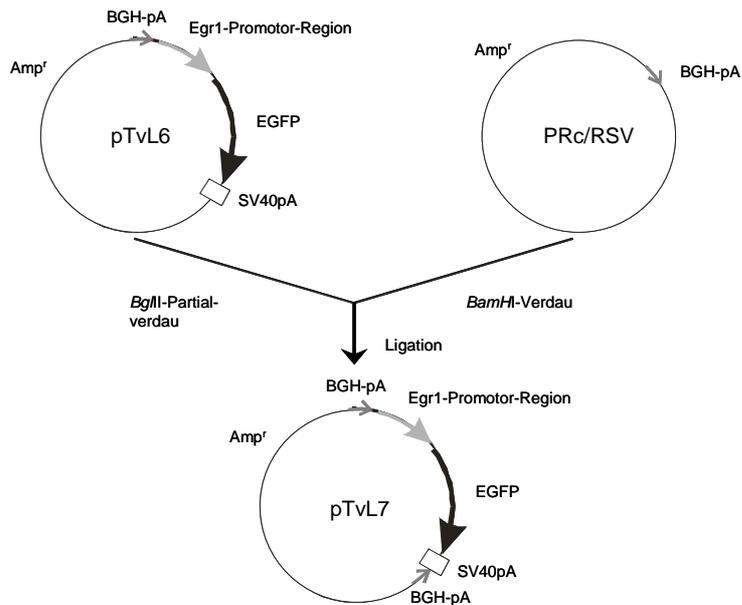


Abbildung 5: Klonierungsschema pTvL7

4.1.2. Herstellung der adenoviralen Vektoren

AdTvL3

Zur Gewinnung des Ad.Egr-1.EGFP-Virus (Synonym AdTvL3) wurden CsCl-gereinigte DNA-Proben von pTvL3 und pBHG10 (Bett et al, 1994; S. 8802-8806) in 293-Zellen kotransfiziert (Abb. 2). Als Positivkontrolle wurde pFG140 verwendet. Nach ca. 10-14 Tagen auftretende Plaques wurden geerntet und die darin enthaltenen Viren zur Infektion von 6cm-Schälchen 293-Zellen verwendet. Nach 6 Tagen wurde ein zytopathischer Effekt beobachtet und der Überstand asserviert, um einen Virusvorrat anzulegen. Die noch auf dem Boden des Schälchens haftenden Zellen wurden mit SDS und Pronase lysiert, die Virus-DNA wurde mittels Phenolextraktion gewonnen. Im Kontroll-Verdau mit *PvuI* und der anschließenden Gelelektrophorese erfüllte die gewonnene DNA die berechneten Fragmentgrößen: Die für einen mit pBHG10 gewonnen replikationsdefizienten AdV typischen Banden von 9778, 4553, 3942, 2782, 2174, 2062 und 1669 bp waren ebenso wie das für das Insert typische Fragment von 4627 bp in der Gelelektrophorese nachweisbar (Abb. 6, Tab. 2). Eine typischerweise bei 6,3 kb liegende Wildtyp-Bande war nicht zu erkennen.

Replikationskompetente, dem Wildtyp ähnelnde Adenoviren (RCA) können nach Kotransfektion in die Helferzelllinie 293 entstehen. Durch homologe Rekombination überlappender adenoviraler Sequenzen des Vektors und der Helferzelllinie können Viren auftreten, die das Transgen verloren, die zur Replikation notwendige E1-Region jedoch

wiedergewonnen haben (Hehir et al, 1996; S. 8459-8467). Die Kontamination eines Vektorvorrats mit RCA birgt bei Infektion des Zielgewebes zum einen die Gefahr der Mobilisierung und Ausbreitung der replikationsdefizienten Vektoren (Imler et al, 1995; S. 711-721). Zum anderen verursachen die RCA selbst durch ihre Ausbreitung eine signifikante Gewebsschädigung (Lochmüller et al, 1994; S. 1485-1491).

Nach Kontrollverdau und Gelelektrophorese wurde ein Virusvorrat angelegt, dessen Titration eine Konzentration von $2,7 \times 10^9$ PFU/ml ergab.

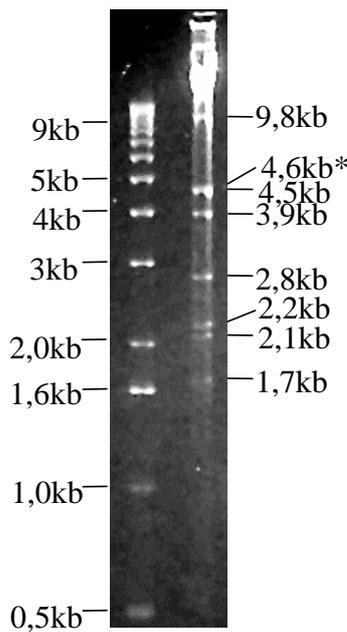


Abbildung 6: Restriktionsverdau von AdTvL3 mit PvuI (*: Bande mit Expressionskassette)

Fragmentgröße	Von : Bis (Bp-Position)
9778	21810 : 31587
4627	1 : 4627
4553	6297 : 10849
3942	13024 : 16965
2782	16966 : 19747
2174	10850 : 13023
2062	19748 : 21809
1669	4628 : 6296

Tabelle 2: Fragmentgrößenvorhersage des PvuI-Verdau von AdTvL3 (Fragmentgrößen in bp).

AdTvL4

Entsprechend wurde Ad.Egr-1.HSV-TK (Synonym AdTvL4) mittels Kontransfektion von pTvL4 und pBHG10 gewonnen (Abb. 3). Ein Restriktionsverdau mit PvuI ergab das erwartete Bandenmuster mit der für das Insert typischen Bande von 5012 kb (Abb. 7, Tab. 3). Die anderen DNA-Fragmente sind Vektorbanden und daher bei AdTvL3 und AdTvL4 identisch. Die Titration des Virusvorrats ergab eine Konzentration von $1,9 \times 10^8$ PFU/ml.

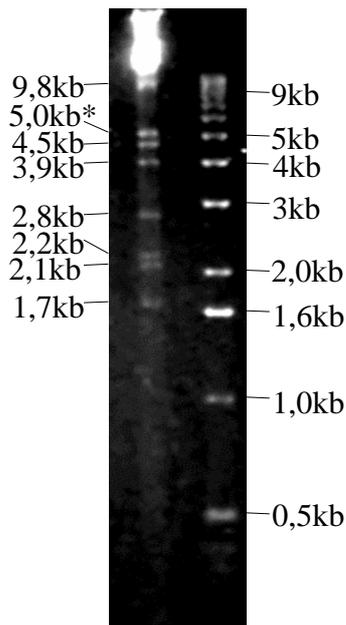


Abbildung 7: Restriktionsverdau von AdTvL4 mit PvuI (*: Bande mit Expressionskassette)

Fragmentgröße	Von : Bis (Bp-Position)
9778	22195 : 31972
5012	1 : 5012
4553	6682 : 11234
3942	13409 : 17350
2782	17351 : 20132
2174	11235 : 13408
2062	20133 : 22194
1669	5013 : 6681

Tabelle 3: Fragmentgrößenvorhersage des PvuI-Verdaus von AdTvL4 (Fragmentgrößen in bp).

4.1.3 Weitere Plasmide und adenovirale Vektoren

Als Positivkontrolle in den Versuchen mit pTvL3 wurde das Plasmid pSW9 (Martina Anton, persönliche Mitteilung) verwendet, welches EGFP sowie den konstitutiven Promotor aus dem Humanen Cytomegalievirus enthält. In den Versuchen mit AdTvL3 kam das aus pSW9 entstandene AdSW15 (Martina Anton, persönliche Mitteilung) zur Anwendung.

4.2. *Egr-1*-Promotor-vermittelte Strahleninduzierbarkeit der EGFP-Expression

4.2.1. EGFP-Expression in transient transfizierten 293-Zellen in Gegenwart hoher Serumkonzentrationen

In Voruntersuchungen sollte nachgewiesen werden, ob die Promotor/Enhancer-Region *mEgr-1*, die in die zur AdV-Herstellung benötigten Shuttleplasmide kloniert wurde, funktionell ist, d.h. ob durch Bestrahlung die Expression des Reportergens EGFP induziert werden kann.

Ca. 5×10^5 293-Zellen wurden auf 25cm²-Fläschchen ausgelegt. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen mit pTvL3 oder pSW9 als Positivkontrolle transfiziert. Als Negativkontrollgruppe (Mock) erhielten die Zellen TE-Puffer. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel der transfizierten Fläschchen mit F11 + 10 % NAFCS durchgeführt und weitere 24 h später wurden sämtliche Zellen nach folgendem Schema (Tab. 4) bestrahlt:

	Mock	pTvL3	pSW9
0 Gy	2	2	2
0,5 Gy	2	0	0
1 Gy	2	0	0
2 Gy	2	2	2
4 Gy	2	0	0
8 Gy	2	2	2

Tabelle 4.: Transfiziertes Plasmid, Strahlendosis, Anzahl der Proben.

Bei Begutachtung der Zellen unmittelbar vor und nach Bestrahlung zeigte sich keine EGFP-Expression bei der Negativkontrolle, starke EGFP-Expression bei der Positiv-Kontrolle, bei jedoch teils stark variierender Zahl der transfizierten Zellen, sowie eine geringe Expression bei den mit pTvL3 transfizierten Zellen.

Die Inspektion der Zellen sechs Stunden nach Bestrahlung ergab ein unverändertes Bild, insbesondere waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Strahlendosen bei den pTvL3-Proben zu erkennen (Photos nicht gezeigt).

20 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich beim Vergleich der mit pTvL3 transfizierten Proben ebenfalls keine relative Änderung der EGFP-Expression, die durch die basale Aktivität des *Egr-1*-Promotors hervorgerufene Genexpression stieg jedoch kontinuierlich an. Allerdings blieb die EGFP-Expression in diesen Proben deutlich unter dem Niveau der Proben, in denen die EGFP-Expression durch den konstitutiven Promotor reguliert wurde.

Zum Teil verantwortlich hierfür war vermutlich die relativ hohe Serumkonzentration von 10 %, da verschiedene Serumfaktoren Einfluss auf die Aktivität des *Egr-1*-Promotors haben (Santiago et al, 1999; S. 937-944). Daher wurde in den nächsten Versuchen eine niedrigere Serumkonzentration gewählt.

4.2.2. EGFP-Expression nach Infektion verschiedener Zellen und Bestrahlung: Abhängigkeit von Zelllinie und Serumkonzentration

Da in dem unter 4.2.1. beschriebenen Vorversuch keine Strahleninduzierbarkeit der EGFP-Expression erkennbar war, wurde in diesem Experiment die Abhängigkeit der *mEgr-1*-Funktion von der verwendeten Zelllinie sowie der eingesetzten Serumkonzentration nach Infektion mit AdV, die den *mEgr-1*-Promotor und EGFP tragen, untersucht. Hierzu wurden vier verschiedene Serumkonzentrationen mit jeweils zwei verschiedenen Viruskonzentrationen sowie einer Negativkontrolle kombiniert.

Es wurden je 3×10^5 Zellen der Zelllinien 293 und R1H auf Kulturschalen mit 9 cm² Oberfläche ausgelegt. Bei beiden Zelllinien sollten die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion nicht konfluent sein, da sich in Teilung befindliche Zellen besser infizieren lassen.

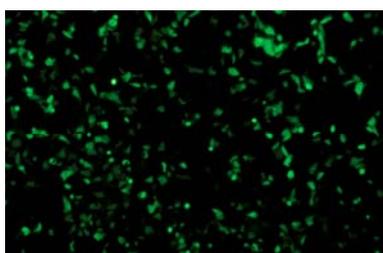
Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Dosen AdTvL3 infiziert, als Negativ-Kontrolle wurde PBS²⁺ verwendet. Da zur Infektion noch kein titrierter Vorrat von AdTvL3 zur Verfügung stand, wurden willkürlich festgelegte Volumina einer Virussuspension eingesetzt. Als Serumkonzentrationen wurden zwei, fünf und zehn Prozent FCS sowie zwei Prozent Pferdeserum verwendet. Die Virussuspension wurde mit PBS²⁺ auf 1:2 bzw. 1:20 verdünnt, von dieser Verdünnung wurden 200 µl pro Kulturschale eingesetzt. Pro Zelllinie wurden je vier Kulturschalen mit je einer Viruskonzentration infiziert. 30 Minuten nach Infektion wurden die Proben mit Medium und verschiedenen Serumkonzentrationen nachgefüttert (Tab. 5).

	R1H		ND		HD	
	Mock		pTvL3		pTvL3	
	0 Gy	6 Gy	0 Gy	6 Gy	0 Gy	6 Gy
2 % HS	0	1	0	1	0	1
2 % FCS	0	1	0	1	0	1
5 % FCS	1	0	1	0	1	0
10 % FCS	1	0	1	0	1	0

293		ND	HD
	Mock	pTvL3	pTvL3
	0 Gy	0 Gy	0 Gy
2 % HS	1	1	1
2 % FCS	1	1	1
5 % FCS	1	1	1
10 % FCS	1	1	1

Tabelle 5: Zelllinie, Virusmenge (ND= niedrige Dosis, HD= Hohe Dosis), Plasmid, _Strahlendosis, Serumkonzentration (HS= Pferdeserum, FCS= fötales Kälberserum), Anzahl der Proben.

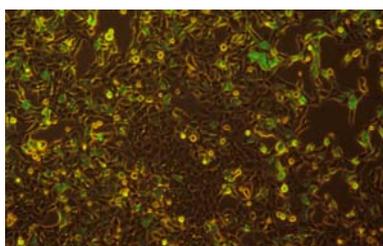
48 Stunden später wurden sämtliche Proben begutachtet und fotografiert, hierbei zeigte sich eine hohe EGFP-Expression in den 293-Zellen (Abb. 8). Die Expression in den R1H-Zellen war deutlich geringer. Ein Einfluss der Serumkonzentration auf die EGFP-Expression war in diesem Experiment nicht zu erkennen, jedoch wurde eine 2%ige Konzentration von fötalem Kälberserum und vor allem eine 2%ige Konzentration von Pferdeserum von den Zellen schlecht toleriert.



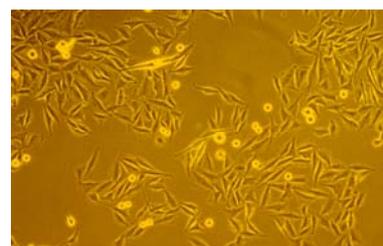
293-Zellen, AdTvL3
Fluoreszenz



R1H-Zellen, AdTvL3
Fluoreszenz



293-Zellen, AdTvL3
Durchlicht + F



R1H-Zellen, AdTvL3
Durchlicht + F

Abbildung 8: EGFP-Expression in Abhängigkeit von der Zelllinie.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde das nächste Experiment nur mit R1H-Zellen durchgeführt.

72 Stunden später wurden die R1H-Zellen, die 2 % fötales Kälberserum oder Pferdeserum erhielten, mit 6 Gy bestrahlt. Die Zellen, die 5 oder 10 % FCS erhielten, blieben unbestrahlt.

