

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München

Strategien zur regulierten adenoviral vermittelten Krebsgentherapie

Matthias Strobl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. J. Graw
2. Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer
3. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 24.04.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.07.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 Das Prostatakarzinom	3
1.1.1 Anatomie der Prostata	3
1.1.2 Epidemiologie und Entstehung des Prostatakarzinoms	4
1.1.3 Aktuelle Therapiestrategien	5
1.2 Gentherapie	7
1.2.1 Allgemein.....	7
1.2.2 Vektoren in der Gentherapie	7
1.2.3 Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie	9
1.2.4 Gentherapie des Prostatakarzinoms.....	14
1.3 Selektive Genexpression	16
1.3.1 Regulierbare Genexpression:	16
1.3.2 Prostataspezifische Expression	19
1.4 Eingesetzte therapeutische Transgene	22
1.4.1 Bovine seminale Ribonuklease.....	22
1.4.2 Cytosin Desaminase	25
1.4.3 YB-1	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit	28
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Material	29
2.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien	29
2.1.2 Geräte	32
2.1.3 Software	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2 Biochemische Methoden.....	41
2.2.3 Zellkulturmethoden.....	43
3 ERGEBNISSE	51
3.1 Allgemein	51
3.2 Voruntersuchungen zur Effizienz des Gentransfers	52
3.3 Charakterisierung der eingesetzten Expressionssysteme	55
3.3.1 Steuerung der PSA Promotor/Enhancer abhängigen Expression	55
3.3.2 Transfektionen zur Charakterisierung der verwendeten Vektoren	59
3.3.3 Übertragung der Transfektionsdaten auf Adenovirusebene	74

3.4	Charakterisierung der eingesetzten therapeutischen Gene nach adenoviralem Gentransfer	94
3.4.1	bsRNase.....	94
3.4.2	Cytosin Desaminase	108
3.4.3	YB-1	114
4	DISKUSSION	121
4.1	Vektorentwicklung.....	122
4.1.1	Gewebespezifische Transkriptionskontrolle durch das PSA Promotor/Enhancer Konstrukt.	122
4.1.2	Verstärkung der PSA P/E abhängigen Expression.....	123
4.2	Therapeutische Transgene.....	129
4.2.1	bsRNase.....	129
4.2.2	Cytosin Desaminase	135
4.2.3	YB-1	139
4.3	Abschließende Betrachtung.....	143
4.4	Ausblick.....	144
	LITERATURVERZEICHNIS	147
	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	161
	Abbildungen.....	161
	Tabellen	163

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro-	m	milli-
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	M	Mol
^{32}P	Phosphorisotop	MEM	<i>Minimum Essential Eagle Medium</i>
5-FC	5-Fluorcytosin	min	Minute
5-FU	5-Fluoruracil	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Abb.	Abbildung	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
AdV	Adenovirus	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
AP	alkalische Phosphatase	MW	Molekulargewicht
AR	Androgenrezeptor	MWCO	Molekulargewichtsauschluss
ARE	androgen responsive element	n	nano-
ATP	Adenosintriphosphat	NLS	Kernlokalisierungssignal
bCD	Cytosin Desaminase aus <i>E.coli</i>	OD	Optische Dichte
bp	Basenpaare	p	piko-
bsRNase	RNase aus Rindersperma	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CAR	Coxsackie-Adenovirus Rezeptor	PBS	Phosphate buffered Saline
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	PBS	salzhaltiger Phosphatpuffer
CMV	Cytomegalievirus	PCa	Prostatakarzinom
CPE	Zytopathischer Effekt	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CSD	<i>cold shock domain</i>	pfu	<i>plaque forming unit</i>
d. h.	das heisst	PI	Propidiumjodid
Da	Dalton	PSA	Prostata-spezifisches Antigen
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PVDF	Polyvinylidendifluorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RE	Restriktionsenzym
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	RLU	<i>relative light units</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	RNAi	RNA-Interferenz
DNS	Desoxyribonukleinsäure	rpm	Umdrehungen pro Minute
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	rRNA	ribosomal Ribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rtTA	reverser Tet-abhängiger Transaktivator
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	SDS	Natriumdodecylphosphat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
EZM	Extrazelluläre Matrix	SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
FKS	Fötale Kälberserum	TBE	Tris-Borat-EDTA
g	Gravitationskonstante oder Gramm	TE	Tris-EDTA
h	Stunde	TRE	<i>Tet-responsive element</i>
IC50	inhibitorische Konzentration	Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>	tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>	tTS	transkriptioneller Tet-abhängiger Silencer
k	kilo-	U	Einheit
kb	Kilobasen	UV	Ultraviolett
l	Liter	V	Volt
LB	Luria-Bertani	Vol.	Volumenanteil
m	Meter	yCD	Cytosin Desaminase aus <i>S.cervisiae</i>

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern, die mit derzeit etablierten Methoden nur in Ausnahmefällen erfolgreich behandelt werden kann. Für den Großteil der Patienten, in denen die Krankheit trotz Behandlung fortschreitet, könnten sich gentherapeutische Ansätze zu einer alternativen Behandlungsmöglichkeit entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das therapeutische Potenzial einer zytotoxischen Ribonuklease aus Rindersperma (*bovine seminale RNase*: bsRNase), des Transkriptionsfaktors YB-1 als Auslöser von Onkolyse und des Suizid-Gens Cytosin Desaminase (bCD) nach adenoviralem Gentransfer untersucht. Unter Verwendung des Promotors und eines Enhancers des PSA Gens konnte eine prostataspezifische Transgenexpression erreicht werden. Als Modellzelllinie für die gewebespezifische Expression diente die PSA-positive Zelllinie LNCaP, Negativkontrollen waren DU-145 und HeLa.

Für eine effiziente Expression der therapeutischen Transgene wurde das relativ schwache PSA-Promotor/Enhancer Konstrukt bzw. der CMV-Promotor in einem universellen Ansatz mit dem Tet-On System gekoppelt. Die entstandenen Plasmidvektoren wurden auf Reporterebene bezüglich ihrer Expressionsstärke, Induzierbarkeit, Kinetik und Gewebespezifität charakterisiert. Basierend auf diesen Daten wurden adenovirale Vektorsysteme mit den therapeutischen Transgenen generiert, die gewebespezifisch und universell aktiviert werden konnten und sich durch eine außergewöhnlich starke Genexpression auszeichneten.

Nach Infektion mit den entsprechenden Vektoren bzw. Vektorkombinationen mit YB-1 als Transgen fand eine gewebespezifische Zellzahlabnahme von 40% und mit bCD von bis zu 61% statt. Die gewebespezifische Expression von bsRNase konnte im Western Blot gezeigt werden. Auf die Quantifizierung der gewebespezifischen Abtötung durch bsRNase wurde aufgrund der außerordentlich hohen Sensitivität der PSA-positiven Referenzzelllinie LNCaP gegenüber bsRNase im Vergleich zu den Kontrollzelllinien verzichtet. Universell aktiviert konnten mit den therapeutischen Transgenen bsRNase, bCD und YB-1 bis zu 100% der Zellen abgetötet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden induzierbare Vektorsysteme entwickelt, die effizient zytotoxische Transgene sowohl gewebespezifisch wie auch universell-aktiviert exprimieren. Mit diesen Vektoren konnte erstmals das gentherapeutische Potenzial von bsRNase und YB-1 *in vitro* demonstriert werden.

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Anatomie der Prostata

Die Prostata ist eine etwa kastaniengroße Drüse, die im Becken lokalisiert ist und *posterior* vom Rektum und *anterior* von der Harnblase umgeben wird. Sie ist für die Produktion von Samenflüssigkeit verantwortlich, die die Motilität von Spermien erhöht. Daneben hat die Prostata einen großen Anteil an der Umwandlung des zirkulierenden Testosterons in seine aktive Form Dihydrotestosteron.

Weitere essenzielle Aufgaben werden der Prostata nach derzeitigem Kenntnisstand nicht zugesprochen. Die Prostata wird von weit verzweigten Gängen durchzogen, die mit sekretorischen Epithelzellen ausgekleidet sind. Diese Zellen sekretieren das prostataspezifische Antigen (PSA) und die prostataspezifische saure Phosphatase (Isaacs 1983). Das Wachstum der Epithelzellen ist androgenabhängig, wohingegen die basalen Zellen, aus denen sich die sekretorischen Epithelzellen differenzieren, androgenunabhängig sind.

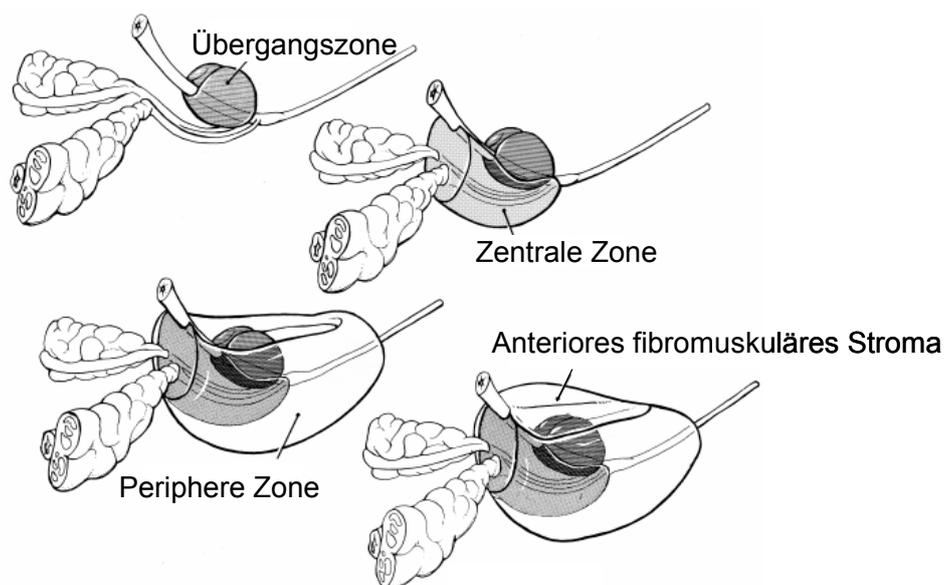


Abbildung 1: Überblick über den anatomischen Aufbau der Prostata

Die Drüse wird in vier histologische Bereiche unterteilt (Abb. 1). Der periphere Bereich macht etwa 70% der Gewebemasse aus und ist Ursprung der meisten Tumoren (Greene et al. 1991). Daneben besteht die Prostata aus dem zentralen Bereich (ca. 20%), dem Übergangsbereich und dem anterioren fibromuskulären Stroma mit einem Gewebeanteil von jeweils etwa 5%. Die Prostata ist nicht eindeutig vom umliegenden Gewebe abgegrenzt und geht in fibröses Gewebe und anschließend in Binde- und Fettgewebe über (McNeal 1988).

1.1.2 Epidemiologie und Entstehung des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) ist mit ca. 20% aller Krebsneuerkrankungen die mittlerweile am häufigsten diagnostizierte bösartige Neubildung beim Mann in Deutschland. Sein Anteil an der Gesamtmortalität aller diagnostizierten Krebsfälle bei Männern beträgt zehn Prozent. PCa ist damit die dritthäufigste Todesursache bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren, allerdings treten bereits vereinzelt klinisch relevante Fälle im Alter ab 50 Jahren auf. In den letzten Jahren nahm die Anzahl der diagnostizierten Fälle von Prostatakarzinomen zu (Stand 2004, Robert-Koch-Institut, www.rki.de). Dies ist hauptsächlich auf sensitivere Untersuchungsmethoden (Greenlee et al. 2000; Hughes et al. 2005) und den generellen Anstieg der Lebenserwartung zurückzuführen.

Über 95% der malignen Prostataneoplasien leiten sich aus Adenokarzinomen ab, die aus Prostataepithelzellen entstehen (Bostwick 1989). Sie bilden mit einer Rate von ca. 80% Metastasen im Knochen- und Lymphknotenbereich (Garnick und Fair 1996). Die molekulare Pathologie des Prostatakarzinoms ist sehr komplex und kann nicht verallgemeinert werden. In Tumorbiopsien wurden Deletionen und Mutationen von Tumorsuppressorgenen sowie hochregulierte Onkogene festgestellt, daneben ist die deregulierte Expression von Komponenten des Androgensystems sowie von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren dokumentiert (Hughes et al. 2005). Man geht davon aus, dass zusätzlich zu den molekularen Faktoren eine genetische Prädisposition, ethnische Herkunft (Rubin und De Marzo 2004), Umwelteinflüsse wie etwa Ernährung und vorausgegangene Entzündungen der Prostata die Entstehung einer Prostataneoplasie zusätzlich beeinflussen (De Marzo et al. 2004).

1.1.3 Aktuelle Therapiestrategien

Bei der Wahl der Therapie des Prostatakarzinoms sind das Lebensalter des Patienten, sein Allgemeinzustand und die Pathologie des Tumors ausschlaggebend. Nach Neudiagnose eines Prostatakarzinoms bei Patienten über siebzig ist aufgrund des langsamen Wachstums des Tumors der abwartende Therapieansatz, das so genannte *Watchful Waiting* indiziert. Die derzeit zur Verfügung stehenden aktiven Therapieformen könnten die Gesamtkonstitution, insbesondere des älteren Patienten, langfristig stark beeinträchtigen oder sogar zum Tod führen. Derzeit angewandte Therapiestrategien werden in kurative und palliative Ansätze unterschieden.