96 Stunden später wurden die Zellen inspiziert und photographiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Induktion der EGFP-Expression in den bestrahlten Zellen (Abb. 9). Ein Vergleich bestrahlter und unbestrahlter Zellen, die ansonsten völlig gleich behandelt wurden, war in diesem Experiment nicht möglich. Da das Experiment auf die Erkennung der Auswirkungen unterschiedlicher Zelllinien und Serumkonzentrationen ausgerichtet war, war jede Probe nur einfach vorhanden, eine Aufteilung aller Proben in eine bestrahlte und eine unbestrahlte Gruppe war also nicht möglich. Jedoch wurden bewusst die Zellen nicht bestrahlt, bei denen man aufgrund der höheren Serumkonzentration ein höheres Maß an Hintergrundexpression erwartet hatte, so dass der Effekt der Bestrahlung in diesem Experiment also allenfalls abgeschwächt würde.

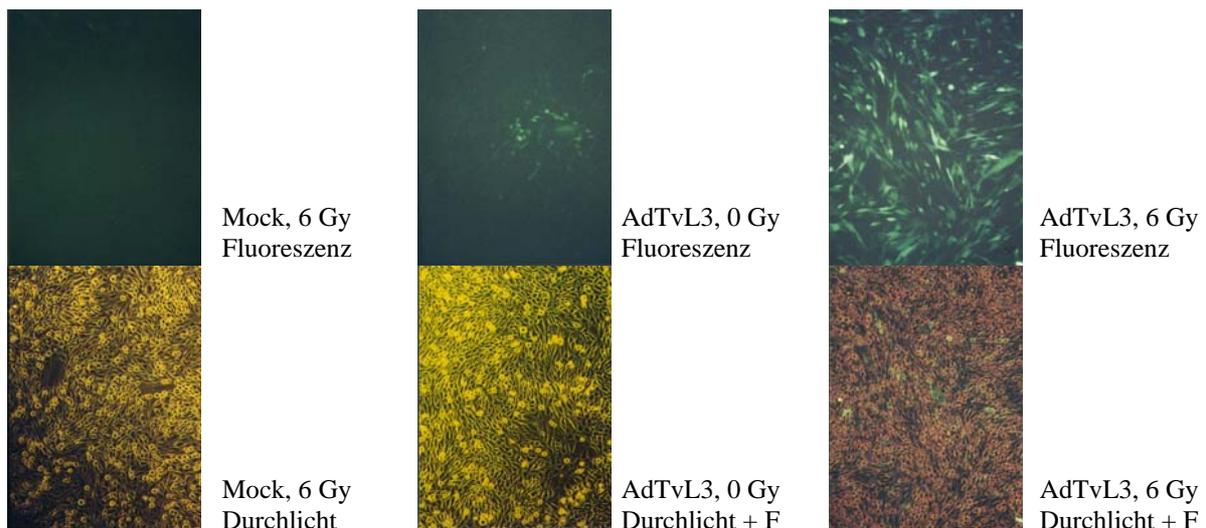


Abb. 9: Induktion der EGFP-Expression in R1H-Zellen durch Bestrahlung mit 6 Gy

4.2.3. Abhängigkeit der EGFP-Expression von der Strahlendosis in AdTvL3-infizierten R1H-Zellen

In diesem Versuch wurde die EGFP-Expression in R1H-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen untersucht und mit der Expression des EGFP-Gens unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors verglichen. Es wurden eine fünfprozentige Serumkonzentration sowie eine MOI von 10 gewählt.

Je 5×10^5 R1H-Zellen wurden auf 25cm^2 -Fläschchen ausgelegt, und 24 Stunden später mit AdTvL3 bzw. AdEGFP bzw. PBS²⁺ als Negativkontrolle infiziert und mit DMEM + 5% FCS nachgefüttert.

42 Stunden später wurde ein Mediumwechsel mit DMEM + 5% FCS durchgeführt. 48 Stunden später wurden die Zellen nach untenstehendem Schema (Tab. 5) bestrahlt.

	Mock	AdTvL3	AdEGFP
0 Gy	2	2	2
1 Gy	0	2	0
2 Gy	2	2	2
4 Gy	0	2	0
8 Gy	2	2	2

Tabelle 6: eingesetztes Virus, Strahlendosis, Anzahl der Proben

90 Stunden später (18 Stunden nach Bestrahlung) wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und photographiert. Es war in den mit AdTvL3 infizierten Proben deutlich eine dosisabhängige Induktion der EGFP-Expression zu erkennen; diese war aber schwächer als die durch den konstitutiven Promotor regulierte EGFP-Expression (Photos nicht gezeigt).

4.2.4. Abhängigkeit der EGFP-Expression von Virus- und Strahlendosis

In diesem Versuch wurde mit einer MOI von 25 bzw. 50 eine höhere Virusmenge als im letzten Versuch eingesetzt.

Nach Aussaat von 5×10^5 R1H-Zellen pro 25cm^2 -Fläschchen und Infektion mit AdTvL3 bzw. AdEGFP nach 24 Stunden wurde 48 Stunden später ein Mediumwechsel mit DMEM + 5% FCS durchgeführt. Zwei Stunden nach Mediumwechsel wurden die Proben bestrahlt (Tab. 7).

	Mock	AdTvL3		AdEGFP	
		MOI 25	MOI 50	MOI 25	MOI 50
0 Gy	1	1	1	1	1
1 Gy	1	1	1	1	1
2 Gy	1	1	1	1	1
4 Gy	1	1	1	1	1
8 Gy	1	1	1	1	1

Tabelle 7: Virusmenge, Strahlendosis, Anzahl der Proben

Bei Inspektion der Zellen fünf Stunden nach Bestrahlung zeigte sich erneut eine deutlich höhere EGFP-Expression bei den mit AdTvL3 infizierten, bestrahlten Zellen. Die mit AdTvL3 infizierten, unbestrahlten Zellen zeigten die schon mehrfach beobachtete geringe EGFP-Expression, die die *Egr-1*-Promotor/Enhancer-Region auch ohne Strahleninduktion vermittelt. Bei Inspektion der Zellen acht Stunden nach Bestrahlung war die Strahleninduzierbarkeit der EGFP-Expression in den mit AdTvL3 infizierten Proben deutlich zu erkennen, während die basale EGFP-Expression in den unbestrahlten Proben geringer als im vorangegangenen Experiment erschien. Die Strahleninduzierbarkeit war ab einer Dosis von 2 Gy zu erkennen. Das Niveau der mit AdSW15 (konstitutiver Promotor) infizierten Proben wurde jedoch nicht erreicht.

23 Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen erneut unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet; zu diesem Zeitpunkt war die Strahleninduktion der EGFP-Expression zwar noch zu erkennen, jedoch war nun auch die Hintergrundexpression deutlich stärker geworden (Photos nicht gezeigt).

4.2.5. Abhängigkeit der EGFP-Expression von der Strahlendosis und dem Zeitpunkt des Versuchsabbruchs

In diesem Versuch wurde die strahleninduzierbare EGFP-Expression in R1H-Zellen untersucht, und zwar acht Stunden, nachdem diese mit AdTvL3 bei einer MOI von 25 infiziert wurden. Je 5×10^5 R1H-Zellen wurden auf 25cm^2 -Fläschchen ausgelegt, und 24 Stunden später mit AdTvL3 bzw. AdEGFP bzw. PBS²⁺ als Negativkontrolle infiziert und mit DMEM + 5 % FCS nachgefüttert.

48 Stunden später wurden die Zellen nach untenstehendem Schema (Tab. 8) bestrahlt.

	Mock	AdTvL3	AdEGFP
0 Gy	2	2	2
1 Gy	0	2	0
2 Gy	0	2	0
4 Gy	0	2	0
8 Gy	2	2	2

Tabelle 8: Verwendetes Virus, Strahlendosis, Anzahl der Proben

Acht Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und photographiert. Die Induktion der *Egr-1*-vermittelten EGFP-Expression durch Bestrahlung sowie die Dosisabhängigkeit der EGFP-Expression zumindest bis 4 Gy waren deutlich zu erkennen (Abb. 10).

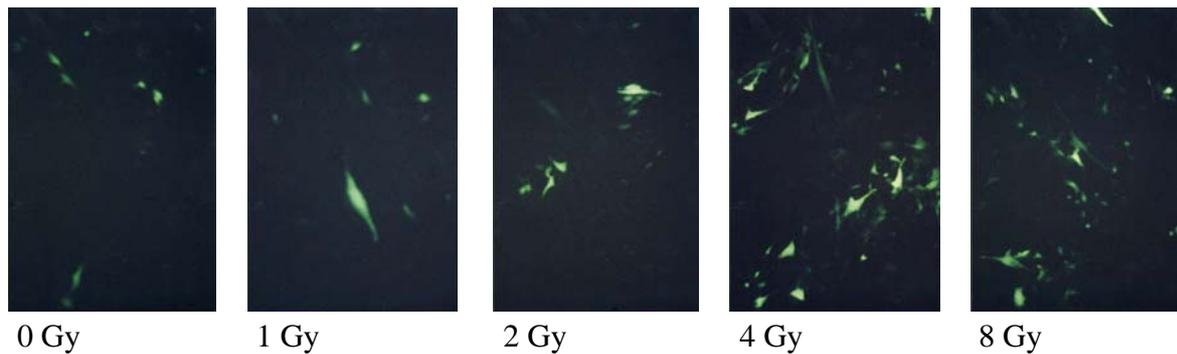


Abb. 10: EGFP-Expression in RIH-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis

4.2.6. Schlußfolgerung

Aus diesen Vorexperimenten mit dem Reportergen EGFP konnte gefolgert werden, dass der verwendete *mEgr-1*-Promotor/Enhancer in AdV funktionell ist. Die Hintergrundaktivität des Promotors war allerdings auch in unbestrahlten Zellen relativ hoch. Zur Quantifizierung der Genexpression dienten die im Folgenden beschriebenen Versuche mit der Herpesviralen Thymidinkinase.

4.3. Strahleninduzierbarkeit der HSV-TK-/Gancyclovir-vermittelten Zytotoxizität

4.3.1. Sensitivität von R1H-Zellen auf Gancyclovir

Um die maximal tolerable Gancyclovir (GCV)-Konzentration zu bestimmen, wurden R1H-Zellen sieben Tage lang mit GCV-haltigem Medium inkubiert. Die GCV-Konzentration im Medium betrug 0,01, 0,1, 1, 10, 100, oder 1000 $\mu\text{g/ml}$, alle 48 Stunden erfolgte die erneute GCV-Gabe im Rahmen des Mediumwechsels. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit GCV-freiem Medium gefüttert. Bereits nach 48 Stunden zeigte sich ein deutlich zytotoxischer Effekt bei den mit 1000 $\mu\text{g GCV/ml}$ Medium behandelten Zellen. Während die unbehandelten Zellen bereits zu 80-90 % konfluent waren, erreichten die mit der GCV-Höchstdosis inkubierten Zellen lediglich eine Konfluenz von etwa 70 %, die Zellzahl pro Kulturschale war deutlich geringer bei vergrößertem Durchmesser der einzelnen Zellen. Auch bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ war eine deutliche Teilungshemmung zu erkennen. Bei einer Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ war der Effekt nur noch sehr gering ausgeprägt, während sich die mit 0,01 bis 1 $\mu\text{g/ml}$ behandelten Proben mikroskopisch nicht von der Negativkontrolle unterschieden.

Am vierten, sechsten und siebten Tag bestätigte sich der stark zytotoxische Effekt der Höchstdosis, die Zellen starben sukzessive ab. Auch bei einer Dosis von 100 $\mu\text{g/ml}$ war die Teilungsfähigkeit der Zellen noch stark eingeschränkt, während die Auswirkungen der 10 $\mu\text{g/ml}$ -Dosis nur sehr schwach ausgeprägt waren. Die Dosen von 0,01 bis 1 $\mu\text{g/ml}$ hatten keinen erkennbaren Effekt auf die R1H-Zellen. Am siebten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolettlösung fixiert und gefärbt (Abb. 11).

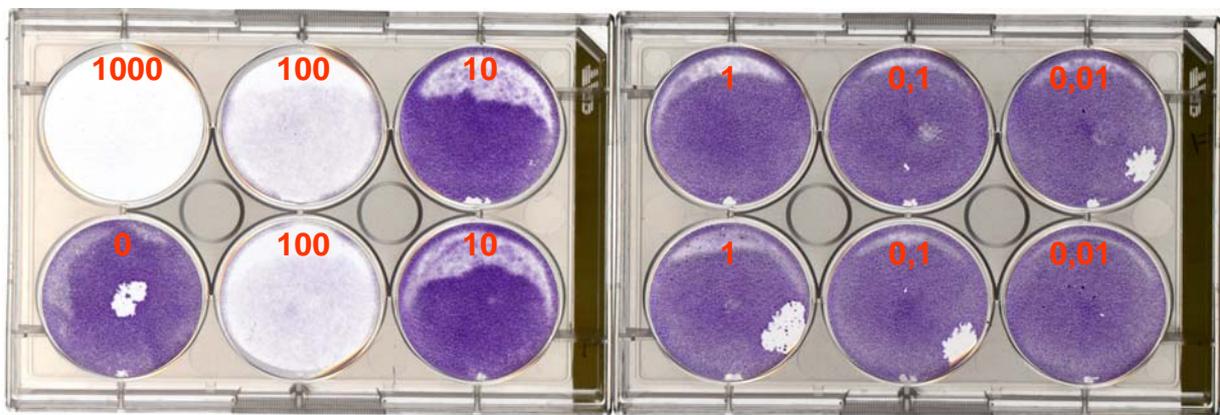


Abbildung 11: GCV-Dosis in $\mu\text{g pro ml}$ Medium; obere Reihe v.l.n.r.: 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 $\mu\text{g GCV/ml}$ Medium; untere Reihe v.l.n.r.: Negativkontrolle, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 $\mu\text{g GCV/ml}$ Medium

4.3.2. Zytotoxizität in AdTvL4-infizierten R1H-Zellen nach Gancyclovir-Gabe und Bestrahlung in Abhängigkeit von Virus-, Gancyclovir- und Strahlendosis

In zahlreichen Vorversuchen wurden sodann verschiedene Parameter des Versuchsaufbaus modifiziert. Dies waren im Einzelnen: Größe der Zellkulturschalen, Zellzahl/-dichte, Viruskonzentration, GCV-Konzentration, Methode und Häufigkeit der GCV-Applikation, Dosis und Häufigkeit der Bestrahlung, Zeitraum zwischen Infektion und Bestrahlung, Zeitraum zwischen Bestrahlung und Fixation der Zellen.

In den weiteren Experimenten kam dann folgender Versuchsaufbau zur Anwendung:

- Aussaat von $7,5 \times 10^3$ R1H-Zellen auf Kulturschalen mit einer Oberfläche von $1,9 \text{ cm}^2$
- 18 Stunden nach Aussaat Infektion mit AdTvL4 mit einer MOI von 10, 25 oder 50
- Sechs Stunden nach Infektion Zugabe von GCV in einer Konzentration von 0,01 bis $100 \mu\text{g/ml}$
- Zwei Stunden nach GCV-Zugabe Bestrahlung mit 0, 4 oder 6 Gy, ggf. 48 Stunden später erneut Bestrahlung mit 6 Gy
- 48 Stunden nach Infektion zweite Applikation von GCV
- 96 Stunden nach Infektion Fixation der Zellen mit Kristallviolettlösung

Pro Vertiefung einer *24-well-plate* wurden $7,5 \times 10^3$ Zellen ausgesät. 18 Stunden später wurden die Proben mit AdTvL4 bei einer MOI von 0, 10, 25 oder 50 infiziert. Weitere sechs Stunden später wurde GCV hinzugegeben, zu einer Endkonzentration im Medium von 0,01 bis $100 \mu\text{g/ml}$. Zwei Stunden später wurde mit 0 bzw. 6 Gy bestrahlt.

24 Stunden nach Infektion war noch bei keiner der Proben ein zytotoxischer Effekt zu erkennen.

48 Stunden nach Infektion wurde die zweite GCV-Dosis verabreicht. Des weiteren wurde ein Teil der Proben erneut mit 6 Gy bestrahlt. Bei Inspektion der Proben unter dem Mikroskop zeigte sich ein geringer zytotoxischer Effekt bei den mit GCV und AdTvL4, MOI 50 behandelten Zellen, unabhängig von der Strahlendosis.

96 Stunden nach Infektion wurden alle adhärennten Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt, einzelne Proben wurden photographiert. Die Zahl der lebenden, d.h. adhärennten Zellen wurde wie unter 3.5.2. beschrieben bestimmt. Dabei entstand der Eindruck, als deckte sich der makroskopische Effekt der Blaufärbung nicht mit der tatsächlichen Zellzahl auf den *wells* (Abb. 12). Dies ließe sich dadurch erklären, daß nicht konfluente Zellen eine

fibroblastenartige Form annehmen und eine größere Oberfläche aufweisen, während konfluente Zellen klein und von runder Form sind.

Die Zellen wurden daher mikroskopisch ausgezählt und die erhaltenen Zellzahlen statistisch ausgewertet. Die gänzlich unbehandelten Proben wurden auf 100 % normiert, die anderen Proben wurden hierzu in Relation gesetzt. Signifikanzen wurden mit dem ein- bzw. zweiseitigen Fisher-T-Test errechnet, als Fehlerbalken sind die Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

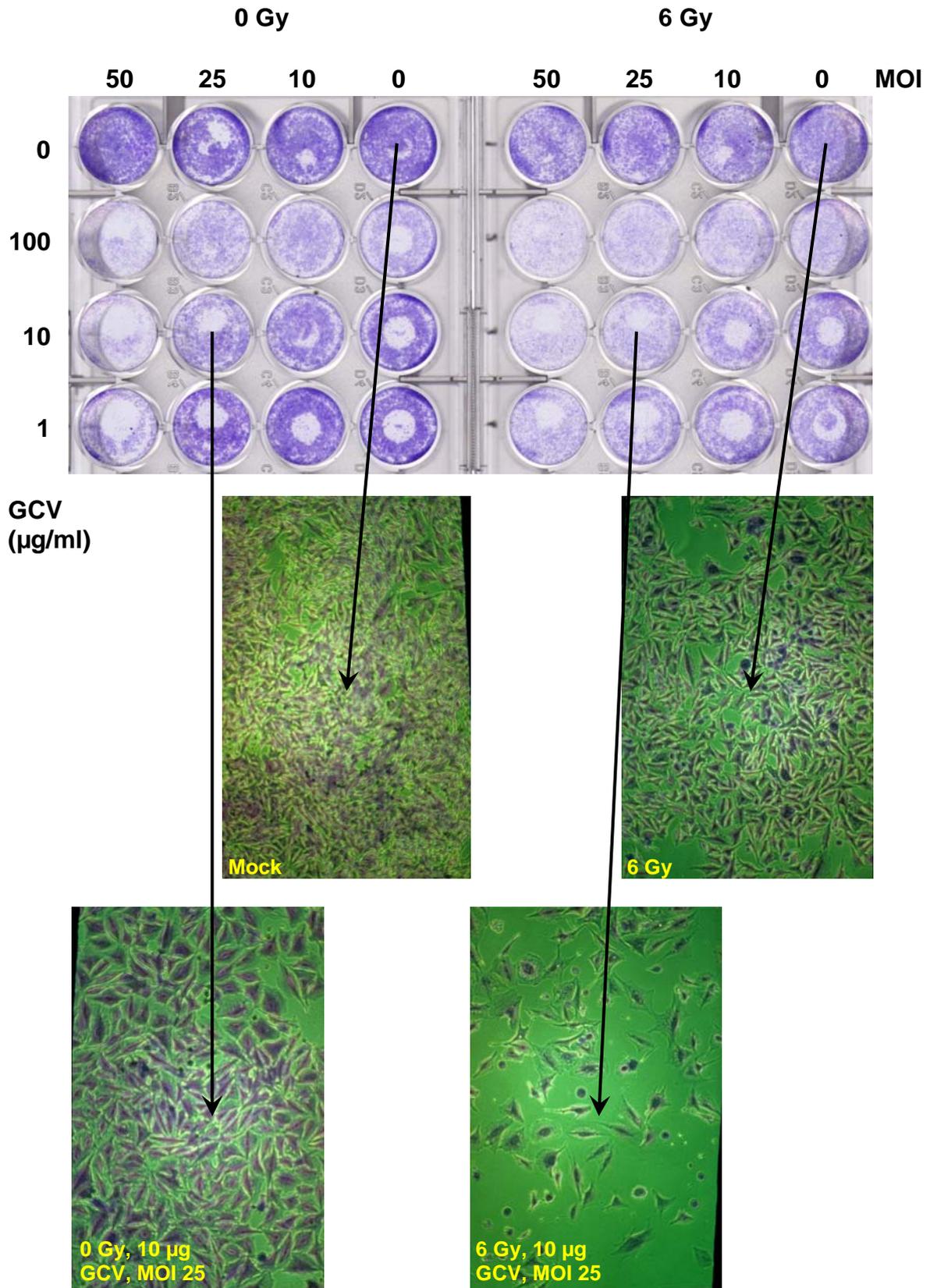


Abbildung 12: Vergleich makroskopischer Blaufärbung und Zellzahl unter dem Mikroskop. GCV-Dosis, Virusdosis, Strahlendosis, Makroskopie, Durchlichtmikroskopie.

Einfluß alleiniger Bestrahlung auf das Zellüberleben

Zunächst wurde der Einfluss einzelner Parameter (Bestrahlung, GCV- und AdV-Konzentration) untersucht. Dabei zeigte sich, dass 50,6 % der Zellen eine einmalige Bestrahlung mit 6 Gy überlebten (6 Gy vs. Mock $p < 0,001$) (Abb. 13). Eine Dosis von 12 Gy, fraktioniert als 2 x 6 Gy, überlebten 40,0 % der Zellen (2 x 6 Gy vs Mock $p < 0,001$, 2 x 6Gy vs 6 Gy $p = 0,06$).

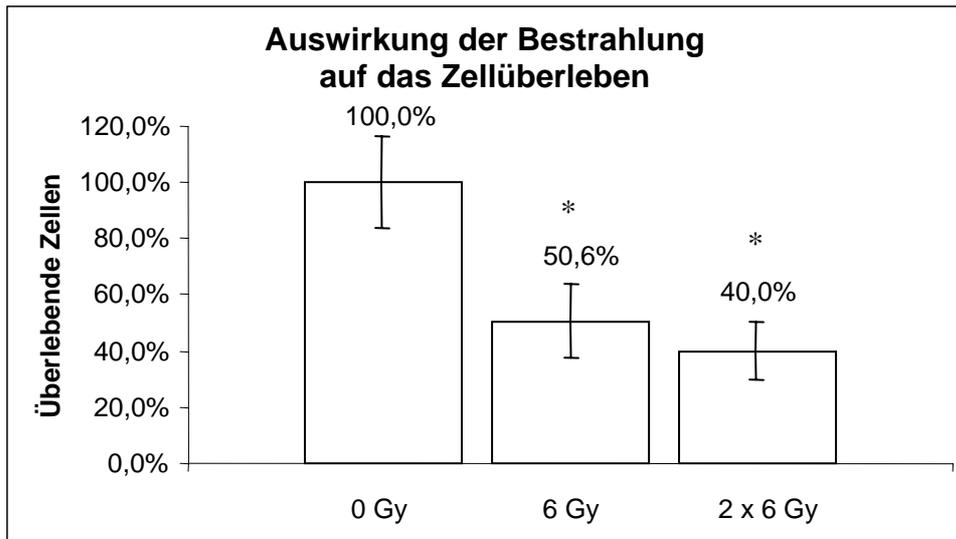


Abbildung 13: Einfluß der Strahlendosis auf die Zytotoxizität. 0 Gy: Unbestrahlte Probe; 6 Gy: mit 6 Gy bestrahlte Probe; 2 x 6 Gy: mit 2 x 6 Gy bestrahlte Probe; *: $p < 0,001$ vs. 0 Gy

Einfluß alleiniger Virusapplikation auf das Zellüberleben

Alleinige AdTvL4-Applikation mit einer MOI von 10 (MOI 10 vs Mock $p = 0,28$), einer MOI von 25 (MOI 25 vs Mock $p = 0,18$) oder einer MOI von 50 (MOI 50 vs Mock $p = 0,07$) führte zu keiner signifikanten Verringerung des Zellüberlebens (Abb. 14).

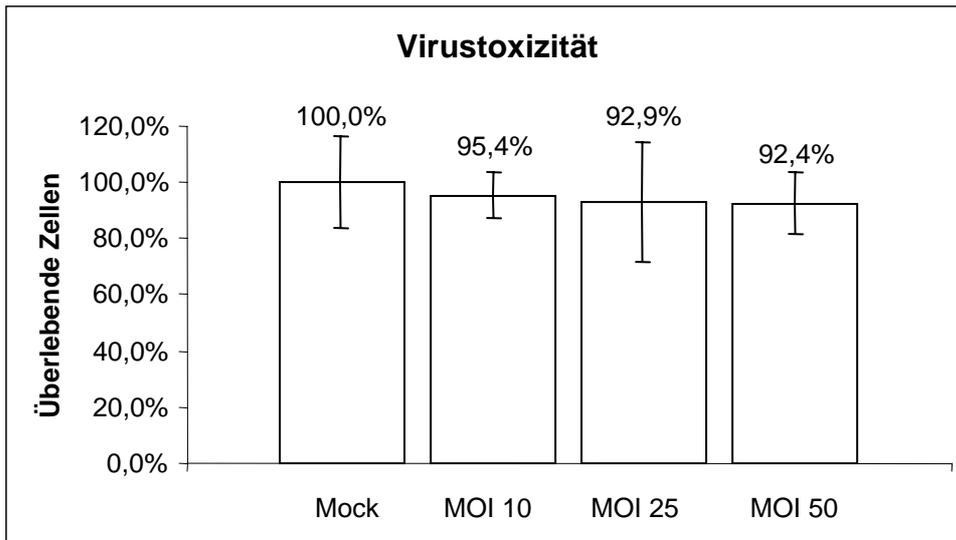


Abbildung 14: Einfluß der Viruskonzentration auf die Toxizität. Mock: unbehandelte Probe; MOI 10: mit AdTvL4, MOI 10 behandelte Probe; MOI 25: mit AdTvL4, MOI 25 behandelte Probe; MOI 50: mit AdTvL4, MOI 50 behandelte (Keine der Proben wurde bestrahlt oder mit GCV behandelt).

Einfluß alleiniger GCV-Applikation auf das Zellüberleben

Die Zugabe von GCV zum Nährmedium hatte erst bei einer Dosis von 10 µg/ml eine signifikant toxische Wirkung (10 µg/ml vs Mock $p < 0,05$). Eine Dosis von 1 µg/ml (1 µg/ml vs Mock $p = 0,25$) oder 0,1 µg/ml (0,1 µg/ml vs Mock $p = 0,26$) verursachte keine statistisch signifikante Toxizität (Abb. 15).

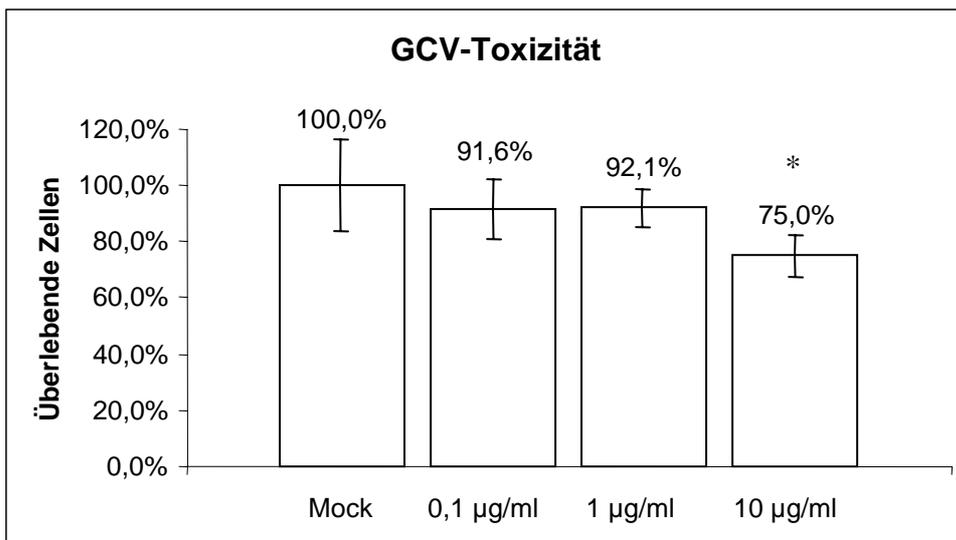


Abbildung. 15: Einfluß der GCV-Konzentration auf die Toxizität. Mock: unbehandelte Probe; 0,1 µg/ml: mit 0,1 µg GCV pro ml Medium behandelte Probe; 1 µg/ml: mit 1 µg GCV pro ml Medium behandelte Probe; 10 µg/ml: mit 10 µg GCV pro ml Medium behandelte Probe. *: $p < 0,05$ vs Mock

Reduktion des Zellüberlebens durch kombinierte Virus- und GCV-Applikation ohne Bestrahlung (*Leakiness*)

In Abbildung 16 ist die Zytotoxizität in Abhängigkeit von der zugesetzten Virus- und GCV-Dosis dargestellt. Sämtliche Proben waren unbestrahlt. Je höher die zugesetzte Virus- bzw. GCV-Dosis war, desto geringer war das Zellüberleben.