Der kurative Ansatz geht von einer vollständigen Heilung des Patienten aus, wobei ein gering ausdifferenzierter Tumor und keine Metastasierung des Tumors Voraussetzung sind. Bei den Therapiemöglichkeiten steht die chirurgische Entfernung der Prostata und des umliegenden potenziell befallenen Gewebes, die so genannte radikale Prostatektomie, im Vordergrund. Da bei dieser Technik auch Nerven durchtrennt werden, können in Folge der Operation Inkontinenz und Impotenz auftreten. Die Strahlentherapie stellt einen weiteren kurativen Ansatz dar. Man unterscheidet zwischen der Bestrahlung durch eine externe Strahlenquelle (Teletherapie) und dem Implantieren radioaktiver Kerne (^{125}I) in den Tumor (Brachytherapie) (Bast et al. 2003; Syed et al. 2003).

Die palliative Therapie wird bei älteren und bei solchen Patienten angewandt, bei denen aufgrund des Differenzierungs- und Metastasierungsgrads des Tumors nicht mehr von einer Heilung ausgegangen werden kann. Das primäre Ziel der palliativen Therapie ist die Lebensverlängerung unter Beibehaltung einer möglichst hohen Lebensqualität. Neben der bereits erwähnten Strahlentherapie, die auch hier eingesetzt wird, spielt besonders die Hormontherapie eine große Rolle. Das Wachstum des Prostatakarzinoms, aber auch das des normalen Prostataepithels, ist androgenabhängig, d. h., es kann zeitlich begrenzt durch Androgendepletion gestoppt werden, die durch eine chirurgische oder eine medikamentöse Kastration erreicht wird. Dabei kommt es zu einem Rückgang des Tumorzellvolumens. Diese Methode wird auch im Zusammenhang mit der radikalen Prostatektomie genutzt, um den Tumor vor der Operation räumlich möglichst zu begrenzen. Im Rahmen der palliativen Therapie kann die Androgendepletion die Progression des Karzinoms zwischen

zwölf und 18 Monate aufhalten. Danach geht der Tumor in ein androgenunabhängiges Wachstum über (Bast et al. 2003).

Die klassische Krebstherapie mit etablierten zytotoxischen und zytostatischen Wirkstoffen hatte bisher in der Therapie des Prostatakarzinoms aufgrund einer nur sehr geringen Effizienz wenig Bedeutung (Bast et al. 2003; Webster et al. 2005). Neue Substanzklassen befinden sich derzeit in klinischer Erprobung (Syed et al. 2003; Petrylak et al. 2004; Hussain et al. 2005). Weitere experimentelle Ansätze beinhalten die Induktion von Apoptose und Differenzierung der Krebszellen (Bankhead 2003), das Beeinflussen der Angiogenese im Tumor (Fortier et al. 1999; Longoria et al. 2005) und die physikalische Therapie des Tumors durch Kältebehandlung (Onik 2001; Pareek und Nakada 2005). Besonders stark gewinnt derzeit in diesem Bereich die Gentherapie an Bedeutung. Darauf wird genauer unter dem folgenden Punkt 1.2.4 eingegangen.

1.2 Gentherapie

1.2.1 Allgemein

Durch den rapiden Fortschritt im Bereich der Gentechnologie eröffnet sich in der Medizin neben den klassischen Therapiemethoden das Feld der so genannten molekularen Medizin. Neben rekombinanten Wirkstoffen und der Stammzelltherapie ist die Gentherapie ein prominenter Vertreter dieses Forschungsgebiets. Die Gentherapie bezeichnet den Transfer von Genen, Genfragmenten und Oligonukleotiden in Zellen oder Gewebe mit dem Ziel, wichtige Zellfunktionen wiederherzustellen, pathologische Mechanismen zu unterdrücken oder entartete Zellen abzutöten. Sie unterteilt sich in die stark umstrittene Keimbahntherapie, die bisher nur im Tiermodell untersucht wird, und die somatische Gentherapie, die den Gentransfer im Individuum außerhalb der Keimbahn zum Ziel hat. Die somatische Gentherapie wiederum spaltet sich in den *in vivo* Ansatz, bei dem die Vektoren direkt appliziert werden und den *ex vivo* Ansatz, mit dem autologe oder allogene Zellen mit entsprechenden Vektoren transduziert und anschließend wieder in den Organismus eingebracht werden.

Derzeit befinden sich in Deutschland Gentherapieansätze in den Bereichen Krebs, HIV, Herz-Kreislaufkrankungen und Transplantationsmedizin in der klinischen Erprobung und decken somit ein weites Spektrum klinischer Indikationen ab (Deutsches Register für somatische Gentransferstudien DeReG, Stand Mai 2005 <http://www.zks.uni-freiburg.de/dereg/>).

1.2.2 Vektoren in der Gentherapie

Ein wichtiges Kriterium beim Design einer Gentherapie ist die Auswahl des passenden Vektors. Aufgrund der Vielzahl der Indikationen stellen sich unterschiedliche Anforderungen bezüglich des zu behandelnden genetischen Defekts, der Dauer der Genexpression, der möglichen Applikationsform, der Transduktionseffizienz und des therapeutischen Ziels. Derzeit werden in der Gentherapie sowohl nichtvirale als auch virale Strategien verfolgt.

Der nichtvirale Gentransfer bezeichnet das Einbringen von Plasmid-Vektoren in Zellen. Im Gegensatz zu viralen Vektorsystemen können dabei sehr große Sequenzen mit mehreren Expressionskassetten transduziert werden. Daneben sind nichtvirale

Systeme kostengünstig und einfach zu handhaben. Die einfachste Form ist der Gentransfer mittels nackter DNA (Wolff und Budker 2005). Diese Art des Transfers ist wenig effizient und bewirkt eine nur schwache und kurz andauernde Genexpression. Die derzeit gängigste Methode des nichtviralen Gentransfers stellt die Kombination von kationischen Liposomen mit Plasmid-DNA dar. Sie zeichnet sich durch eine hohe Transduktionseffizienz *in vitro* aus. Da die verwendeten Liposomen im Organismus toxisch wirken, sind sie nur für den Gentransfer *ex vivo* geeignet (Hirko et al. 2003). Die genetisch veränderten Zellen werden anschließend in den Organismus zurückgegeben. Weitere Ansätze zum effizienten nichtviralen *ex vivo* Gentransfer beinhalten Elektroporation, Mikroinjektion, bioballistische Verfahren (Prince 1998) und Magnetofektion (Scherer et al. 2002).

Der virale Gentransfer basiert auf den im Laufe der viralen Evolution perfektionierten Mechanismen, möglichst effizient in Wirtszellen einzudringen und die Erbinformation in den Zellkern einzuschleusen. Durch Eliminieren von Sequenzen, die für die Pathogenität des Virus kodieren und deren Genprodukte beim Gentransfer keine Rolle spielen, wird die Therapiesicherheit erhöht und Platz für therapeutische Gene bzw. Expressionskassetten geschaffen. Üblicherweise werden so replikationsdefiziente bzw. konditionell replikationskompetente Viren generiert. Die Genprodukte, die für die virale Replikation notwendig sind, werden *in trans* in einer Verpackungszelllinie zur Verfügung gestellt. Virale Vektoren werden in integrierende und nicht integrierende Systeme unterschieden.

Rekombinante integrierende Viren inserieren ihr Genom in das der Wirtszelle und garantieren so eine dauerhafte Expression des therapeutischen Transgens. Diese Eigenschaft macht sie so zu idealen Vektoren für die stabile Transduktion von Zellen für die Tumorstabilisierung (Nelson et al. 2000) oder bei der Korrektur monogenetisch bedingter Erkrankungen (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Unter den integrierenden Viren sind Retroviren in Bezug auf Gentherapie die am besten charakterisierte Gruppe. Eine wichtige Weiterentwicklung auf dem Feld des retroviralen Gentransfers war die Etablierung der Lentiviren, die sich von den humanen Immundefizienzviren Typ 1 (HIV-1), und Typ 2 (HIV-2), sowie dem felines Immundefizienzvirus (FIV) und dem Affenimmundefizienzvirus (SIV) ableiten. Lentiviren verfügen im Gegensatz zu den einfachen Retroviren über eine komplexere Genomorganisation und können auch postmitotische Zellen infizieren (Verma und Weitzman 2005). Neben den Retroviren gehören die nichtpathogenen adenoassoziierten Viren (AAV) aus der Gruppe der

Parvoviren zu den derzeit als Vektoren genutzten integrierenden Viren. Im Gegensatz zu Retroviren integrieren AAV gerichtet ins Wirtsgenom. Sie verfügen über ein einzelsträngiges DNA-Genom und können ausschließlich in Zellen replizieren, die mit Herpes- oder Adenoviren koinfiziert sind (Verma und Weitzman 2005).

Das Potenzial nicht integrierender Viren liegt in der transienten Transgenexpression, sodass eine dauerhafte Expression und eine damit assoziierte Beeinträchtigung des Organismus weit gehend ausgeschlossen werden kann. Die derzeit wichtigste Gruppe der nicht integrierenden Vektoren stellen die Adenoviren dar, die unter Punkt 1.2.3 ausführlich besprochen werden. Daneben wird das *Herpes simplex Virus* (HSV) Typ 1, ein DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae, aufgrund seines Tropismus insbesondere als Vektor zur Transduktion von neuronalen Geweben und Tumoren eingesetzt (Frampton et al. 2005). Eine weitere Vektorgruppe sind die Vacciniaviren, die aufgrund ihrer hohen Transgenkapazität von bis zu 25 kb auch zum Multigen-transfer eingesetzt werden können (Peplinski et al. 1998). Sie finden ihre Anwendung vorwiegend in der Tumorstudie (Moroziewicz und Kaufman 2005). Neuere Vektoren in der Gentherapie schließen Baculoviren (Sarkis et al. 2000; Hu 2005) und Alphaviren (Lundstrom 2005) ein.

Derzeit wird in Deutschland in bereits begonnen bzw. geplanten Gentherapiestudien das therapeutische Potenzial von Retroviren (*ex vivo*), nackter DNA (*in vivo* und *ex vivo*), Adeno- und adenoassoziierten Viren (*in vivo*), Herpesviren (*in vivo*) und Vacciniaviren (*in vivo*) untersucht (Quelle: Deutsches Register für somatische Gentransferstudien DeReG, Stand Mai 2005; <http://www.zks.uni-freiburg.de/dereg/>).

1.2.3 Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie

Adenoviren (AdV) wurden erstmals 1953 bei der Suche nach Erregern akuter Atemwegsinfekte isoliert (Rowe et al. 1953). Die Einteilung der humanen Adenoviren erfolgt nach Serotypen, von denen derzeit 49 bekannt sind (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/respiratory/eadfeat.htm>, Stand: Dezember 2005). Außerdem werden die Viren auf Basis ihrer genetischen Variabilität, ihres onkogenen Potenzials, ihrer Hämagglutininseigenschaften und des GC-Gehalts ihrer DNA in die Subgenera A bis F unterteilt (Shenk 1996; Roelvink et al. 1998). AdV können, abhängig vom Serotyp, Atemwegsinfekte, Gastroenteritis, Bindehautentzündung und Blasenentzündung verursachen (Shenk 1996)

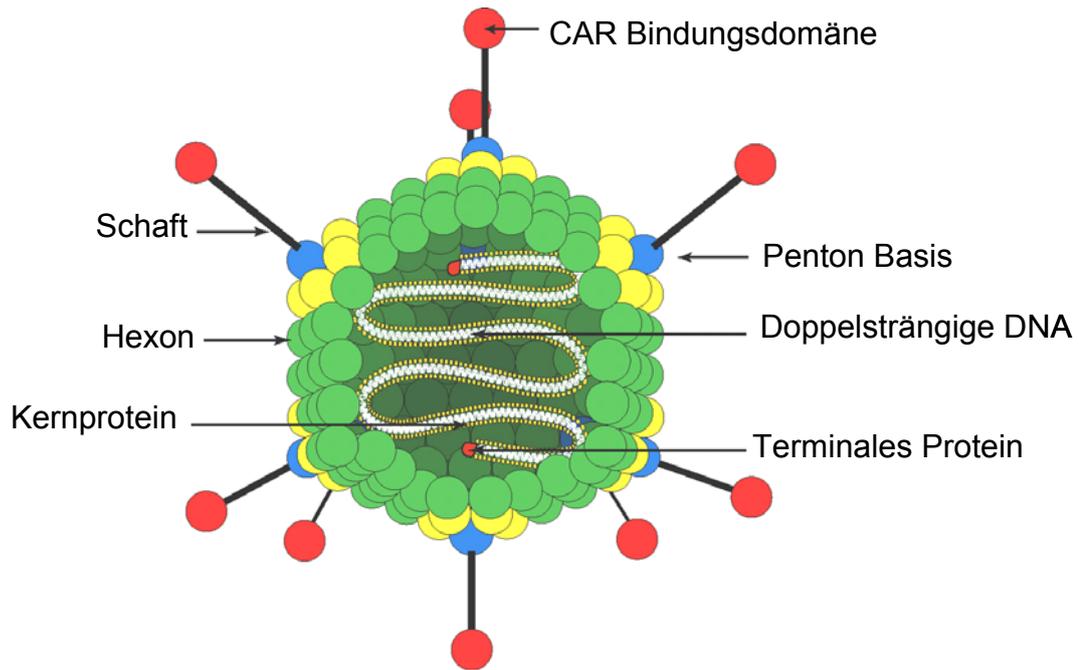


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Adenovirus (nach: Qbiogene Inc.)