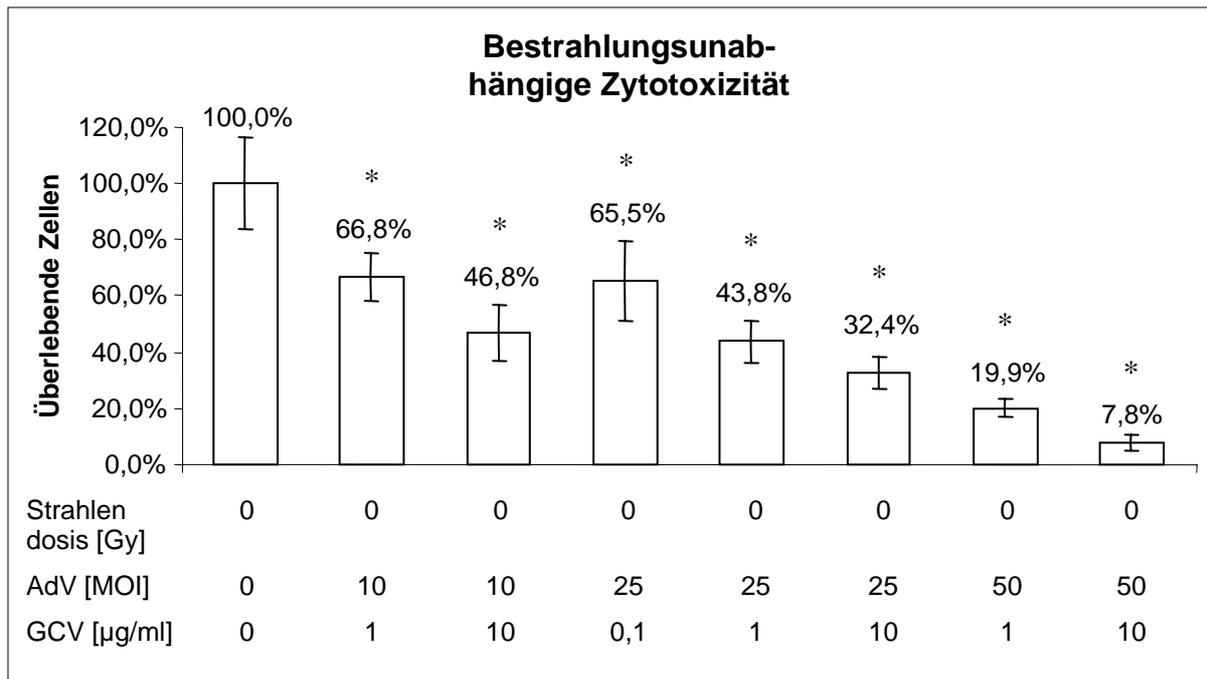


Abbildung 16: Zytotoxizität in Abhängigkeit von Virus- und GCV-Dosis bei unbestrahlten Zellen. *: $p < 0,001$ vs Mock.

Strahleninduzierbarkeit der AdTvL4-/GCV-vermittelten Zytotoxizität bei hohen Virusdosen

Bei einer MOI von 50 in Verbindung mit einer GCV-Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ oder 1 $\mu\text{g/ml}$ konnte keine signifikante Strahleninduktion erreicht werden (Abb. 17). Darüber hinaus wirkte eine GCV-Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ auch ohne Bestrahlung oder zusätzliche Virusgabe schon zytotoxisch, so daß auf eine weitere Darstellung der mit einer MOI von 50 oder einer GCV-Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ behandelten Zellen verzichtet wird.

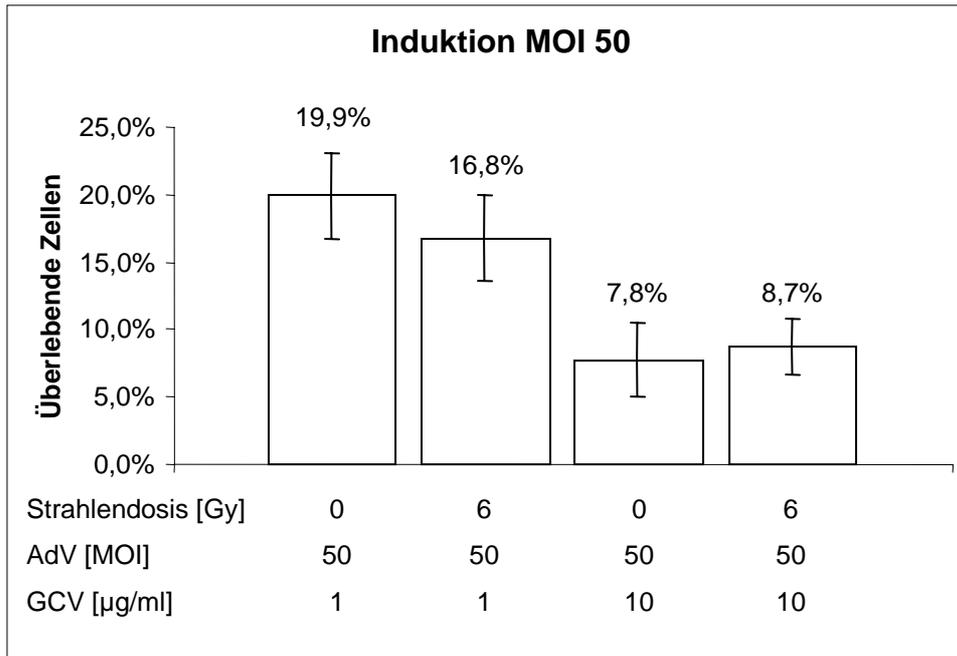


Abbildung 17: Induktion der Zytotoxizität bei einer MOI von 50.

Additiver Effekt der AdTvL4-/GCV-Gabe zur strahlenvermittelten Zytotoxizität

Die Zytotoxizität einer Strahlendosis von 6 Gy konnte durch die Zugabe von AdTvL4 mit einer MOI von 25 sowie GCV in einer Dosis von 1 $\mu\text{g/ml}$ um den Faktor 2,2 gesteigert werden (Abb. 18). Bei gleicher Virus- und GCV-Dosis und einer Strahlendosis von 2 x 6 Gy wurde die Zytotoxizität um das 2,1-fache erhöht. Der Unterschied zwischen Ein- und Mehrfachbestrahlung der mit Virus und GCV behandelten Zellen erreichte in diesem Experiment keine statistische Signifikanz (6 Gy/MOI 25/1 $\mu\text{g/ml}$ vs. 2 x 6 Gy/MOI 25/1 $\mu\text{g/ml}$: $p=0,09$).

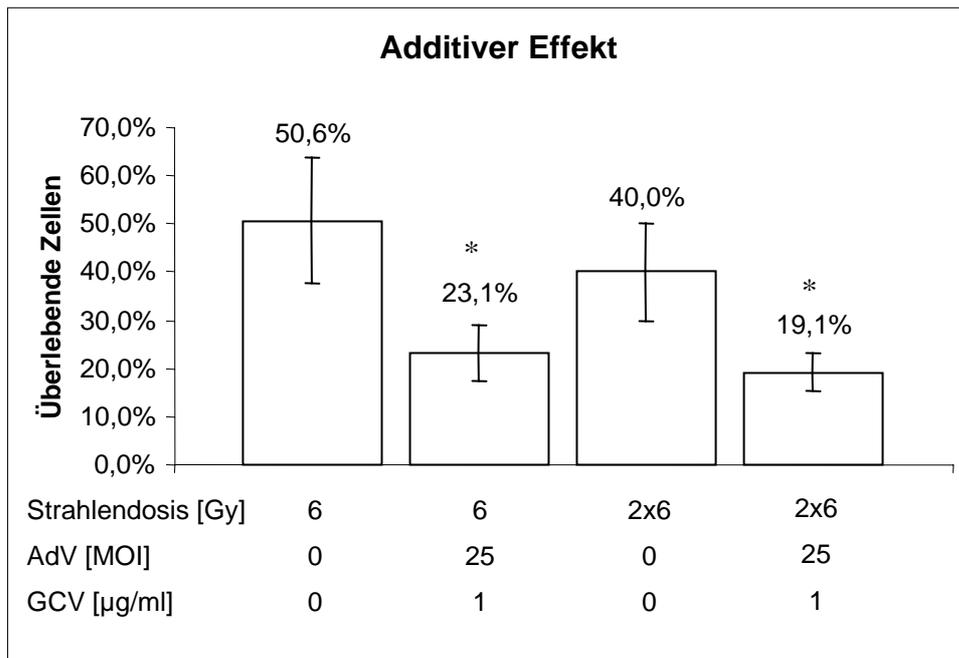


Abbildung 18: Additiver Effekt der Virus-/GCV-Applikation zur Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis. *: $p < 0,05$ vs. lediglich bestrahltes Pendant

Induktion und additiver Effekt der strahleninduzierten AdTvL4-/GCV-vermittelten Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Virusdosis

In der Gegenüberstellung der Virusdosen MOI 10 und MOI 25 zeigte sich bei höherer Virusdosis ein wie erwartet höherer additiver Effekt zur alleinigen Strahlentherapie (6 Gy vs. 6 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml: $p < 0,001$; Faktor: 2,2), bei höherer Leikiness (0 Gy vs. 0 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml: $p < 0,01$; Faktor: 2,3) (Abb. 19). Der Induktionsfaktor durch Bestrahlung mit 6 Gy betrug bei der hier verwendeten AdV-Dosis von MOI 25 1,9 (0 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml vs. 6 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml: $p < 0,001$).

Der additive Effekt der Virusdosis MOI 10 war mit einem Faktor von 1,5 geringer ausgeprägt (6 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml vs. 6 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml: $p < 0,05$; 6 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml vs. 6 Gy alleine: $p < 0,05$). Jedoch war auch die Leikiness mit einem Faktor von 1,5 deutlich niedriger (0 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml vs. Mock: $p < 0,001$). Der Induktionsfaktor war mit 2,0 dem der höheren Virusdosis mindestens gleichwertig (0 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml vs. 6 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml: $p < 0,001$).

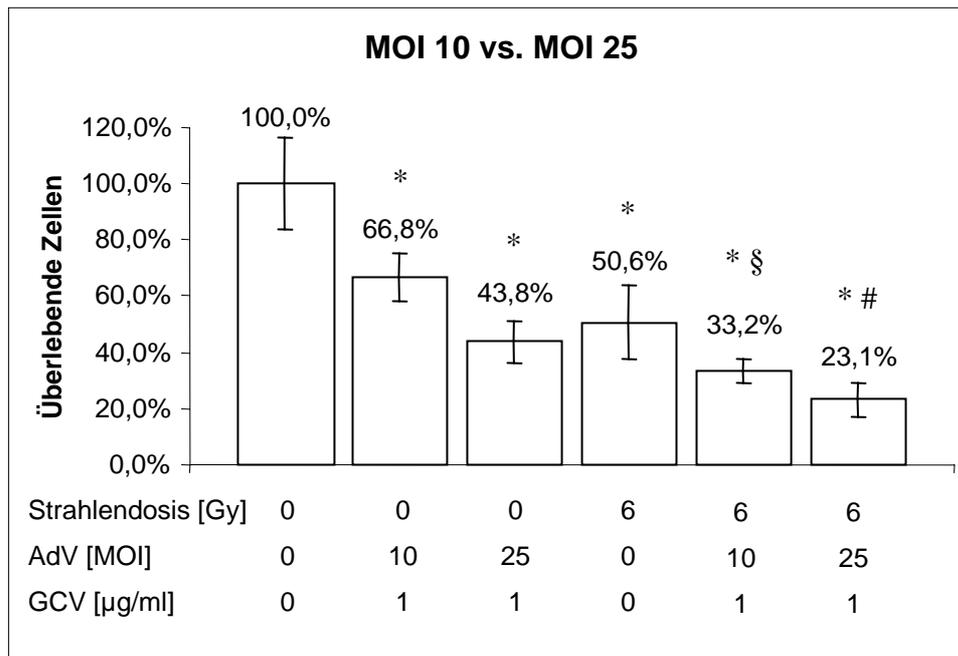


Abbildung 19: Abhängigkeit von Leakiness und additivem Effekt von der Virusdosis. *: $p < 0,01$ vs Mock. §: $p < 0,001$ vs. unbestrahltes Pendant; #: $p < 0,001$ vs. unbestrahltes Pendant;

4.3.3. Zytotoxizität in AdTvL4-infizierten R1H-Zellen nach Gancyclovir-Gabe und Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Der Versuchsaufbau war weitestgehend identisch mit dem des unter 4.3.2 beschriebenen Experimentes, allerdings wurde diesmal mit 0, 4 und 6 Gy bestrahlt, GCV wurde in einer Dosis von 0,01 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ appliziert, die Virusdosis lag bei einer MOI von 10 oder 25.

$7,5 \times 10^3$ R1H-Zellen wurden pro Vertiefung einer 24-well-plate ausgesät.

18 Stunden später wurden die Proben mit AdTvL4 bei einer MOI von 0, 10, oder 25 infiziert.

Weitere vier Stunden später wurde GCV hinzugegeben bei einer Konzentration im Medium von 0,01 bis 10 $\mu\text{g/ml}$.

Zwei Stunden später, 24 Stunden nach Aussaat, wurde mit 0, 4 oder 6 Gy bestrahlt.

24 Stunden nach Bestrahlung war noch bei keiner der Proben ein zytotoxischer Effekt zu erkennen.

48 Stunden nach Bestrahlung wurde die zweite GCV-Dosis verabreicht. Ein zytotoxischer Effekt war nach wie vor nicht zu beobachten.

72 Stunden nach Bestrahlung erschien der zytotoxische Effekt bei den mit Virus und GCV behandelten und bestrahlten Proben deutlich stärker als bei den unbestrahlten Pendants oder bei den lediglich bestrahlten, sonst aber unbehandelten Proben.

96 Stunden nach Bestrahlung wurden die Proben mit Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt. Nach Bestimmung der Zellzahlen der einzelnen Proben unter dem Mikroskop bestätigte sich das Ergebnis des letzten Versuchs.

Einfluß verschiedener Strahlendosen auf das Zellüberleben

Zunächst wurde der Einfluß der einzelnen Strahlendosen auf das Zellüberleben untersucht. Eine Strahlendosis von 4 Gy überlebten 70,6 % der Zellen (4 Gy vs. Mock bzw. vs. 6 Gy $p < 0,001$), eine Dosis von 6 Gy 44,2 % der Zellen (6 Gy vs. Mock: $p < 0,001$) (Abb. 20).

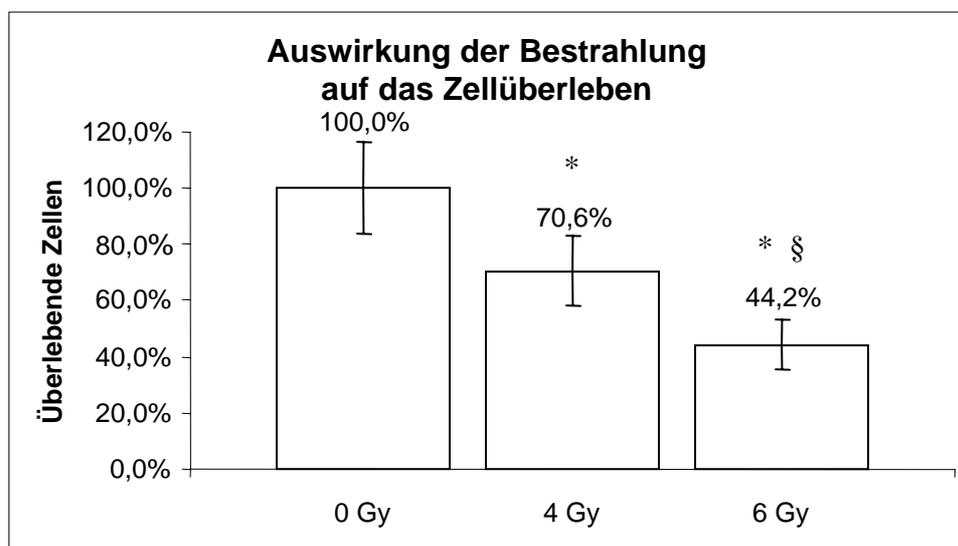


Abbildung 20: Zellüberleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis. *: p vs. 0 Gy $< 0,001$; §: p vs. 4 Gy $< 0,001$

Strahleninduktion der AdT_vL4-/GCV-vermittelten Zytotoxizität

Bei der mit AdT_vL4, MOI 25 und einer GCV-Dosis von 1 µg/ml behandelten Probe überlebten 41,6 % der Zellen (Abb. 21). Durch Bestrahlung mit 4 Gy wurde das Überleben auf 31,4 % gesenkt (4 Gy- vs. 0 Gy-Pendant $p < 0,05$, Faktor: 1,3). Die Bestrahlung mit 6 Gy überstanden 20,9 % der mit MOI 25 und 1 µg GCV/ml behandelten Zellen (6 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml vs. 0 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml $p < 0,001$, Faktor: 2,0; 6 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml vs. 4 Gy/MOI 25/1 µg GCV/ml: $p < 0,05$, Faktor: 1,5).

Die Zytotoxizität der Virusdosis MOI 10 in Verbindung mit 1 µg GCV/ml war deutlich geringer. Hier überlebten 72,3 % der Zellen. Durch Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy konnte das Zellüberleben bereits um den Faktor 2,0 auf 35,9 % gesenkt werden ($p < 0,001$). Eine Strahlendosis von 6 Gy reduzierte die überlebende Zellfraktion um den Faktor 2,4 auf

29,6 % (6 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml p vs. 0 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml p< 0,001; 6 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml vs. 4 Gy/MOI 10/1 µg GCV/ml p< 0,05, Faktor: 1,2).

Im Vergleich der beiden Virusdosen zeigte sich eine 1,7-fach höhere Leakiness bei einer MOI von 25 (p<0,001). Die Induktion durch Bestrahlung mit 4 bzw. 6 Gy erbrachte jedoch nur eine um den Faktor 1,14 (p= 0,13; n.s.) bzw. 1,4 (p< 0,05) höhere Zytotoxizität.

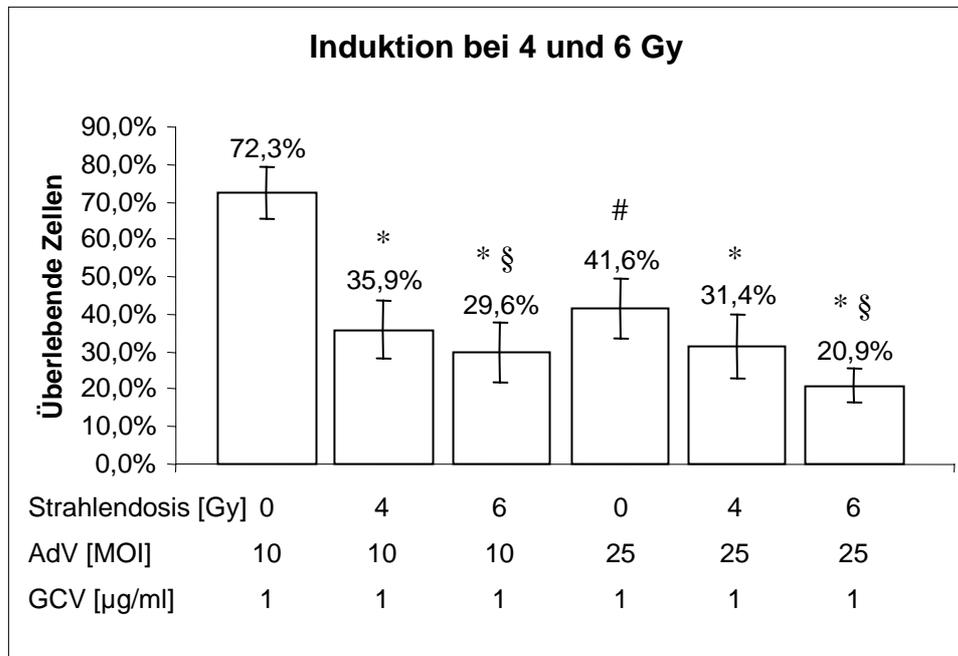


Abbildung 21: Zytotoxizität in Abhängigkeit von Strahlen- und Virusdosis. *: p< 0,001 vs. unbestrahltes Pendant; §: p< 0,05 vs. 4 Gy-Pendant; #: p< 0,001 vs. MOI 10-Pendant.

Additiver zytotoxischer Effekt der AdTvL4-/GCV-Gabe zur Bestrahlung

Eine Strahlendosis von 4 Gy überlebten 70,6 % der Zellen (s. Abb. 22). Durch Gabe von AdTvL4 in einer MOI von 10 sowie 1 µg GCV/ml konnte das Überleben um den Faktor 2,0 gesenkt werden (p < 0,001). Der additive Effekt der Dosis AdTvL4 MOI 25/1µg GCV/ml war mit 2,3 geringgradig höher, jedoch war der Unterschied zur niedrigeren Virusdosis nicht signifikant (p=0,13).

Das Zellüberleben bei einer Einzeldosis von 6 Gy betrug in diesem Experiment 44,2 %. Von den mit AdTvL4 in einer MOI von 10 sowie 1µg GCV/ml behandelten Zellen überlebten 29,6 %. Die Zytotoxizität war um den Faktor 1,5 erhöht (p<0,001). Bei einer Virusdosis von MOI 25 betrug der additive Effekt 2,1 (6 Gy/MOI 25/1µg GCV/ml vs 6Gy/0/0 p<0,001; 6 Gy/MOI 25/1µg GCV/ml vs. 6Gy/MOI 10/1µg GCV/ml p< 0,05).

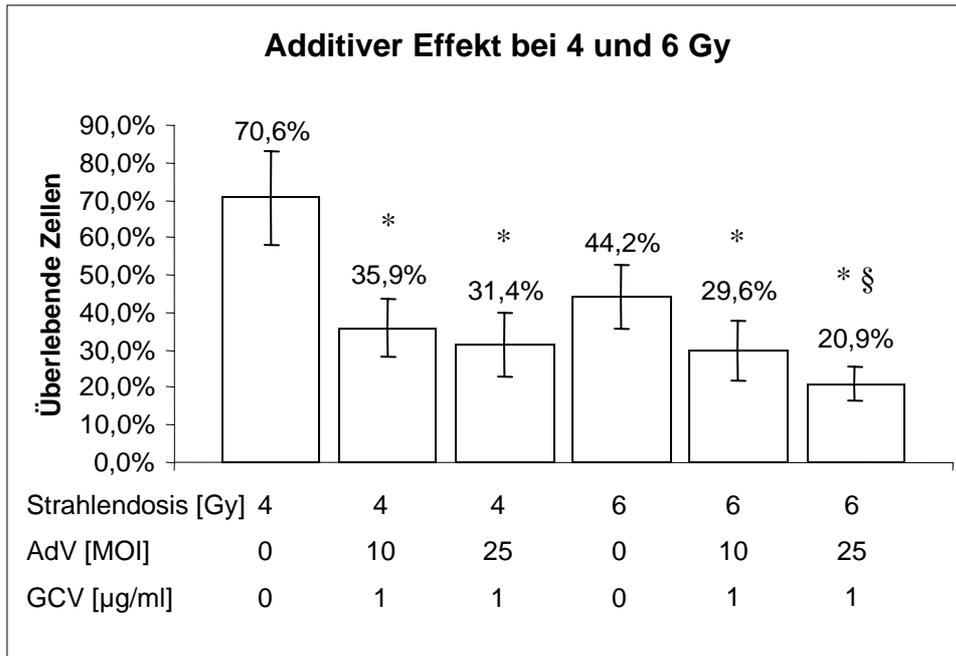


Abbildung 22: Additiver Effekt der Virus-/GCV-Gabe zur alleinigen Strahlentherapie in Abhängigkeit von der Virusdosis. *: $p < 0,001$ vs. ausschließlich bestrahlte Probe; §: $p < 0,05$ vs. MOI 10-Pendant

4.3.4. Unabhängige Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau

In diesem unabhängigen Versuch wurden die Proben lediglich mit einer Virus- und einer GCV-Dosis behandelt. Die Auswertung erfolgte als Lebendzellzahlbestimmung mittels Trypanblau. Jede einzelne Probe war dreifach angesetzt.

Es wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung auf *six-well-plates* ausplattiert.

16 Stunden später wurden die Zellen mit AdTvL4, MOI 0 oder 25 infiziert.

Sechs Stunden nach Infektion wurde GCV in einer Endkonzentration im Medium von 0 oder 1 μg pro ml verabreicht. Acht Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 0 oder 4 Gy bestrahlt. Achtundvierzig Stunden nach Infektion wurde die zweite GCV-Dosis verabreicht.

Zweiundsiebzig Stunden nach Infektion wurde die Lebendzellzahl der Proben mittels Trypanblau bestimmt. Es bestätigten sich die Ergebnisse der beiden vorangegangenen Experimente.

Additiver Effekt, Leakiness und Induktion

Eine Einzeldosis von 4 Gy überlebten 67,0 % der Zellen ($p < 0,001$ vs. Mock; Überlebensrate in den Kristallviolett-Experimenten: 70,6 %) (Abb. 23). Durch Kombination von Bestrahlung, Virus- und GCV-Gabe wurde das Überleben um den Faktor 2,4 auf 28,1 % im Vergleich zu

alleiniger Bestrahlung gesenkt ($p < 0,001$; Überlebensrate in den Kristallviolett-Experimenten: 31,4 %).

Nach alleiniger Gabe von Virus und GCV lebten noch 41,2 % der Zellen ($p < 0,001$ vs. Mock; Überlebensrate in den Kristallviolett-Experimenten: 41,6 %). Die zusätzliche Induktion mit einer Strahlendosis von 4 Gy verringerte das Zellüberleben um den Faktor 1,5 auf 28,1 % ($p < 0,001$; Überlebensrate in den Kristallviolett-Experimenten: 31,4 %).

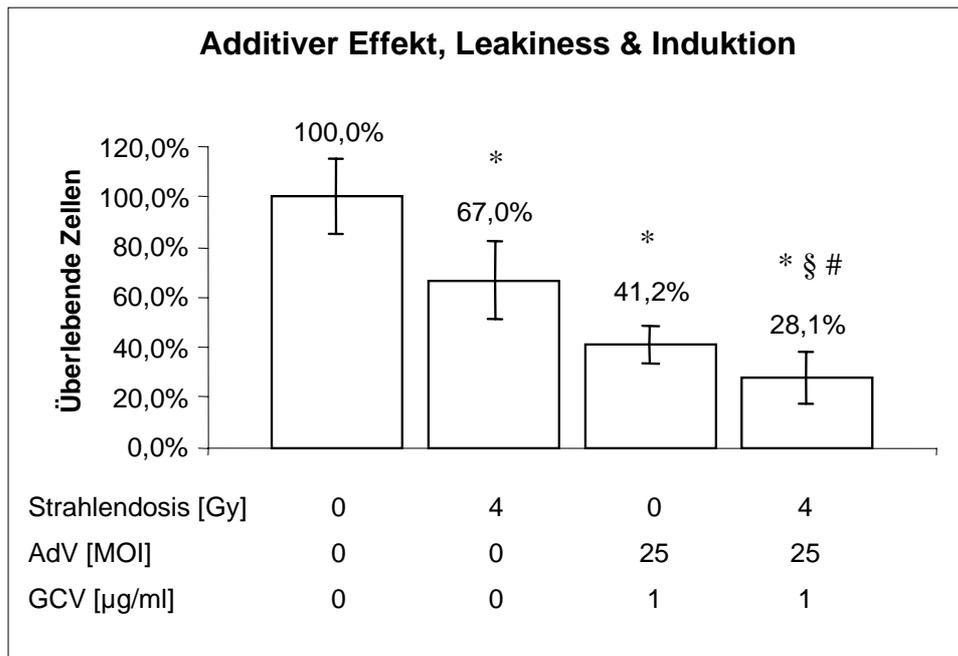


Abbildung 23: Additiver Effekt der Virus-/GCV-Kombination zu alleiniger Bestrahlung, Leakiness, Strahleninduktion der Virus-/GCV-vermittelten Zytotoxizität. *: $p < 0,001$ vs. 0/0/0; §: $p < 0,001$ vs. 4 Gy alleine; #: $p < 0,001$ vs. 0/25/1.

4.4. Isolatoren-Versuche

Um den potentiellen Einfluss adenoviraler Sequenzen auf die Hintergrundaktivität des *mEgr-1*-Promotors zu untersuchen, wurden zunächst Plasmide hergestellt, die in 5'-Position oder in 5'- und 3'-Position des *mEgr-1*-Promotors bovine Wachstumshormon-Polyadenylierungs-sigale als Isolatoren (s. 3.1.1, Abb. 4 und Abb. 5) enthielten. R1H-Zellen wurden mit diesen Plasmiden transfiziert und die EGFP-Expression in bestrahlten sowie in unbestrahlten Zellen beobachtet und dokumentiert.

4.4.1. Einfluß der Isolatoren auf die Hintergrundexpression von EGFP im zeitlichen Verlauf

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob der Einbau der Isolatoren die EGFP-Expression beeinflusst. Es zeigte sich im Vergleich mit pTvL3 (p.Egr-1.EGFP) eine geringere EGFP-Expression in den R1H-Zellen, die mit pTvL6 (dem Plasmid mit einem Isolator vor der Expressionskassette) oder pTvL7 (dem Plasmid mit je einem Isolator vor und nach der Expressionskassette) transfiziert wurden. Dieses Ergebnis ließ sich im zeitlichen Verlauf 24, 48 und 72 Stunden post transfectionem photographisch dokumentieren (Photos nicht gezeigt).

4.4.2. Einfluß der Isolatoren auf die basale Aktivität sowie auf die Strahleninduzierbarkeit des *Egr-1*-Promotors im zeitlichen Verlauf

Im diesem Versuch wurde die Hälfte der mit den Plasmiden pTvL3, -6 und -7 transfizierten Proben zwölf Stunden nach Transfektion mit 6 Gy bestrahlt. Im weiteren Verlauf des Experiments zeigte sich, daß die Induzierbarkeit der *Egr-1*-Region auch in den Plasmiden erhalten geblieben war, die ein oder zwei Isolatoren enthielten. Dieses Ergebnis wurde, wie im vorangegangenen Experiment, im Blindversuch bestätigt und 24, 36, 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion photographisch dokumentiert (Abb. 24 und 25).

Einfluß der Isolatoren auf die *Egr-1*-vermittelte EGFP-Expression in R1H-Zellen

48h nach Transfektion, 36h nach Bestrahlung

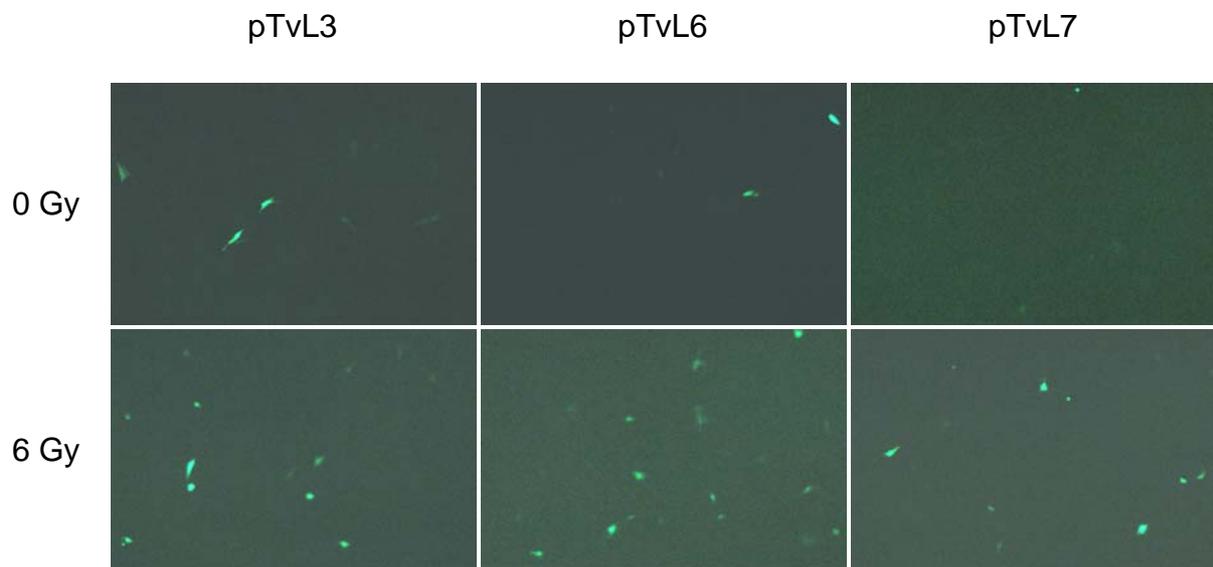


Abbildung 24: EGFP-Expression in R1H-Zellen, die mit pTvL3, pTvL6 oder pTvL7 transfiziert und mit 0 oder 6 Gy bestrahlt wurden. Dokumentation 48 Stunden nach Transfektion, 36 Stunden nach Bestrahlung.