AdV sind ikosaedrische Partikel und bestehen aus einem Proteinkapsid, in das ein doppelsträngiges, ca. 36 kb großes, lineares DNA-Genom verpackt ist (Abb. 2). An beiden Enden der DNA, die um das histonähnliche Kernprotein VII gewunden ist, befinden sich terminale Proteine, die kovalent mit der DNA verbunden sind. Daneben binden die Polypeptide V und X an die DNA. Das Kapsid besteht aus 252 Untereinheiten (Kapsomere), die sich in 240 Hexone und 12 Pentone aufteilen. Diese Bezeichnungen beziehen sich auf den Aufbau des Kapsids: Hexone sind von sechs und Pentone von fünf benachbarten Strukturen umgeben (vgl.: Abb. 2). Jedes Penton besteht aus einer Basis, die einen Teil der Kapsidoberfläche bildet, und einem Faserprotein, an dessen Spitze eine globuläre Rezeptorbindungsdomäne lokalisiert ist (Shenk 1996).

Nach Konvention wird das doppelsträngige, ca. 36 kb große, lineare AdV-Genom mit der E1-Region, auf die im Folgenden noch eingegangen wird, am linken Ende dargestellt (Abb. 3). Es wird an beiden Enden von *Inverted Terminal Repeats* (ITR) flankiert, an denen die DNA-Replikation initiiert wird. Unmittelbar anschließend an das linke ITR ist die Verpackungssequenz Ψ lokalisiert, die aus sieben AT-reichen Sequenzwiederholungen besteht und während der viralen Replikation die Verpackung der DNA in die Kapside steuert (Hearing et al. 1987).

Das virale Chromosom ist in fünf frühe (E1A, E1B, E2, E3 und E4), zwei verzögert frühe (IX und IVa2) und eine späte Transkriptionseinheit unterteilt, aus der fünf mRNA Subfamilien (L1 – L5) hervorgehen. Das VA Segment kodiert für ca. 160 bp lange, nicht translatierte, virusassoziierte (VA) RNA Sequenzen, die die Translation viraler Genprodukte regulieren und die von der zellulären RNA-Polymerase III transkribiert werden. Kodierende mRNAs werden von der RNA-Polymerase II von beiden DNA-Strängen transkribiert. Die Transkription der adenoviralen Gene ergibt jeweils eine Population von mRNAs, die durch alternatives Spleissen oder unterschiedlichen Polyadenylierungssequenzen entstehen. Die Expression der einzelnen Gene ist zeitlich in Gruppen organisiert. Die frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 sowie die verzögert frühen Gene IX und IVa2 werden vor Beginn der viralen Replikation exprimiert, die späte Transkriptionseinheit wird nach Beginn der Replikation als ein mRNA Molekül transkribiert und in die fünf späten mRNA Subpopulationen L1-L5 aufgespalten, die für die Strukturproteine des Virus kodieren. Die frühen Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren (E1A, E1B), für Proteine der DNA-Replikationsmaschinerie (E2), für die Modulierung der Immunantwort (E3) und die Regulation der Transkription, der viralen DNA-Replikation und des mRNA Transports (E4) (Shenk 1996).

Späte Transkription

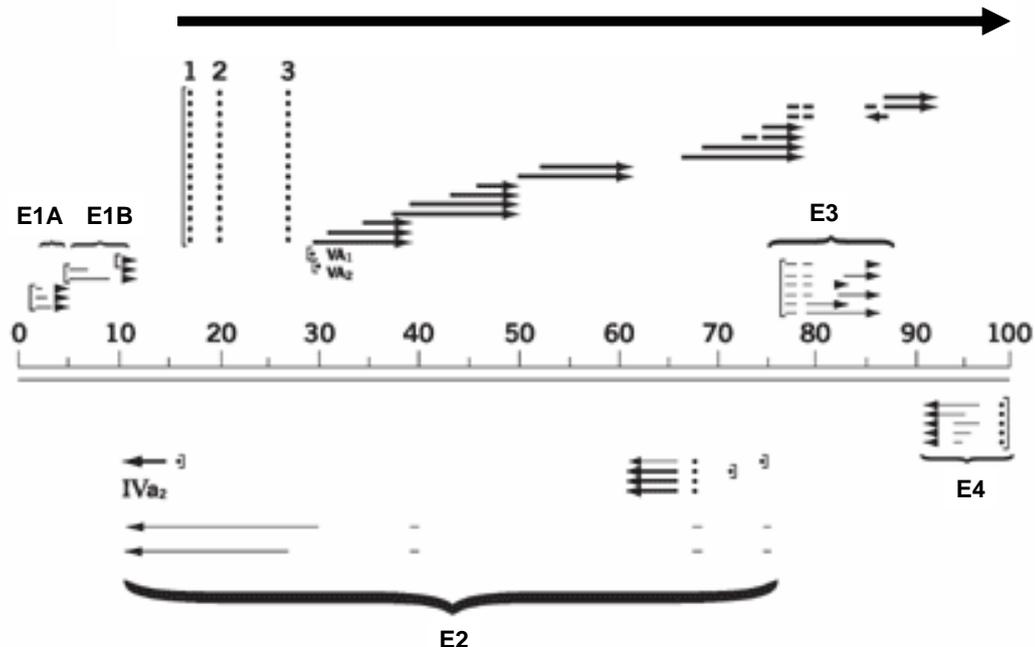


Abbildung 3: Schematische genomische Organisation des Adenovirus. Das Genom wird in 100 Einheiten unterteilt (Skalierung). Die Pfeile stellen die einzelnen mRNA Populationen dar. Die späten Transkripte haben ihren Ursprung am Major Late Promotor (MLP) bei 16,3 Einheiten und sind mit einer dreiteiligen Leadersequenz ausgestattet (1; 2; 3) (verändert nach Shenk 1996).

Der replikative Zyklus des Adenovirus startet mit einer frühen Phase, die mit der Infektion beginnt und nach etwa sechs Stunden mit Beginn der DNA-Replikation abgeschlossen ist. Darauf folgt die späte Phase, die mit der Expression der späten Gene beginnt und mit der Zelllyse endet. Der erste Schritt der frühen Phase ist die Infektion, die durch Bindung der Rezeptorbindungsdomäne an einem Rezeptor auf der Zelloberfläche eingeleitet wird. Die Mehrzahl der Serotypen bindet an den Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR), einem Mitglied der Immunglobulin Superfamilie (Bergelson et al. 1997; Roelvink et al. 1998). Die CAR Verteilung auf der Oberfläche der Zielzellen bzw. Zielgewebe ist somit bezüglich ihrer Infizierbarkeit entscheidend. Bei *in vitro* Experimenten wird daher die Infizierbarkeit durch die MOI_{50} angegeben, die die Anzahl der viralen *Plaque Forming Units* (pfu) beschreibt, die benötigt werden, um 50% der Zellen zu infizieren. Zur Internalisierung ist zusätzlich die Interaktion eines Arg-Gly-Asp (RGD) -Motivs der Penton Basis mit den zellulären Integrinen des $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Typs notwendig (Wickham et al. 1993). Danach wird der Viruspartikel an clathrinreichen Bereichen der Zellmembran, den *Clathrin Coated Pits*, endozytiert. Das Virus verliert im Endosom die Faserproteine und wird nach Ansäuerung und Interaktion der Pentonbasis mit den $\alpha_v\beta_5$ Integrinen an der Innenseite des Endosoms ins Zytosol freigesetzt. Der anschließende Transport zum Nukleus ist Dynein/Dynactin abhängig. Am Nukleus bindet der Viruspartikel an den *Nuclear Pore Complex Receptor* CAN/Nup214, der den Partikel rezeptorvermittelt abbaut und die virale DNA in den Kern eingeschleust (Meier und Greber 2004).

In der Gentherapie spielen Adenoviren (AdV) neben Retroviren eine herausragende Rolle. Neben einem weiten Wirtstropismus und einer hohen Transduktionseffizienz in mitotischen und postmitotischen Zellen kann AdV leicht und in hohen Titern präpariert werden. Aufgrund seiner Stabilität ist das Virus einfach zu handhaben und kann *in vivo* und *ex vivo* effizient eingesetzt werden. Das virale Genom verbleibt episomal, sodass nur eine transiente Transgenexpression stattfindet (Verma und Weitzman 2005). Damit eignet sich AdV für die direkte Tumorentherapie, da eine dauerhafte Expression der eingesetzten Transgene, die den Zelltod auslösen sollen, nicht erstrebenswert ist.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten adenoviralen Vektoren leiten sich vom AdV Serotyp 5 ab, dessen Verpackungskapazität für DNA bei etwa 105% seines Genoms liegt (Bett et al. 1993). Da diese zusätzliche Kapazität von ca. 1,8 kb zur Nutzung von AdV als Transgen tragenden Vektor nicht ausreicht, wurden in ersten

Ansätzen rekombinante Adenoviren mit Deletionen in der E1- und/oder der E3-Region generiert (Berkner und Sharp 1983; Haj-Ahmad und Graham 1986). Diese rekombinanten AdV der ersten Generation verfügen bei einer E1/E3-Deletion über eine erweiterte Transgenkapazität von bis zu 8 kb. Durch den Verlust der E1-Region, die für die Initiierung des lytischen Zyklus notwendig ist, ist das AdV replikationsdefizient. Zur Herstellung und Propagierung des Virus wird deshalb die Verpackungszelllinie 293 eingesetzt, die stabil mit einem ca. 4 kb großen DNA-Fragment vom 5' Ende des AdV-Genoms, das auch die für die Virusreplikation essenzielle E1-Region enthält, transfiziert ist (Graham et al. 1977). In dieser Zelllinie werden die Genprodukte der E1-Region *in trans* zur Verfügung gestellt, die die Replikation des rekombinanten, E1-defizienten AdV ermöglicht. Der Verlust der E3-Region, die die Gene für die Modulierung der Immunantwort trägt, hat keine Auswirkungen auf die Replikationskompetenz des Virus.

Adenoviren der ersten Generation wurden hinsichtlich ihrer Verpackungskapazität und ihrer Immunogenität kontinuierlich weiterverbessert. Zusätzliche Deletionen in der E2-Region (Amalfitano et al. 1998) und in Bereichen der E4-Region (Yeh et al. 1996) charakterisieren AdV der zweiten Generation. Sie weisen neben einer höheren Transgenkapazität eine geringere Immunogenität durch Deletion viraler Gene auf und ermöglichen so eine Erhöhung der Expressionsdauer (Engelhardt et al. 1994). Die dritte Generation rekombinanter Adenoviren enthält vom ursprünglichen adenoviralen Genom noch die beiden ITR und das Verpackungssignal Ψ (*Gutless Virus*) (Parks et al. 1996). Neben einer Steigerung der Verpackungskapazität auf ca. 36 kb erfolgt durch die vollständige Deletion adenoviraler Gene nur eine schwach ausgeprägte Immunantwort, sodass Expressionen von bis zu 84 Tagen beschrieben wurden (Chen et al. 1997).

1.2.4 **Gentherapie des Prostatakarzinoms**

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt ein sehr interessantes Ziel für eine gentherapeutische Intervention dar, da es derzeit mit gängigen Methoden nicht hinreichend behandelt werden kann (vgl.: 1.1.3). In der Tumorgentherapie wird generell zwischen korrektiven und zytoreduktiven Ansätzen unterschieden:

Im Rahmen der korrektiven Therapie werden tumorauslösende Veränderungen im Genom der Zelle durch Gentransfer behoben. Diese Veränderungen können durch Abweichen des Methylierungsmusters, durch Punktmutationen oder durch Verluste ganzer Chromosomenabschnitte charakterisiert sein (Isaacs et al. 1994; Hughes et al. 2005). Eine Möglichkeit der Korrektur ist das Einbringen eines Gens, das für die funktionale Wildtypform eines deletierten bzw. mutierten Tumorsuppressorproteins kodiert. In diesem Zusammenhang wurden bereits erfolgreich Studien mit der Substitution von Wildtyp p53 realisiert (Pisters et al. 2004). Daneben wurden mit den Tumorsuppressorproteinen NKX3.1, PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog), p16 und Rb (Retinoblastomprotein) weitere potenzielle therapeutische Interventionspunkte für die korrektive Gentherapie des Prostatakarzinoms identifiziert (Isaacs 1995; Pesche et al. 1998; Harrington et al. 2001; Hughes et al. 2005).

Weitere Ansatzpunkte stellen die im PCa hochexprimierten Onkogene bzw. Proto-Onkogene dar (Hughes et al. 2005), deren Expression durch den Einsatz von *Antisense*-Oligonukleotiden gehemmt werden kann (Chi und Gleave 2004). Chemisch modifizierte *Antisense*-Oligonukleotide gegen die Onkogene *c-myc* und *bcl-2* befinden sich bereits in klinischer Erprobung (Chi 2005; Devi et al. 2005). Die Hemmung der Expression von Proto-Onkogenen und Onkogenen im Prostatakarzinom konnte zudem durch RNA Interferenz (RNAi) realisiert werden (Futami et al. 2002; Haag et al. 2005; Wannenes et al. 2005). In weiteren gegen Bcl-2 gerichteten Ansätzen konnte der antiapoptotische Effekt durch Überexpression des dominant negativen Proteins Bax nach Gentransfer (Gu et al. 2002; Zhang et al. 2002b) und durch RNAi blockierte Bildung des Bax Inhibitor-1 (Grzmil et al. 2003) aufgehoben werden.

Die Immuntherapie ist wie die im Folgenden beschriebene Enzym/*Prodrug* Therapie, die Expression zytotoxischer Genprodukte und die Onkolyse eine zytoreduktive Therapie. Sie basiert auf der Aktivierung einer ruhenden Immunreaktion gegen den Tumor, die durch eine verbesserte Präsentation von tumor- bzw. gewebespezifischen Antigenen gegenüber dem Immunsystem aktiviert wird (Webster et al. 2005). Dies ist

besonders im PCa von Bedeutung, da PCa Zellen nur über ein sehr geringes immunogenes Potenzial verfügen (Blades et al. 1995).