96h nach Transfektion, 84h nach Bestrahlung

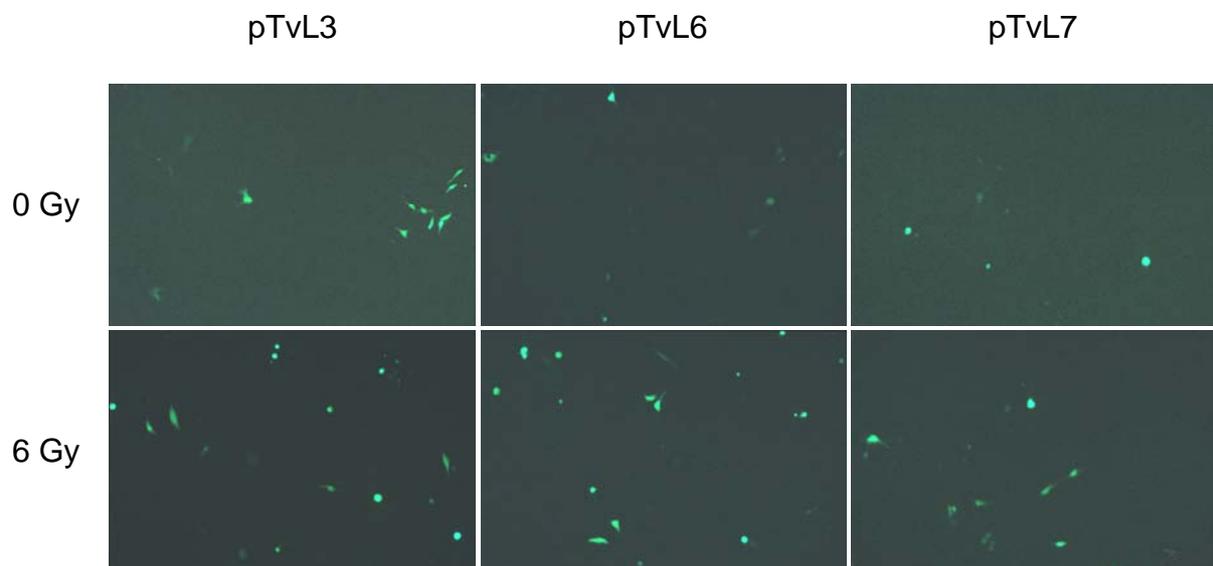


Abbildung 25: EGFP-Expression in R1H-Zellen, die mit pTvL3, pTvL6 oder pTvL7 transfiziert und mit 0 oder 6 Gy bestrahlt wurden. Dokumentation 96 Stunden nach Transfektion, 84 Stunden nach Bestrahlung.

Diese positiven Vorversuche führten zur Herstellung entsprechender Isolator-tragender AdV zur Expression von HSV-TK, die in Anton et al. (Anton et al, 2005, S. 640-646) beschrieben wurden.

5. Diskussion

Zur strahleninduzierbaren Expression der Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase in Tumorzellen wurde ein adenoviraler Vektor konstruiert, in welchem als Fremd-DNA die strahleninduzierbare Promotor-Enhancer-Region *Egr-1* sowie das Suizidgen HSV-TK enthalten sind. Um die Strahleninduzierbarkeit von *Egr-1* sowie dessen Aktivierung in Abhängigkeit von der Strahlendosis zu testen, wurde zunächst ein Reportervirus hergestellt, das den *mEgr-1*-Promotor und das Reportergen EGFP enthielt.

In den Versuchen mit dem Reportervirus hat sich *Egr-1* als funktional erwiesen, die vorbeschriebene Strahleninduzierbarkeit (Hallahan et al, 1991; S. 2156-2160) konnte reproduziert werden. Eine Induktion der EGFP-Expression war bereits bei einer Strahlendosis von 2 Gy deutlich erkennbar (Abb. 9 in 4.2.6.). Dosen von mehr als 6 Gy bewirkten keine erkennbare Steigerung der Expression mehr, weshalb für die Experimente mit dem zytotoxischen Virus Dosen von 4 und 6 Gy verwandt wurden.

Auch das HSV-TK/GCV-System erwies sich in unseren Versuchen als funktional. Die Infektion von Zellen mit AdSW15, einem Virus, in dem die HSV-TK unter der Kontrolle des konstitutiven CMV- (Cytomegalievirus) Promotors stand, führte bei gleichzeitiger Verabreichung von GCV zu signifikanter Wachstumshemmung und zum Zelltod.

Eine alleinige GCV-Gabe erwies sich erst bei höheren Dosen ab 100 µg/ml als deutlich zytotoxisch. In unseren Experimenten kamen daher Maximaldosen von 10 µg/ml zum Einsatz.

In den Versuchen mit AdTvL4 (Ad.Egr.HSV-TK) ließ sich ein strahleninduzierter zytotoxischer Effekt nachweisen und mehrfach reproduzieren. Dieser zytotoxische Effekt (35,9 % Zellüberleben bei 4 Gy + AdTvL4 MOI 10 + 1µg GCV/ml) war sowohl höher als bei alleiniger Bestrahlung (70,6 % Zellüberleben bei 4 Gy), als auch höher als die durch Hintergrundexpression verursachte Zytotoxizität bei AdTvL4- und GCV-Gabe (72,3 % Zellüberleben bei AdTvL4 MOI 10 + 1 µg GCV/ml). Es waren also sowohl eine Induktion der Genexpression durch Bestrahlung als auch ein additiver zytotoxischer Effekt zur alleinigen Bestrahlung deutlich erkennbar.

In unseren Versuchen wurden die besten Ergebnisse mit einer relativ niedrigen GCV-Dosis von 1 µg/ml, welche sich in den Vorversuchen als atoxisch erwiesen hatte, erzielt. Die Virusdosis in den Versuchen mit dem besten Ergebnis lag bei MOI 10. Der additive Effekt zur alleinigen Bestrahlung war bei 4 Gy am deutlichsten ausgeprägt.

Die Versuchsergebnisse wurden beeinflusst durch die zeitlichen Abstände zwischen Infektion, Bestrahlung und Fixierung und Färbung der Zellen. Je länger die Exposition mit Virus und GCV andauerte, desto stärker stieg die durch Basalexpression der HSV-TK verursachte Zytotoxizität an.

Bei optimierten Versuchsbedingungen, nämlich einer Strahlendosis von 4 Gy, einer MOI von 10 und einer GCV-Dosis von 1 µg/ml gelang eine Induktion der Zytotoxizität um den Faktor 2,0, bei einem additiven Effekt zur alleinigen Bestrahlung um den Faktor 2,0. Das Zellüberleben bei den lediglich mit AdTvL4 und GCV behandelten Zellen betrug hierbei 72,3 %.

Die strahleninduzierbare *Egr-1*-Promotor/Enhancer-Region wird von zahlreichen Arbeitsgruppen verwendet, um die Genexpression in verschiedenen Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* zu steuern.

Joki et al (Joki et al, 1995; S. 1507-13) beschreiben die Expression des Luciferase-Gens in Gliom-Zellen, die mit dem Plasmid pEgr-1.Luc transfiziert und anschließend bestrahlt wurden. Ein bis drei Stunden nach Bestrahlung mit 20 Gy bestand eine im Vergleich zur basalen Expressionsrate zehnfach erhöhte Promotoraktivität. Nach Transfektion von Gliom-Zellen mit dem Plasmid pEgr-Tk (enthielt *Egr-1* und HSV-TK als Expressionskassette) und Bestrahlung reagierten die Zellen sensitiv auf GCV-Behandlung. Joki et al fanden eine 20-fach erhöhte Sensitivität auf GCV in den transfizierten und bestrahlten Zellen.

In den Arbeiten von Manome et al (Manome et al, 1998; S. 1409-17) kam ein Egr1.lacZ-Konstrukt zum Einsatz, welches mithilfe eines replikationsdefizienten Adenovirus in Zellen der Ratten-Gliosarkomzelllinie 9L eingeschleust wurde. Nach Bestrahlung mit einer Dosis von nur 2 Gy ließ sich eine dreifache Steigerung der β -Galactosidaseaktivität beobachten. Auch die *in vivo*-Versuche mit intracerebralen 9L-Tumoren zeigten eine Steigerung der β -Galactosidaseaktivität nach Infektion mit dem Reportervirus und anschließender Bestrahlung. Durch die Verwendung von *Egr-1* ließ sich also eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Genexpression erzielen.

Hallahan et al (Hallahan et al, 1995; S. 786-91) verbanden den *Egr*-Promotor mit dem TNF- α -Gen und konstruierten ein replikationsdefizientes Adenovirus. Damit infizierten sie Tumoren, die aus der Zelllinie SQ20B (humanes Plattenepithelkarzinom) in Nacktmäusen gewachsen waren. Im Vergleich zu alleiniger Bestrahlung mit 50 Gy (in Einzeldosen von 5 Gy) verursachte die Kombination von Ad.Egr.TNF und Bestrahlung mit 50 Gy eine stärkere Wachstumsverzögerung. Allerdings entstand durch die alleinige Gabe von Ad.Egr.TNF eine

ähnliche Wachstumsverzögerung, die als Hinweis auf TNF- α -Expression auch ohne Strahleninduktion gewertet wurde.

Seung et al (Seung et al, 1995; S. 5561-5) transfizierten ein murines Fibrosarkom mit Egr.TNF α , als Vektor dienten kationische Liposomen. Sie konnten eine signifikante Wachstumsverzögerung durch kombinierte Gabe von Egr.TNF und einer Einzeldosis von 20 Gy beobachten. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt als bei Bestrahlung oder Transduktion von Egr.TNF alleine.

Mauceri et al (Mauceri et al, 1996; S. 4311-4) konnten am Tiermodell in mit Ad.Egr.TNF und Bestrahlung behandelten Tumoren eine deutliche intratumorale Nekrose sowie die Thrombosierung von tumoreigenen Gefäßen nachweisen. Intratumorale Thrombosen traten nicht auf bei Tieren, die nur mit Ad.Egr.TNF oder Bestrahlung behandelt wurden. Auch das umgebende Normalgewebe wies keine Schädigung durch die kombinierte Behandlung auf.

Kawashita et al (Kawashita et al, 1999; S. 1509-19) transfizierten Zellen eines humanen hepatozellulären Karzinoms mit einem Egr.HSV-TK-Konstrukt; nach Bestrahlung reagierten die Zellen hochsensitiv auf GCV, das Zellüberleben sank auf unter fünf Prozent im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch trat auch nach Gabe von Egr.HSV-TK und GCV ohne Bestrahlung eine 40%ige Wachstumsverzögerung auf. *In vivo* konnte durch kombinierte Behandlung mit Egr.HSV-TK, GCV und Bestrahlung eine fast vollständige Tumorregression erreicht werden.

Wie auch in den Arbeiten von Hallahan, Seung oder Kawashita erwies sich in unserer Studie die Expression des Suizidgens ohne vorangegangene Strahleninduktion als maßgeblicher limitierender Faktor. Hierfür sind vermutlich vor allem zwei Faktoren verantwortlich:

Zum einen reagiert *Egr-1* nicht ausschließlich auf bei Bestrahlung entstehende Sauerstoffradikale (Datta et al, 1993; S. 2419-2422), sondern auch auf Serumfaktoren. So konnten Santiago et al (Santiago et al, 1999; S. 937-944) zeigen, dass die Expression des *Egr-1*-Gens und somit die Aktivität des *Egr-1*-Promotors in Gefäßläsionen von der Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (FGF-2) abhängt. Die Aktivierung von *Egr-1* wurde sowohl durch Anti-FGF-2-Antikörper als auch durch Inhibition der vermittelnden Proteinkinase ERK-2 fast vollständig gehemmt.

Für eine Beeinflussung von *Egr-1* durch Serumfaktoren sprach der in hier vorliegenden Arbeit insbesondere die beobachtete vermehrte Genexpression bei Verwendung von Nährmedium mit höherer Serumkonzentration. Im weiteren Verlauf wurde die Serumkonzentration in den Versuchen deshalb von 10 % auf 5 % reduziert.

Zum anderen befinden sich im viralen Genom Enhancer, welche eine Genexpression der benachbarten DNA-Abschnitte und somit auch die Expression des Reporter- bzw. Suizidgens unabhängig von Bestrahlung auslösen (Buvoli et al, 2002; S. 227-31). Eine Möglichkeit, den potentiellen Einfluss viraler Enhancer auszuschließen, wäre die Verwendung von sogenannten „Gutless“ AdV. Diese enthalten außer den *inverted terminal repeats* und dem Verpackungssignal keine weiteren viralen Sequenzen (Parks et al, 1996; S. 13565-13570). Ein vollständiges Entfernen der viralen Enhancer aus dem Genom des Viruskonstruktes ist nicht möglich, da z.B. ein Enhancer mit dem Verpackungssignal überlappt, dieses aber nach wie vor essentieller Teil auch von „Gutless“ AdV ist.

Die Reduktion dieser durch die obengenannten viralen Enhancer verursachten Genexpression wurde bereits mehrfach beschrieben und auch im Rahmen dieser Arbeit in Anfängen verwirklicht.

So beschreiben Vassaux et al (Vassaux et al, 1999; S. 1192-1197) den Verlust der gewebsspezifischen Expression bei Promotoren, die in adenovirale DNA kloniert wurden. Zur Wiederherstellung dieser selektiven Expression flankierten sie eine Expressionskassette, die den ERBB2-Promotor enthielt, mit dem Transkriptionsstop-Signal des bovinen Wachstumshormons BGH. Diese Expressionskassette, die auf beiden Seiten die BGH-Polyadenylat-Region enthielt, wurde in einen adenoviralen Vektor subkloniert. Das verwendete Transgen, die HSV-TK, wurde nach Infektion nur in ERBB2-exprimierenden Zellen exprimiert, die Selektivität des ERBB2-Promotors war somit wiederhergestellt.

Steinwaerder et al (Steinwaerder et al, 2000; S. 556-567) berichten über die Beeinflussung heterologer Promotoren durch virale Expressionsregulatoren in replikationsdefizienten Adenoviren. Die Aktivität eines Metall-induzierbaren Promotors wurde durch adenovirale Sequenzen beiderseits der Expressionskassette beeinflusst. Die Expressionskassette wurde daraufhin mit einem aus dem Hühner- β -Globin-Locus HS-4 entwickelten Isolator umgeben. Durch Subklonieren von Isolatoren auf beide Seiten der Expressionskassette konnte die basale Expression des Transgens bis in die Nähe der Nachweisgrenze reduziert werden. Die Induktionsfaktoren wurden *in vitro* um das 40-fache, *in vivo* um das 15-fache erhöht.