Die Genterapie mit Enzym/*Prodrug* Systemen (*Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy*: GDEPT) beruht auf der Konversion einer exogenen, nicht toxischen Substanz in einen zytotoxischen Metaboliten durch ein Enzym, dessen Erbinformation vorher in die Zielzelle transduziert wurde und das der Zielorganismus nicht selbst synthetisiert (Dachs et al. 2005). Im Rahmen der Therapie des PCa konnte durch den Einsatz prostataspezifischer Promotoren in Kombination mit Suizidgenen das gewebespezifische Abtöten der Zielzellen gezeigt werden (Martiniello-Wilks et al. 2002; Yoshimura et al. 2002; Park et al. 2003). Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Suizidgen Cytosin Desaminase wird unter Punkt 1.4.2 ausführlicher betrachtet.

Die Expression von Zytotoxinen führt zu Schädigung und zum Untergang der transduzierten Zelle und beeinträchtigt bzw. tötet idealerweise auch benachbarte Tumorzellen (*Bystander*-Effekt). Der zytoreduktive Effekt kann durch die Transduktion von exogenen Toxinen, wie etwa dem Diphtherietoxin erreicht werden (Li et al. 2002; Peng et al. 2002). Die Verwendung endogener Toxine beschränkt sich in der Hauptsache auf Apoptose auslösende Faktoren, wie Bax, Fas-Ligand oder TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Norris et al. 2001).

In der onkolytischen Tumorthherapie werden selektiv replikationskompetente Viren eingesetzt, die in der Zielzelle replizieren und den lytischen Zyklus vollenden, d.h. die Wirtszelle lysieren. Bei onkolytischen Viren wird zwischen intrinsisch selektiven RNA Viren, die nur in Zellen mit Interferonresistenz vermehrungsfähig sind (z.B. Reoviren, Masernvirus Subtyp MV-SPUD, Newcastle Disease Virus), Viren, die sich durch eine Deletion in ihrem Genom nur selektiv in Tumorzellen vermehren können (Adenovirus, Vacciniavirus, HSV, Poliovirus), Viren, deren Replikationsmaschinerie unter die Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors gebracht wurde (Adenovirus, HSV). (Kirn 2002) und replikationsdefiziente Viren, die durch Koexpression und daraus resultierender Akkumulation zelleigener Transkriptionsfaktoren, replizieren können, unterschieden (Holm et al. 2002).

1.3 Selektive Genexpression

1.3.1 Regulierbare Genexpression:

Die Möglichkeit der Regulation der Genexpression ist heute in vielen Feldern der Biologie und Medizin von großer Bedeutung. Sie wird *in vitro* zur Aufklärung der Funktion von Proteinen in der Zelle genutzt, in transgenen Tieren stellt sie durch die Möglichkeit des An- und Abschaltens von Genen ein wichtiges Instrument zur Funktionsaufklärung von Proteinen während der Ontogenese und im adulten Tier dar (Gossen und Bujard 2002). Mit den Fortschritten und den Erfahrungen der Gentherapie zeigt sich auch hier der wachsende Bedarf nach regulierbaren Expressionssystemen, da viele Erkrankungen heterogen und dynamisch verlaufen und so eine optimale Anpassung der Transgenexpression erfordern (Agha-Mohammadi und Lotze 2000; Clackson 2000).

Die Möglichkeit zur Regulation der Genexpression ist auch in der vorliegenden Arbeit ein wichtiger Aspekt. Bei der hier beschriebenen Herstellung von viralen Vektoren, die ein toxisches Transgen tragen, ist eine Regulation essenziell, um die Verpackungszelllinie bei der Vektorgenerierung und –propagation nicht durch unkontrollierte Transgenexpression zu schädigen (Massie et al. 1998). Das ideale Regulationssystem sollte spezifisch sein, d.h., der Induktor ist nicht toxisch, interferiert nicht mit zellulären Signalwegen und sollte eine gute Bioverfügbarkeit besitzen. Die Induktion der Expression sollte reversibel und dosisabhängig modulierbar sein. Von den bislang beschriebenen und genutzten Systemen zur Genregulation (Fussenegger 2001; Shimizu-Sato et al. 2002) erfüllt das heterologe Tetrazyklin induzierbare System (Tet-System) die beschriebenen Anforderungen weitestgehend. In den mehr als zehn Jahren, seit der erstmaligen Beschreibung des Tetrazyklin regulierbaren Expressionssystems fand eine kontinuierliche Verfeinerung und Verbesserung dieses Systems statt (Gossen und Bujard 2002), sodass es heute der Standard im Bereich der regulierbaren Genexpression ist.

Das in dieser Arbeit verwendete Tet-System leitet sich vom Transposon 10 ab, das *Escherichia coli* Resistenz gegen das Antibiotikum Tetrazyklin verleiht. Die Resistenz wird über einen Repressor (TetR) reguliert, der in Abwesenheit von Tetrazyklin an eine Operatorsequenz (*tetO*) bindet und so die Transkription des Resistenz vermittelnden Proteins TetA unterbindet (Meier et al. 1988). Zur Adaptation dieses Mecha-

nismus an eukaryontische Systeme wurde die 130 Aminosäuren umfassende, C-terminale Domäne des VP16 Proteins des *Herpes simplex* Virus (HSV), essenziell für die Transkriptionsaktivierung der *immediate early* Gene von HSV (Triezenberg et al. 1988) an TetR fusioniert. Das chimäre Molekül wird als tetrazyklinabhängiger Transaktivator (tTA) bezeichnet. Das Gen, dessen Expression reguliert werden soll, wird unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors gesetzt. Dieser leitet sich aus dem Promotor des humanen Cytomegalie Virus ab, der die Transkription der *immediate early* Gene steuert. Durch Entfernen der Enhancerregion entsteht ein Fragment, das Position +75 bis Position -53 der originären Sequenz umfasst und über keine intrinsische Aktivität verfügt. 5' des Promotors befindet sich das Tet-Responsive Element (TRE), das sich aus sieben 19 bp *tetO* Sequenzen zusammensetzt. Das Gesamtkonstrukt aus minimalem CMV-Promotor und TRE wird als $P_{hCMV^{*-1}}$ bezeichnet. Am TRE bindet in Abwesenheit von Tetrazyklin tTA und induziert über die VP16 Domäne die Transkription vom minimalen CMV-Promotor (Tet-Off System). Zugabe von Tetrazyklin bewirkt eine Änderung der Konformation des tTA, was zu seinem Abdissoziieren und damit zum Transkriptionsstop führt (Gossen und Bujard 1992).

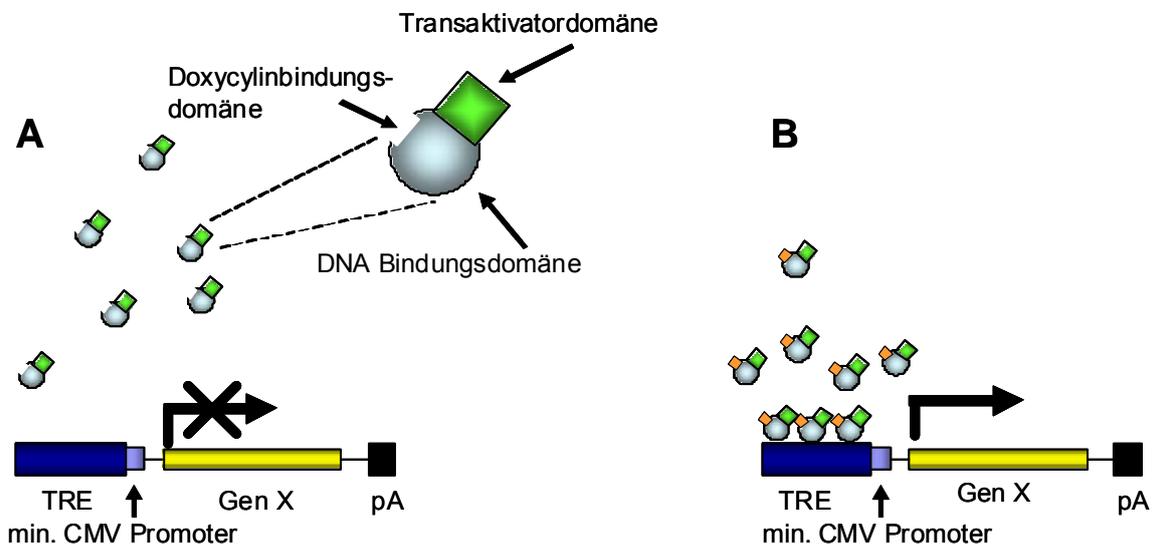


Abbildung 4: Tet-On System: In Abwesenheit von Doxycylin kann der aus einer Transaktivator- und einer DNA-Bindungsdomäne bestehende reverse Tet-Transaktivator (rtTA) nicht an das TRE binden und es findet keine Transkription statt (A). Nach Zugabe von Doxycylin bindet der rtTA an TRE und die Transkription vom minimalen CMV-Promotor setzt ein (B).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das aus dem Tet-Off System abgeleitete Tet-On System verwendet, das auf einem modifizierten Transaktivator beruht. Der Austausch von Glu71 → Lys71, Asp95 → Asn95, Leu101 → Ser101 und Gly102 → Asp102 im vorher beschriebenen tTA ergibt eine inverse Spezifität, d. h. nach Bindung von Tetrazyklin bindet der modifizierte reverse tetrazyklinabhängige Transaktivator (rtTA) an das TRE (Abb. 4) und induziert so die Transkription vom minimalen CMV-Promotor (Gossen et al. 1995).

Besonders im Bereich der Gentherapie ist das Tet-On System die Regulationsmethode der Wahl. In vielen Fällen wird eine Expression in einem kleinen Zeitfenster benötigt, die durch Tetrazyklingabe induziert und durch Absetzen des Tetrazyklins beendet wird. Dieser Aspekt wird besonders bei stabiler Transduktion von Körperzellen, aber auch bei transienter Expression von toxischen Genprodukten ausschlaggebend, die bei Verwendung des Tet-Off Systems eine permanente oder längerfristige Verabreichung von Tetrazyklin erforderlich machen würden (Saez et al. 1997; Lamartina et al. 2002). Mit Etablierung des Tet-On Systems konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die beiden Tetrazyklinderivate Doxycyclin und Anhydrotetrazyklin eine etwa hundertfach stärkere Induktion als Tetrazyklin zeigten (Gossen et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem modifizierten Transaktivator rtTA2^S-M2 gearbeitet, der bezüglich Spezifität, Induzierbarkeit und Toxizität verbessert worden war (Baron et al. 1997; Urlinger et al. 2000). Die Expression des eigentlichen Transgens wurde vom initial publizierten P_{hCMV*-1} (Gossen und Bujard 1992) gesteuert.

Dieses Promotorkonstrukt zeichnet sich episomal durch eine beträchtliche Hintergrundexpression aus. Hier kann sich, im Gegensatz zu genomintegrierenden Vektoren, durch die fehlende Einbettung ins Chromatin zelltypabhängig eine beträchtliche intrinsische Aktivität entwickeln (Gossen et al. 1993; Freundlieb et al. 1997). Allerdings ist auch in stabil transduzierten Zellen eine optimale Regulation ohne Hintergrundexpression nur nach Integration in absolut interferenzfreie Bereiche des Chromosoms möglich. In einer Weiterentwicklung des TRE konnte diese Hintergrundaktivität stark verringert und gleichzeitig die Regulierbarkeit verbessert werden (Agha-Mohammadi et al. 2004). Diese Weiterentwicklung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mehr in die bereits fortgeschrittenen Experimente integriert werden.

Einen weiteren Ansatz, unspezifische Expression im Tet-On System einzuschränken, stellt das doxycyclinabhängige Silencing-Element dar. Dieses Werkzeug wird in der Hauptsache dann genutzt, wenn die eingebrachten Tet-abhängigen Expressionskassetten episomal vorliegen. Die Fusion der eukaryontischen humanen Transkriptions-Repressordomäne Krueppel Associated Box A (KRAB-A) (Witzgall et al. 1994) an TetR ermöglicht die doxycyclinabhängige Transkriptionsrepression. Dieses Silencer-System arbeitet komplementär zum Tet-On System: In Abwesenheit von Doxycyclin bindet der Silencer an $P_{hCMV^{*1}}$ und legt die intrinsische Aktivität des Konstrukts still. Wird dem System Doxycyclin zugeführt, dissoziiert der Silencer vom TRE ab, und das aktivierte rtTA kann binden und die Transkription auslösen (Freundlieb et al. 1999) (Abb. 5).