In unserer Arbeit wurden drei Plasmide verglichen, die *Egr-1* und EGFP enthielten. Ein Plasmid war am linken Ende der Expressionskassette durch einen Isolator (BGH-pA) flankiert, ein weiteres war auf beiden Seiten der Expressionskassette von Isolatoren umgeben. Als Vergleich diente pTvL3 (pEgr.EGFP). Die basale EGFP-Expression in Zellen, die mit den Plasmiden pTvL6 (pBGH-pA.Egr.EGFP) oder pTvL7 (pBGH-pA.Egr.EGFP.BGH-pA) transfiziert wurden, war deutlich geringer als bei pTvL3 (pEgr.EGFP). Die

Strahleninduzierbarkeit blieb bei den mit Isolatoren versehenen Plasmiden erhalten und erschien lediglich bei pTvL7 geringgradig eingeschränkt.

Die Fortführung dieses Ansatzes in unserer Arbeitsgruppe führte zu den Ergebnissen von Anton et al (Anton et al, 2005, S. 640-646). In diesen Experimenten wurden adenovirale Konstrukte mit einer Expressionskassette bestehend aus *Egr-1* und HSV-TK verwandt. Analog zu den oben erwähnten Versuchen mit pTvL3, pTvL6 und pTvL7 waren die Expressionskassetten in diesen Adenoviren von dem Isolator (I) BGH umgeben. Anton et al beobachteten eine Steigerung des Zellüberlebens von 33,1 % bei den mit Ad.Egr.HSV-TK und GCV behandelten Zellen auf 75,8 % bei den mit Ad.I.Egr.HSV-TK.I und GCV behandelten Zellen. Durch Bestrahlung mit 6 Gy sank das Zellüberleben auf 17,3 % bei dem Virus ohne Isolatoren bzw. 21,9 % bei dem Virus mit zwei Isolatoren. Der maximale zytotoxische Effekt war also bei dem mit zwei Isolatoren versehenen Viruskonstrukt etwas geringer, jedoch stieg der Induktionsfaktor von 1,9 bei Ad.Egr.HSV-TK auf 3,5 bei Ad.I.Egr.HSV-TK.I.

Die Versuchsergebnisse mit AdTvL3 und AdTvL4 wurden des weiteren beeinflusst durch die Tatsache, daß sich bei der Viruspräparation eine, wenn auch geringe, Kontamination mit durch Rekombination entstandenem, replikationskompetentem Wildtyp-Adenovirus (RCA) nicht ausschließen läßt. Die Kontamination eines Vektorvorrats mit replikationskompetenten Adenoviren kann bei Infektion des Zielgewebes eine Mobilisierung und Ausbreitung der replikationsdefizienten Vektoren verursachen (Imler et al, 1995; S. 711-721). Ferner verursachen die RCA selbst durch Zellyse und Ausbreitung eine signifikante Gewebsschädigung (Lochmüller et al, 1994; S. 1485-1491). Einen weiteren Faktor stellt die bei mehrmaligem Auftauen und Einfrieren auftretende Aggregation von adenoviralen Vektoren dar. Hierdurch können mehrere Kopien in eine Zelle gelangen und somit *in vitro* zu ungleicher Verteilung der Viruspartikel auf dem Zellrasen führen. Zur Vermeidung dieser Effekte wurden in unserer Arbeitsgruppe im weiteren Verlauf CsCl-aufgereinigte Vektoren verwendet (Anton et al, 2005, S. 640-646). Eine andere Möglichkeit, die Beeinflussung durch replikationskompetente Adenoviren zu vermeiden, stellen Systeme von speziell aufeinander abgestimmten Vektoren und Helferzelllinien dar (Fallaux et al, 1996; S. 215-222; Schiedner et al, 2000; S. 2105-2116). In diesen Systemen gibt es keine homologen Sequenzen zwischen den adenoviralen Vektoren und der E1-Region der Helferzelllinie.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich damit, die Effektivität des *Egr-1*-Promotors zu erhöhen. Marples et al (Marples et al, 2000; S. 511-517; Marples et al, 2002; S. 231-239) synthetisierten auf der Basis des dem Wildtyp-*Egr-1* entnommenen CARG-Elements neue

Promotoren und verglichen sie mit dem Wildtyp-Promotor. Durch eine Erhöhung der Anzahl an strahlensensitiven CArG-Elementen ließ sich die Strahleninduktion ebenso verstärken wie durch eine Veränderung der A/T-Sequenzen innerhalb des CArG-Elementes. Eine Kombination dieser beiden Modifikationen erbrachte eine Verdoppelung der Radiosensitivität im Vergleich zum Wildtyp-*Egr-1*-Promotor.

Scott et al setzten in einer weiteren Arbeit (Scott et al, 2000; S. 1121-1125) eine synthetische Promotorregion ein, bestehend aus vier dem Wildtyp-*Egr-1*-Promotor entstammenden CArG-Sequenzen. Mithilfe dieser synthetischen Promotorregion kontrollierten die Autoren nicht die Expression des Suizidgens selbst, sondern die Expression der Cre Rekombinase. Diese aktivierte über loxP-assoziierte Rekombination die Expression des Suizidgens, welches vor der Rekombination vom CMV-Promotor isoliert war und nicht exprimiert wurde. Nach Rekombination stand das Suizidgen unter der Kontrolle des CMV-Promotors und wurde stärker und dauerhafter exprimiert als in Experimenten mit der Wildtyp-*Egr-1*-Region.

Eine andere Möglichkeit, die Effektivität des *Egr-1*/HSV-TK-Systems zu steigern, ist die Kombination mit fraktionierten Strahlentherapieschemata. Hierbei würde die Expression des Transgens in den transduzierten Zellen durch wiederholte Strahlenapplikation mehrfach induziert werden. Staba et al (Staba et al, 1998; S. 293-300) verwandten dieses Prinzip in einem Mausmodell mit einem soliden malignen Gliom. Nach intratumoraler Injektion von Ad.Egr.TNF (adenoviraler Vektor, welcher TNF unter der Kontrolle des *Egr*-Promotors enthält) applizierten sie 30 Gy in Einzeldosen von fünf Gy über sechs Tage. Hieraus resultierte in 71 % der Versuchstiere eine komplette Tumorregression, verglichen mit einer Regressionsrate von 7,4 % bei alleiniger Bestrahlung und 0 % bei alleiniger Ad.Egr.TNF-Gabe.

Greco et al kombinierten in einer weiteren Arbeit strahleninduzierbare CArG-Elemente aus dem *Egr-1*-Gen mit Hypoxie-empfindlichen Elementen aus dem Erythropoetin-Gen, dem Phosphoglycerat-kinase-1-Gen oder dem *vascular endothelial growth factor*-Gen (Greco et al, 2002; S. 1403-1411). Diese kombinierten Promotoren wiesen eine ca. zweifach erhöhte Aktivität nach Bestrahlung oder unter Hypoxie sowie eine bis zu 3,5-fach erhöhte Aktivität unter Bestrahlung und gleichzeitiger Hypoxie auf. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit eines effektiven Angriffs besonders solchen Tumorgewebes, welches aufgrund bestehender Hypoxie relativ strahlenresistent ist (Neal et al, 1997).

Eine neuartige Möglichkeit, Genexpression im Zielgewebe zu kontrollieren, stellen sogenannte Stress-induzierte Promotoren dar. In einer 2004 vorgestellten Arbeit berichten Dong et al über den GRP78-Promotor, welcher unter Bedingungen wie niedrigem zellulärem

Glucose-Gehalt, Azidose oder Hypoxie aktiviert wird (Dong et al, 2004; S. 553-61). Humane Mammakarzinom-*Xenografts* wurden im Tiermodell mit einem retroviralen Vektor behandelt, welcher HSV-TK unter der Kontrolle des GRP78-Promotors enthielt. Nach GCV-Gabe und Aktivierung des Promotors kam es in mehreren Fällen zu einer kompletten Tumorregression.

Ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung sind Hitze-induzierbare Promotoren wie der dem Hitze-Schock-Protein 70B-Gen entstammende hsp70B-Promotor. Lohr et al klonierten diesen Promotor sowie Interleukin-12 als toxisches Gen in einen adenoviralen Vektor (AdhspIL12). Nach intratumoraler Injektion des Vektors im Tiermodell sowie lokaler Überwärmung des Gewebes fanden sie eine ca. 30-fach höhere Interleukin-12-Expression im Vergleich zu Tumorgewebe, welches mit AdhspIL12 infiziert, aber nicht überwärmt wurde. Die Interleukin-12-Konzentration in Leber, Milz und Serum lag bei diesen Tieren auf dem Niveau der Tiere, welchen AdGFP als Kontrolle verabreicht wurde. Eine suffiziente thermische Kontrolle der Promotoraktivität schien also gegeben (Lohr et al, 2001; 3625-8).

Die Gruppe von Li et al verwandte ebenfalls den Hitze-induzierbaren hsp70-Promotor in Versuchen zur Strahlensensibilität bestimmter Tumorzelllinien. Sie verbanden den Promotor mit dem Gen für das Anti-Sense-Ku70-Protein. Das normale Ku70-Protein ist an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen nach Bestrahlung beteiligt. In seiner Anti-Sense-Form kann es diese Funktion nicht erfüllen, das Vorliegen der Anti-Sense-Form in einer Zelle führt jedoch zu verminderter Sekretion des funktionsfähigen Proteins. Nach Transduktion dieser hsp70.Antisense-Ku70-Expressionskassette mittels adenoviraler Vektoren wurden die verwendeten Fsa-II-Tumorzellen für 45 Minuten auf 43 °C erwärmt. Durch die induzierte Expression des Antisense-Ku70-Proteins konnte in der Folge die Strahlendosis bei gleichem Effekt auf das Zellüberleben um etwa ein Viertel reduziert werden. Es gelang also die Strahlensensibilisierung der Zellen durch hitzeinduzierte Expression des verwendeten Transgens (Li et al, 2003; 3268-74).

Mit dem Problem der Strahlenresistenz hypoxischer Tumoreale (Neal et al, 1997) beschäftigen sich experimentelle gentherapeutische Ansätze, in denen Hypoxie-induzierbare Promotor-Elemente zum Einsatz kommen. Post und van Meir legten die prinzipielle Durchführbarkeit therapeutischer Ansätze mithilfe eines hypoxie-abhängigen replizierenden Adenovirus dar (Post et al, 2003; S. 2065-72). Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1), der das Endprodukt einer unter hypoxischen Bedingungen induzierten Signalkaskade darstellt, vermittelt zelluläre Reaktionen auf Hypoxie durch Anbindung an Hypoxie-responsible Elemente (HRE) in bestimmten Zielgenen. Post et al konstruierten ein Adenovirus, dessen für die Replikation notwendige E1A-Region unter der Kontrolle solcher HRE stand. Das

entstandene attenuierte Hypoxie-responsible Adenovirus lysierte *in vitro* selektiv hypoxische Zellen. Die Möglichkeit, hypoxische Areale solider Tumoren gezielt anzugreifen, scheint also gegeben.

Binley et al konstruierten aus den obengenannten Hypoxie-responsiblen Elementen einen synthetischen Promotor zur kontrollierten Expression von Suizidgenen. Im Tierversuch zeigte dieser Promotor in Leber oder Milz nur geringe Aktivität, 1000-fach niedriger als die Aktivität des konstitutiven CMV/IE-Promotors. Innerhalb des Tumormikromilieus lag die Aktivität des synthetischen hypoxie-responsiblen Promotors im Bereich des CMV/IE-Promotors. Die Hepatotropie der adenoviralen Vektoren wurde genutzt, um die systemische Toxizität des HSV-TK/GCV-Systems zu beurteilen, wenn das HSV-TK-Gen unter der Kontrolle des hypoxie-responsiblen Promotors steht (Ad.HRE.TK). Während hochdosierte Gabe von GCV und adenoviralen Vektoren, die HSV-TK unter der Kontrolle des CMV/IE-Promotors enthielten (Ad.CMV.TK), erhebliche Lebernekrosen hervorrief, wurde die gleiche Dosis von GCV und Ad.HRE.TK gut toleriert. Die Autoren konnten somit eine tumorselektive Expression von Fremdgenen mithilfe eines synthetischen Hypoxie-responsiblen Promotors beweisen (Binley et al, 2003; S. 540-549).

Auch im Vergleich mit diesen Hyperthermie- oder Hypoxie-induzierbaren Promotor-Konstrukten hat der auf der strahleninduzierbaren *Egr-1*-Promotorregion basierende Therapieansatz nicht an Stellenwert verloren. Dies nicht zuletzt deshalb, da Strahlentherapie noch immer die Therapie der Wahl bei den meisten soliden Tumoren darstellt und ihre Kombination mit gentherapeutischen Ansätzen daher von hohem Interesse ist.

So stellten Senzer et al 2004 die Ergebnisse der ersten Phase I-Studie vor, in der Patienten mit soliden Tumoren, die nicht mehr kurativ therapierbar waren, mit kombinierter Strahlen- und Gentherapie behandelt wurden. Diese Patienten bekamen zusätzlich zu palliativer Bestrahlung TNFerade verabreicht, einen adenoviralen Vektor, welcher als Fremd-DNA *Egr-1* sowie das humane TNF α -Gen enthielt. TNFerade wurde einmal wöchentlich über sechs Wochen in Dosen von 4×10^7 bis 4×10^{11} Viruspartikeln intratumoral injiziert, begleitet von Strahlentherapie-Schemata mit Gesamtdosen von 30 bis 70 Gy. Bei Patienten mit mehreren Tumormanifestationen wurde zum Vergleich der Ansprechraten eine Index-Läsion und eine Kontroll-Läsion gewählt (Senzer et al, 2004; S. 592-601).

Bei 36 Patienten wurde die begleitende Toxizität beurteilt, als Komplikationen traten Fieber, Schmerzen an der Injektionsstelle und Schüttelfrost auf. Dosis-limitierende Toxizitäten traten nicht auf. Bei 30 auf das Ansprechen des Tumors untersuchten Patienten kam es in 13 Fällen zu einem objektivierbaren Ansprechen des Tumors (fünf Komplettremissionen, neun

Teilremissionen). Bei den fünf Patienten, die mehrere Tumormanifestationen aufwiesen, kam es in vier Fällen zu einer Progression der lediglich bestrahlten Kontroll-Läsion. Bei den mit TNFerade und Bestrahlung behandelten Index-Läsionen dieser Patienten wurde ein deutlich besseres Ansprechen des Tumors beobachtet, im einzelnen waren dies eine Komplettremission, eine Teilremission, eine Minimalremission und ein Fall von *stable disease*.

Diese ermutigenden Ergebnisse führten zur Initiierung kontrollierter prospektiver klinischer Studien, welche die Möglichkeiten des gentherapeutischen Ansatzes mit TNFerade ausloten sollen.