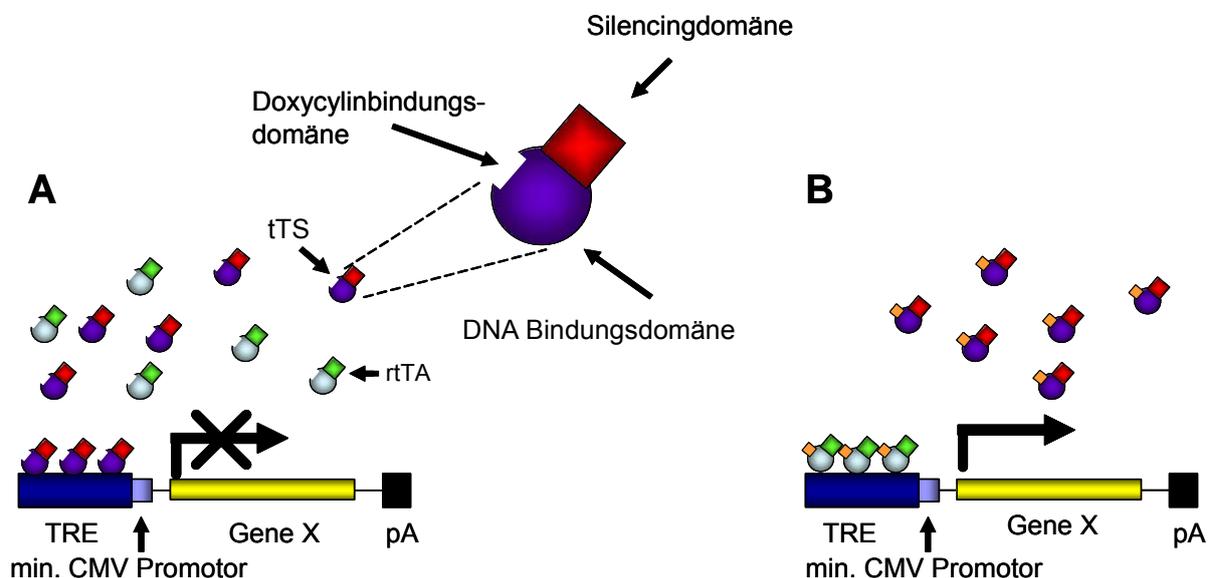


Abbildung 5: Kombination aus Tet-On System und dem Tet-Silencer: In Abwesenheit von Doxycyclin bindet der transkriptionelle tet Silencer (tTS) (dunkelblau/rot dargestellt) an TRE und blockiert unspezifische Transkription (A). Nach Zugabe von Doxycyclin dissoziiert tTS vom TRE und der reverse Tet-Transaktivator (hellblau/grün dargestellt) kann binden und die Transkription einleiten (B).

1.3.2 Prostataspezifische Expression

Unabhängig von Vektor oder therapeutischer Strategie ist eine lokal begrenzte Expression des Transgens erstrebenswert, um negative systemische Effekte weitgehend auszuschließen. Die gewebespezifische Expression kann durch den Einsatz gewebespezifischer bzw. tumorspezifischer Promotoren erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Promotor/Enhancer Region des prostataspezifischen Antigens (PSA) zur gewebespezifischen Transkription eingesetzt. PSA ist eine kallikreinähnliche Serin-Protease, die androgenabhängig vorwiegend von Epithelzel-

len der Prostata gebildet wird. In geringen Maßen konnte die Expression von PSA in anderen Geweben, wie etwa in den trachealen Epithelien, Schilddrüse, Darm, Pankreas und Harnleiter nachgewiesen werden (Olsson et al. 2005). Die enzymatisch aktive, reife Form von PSA setzt sich aus 237 Aminosäuren zusammen, das Molekulargewicht beträgt 33 kDa. Die Protease PSA baut im Sperma Semenogelin I, Semenogelin II und Fibronektin zu kurzen Peptidketten ab. Die Degradation dieser großen Proteine führt zu einer verringerten Viskosität der Samenflüssigkeit und damit zu einer erhöhten Motilität der Spermatozoen (Haeberli 1992).

Die PSA-Expression ist androgengesteuert und wird von einem Enhancer reguliert, der *upstream* des PSA Gens zwischen -5824 und -3738 lokalisiert ist (Abb. 6).



Abbildung 6: Genomische Organisation der Promotorregion des PSA Gens. Der PSA Promotor (-580 bis Transkriptionsstart) enthält neben der TATA-Box ein *Androgen Responsive Element* (ARE), im PSA-Enhancer (-5824 bis -3738) sind drei AREs lokalisiert.

Die Transkription erfolgt von einem Promotor, der zwischen -580 und dem Transkriptionsstart liegt. Diese Kombination enthält im Enhancer drei *Androgen Responsive Elements* (ARE) und in der Promotorregion ein weiteres ARE; an sie binden aktivierte Androgenrezeptoren (AR) und initiieren die Transkription (Schuur et al. 1996). Die Expressionsstärke des beschriebenen minimalen PSA-Promotor/Enhancer Konstrukts (PSA P/E) liegt bei ca. 0,7% der Aktivität eines CMV-Promotors, die durch einen zusätzlichen *upstream* PSA-Enhancer versiebenfacht werden konnte (Latham et al. 2000). Zwar ist beim Einsatz in der E1-Region des AdV eine minimale Verstärkung durch virale Transkriptionselemente zu erwarten (Steinwaerder und Lieber 2000), allerdings sind therapeutisch sinnvolle Expressionslevel in einem physiologischen Kontext nicht möglich (Yoshimura et al. 2001). Eine Expressionsverstärkung auf therapeutische Level konnte durch einen unter PSA P/E Kontrolle exprimierten GAL4-VP16 Transaktivator, der die Expression des eigentlichen

chen therapeutischen Gens nach Bindung an GAL4 Bindungsdomänen eines synthetischen Promotors induziert, erreicht werden (Segawa et al. 1998).

Stärkere prostataspezifische Expressionen durch den Promotor des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) (O'Keefe et al. 2000; Zeng et al. 2005) und des humanen glandulären Kallikrein 2 (hK2) (Xie et al. 2001) wurden nach Beginn dieser Forschungsarbeit beschrieben. In einer modifizierten Form werden der Probasinpromotor aus der Ratte (Lowe et al. 2001; Kakinuma et al. 2003), der Promotor des *Prostate Secretory Protein of 94 Amino Acids* (PSP94) (Gabril et al. 2002) und ein Konstrukt aus Elementen der regulatorischen Sequenzen von PSA und PSMA (Li et al. 2005) zur prostataspezifischen Expression eingesetzt.

1.4 Eingesetzte therapeutische Transgene

1.4.1 Bovine seminale Ribonuklease

Das Enzym bsRNase kommt in der Natur in der Samenflüssigkeit und in den Samenbläschen von Rindern vor und wurde erstmals von D'Alessio (1963) beschrieben. bsRNase verfügt neben der katalytischen Aktivität auch über eine Reihe physiologischer Eigenschaften. Ihre herausragendste Funktion ist die selektive Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Matousek 2001). Daneben wirkt bsRNase embryotoxisch (Matousek 1975), aspermatogen und immunsuppressiv (Kim et al. 1995a; Kim et al. 1995c).

Strukturell ist bsRNase ein 27,4 kDa Homodimer, dessen Monomer hochhomolog zur bovinen RNase A aus dem Pankreas ist. bsRNase ist die einzige bekannte dimere Ribonuklease bei Vertebraten (D'Alessio 1999). Die beiden Monomere sind jeweils über zwei Disulfidbrücken zwischen einem Cystein an Position 31 der einen Untereinheit mit einem Cystein an Position 32 der anderen Untereinheit verknüpft. Die molekulare Struktur des Moleküls erlaubt zwei Quartärstrukturen, wobei die N-terminalen α -Helices jeweils mit der eigenen C-terminalen Domäne oder mit der C-terminalen Domäne des zweiten Monomers interagieren (Abb. 7). Die daraus resultierenden Quartärstrukturen werden im Weiteren als M=M und MxM bezeichnet. Beide Konformationen kommen natürlich vor, wobei etwa zwei Drittel der Moleküle die MxM Variante repräsentieren (Piccoli et al. 1992).

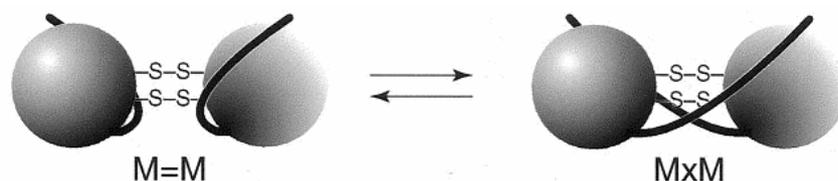


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der beiden möglichen Quartärstrukturen M=M und MxM der bsRNase (nach: Kim, Soucek et al. 1995)

Die bsRNase katalysiert bevorzugt den Abbau von doppelsträngiger RNA und DNA-RNA Hybriden nach Pyrimidinen (Libonati und Floridi 1969; Taniguchi und Libonati 1974), eine schwächere Aktivität wurde an einzelsträngiger RNA beschrieben (Yakovlev et al. 1997). Monomer und Dimer unterscheiden sich nicht in ihrer enzyma-

tischen Aktivität. Im Gegensatz zur monomeren Form verfügt das Dimer neben der eigentlichen katalytischen Funktion auch über die bereits beschriebenen physiologischen Eigenschaften.

Die herausragendste Funktion der bsRNase ist die selektive Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, die in den frühen siebziger Jahren am Mausmodell entdeckt wurde und bis in die Gegenwart sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an unterschiedlichen Modellen demonstriert werden konnte (Matousek 2001). Es wurde gezeigt, dass sowohl die katalytisch aktive Domäne der Monomere (Kim et al. 1995a), als auch die dimere Form, und hier insbesondere die MxM Konformation, für die Antitumoraktivität des Wildtyp-Enzyms essenziell sind (Kim et al. 1995b). Bindungsexperimente mit bsRNase führten zu dem Ergebnis, das Protein nach Bindung an die extrazelluläre Matrix (EZM) über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Es wurde beobachtet, dass im Gegensatz zu RNase A und dem Monomer der bsRNase nur das Dimer der bsRNase an die EZM binden und internalisiert werden kann. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der Bindung an Krebs- bzw. immortalisierten Zellen und Primärzellen festgestellt werden (Mastronicola et al. 1995). Während und nach der Endozytose wird das Dimer in der M=M Form von zytosolischem reduzierendem Glutathion konformationsbedingt durch Aufbrechen der beiden Disulfidbrücken der beiden Untereinheiten monomerisiert. Die Disulfidbrücken der MxM Konformation bleiben dagegen im reduzierenden Milieu stabil (Abb. 8).

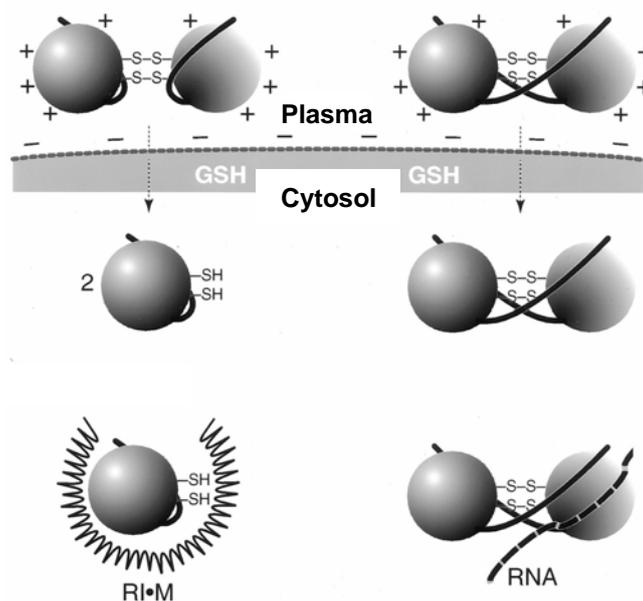


Abbildung 8: Stabilität der MxM und der M=M Konformation der bsRNase während der Aufnahme in die Zelle. Die M=M Form wird durch reduzierendes Glutathion (GSH) monomerisiert und wird durch intrazelluläre RNase Inhibitoren (RI•M) inaktiviert, während die MxM Form als katalytisch aktives Dimer intakt bleibt (nach Kim et al. 1995b)

Aufgrund der MxM Konformation können intrazelluläre RNase Inhibitoren nicht an das Molekül binden und die Aktivität inhibieren. Die Konformation des Monomers, das aus dem M=M Dimer hervorgegangen ist, erlaubt dagegen die Bindung von RNase Inhibitoren und somit die Inaktivierung des Enzyms (Kim et al. 1995b). Varianten von bsRNase, in denen die Bindungsstelle für RNase Inhibitoren mutiert worden war, zeigten als Monomere die beschriebene Antitumorwirkung. Im Endosom wird bsRNase in das Trans Golgi Netzwerk (TNG) transportiert. Von dort wird es in Tumor- bzw. immortalisierten Zellen nach einem bisher noch nicht bekannten Mechanismus in das Zytosol freigesetzt (Bracale et al. 2002). Es wird angenommen, dass bei diesem Vorgang die Fähigkeit von bsRNase, negativ geladene Membranen zu destabilisieren und zu durchdringen, eine wichtige Rolle spielen könnte (Mancheno et al. 1994). Aus bisher noch unbekanntem Gründen erfolgt die Freisetzung des Enzyms nur in Tumor- bzw. immortalisierten Zellen. Die katalytische Aktivität von bsRNase beschränkt sich vorwiegend auf ribosomale RNA und hier im Besonderen auf die 18S und die 28S Untereinheit. 5S rRNA, 5,8S rRNA und tRNA werden unter physiologischen Bedingungen in der Zelle von bsRNase nicht degradiert (Wu et al. 1995). Durch den Abbau der Ribosomen kommt es zum Erliegen der Proteinbiosynthese und in der Zelle wird Apoptose induziert (Cinatl et al. 1999; Sintra et al. 2000).

Fast alle bis heute beschriebenen biologischen Aktivitäten der bsRNase wurden mit gereinigtem Protein, das nativ aus Rindern gewonnen wurde, charakterisiert (Matousek 2001). Nach Aufklärung der Sequenz von bsRNase (Preuss et al. 1990) konnte das funktionale Enzym rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt werden. Dadurch wurde es möglich, gezielt Mutationen einzuführen, die eine genauere Charakterisierung des Enzyms zuließen (Matousek 2001). Die Aufklärung der Sequenz eröffnete gleichzeitig die Möglichkeit, bsRNase in eukaryontischen Systemen funktional zu exprimieren. Es gelang, CHO-Zellen stabil mit der cDNA für bsRNase zu transfizieren. Aufgrund der Zytotoxizität des Proteins musste in dem einzigen bisher beschriebenen Ansatz zur Expression von bsRNase in einer eukaryontischen, immortalen Zelllinie die Transkription von einem induzierbaren Metallothioneinpromotor kontrolliert werden. (Russo et al. 1993). Der Einsatz von bsRNase als therapeutisches Transgen im Rahmen der Gentherapie wurde bisher noch nicht beschrieben.

1.4.2 Cytosin Desaminase

Cytosin Desaminase (CD) katalysiert in Bakterien und Pilzen die hydrolytische Desaminierung von Cytosin zu den Metaboliten Uracil und Ammoniak (Andersen et al. 1989). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete cDNA für CD aus *Escherichia coli* (bakterielle CD: bCD) kodiert für ein Protein aus 427 Aminosäuren (Austin und Huber 1993). Als Suizidgen in der Gentherapie wandelt bCD die gering toxische Vorläufersubstanz (*Prodrug*) 5-Fluorcytosin (5-FC) in das toxische Produkt 5-Fluoruracil (5-FU), das in dieser Form bereits erfolgreich in der systemischen Tumorthherapie eingesetzt wird (Sotos et al. 1994; Bast et al. 2003). Die zytotoxische Wirkung von 5-FU erfolgt auf drei Ebenen. 5-FU wird im zellulären Stoffwechsel zu 5-FdUMP und 5-FUMP umgewandelt (Abb. 9). 5-FdUMP inhibiert durch kovalente Bindung irreversibel die Thymidylatsynthase. Das durch Phosphorylierung von 5-FdUMP entstandene Triphosphat 5-FdUTP wird als Nukleotidanalogen während der Mitose in die replizierende DNA eingebaut und führt zum Strangabbruch. 5-FUTP wird in naszierende mRNA und rRNA inkorporiert und verursacht so Störungen der Proteinbiosynthese, die zum Zelluntergang führen (Springer und Niculescu-Duvaz 1996).

Durch den Einsatz von CD tragenden Vektoren in Kombination mit 5-FC, das als zugelassenes Antimykotikum bereits therapeutisch eingesetzt wird und gut charakterisiert ist, kann eine lokale Anreicherung von 5-FU stattfinden. Im Tumor können damit 5-FU Spiegel erreicht werden, die systemisch aufgrund der massiven Nebenwirkungen nicht erzielt werden können. 5-FC und 5-FU unterliegen der passiven Diffusion, sodass 5-FU nach der Umwandlung aus einer CD exprimierenden Zelle diffundieren und von benachbarten Zellen aufgenommen werden kann (Huber et al. 1994; Lawrence et al. 1998). Dieser stark ausgeprägte *Bystander*-Effekt wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Huber et al. 1994) beobachtet und ist bei generell suboptimaler Transduktionseffizienz im Tumor für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung essenziell (Trinh et al. 1995).

Die Koexpression von CD mit Phosphoribosyltransferase aus *Escherichia coli* verstärkt durch die direkte Umwandlung von 5-FU zu 5-FdUMP die Wirkung von 5-FU (Miyagi et al. 2003; Seo et al. 2005). Eine verbesserte Antitumorwirkung konnte außerdem durch den Einsatz mit CD aus *Saccharomyces cerevisiae*, deren katalyti-

sche Aktivität der bakteriellen CD überlegen ist, erreicht werden (Hamstra et al. 1999; Kievit et al. 1999).

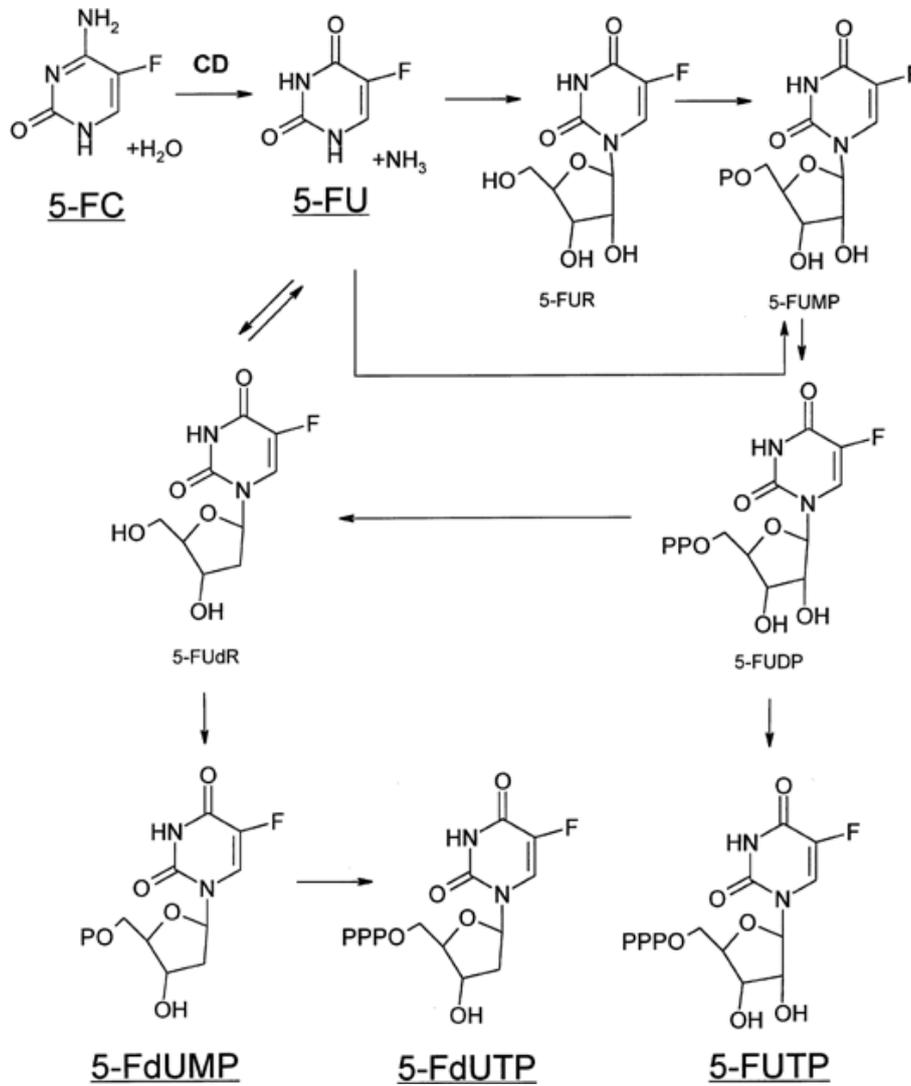


Abbildung 9: Umwandlung von 5-FU in seine zytotoxischen Metaboliten 5-FdUMP, 5-FdUTP und 5-FUTP (nach Springer und Niculescu-Duvaz 1996).

1.4.3 YB-1

Das 43 kDa Y-Box bindende Protein YB-1 wird von einer ca. 1,5 kb großen mRNA kodiert und gehört zur Superfamilie der hochkonservierten *Cold Shock Domain* (CSD) Proteine. Neben der Cold Shock Domäne besteht YB-1 aus einer alanin- und prolinreichen N-terminalen Domäne mit unbekannter Funktion, und einer C-terminalen Domäne, die mit Protein–Protein Interaktionen in Verbindung gebracht wird (Kohno et al. 2003). YB-1 ist im Zytoplasma lokalisiert und wird nach Exposition der Zelle mit externen Stressfaktoren wie UV-Strahlung, Hitze oder toxischen Substanzen in den Kern transloziert. Neben einer diskutierten Funktion bei der DNA-Reparatur agiert YB-1 als Transkriptionsfaktor, indem es an die Y-Box, deren Sequenz Motiv 5' CTGATTGG 3' in der Promotorregion einer Vielzahl eukaryontischer Gene zu finden ist, bindet. YB-1 kann Y-Box unabhängig nach Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription regulieren. Außerdem wurde die Bindung an einzelsträngige DNA beschrieben (Kohno et al. 2003). Daneben wird YB-1 beim RNA-Metabolismus und bei der Translationskontrolle eine Bedeutung zugesprochen (Matsumoto und Wolffe 1998). YB-1 konnte in Tumoren der Lunge, der Eierstöcke und der Mammae, im Kolonkarzinom, Osteosarkomen und im malignen Melanom überexprimiert nachgewiesen werden (Jurchott et al. 2003). In Tumorzellen stimuliert es die Transkription der Gene für das *Multi Drug Resistance* Protein (MDR1) und das *Multi Drug Resistance Related* Protein (MRP1) (Stein et al. 2001).

Im Kontext mit Wildtyp AdV reguliert zelluläres YB-1 das prä-mRNA *Splicing* des viralen E1A-Proteins. Das adenovirale E1B-55kDa Protein erleichtert die Anreicherung von YB-1 im Nukleus, das den E2 *late* Promotor durch spezifische Interaktion mit der promotorproximalen Y-Box aktiviert. Die Induktion dieses Promotors erlaubt die Transkription der E2-Genprodukte für die virale DNA-Replikation. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von YB-1 als Transgen in E1-deletierten AdV zu effizienter viraler Replikation führt (Holm et al. 2002). Im Hinblick auf die beschriebene Überexpression von YB-1 in Tumor- und insbesondere in MDR Tumorgewebe kann adenoviral transduziertes YB-1 in Abwesenheit der viralen E1-Proteine in Synergie mit zellulärem YB-1 tumorspezifisch zur viralen Replikation und damit zur Zelllyse führen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Prostatakarzinom kann mit derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln nur sehr unzureichend therapiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein prostataspezifisches Expressionssystem entwickelt werden, das unter Einsatz verschiedener therapeutischer Transgene eine Basis für eine zukünftige gentherapeutische Anwendung bei der Behandlung des Prostatakarzinoms bilden soll. Die Transduktion dieser Gene sollte mittels eines adenoviralen Vektorsystems erfolgen, das eine effiziente Transduktion und im Vergleich mit anderen Expressionssystemen eine effiziente Transkription des gewählten Transgens ermöglicht. Die gewebespezifische Expression sollte von dem prostataspezifischen PSA-Promotor reguliert werden.

Zusätzlich zu der bereits etablierten Cytosin Desaminase sollten erstmals im Kontext einer therapeutischen Anwendung die selektiv tumortoxische, in der Samenflüssigkeit von Rindern vorkommende RNase (bsRNase) und der Transkriptionsfaktor YB-1, der bei hohen intrazellulären Konzentrationen die Replikation *per se* replikationsdefizienter Adenoviren erlaubt, als mögliche Kandidatengene für eine zytotoxische bzw. onkolytische Gentherapie charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien.

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden die verwendeten Chemikalien von Merck, Darmstadt und Sigma, Deisenhofen bezogen. 5-Fluorcytosin (Ancotil: ICN Pharma, Eschwege) und 5-Fluoruracil (Ribofluor: Ribospharm, München) wurden gelöst als Arzneimittelformulierung verwendet

2.1.1.1 Puffer und Lösungen

PBS**

PBS (nach (Sambrook et al. 1989)
0,68 mM CaCl₂
0,49 mM MgCl₂

Citric Saline

0,135 M KCl
15 mM Natrium Citrat

DNase I Lösung

20 mM Tris/HCl, pH 7,4
50 mM NaCl
1 mM Dithiothreitol
0,1 mg/ml bovines Serumalbumin
50% Glycerol
10 mg/ml DNase I

Agarose-Overlay

2x MEM Medium
0,2% Hefeextrakt
10% Pferdeserum
4 mM Glutamin
200 U/ml Penicillin/Streptomycin
5 µg/ml Amphotericin B

unmittelbar vor Gebrauch wird das identische Volumen flüssiger Agarose (1g Agarose / 100 ml H₂O, ca 44°C) zugegeben.

SDS/Pronase Lösung

0,05% Pronase
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
10 mM EDTA
0,5% SDS

Die Zusammensetzungen aller weiteren im Rahmen der molekular- und zellbiologischen Arbeiten verwendeten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Anleitungen aus *Molecular Cloning*, (Sambrook, Fritsch et al. 1989) hergestellt.

2.1.1.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide als Sequenzier- oder PCR-Primer wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen. Die verwendeten PCR-Primer werden im Methodenteil unter 2.2.1.1 näher dargestellt, die Sequenzen der Sequenzierprimer werden im Methodenteil unter 2.2.1.5 beschrieben.

2.1.1.3 Plasmide

Tabelle 1: Im Rahmen der Arbeit verwendete, nicht selbst hergestellte Plasmide

Plasmidvektor	Bezugsquelle
pBluescript™SK	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pcDNA3.1(+)/Neo	Invitrogen, Eggenstein
pΔE1sp1A	Microbix, Toronto, Kanada
pBHG10	Microbix, Toronto, Kanada
pDC 312	Microbix, Toronto, Kanada
pBHGlox	Microbix Toronto, Kanada
pShuttle	QBiogene; Heidelberg
pAdEasy	QBiogene; Heidelberg
pTet-tTS	Clontech; Heidelberg
pTRE2	Clontech; Heidelberg
pUHRt62-1	H. Bujard, Heidelberg
pBSV5	K.-H. Scheit, Göttingen
CN0	S. Rubinchik, Charleston, USA
pCMV.CD	R.G. Crystal, New York, USA

2.1.1.4 Radionuklide

Zur Markierung der Northern Blot Sonden wurde von [α -³²P] dCTP von ICN (Eschwege) verwendet.

2.1.1.5 Bakterienstämme

Die benutzten und im Folgenden beschriebenen Bakterienstämme leiten sich ausschließlich von *E. coli* K12 ab. *E. coli* DH10B (GibcoBRL, Eggenstein) mit dem Genotyp *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*, *nupG* wurde für Klonierungsexperimente und Plasmidamplifikationen benutzt. *E. coli* BJ5183 (Qbiogene, Heidelberg) mit dem Genotyp *endA,1 sbcBC*, *recBC*, *galK*, *met thi-1*, *bioT*, *hsdR (Strr)* wurde zur intrazellulären Rekombination im Rahmen der Adenovirusgenerierung mit dem AdEasy™ System verwendet.