Die Kontrolle der Expression therapeutischer Gene mithilfe der strahleninduzierbaren *Egr-1*-Region stellt also einen vielversprechenden Ansatz innerhalb der modernen Tumorthherapie dar. Besonderes Augenmerk muß auf die sich bietenden Möglichkeiten der Optimierung dieses Promotors gerichtet werden. So wurden, wie bereits oben erwähnt, schon von mehreren Autoren synthetische Promotoren vorgestellt, die auf den strahlensensiblen CA₁G-Elementen der *Egr*-Region beruhen, jedoch eine bessere Induzierbarkeit als der Wildtyp-Promotor aufwiesen (Marples et al, 2000; S. 511-517; Marples et al, 2002; S. 231-239). Die Reduktion der Hintergrundexpression des *Egr-1*-Promotors durch Einbau von Isolatoren ist in der aktuellen Literatur dezidiert beschrieben (Vassaux et al, 1999; S. 1192-1197; Steinwaerder et al, 2000; S. 556-567, Anton et al, 2005, S. 640-646) und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit in Ansätzen mit Erfolg verwirklicht.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adenovirale Vektoren zur strahleninduzierbaren Expression des EGFP sowie der Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase in Tumorzellen konstruiert. In den *in vitro*-Versuchen konnte eine signifikante Induktion der Genexpression nach Bestrahlung mit klinisch relevanten Bestrahlungsdosen von 2-6 Gy nachgewiesen werden. Ebenso bestand ein signifikanter additiver Effekt zur alleinigen Bestrahlung. Eine maximale Induktion der Zellabtötung, um einen Faktor 2,4, wurde mit einer MOI von 10 des AdTvL4, einer Bestrahlung von 6 Gy und einer Gancyclovirkonzentration von 1µg/ml erreicht. Des Weiteren war die Zytotoxizität von der AdV-Konzentration abhängig: mit steigender AdV-Konzentration nahm die Zytotoxizität zu, allerdings stieg auch die Hintergrundaktivität und somit die bestrahlungsunabhängige Reduktion des Zellüberlebens.

Die wichtigste Limitation dieser Arbeit war die basale Expression des Suizidgens, welche zu unerwünschter Zytotoxizität in infizierten, aber unbestrahlten Zellen führte. Eine Reduktion dieser basalen Promotoraktivität gelang auf der Ebene des Reporterplasmids durch den Einbau von Polyadenylierungssignalen aus dem bovinen Wachstumshormon BGH als Isolatoren. Die Wirksamkeit dieser Isolatoren in adenoviralen Konstrukten wurde als Fortsetzung dieser Arbeit zunächst in Zellkultur mit dem hier beschriebenen AdTvL4 verglichen und soll zukünftig im Tiermodell untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Anton M, Gomaa IE, von Lukowicz T, Molls M, Gansbacher B, Wurschmidt F. Optimization of radiation controlled gene expression by adenoviral vectors *in vitro*. *Cancer Gene Ther.* 2005 Jul; 12(7): 640-6
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DG, Seidman JG, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1988; John Wiley&Sons Inc., Hoboken, NJ, USA
- Barendsen GW, Broerse JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarkoma with 15 MeV neutrons and 300 kV x-rays. I: Effects of single exposures. *Eur J Cancer.* 1969 Sep; 5 (4): 373-91
- Beck-Bornholdt, Omniczynski M, Theis E, Vogler H, Würschmidt F, Influence of treatment Time on the response of rat rhabdomyosarcoma R1H to fractionated irradiation. *Acta Oncologica*, 1991; Vol. 30 No. 1, 57-63
- Bett AJ, Haddara, W, Prevec L, Graham FG. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* 1994; Vol. 91, 8802-8806
- Binley K, Askham Z, Martin L, Spearman H, Day D, Kingsman S, Naylor S. Hypoxia-mediated tumour targeting. *Gene Ther.* 2003 Apr; 10(7): 540-9
- Buvoli M, Langer SJ, Bialik S, Leinwand LA. Potential limitations of transcription terminators used as transgene insulators in adenoviral vectors. *Gene Ther.*, 2002; 9: 227-31
- Carrio M, Mazo A, Lopez-Iglesias C, Estivill X, Fillat C. Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer.* 2001; 94(1): 81-8
- Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91(8): 3054-7
- Cormack BB, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996; 173(1 Spec No): 33-8
- Cremer K, Bodemer M, Summers WC. Characterization of the mRNA for herpes simplex virus thymidine kinase by cell-free synthesis of active enzyme. *Nucleic Acids Res.*, 1978; 5(7): 2333-44

- Cremer KJ, Summers WP, Summers WC. The thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1: cell-free protein synthesis and substrate specificity studies. *IARC Sci Publ.*, 1978; (24 Pt 1): 337-45
- Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)₆GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 2419-2422
- Dong D, Dubeau L, Bading J, Nguyen K, Luna M, Yu H, Gazit-Bornstein G, Gordon EM, Gomer C, Hall FL, Gambhir SS, Lee AS. Spontaneous and controllable activation of suicide gene expression driven by the stress-inducible grp78 promoter resulting in eradication of sizable human tumors. *Hum Gene Ther.* 2004 Jun;15(6):553-61
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, van Ormondt H, Hoeben RC, van der Eb A. Characterization of 911: A new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Human Gene Therapy*, 1996; 7: 215-222
- Graham FL and van der Eb AJ. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 1973; 54, 536-539
- Graham FL and Prevec L. Manipulation of Adenovirus Vectors. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols. P 109-127. The Humana Press Inc., Clifton, NJ, 1991
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977 Jul; 36 (1): 59-74
- Greco O, Marples B, Dachs GU, Williams KJ, Patterson AV, Scott SD. Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation. *Gene Therapy*, 2002; 9: 1403-1411
- Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, Dunphy EJ, Wayne JD, Hanna NN, Toledano A, Hellman S, Kufe DW, Weichselbaum RR. Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat Med*, 1995; 1(8): 786-91
- Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML, Virudachalam S, Kufe D, Weichselbaum RR. Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 2156-2160

- Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, Choquette TL, Berthelette PB, White GA, Couture LA, Everton MB, Keegan J, Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE, Wadsworth SC. Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J. Virol.*, 1996; 70, 8459-8467
- Hitt MM, Bett AJ, Addison CL, Prevec L, Graham FL. Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. In: Adolph KW, ed. *Viral Gene Techniques*. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic press, 1995: 13-30
- Imler JL, Bout A, Dreyer D, Dieterle A, Schultz H, Valerio D, Methali M, Pavirani A. Trans-complementation of E1-deleted adenovirus: A new vector to reduce the possibility of codissemination of wild-type and recombinant adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 1995; 6, 711-721
- Joki T, Nakamura M, Ohno T. Activation of the radiosensitive EGR-1 promoter induces expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and sensitivity of human glioma cells to ganciclovir. *Hum Gene Ther.* 1995; 6(12): 1507-13
- Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, Nagayama Y, Kawazoe Y, Eguchi S, Kuroda H, Fujioka H, Ito M, Kanematsu T, Yamashita S. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation. *Hum Gene Ther.* 1999; 10(9): 1509-19
- Li GC, He F, Shao X, Urano M, Shen L, Kim D, Borrelli M, Leibel SA, Gutin PH, Ling CC. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2003 Jun 15; 63(12): 3268-74
- Lochmüller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, Karpati G, Acsadi G. Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants ($\Delta E1 + \Delta E3$) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* 1994; 5: 1485-1491
- Lohr F, Huang Q, Hu K, Dewhirst MW, Li CY. Systemic vector leakage and transgene expression by intratumorally injected recombinant adenovirus vectors. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(11): 3625-8
- Manome Y, Kunieda T, Wen PY, Koga T, Kufe DW, Ohno T. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum Gene Ther.* 1998; 9(10): 1409-17

- Marples B, Greco O, Joiner MC, Scott SD. Molecular approaches to chemo-radiotherapy. *Eur J Cancer* 2002; 38(2): 231-239
- Marples B, Scott SD, Hendry JH, Embleton MJ, Lashford LS, Margison GP. Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy. *Gene Therapy*, 2000; 7; 511-517
- Matono S, Tanaka T, Sueyoshi S, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K. Bystander effect in suicide gene therapy is directly proportional to the degree of gap junctional intercellular communication in esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2003; 23(5): 1309-15
- Mauceri HJ, Hanna NN, Wayne JD, Hallahan DE, Hellman S, Weichselbaum RR. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene therapy targeted by ionizing radiation selectively damages tumor vasculature. *Cancer Res.* 1996; 56(19): 4311-4
- Neal AJ, Hoskin PJ: *Clinical Oncology: Basic Principles and Practice*. Second Edition. Oxford University Press. 1997
- Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, Kruse CA. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol Histopathol.* 2003 Apr;18(2):495-507.
- Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1996; Vol. 93, pp. 13565-13570
- Post DE, Van Meir EG. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene.* 2003 Apr 10;22(14):2065-72
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992; 111(2): 229-33
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; second edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY, USA
- Santiago FS, Lowe HC, Day FL, Chesterman CN, Khachigian LM. Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol*, 1999; 154: 937-944
- Schiedner G, Hertel S, Kochanek S. Efficient Transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: Generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Human Gene Therapy*, 2000; 11: 2105-2116
- Scott SD, Marples B, Hendry JH, Lashford LS, Embleton MJ, Hunter RD, Howell A, Margison GP. A radiation-controlled molecular switch for use in gene therapy of cancer. *Gene Therapy*, 2000; 7: 1121-1125

- Senzer N, Mani S, Rosemurgy A, Nemunaitis J, Cunningham C, Guha C, Bayol N, Gillen M, Chu K, Rasmussen C, Rasmussen H, Kufe D, Weichselbaum R, Hanna N. TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors. *J Clin Oncol.* 2004 Feb 15; 22(4): 592-601
- Seung LP, Mauceri HJ, Beckett MA, Hallahan DE, Hellman S, Weichselbaum RR. Genetic radiotherapy overcomes tumor resistance to cytotoxic agents. *Cancer Res.* 1995; 55(23): 5561-5
- Smith RR, Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, Thomas LB. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer,* 1956; 9: 1211-1218
- Staba MJ, Mauceri HJ, Kufe DW, Hallahan DE, Weichselbaum RR. Adenoviral TNF-alpha gene therapy and radiation damage tumor vasculature in a human malignant glioma xenograft. *Gene Ther.* 1998 Mar; 5(3):293-300
- Steinwaerder DS, Lieber A. Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2000; 7: 556-567
- Takamiya Y, Short MP, Ezzeddine ZD, Moolten FL, Breakefield XO, Martuza RL. Gene therapy of malignant brain tumors: a rat glioma line bearing the herpes simplex virus type 1-thymidine kinase gene and wild type retrovirus kills other tumor cells. *J Neurosci Res.* 1992; 33(3): 493-503
- Tsai-Morris CH, Cao XM, Sukhatme VP. 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res.,* 1988; 16(18): 8835-46
- Vassaux G, Hurst HC, Lemoine NR. Insulation of a conditionally expressed transgene in an adenoviral vector. *Gene Ther* 1999; 6: 1192-1197
- Verma IM, Gene Therapy. *Sci Am,* 1990 Nov; 222(5): 68-72
- Vogler H and Beck-Bornholdt H-P, Radiotherapy of the Rhabdomyosarcoma R1H of the rat: Kinetics of cellular inactivation by fractionated irradiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.,* 1988; Vol. 14: 317-325
- Würschmidt F, Beck-Bornholdt H-P, Vogler H, Radiobiology of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat: influence of the size of irradiation field on tumor response, tumor bed effect, and neovascularization kinetics. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.,* 1990; Vol. 18: 879-882

Würschmidt F, Vogler H, Beck-Bornholdt H-P, Radiotherapy of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat: the influence of the number of fractions on tumor and skin response. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 1988; Vol. 14: 497-502

Zhang WW, Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy*, 1999; Vol 6, No 2: 113-138

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Klonierungsschema von pTvL1 und pTvL2	39
Abbildung 2: Klonierungsschema pTvL3; Rekombination zu AdTvL3	40
Abbildung 3: Klonierungsschema pTvL4; Rekombination zu AdTvL4	41
Abbildung 4: Klonierungsschema pTvL6	42
Abbildung 5: Klonierungsschema pTvL7	43
Abbildung 6: Restriktionsverdau von AdTvL3 mit PvuI	44
Abbildung 7: Restriktionsverdau von AdTvL4 mit PvuI	45
Abbildung 8: EGFP-Expression in Abhängigkeit von der Zelllinie	48
Abbildung 9: Induktion der EGFP-Expression durch Bestrahlung mit 6Gy	49
Abbildung 10: EGFP-Expression in R1H-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis	52
Abbildung 11: GCV-Dosis in µg pro ml Medium	53
Abbildung 12: Vergleich makroskopischer Blaufärbung und Zellzahl unter dem Mikroskop	56
Abbildung 13: Einfluß der Strahlendosis auf die Zytotoxizität.	57
Abbildung 14: Einfluss der Viruskonzentration auf die Toxizität.	58
Abbildung 15: Einfluß der GCV-Konzentration auf die Toxizität.	58
Abbildung 16: Zytotoxizität in Abhängigkeit von Virus- und GCV-Dosis bei unbestrahlten Zellen.	59
Abbildung 17: Induktion der Zytotoxizität bei einer MOI von 50	60
Abbildung 18: Additiver Effekt der Virus-/GCV-Applikation zur Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis	61
Abbildung 19: Abhängigkeit von Leakiness und additivem Effekt von der Virusdosis	62
Abbildung 20: Zellüberleben in Abhängigkeit von der Strahlendosis	63
Abbildung 21: Zytotoxizität in Abhängigkeit von Strahlen- und Virusdosis	64
Abbildung 22: Additiver Effekt der Virus-/GCV-Gabe zur alleinigen Strahlentherapie in Abhängigkeit von der Virusdosis	65
Abbildung 23: Additiver Effekt der Virus-/GCV-Kombination zu alleiniger Bestrahlung, Leakiness, Strahleninduktion der Virus-/GCV- vermittelten Zytotoxizität	66

Abbildung 24: EGFP-Expression in R1H-Zellen, die mit pTvL3, pTvL6 oder pTvL7 transfiziert und mit 0 oder 6 Gy bestrahlt wurden. Dokumentation 48 Stunden nach Transfektion, 36 Stunden nach Bestrahlung	68
Abbildung 25: EGFP-Expression in R1H-Zellen, die mit pTvL3, pTvL6 oder pTvL7 transfiziert und mit 0 oder 6 Gy bestrahlt wurden. Dokumentation 96 Stunden nach Transfektion, 84 Stunden nach Bestrahlung	68
Tabelle 1: Fragmentvorhersage für SacI-Verdau der pTvL7-Ligation	42
Tabelle 2: Fragmentgrößenvorhersage des PvuI-Verdaus von AdTvL3	44
Tabelle 3: Fragmentgrößenvorhersage des PvuI-Verdaus von AdTvL4	45
Tabelle 4.: Transfiziertes Plasmid, Strahlendosis, Anzahl der Proben	46
Tabelle 5: Virusmenge	48
Tabelle 6: eingesetztes Virus, Strahlendosis, Anzahl der Proben	50
Tabelle 7: Virusmenge, Strahlendosis, Anzahl der Proben	51
Tabelle 8: Verwendetes Virus, Strahlendosis, Anzahl der Proben	52

9. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Betreuerin Martina Anton, meinem Doktorvater Florian Würschmidt und Sieglinde Wegerer, ohne die diese Arbeit niemals entstanden wäre. Ferner danke ich Herrn Professor Gänsbacher und Herrn Professor Molls, in deren Institut bzw. Klinik ich zu arbeiten das Vergnügen hatte. Des weiteren gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die dieses Projekt finanziell unterstützt hat. Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung in allen Belangen.