2.1.1.6 Bakterienmedien

Die angegebenen Bakterienstämme wurden auf sterilen Luria-Bertani (LB) Agarplatten bzw. in sterilem LB Flüssigmedium mit erforderlichen Antibiotikazusätzen kultiviert (Sambrook et al. 1989).

2.1.1.7 Antikörper

bsRNase wurde im Western Blot mit einem polyklonalem Antiserum, das aus Kaninchen gewonnen wurde, nachgewiesen. Das Antiserum wurde freundlicherweise von Dr. J. Matousek (Libechov, Tschechische Republik) zur Verfügung gestellt. Als Sekundärantikörper diente ein Meerrettichperoxidase (*Horse Radish Peroxidase*: HRP) konjugierter Maus-anti-Kaninchen Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg).

2.1.1.8 Zellen und Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind ausschließlich humanen Ursprungs und sind, mit Ausnahme der 293-Zelllinie, Derivate von Tumoren bzw. Metastasen. 293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die durch Transduktion adenoviraler E1-Sequenzen immortalisiert wurden. Die beschriebenen Zellen wurden von ATCC (Manassas, USA) bzw. DSMZ (Braunschweig), die Zelllinie 293 von Microbix (Toronto, Kanada) bezogen.

Tabelle 2: Im Rahmen der Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	PSA Status
LNCaP	Lymphknotenmetastase des Prostatakarzinoms	Positiv
DU-145	Gehirnmetastase des Prostatakarzinoms	Negativ
HeLa	Cervixkarzinom	Negativ
293	Embryonale Nierenzellen	Negativ
MCF7	Mammakarzinom	Negativ
PC3	Knochenmarksmetastase des Prostatakarzinoms	Negativ

2.1.1.9 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

RPMI 1640	Biochrom, Berlin
DMEM	Biochrom, Berlin
MEM	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Phosphate Buffered Saline	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum nordamerikanischen Ursprungs	Biochrom, Berlin
Pferdeserum	PAA, Cölbe
Stripped Serum	Sigma, Deisenhofen
Glutamin	Sigma, Deisenhofen
OptiMEM	Biochrom, Berlin
Methyltrienolon (R1881)	Gibco, Karlsruhe
Pyruvat	NEN, Rodgau-Jügesheim
Doxycyclin	Sigma, Deisenhofen
	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Geräte

MJ Research PT-200 Thermocycler	Waltham, USA
Agarose-Gelektrophorese Apparaturen:	
Hoefer HE 33	Amersham Biosciences, Freiburg
Sub Cell GT	Bio-Rad, München
UV Crosslinker Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Spannungsquellen	Bio-Rad, München
Photometer Beckman DU640	Beckman-Coulter, Krefeld
UV-Transilluminator	Biotech-Fischer GmbH, München
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Geldokumentationssystem	LTF, Wasserburg
SDS PAGE Elektrophoreseapparatur SE600	Amersham, Freiburg
Blotting Apparatur TE62	Amersham, Freiburg
ELISA Reader Biolumin 960	Molecular Dynamics, Freiburg
γ-Counter Packard TopCount	Canberra Eurisys, Rüsselsheim
γ-Counter	Perkin Elmer Wallac, Freiburg
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Bakterienbrutschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Zellkulturbrutschrank	Forma Scientific, Dreieich
Stickstofftank	Messer, Griesheim
Hybridisierofen GFL 7601	GFL, Burgwedel
Kodak Image Station 440	Kodak, Stuttgart
Phosphoimager Fuji FLA 2000	Fuji, Straubenhardt
Durchflusszytometer FACSVantage	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zentrifugen:	
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge J2-HS	Beckman Coulter, Krefeld
Heraeus Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Heraeus Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau
Mini Centrifuge 1200	Biozym, Hess. Oldendorf
Zentrifugen-Rotoren:	
SW32Ti	Beckman Coulter, Krefeld
80Ti	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.3 Software

2.1.3.1 Microsoft Excel

MS Excel wurde für die Auswertung der gewonnenen Daten und für deren Darstellung in Diagrammform benutzt.

2.1.3.2 Vector NTi Suite 5.5

Vector NTi Suite 5.5 (Informax, Eggenstein) diente zur virtuellen Konstruktion von Plasmiden und der Errechnung von Restriktionsfragmenten. Das Programm wurde auch zu Sequenzvergleichen und eingeschränkt zum Primerdesign für PCR und Sequenzierungen genutzt.

2.1.3.3 Kodak 1D 3.5

Die Software Kodak 1D 3.5 ist integraler Bestandteil der Kodak Image Station und diente der Visualisierung, Dokumentation und Nachbearbeitung von Western Blots, deren Detektion durch Chemolumineszenz erfolgte.

2.1.3.4 Software für den Phospho-Imager Fuji FLA 2000

Zur Detektion und Dokumentation der radioaktiven Signale diente das Programm BASReader 2.26. Zur Auswertung und Nachbearbeitung wurde das Programm AIDA 2.0 eingesetzt. Beide Programme werden von der Firma Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, vertrieben.

2.1.3.5 Weitere Programme

Neben den erwähnten Programmen wurde weitere Software aus dem MS Office Paket und Photoshop 7.0 benutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme (RE) katalysieren die hydrolytische Spaltung von DNA. Sie sind in drei Typengruppen eingeteilt, wobei die in der vorliegenden Arbeit verwendeten RE ausschließlich dem Typ II zugeordnet werden. Das Enzym bindet an einer Erkennungsstelle, die sich durch eine spezifische Nukleotidsequenz auszeichnet, und hydrolysiert die DNA innerhalb bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft der Erkennungssequenz. Abhängig vom eingesetzten Restriktionsenzym entstehen glatte Enden (*blunt ends*) oder 5' bzw. 3' überhängende Enden (*sticky ends*).

RE wurden in dieser Arbeit zum Herstellen von DNA Fragmenten zur Klonierung und zur Restriktionsanalyse eingesetzt. Puffer, Inkubationstemperatur und weitere Bedingungen für die Restriktionsverdau wurden nach Empfehlung der Hersteller gewählt. In präparativen Restriktionsansätzen wurde bis zu 5 µg DNA mit 10 U, in analytischen Ansätzen wurde bis zu 500 ng DNA mit 5 U des entsprechenden Enzyms geschnitten. Das Gesamtvolumen betrug in der Regel 20 µl, die Inkubation wurde wenigstens eine Stunde, maximal über Nacht durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten RE wurden von den Herstellern Roche Diagnostics (Mannheim) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt) bezogen.

Ligation

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete T4 DNA Ligase leitete sich aus dem Bakteriophagen T4 ab und katalysiert die Phosphodiesterbindung von 3' Hydroxyl- und 5' Phosphatresten von DNA. T4 Ligase wurde zur Klonierung von DNA Fragmenten in Vektoren genutzt. Vektor und Insert lagen bei der Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden in einem molaren Verhältnis von 1:10, bei der Ligation von Fragmenten mit glatten Enden in einem molaren Verhältnis von 1:5 vor, wobei jeweils 100 ng des Inserts eingesetzt wurden. *Sticky End* Ligationen wurden mit 1 U Ligase (1 U/µl), *Blunt End* Ligationen wurden mit 5 U Ligase (5 U/µl) (jeweils: Roche Diagnostics) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 14°C über Nacht durchgeführt.

Als Puffer wurde der fünffach konzentrierte T4 DNA Ligase Puffer von Gibco Lifetechnologies (Eggenstein) eingesetzt.

Dephosphorylierung

Bei der Linearisierung von Vektoren durch RE entstehen lineare DNA Stücke, deren Enden 5' eine Phosphatgruppe und 3' eine Hydroxylgruppe tragen. Um einen intramolekularen Ringschluss bei der Ligationsreaktion zu vermeiden, werden die endständigen 5' Phosphatgruppen des Vektormoleküls durch eine Phosphatase abgespalten. Die hier eingesetzte alkalische Phosphatase (AP) (Roche Diagnostics) ist unter den Reaktionsbedingungen herkömmlicher Restriktionsansätze aktiv. Eine Stunde nach Beginn des Restriktionsverdau wurde 1 U AP zur Reaktion gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Generierung von Blunt Ends

Die Ligation eines Inserts in einen Vektor, der 5' überhängende nichtkompatible Enden trägt, kann durch Auffüllen der überhängenden Enden mit dem Klenow Fragment der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics) zu einem glatten Ende erreicht werden. Die Reaktion kann unmittelbar nach Beendigung der Restriktion im selben Ansatz durchgeführt werden, wenn der Restriktionspuffer Mg^{++} enthält. Dazu werden dNTP zu einer Endkonzentration von 100 μ M und 1 U Klenow Enzym zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (engl.: *Polymerase Chain Reaction*: PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA Fragmente (Sambrook et al. 1989). Der PCR-Prozess umfasst das Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix, die Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz und die anschließende DNA-Elongation. Der Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen die Durchführung mehrerer Zyklen ohne Aktivitätsverlust.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde PCR zur Amplifikation von bsRNase aus dem Plasmid pBSV5 genutzt. Zur weiteren Klonierung wurden die Primer so gestaltet, dass das PCR-Produkt 5' eine Erkennungssequenz für *Hind* III (Vorwärts Primer) und 3' eine Erkennungssequenz für *Sal* I (Rückwärts Primer) hat. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme sind in der Sequenzdarstellung jeweils grau unterlegt.

Die komplementären Bereiche zur Zielsequenz sind unterstrichen und ergeben für den Vorwärts Primer eine Schmelztemperatur von 58°C und für den Rückwärts Primer von 60°C.

Primer: bsRNase

Vorwärts Primer: 5' GCG ATA AAG CTT GGA GTG AGG TCA TCA TGG C 3'

Rückwärts Primer: 5' GCA TAT GGT CGA CGG CTA CAC TGA AGC ATC GAA GTG 3'

Tabelle 3: Temperaturprofil für die Polymerase-Kettenreaktion

	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	1	94	2' 45''
Anlagerung	2	54	90''
Synthese	3	72	1'
Denaturierung	4	94	45''
Anlagerung	5	54	45''
Synthese	6	72	1'
29 Zyklen der Schritte 4-6			
Synthese	7	72	10'
Abkühlen	8	4	∞

Die Reaktionsansätze wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Sie enthielten die Primer in einer Endkonzentration von 1 µM, <0,5 µg Template, 200 µM dNTP, 2,5 U Taq Polymerase und PCR-Puffer. dNTP, Taq Polymerase und Puffer wurden von Roche Diagnostics bezogen.

2.2.1.2 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarose-Gel

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Für analytische Gele wurde in Tris Borat EDTA Puffer (TBE-Puffer) pH 8,0 (Sambrook et al. 1989) gelöste Agarose (Peqlab, Erlangen) in einem Mikrowellenofen aufgeschmolzen, für präparative Gele wurde Tris Acetat EDTA Puffer (TAE-Puffer) pH 8,0 (Empfehlung des Herstellers des zur DNA-Extraktion aus Agarosegelstücken genutzten Kits) verwendet. Das flüssige Gel wurde vor dem Gießen in einen Gelträger mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Gel) gemischt.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden für präparative und analytische Zwecke im Rahmen von Klonierungen Gele mit einem Agaroseanteil von einem Prozent genutzt, zur Restriktionsanalyse des rekombinanten adenoviralen Genoms wurden TBE-Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8% verwendet. Abhängig von individuellen Anforderungen im Experiment wurde der Agaroseanteil der verwendeten Gele variiert (Sambrook et al. 1989). Nach der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert. Die verwendeten Größenstandards wurden von Gibco Lifetechnologies bezogen.

2.2.1.3 Nukleinsäureisolierung

Isolierung von Gesamt-RNA

RNA-Isolierung aus Zellkulturproben wurde mit dem RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstelleranleitung durchgeführt. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der selektiven Bindung von Gesamt-RNA aus dem Zelllysat an einer, auf Silicagel basierenden Membran, die nach mehreren Waschschritten in H₂O eluiert wird.

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA Präparation in kleinem Maßstab wurde vorwiegend in Klonierungsexperimenten zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienklonen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Isolierung kleinerer Plasmide die *Boiling Preparation* nach der in *Molecular Cloning* beschriebenen Vorschrift durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Bei größeren Plasmiden (≥ 6 kb) wurde die Methode der alkalischen Lyse nach dem *Current Protocols in Molecular Biology* (Engbrecht und Brent 1993) beschriebenen Protokoll angewandt.

Die Plasmidpräparation in größerem Maßstab wurde mit dem MaxiPrep Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben durchgeführt. Plasmid-DNA wird hier nach alkalischer Lyse an eine Anionentauschermatrix gebunden und nach mehreren Waschschritten eluiert und präzipitiert. Plasmide, die zur Kotransfektion mit dem Ziel der Adenovirusgenerierung benötigt wurden, wurden mit Hilfe eines CsCl-Gradienten nach alkalischer Lyse aus dem Pellet einer 500 ml Übernachtskultur isoliert (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Nach Präzipitation wurde das DNA-Pellet in 8 ml 0,1x SSC aufgenommen. Dazu wurde 8 g CsCl gegeben und die entstandene Lösung 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 3800 rpm, 4°C) wurde der Überstand in

ein OptiSeal Zentrifugenröhrchen (Beckman-Coulter, Krefeld) überführt und mit 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Das Zentrifugenröhrchen wurde bis zur Öffnung mit 1 g CsCl/ ml 0,1x SSC aufgefüllt und durch Verschweißen der Öffnung versiegelt. Die Zentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge Optima LE 80K (Beckman-Coulter) bei 55000 rpm in einem Ti80 Rotor (Beckman-Coulter) bei 14°C für mindestens 14 Stunden. Das Isolieren der Plasmidbande, die Ethidiumbromid Extraktion und die Präzipitation der gereinigten Plasmid-DNA wurde nach Protokollen in *Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989) durchgeführt.

Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus dem Agarosegel

Nach Gelelektrophorese wurde das benötigte Fragment unter UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarose wurde mit dem Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, Mannheim) nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Bindung von DNA an Silikatkügelchen, von denen die DNA nach mehreren Waschschrinen mit H₂O eluiert wird.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt, wobei 1 OD 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA entspricht. Die Reinheit der DNA bzw. RNA Präparationen wurde aus dem Quotienten der OD_{260nm} und OD_{280nm} bestimmt, der bei DNA bei 1,8 und bei RNA bei 2,0 liegen sollte.

2.2.1.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Plasmide und PCR-Produkte wurden mittels der Kettenabbruchreaktion nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve, Vaterstetten, mit einem ABI 373A Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die im Folgenden aufgelisteten Primer verwendet, die von MWG Biotech, Ebersberg, bezogen wurden.

Daneben wurde bei Downstreamsequenzierungen vom CMV-Promotor und T7-Promotor, bei Upstreamsequenzierungen vom *Bovine Growth Hormon* (BGH) Polyadenylierungssignal mit Standardprimern der Firma Sequiserve gearbeitet.

Primer: pMS4-F-807

Bindungsstelle: PSA-Promoter/Enhancer
(807 bp – 830 bp)
Sequenzierrichtung: 5' – 3'

5' GCA TCA CTA TGG GAT GGG TAT TAC 3'

Primer: pMS4-F-1871

Bindungsstelle: PSA-Promoter/Enhancer
(1871bp – 1890 bp)
Sequenzierrichtung: 5' – 3'

5' AAC CAA GGT TCT AGG TCC CG 3'

Primer: pIX

Bindungsstelle: Ad5 Protein IX
Sequenzierrichtung: 3' – 5'

5' AAC GAG TTG GTG CTC ATG G 3'

Primer: pMS4-F-1348

Bindungsstelle: PSA-Promoter/Enhancer
(1348bp – 1369 bp)
Sequenzierrichtung: 5' – 3'

5' TTG CCC CCC CCA AAT CTT GTA G 3' :

Primer: SV40 pA

Bindungsstelle: SV40 pA
Sequenzierrichtung: 3' – 5'

5' AAG TTG CTC GAA GTC G 3' :

Primer: bsRNseq120

Bindungsstelle: bsRNase
Sequenzierrichtung: 5' – 3'

5' TGG CAG CTG CAG ATT CC 3'

2.2.1.6 Propagierung von Plasmiden in Bakterien

Neu ligierte Plasmide und bereits vorhandene Plasmide wurden zum Zweck der Amplifikation mittels der Hitzeschockmethode in Zellen des Bakterienstamms *Escherichia coli* DH10B transformiert, die zuvor mit der CaCl₂ Methode kompetent gemacht wurden (Seidman et al. 1993).

Die Amplifikation der transformierten Plasmide erfolgte unter Selektionsdruck, der durch Zugabe eines plasmidspezifischen Antibiotikums (*pShuttle und Derivate*: Kanamycin; *pBSV5*: Tetrazyklin; *alle weiteren verwendeten Plasmide*: Ampicillin) ins Medium erreicht wurde (Sambrook et al. 1989). Bakterien, in die DNA aus Ligationen transformiert wurde, wurden auf LB-Agar bei 37°C kultiviert; zur Amplifikation von Plasmiden wurde flüssiges LB-Medium verwendet.

Die Plasmidamplifikation in großem Maßstab wurde in 250 ml bzw. 500 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz durchgeführt. Zur Analyse der Plasmide in Bakterienklonen, die nach der Transformation eines Ligationsansatzes erhalten worden waren, wurde ein Milliliter antibiotikumhaltiges LB-Medium mit dem entsprechenden Klon inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

2.2.1.7 Northern Blot Analyse

Im Rahmen einer Northern Blot Analyse kann die Transkription einer spezifischen mRNA durch gelelektrophoretische Auftrennung, Immobilisierung auf einer Nylonmembran und anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde nachgewiesen werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch ubiquitäre RNasen wurde für die Herstellung der benötigten Puffer Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser benutzt (Sambrook et al. 1989). Plastikgeräte und Glasgefäße wurden zu diesem Zweck mit RNase ZAP (Ambion, Huntingdon, UK) behandelt und mit DEPC-Wasser gespült. Alle hier verwendeten Reagenzien waren ausschließlich für Arbeiten mit RNA reserviert.

Je 10 µg der einzelnen RNA Proben wurden unter Vakuum zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 µl DEPC H₂O resuspendiert und mit 2 Vol. *RNA Sample Loading Buffer* (Sigma, Deisenhofen) versetzt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Gelelektrophorese wurde ein einprozentiges Agarosegel, das mit 1x MOPS-(3-Morpholinopropansulfonsäure) Puffer (Sambrook et al. 1989) gegossen worden war, mit einem Formaldehydgehalt von 2% verwendet. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Elektrophorese wurde 2,5 Stunden bei 50 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde die Integrität der RNA unter UV Licht überprüft.

Das Gel wurde anschließend 2 x 10 Minuten in 10x SSC (Sambrook et al. 1989) geschwenkt. Der Transfer aus dem Gel auf die Nylonmembran wurde mit dem Kapillarblottingverfahren durchgeführt. Dazu wurden zwei Whatman Filter, die in 10x SSC getränkt waren, auf eine Frischhaltefolie gelegt, darauf wurde das Gel, mit der Oberseite nach unten, mittig platziert. Auf das Gel wurde blasenfrei eine Nylonmembran (GeneScreen, Perkin Elmer NEN, Freiburg) gelegt, die wiederum von zwei in 10x SSC getränkten Whatman Filtern bedeckt wurde. Auf diese Filter wurde eine ca. 5 cm dicke Schicht zugeschnittener, handelsüblicher Papierhandtücher gelegt, die mit einem Gewicht beschwert wurden. Das Blotting wurde über Nacht durchgeführt. Die RNA wurde durch Backen (3 Stunden; 80°C) bzw. durch ein UV-Crosslinking im Stratalinker (Stratagene, Heidelberg) nach Anleitung des Herstellers auf der Membran fixiert. Die verwendeten ³²P-markierten Sonden wurden mit dem Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) unter Verwendung von [α-³²P] dCTP nach Anleitung des Herstellers synthetisiert. Zur Abtrennung der freien Nukleotide wurde das Reaktionsgemisch durch Gelfiltration über eine Sephadex G25 Säule (Amersham Bioscience) aufgereinigt. Die Hybridisierung wurde nach Anleitung aus

Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) über Nacht bei 65°C im Hybridisierungs-ofen durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 15 Minuten bei 65°C mit Waschlösung (6x SSC / 0,1% SDS) im Hybridisierungs-ofen gewaschen und anschließend auf einem Whatmanfilter getrocknet. Die Signale auf der Membran konnten nach einer Exposition von ca. 30 Minuten auf einer Phosphoimager-Platte im Phosphoimager (Fuji, Straubenhardt) detektiert werden.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Western Blot

Die Western Blot Technik basiert auf der Immobilisierung elektrophoretisch im SDS-Polyacrylamidgel getrennter Proteine (Laemmli 1970) auf einer Membran. Die Detektion erfolgt über spezifische Antikörper.

Die genauen Zusammensetzungen der hier verwendeten Puffer und Lösungen wurden aus *Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989) entnommen. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellextrakte durch Lyse der Zellen in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% Na-Deoxycholat; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) und anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 30 Minuten) in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau) gewonnen. Mit Zellextrakten und Zellkulturüberständen wurde vor dem Auftragen auf das Gel grundsätzlich auf Eis gearbeitet. Die Proben wurden mit 4x SDS Ladepuffer versetzt und 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Die Proteine wurden anschließend über SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese bei 120 V mit Wasserkühlung (Hoefer SE600, Amersham Biosciences) aufgetrennt. Das verwendete 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) wurde von Roth, Karlsruhe bezogen. Als Größenstandard diente High Range Rainbow Coloured Protein Marker (Amersham Biosciences).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine nach dem Wet Blot Verfahren in der Blottingapparatur TE62 (Amersham Bioscience) nach Anleitung des Geräteherstellers unter ständiger Umwälzung des gekühlten Transferpuffers auf eine PVDF-Membran (Amersham Bioscience) transferiert, die nach Herstellerangaben vorbehandelt worden war.

Zur Detektion der bsRNase wurde als Primärantikörper ein polyklonales Antiserum eingesetzt, das in Kaninchen gewonnen worden war (freundlicherweise von Dr. J.

Matousek zur Verfügung gestellt). Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugierter Antikörper (Amersham Bioscience) eingesetzt. Der Primärantikörper wurde als Lyophilisat geliefert und in PBS zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst und in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte chemilumineszent unter Verwendung des ECL-Substrats (Amersham Bioscience). Die Inkubation mit den einzelnen Antikörpern und die folgenden Waschschriffe erfolgten nach Empfehlung des Herstellers des ECL-Kits. Der Nachweis der chemilumineszenten Signale erfolgte mit der Kodak Image Station 440.

2.2.2.2 Quantifizierung des Proteingehalts von Zelllysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit dem BCA (*bicinchoninic acid*) Reagenz (Smith, Krohn et al. 1985), das von Pierce (Bonn) bezogen wurde. Die Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten erfolgte nach Herstellerempfehlung colorimetrisch bei 560 nm mit dem Biolumin ELISA Reader (Molecular Dynamics, Freiburg).

2.2.2.3 Quantifizierung der Luciferase Aktivität in transduzierten Zellen

Die untersuchten Zellen, die im Monolayer kultiviert worden waren, wurden nach Waschen mit PBS durch Zugabe des Lysepuffers (250 mM Tris/HCl pH 7.8; 0.1% Triton X-100) 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Zur Bestimmung des Luciferasegehalts wurden 50 µl des Lysats mit 100 µl Luciferinpuffer versetzt. Nach zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Luciferaseaktivität in einem γ -Counter (TopCount, Canberra Eurisys, Rüsselsheim) bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde anschließend auf den Proteingehalt des Lysats normalisiert.

In den hier beschriebenen Transfektionsexperimenten wurde aufgrund der vergleichsweise geringen Expressionslevel ein kommerziell erhältlicher Luciferinpuffer (Promega) verwendet, mit dem auch schwache Luciferaseaktivität bestimmt werden kann. In Experimenten mit adenoviralen Vektoren wurde eine stärkere Expression beobachtet, sodass ein selbst hergestellter, weniger sensitiver Luciferinpuffer (60 mM Dithiothreitol, 10 mM Magnesiumsulfat, 1 mM ATP, 30 µM D (-)-Luciferin (Roche Diagnostics), 25 mM Glycyl-Glycin pH 7.8) verwendet werden konnte.

2.2.2.4 Quantifizierung der Cytosin Desaminase Aktivität in transduzierten Zellen

Die Quantifizierung von CD wurde in Anlehnung an die Arbeit von Evoy et al. (1997) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 48 Stunden nach Infektion lysiert und die Lysate der Dreifachansätze vereinigt. 30 mM 5-FC wurden 24 Stunden bei 37°C mit 100 µg Protein aus dem Lysat inkubiert. Die Umsetzung in 5-FU wurde spektrophotometrisch durch Absorptionsmessungen bei 255 nm und 290 nm nach folgender Formel festgestellt und durch Bestimmung des verbliebenen 5-FC Anteils verifiziert:

$$\begin{aligned} \text{A: } & (0,1846 \times \text{OD}_{290} - 0,02485 \times \text{OD}_{255}) \times 20 = \text{mM 5-FC} \\ \text{B: } & (0,1849 \times \text{OD}_{255} - 0,04907 \times \text{OD}_{290}) \times 20 = \text{mM 5-FU} \end{aligned}$$

Formel 1: Berechnung der 5-FC (A) bzw. 5-FU-Gehalts (B) mittels Absorptionsmessungen bei 255 nm und 290 nm (nach Evoy et al. 1997)

2.2.3 Zellkulturmethoden

2.2.3.1 Zellkulturführung

Die verwendeten Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für HeLa-, DU-145-, PC3-, MCF7- und 293-Zellen, die zur Virusamplifikation eingesetzt worden waren, wurde DMEM eingesetzt, das mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 2 mM L-Glutamin substituiert war. 293-Zellen, die für Virusgenerierung und Titrations eingesetzt wurden, waren in MEM mit 2 mM L-Glutamin und 10% FKS nordamerikanischen Ursprungs kultiviert worden. LNCaP-Zellen wurden in RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum nordamerikanischen Ursprungs und 1 mM Natriumpyruvat gezogen. In Experimenten mit dem Hintergrund der gewebe-spezifischen Expression adenoviraler Vektoren wurden die Kulturmedien aller verwendeten Zellen mit 5 nM Methyltrienolon (R1881), einem synthetischen, nicht-metabolisierbaren Androgen, supplementiert.

Die Zellen wurden nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA Lösung aus dem Kulturgefäß abgelöst, in Medium aufgenommen und in ein neues Kulturgefäß überführt. Die verwendeten Medien sowie Trypsin/EDTA und PBS waren zuvor auf

37°C angewärmt worden. Das Teilungsverhältnis betrug bei LNCaP- und 293-Zellen, die zur Virusgenerierung und Titration eingesetzt worden waren, maximal 1:3. Alle anderen Zelllinien wurden je nach Bedarf im Verhältnis von bis zu 1:8 geteilt. 293-Zellen für Virusgenerierung und Titration wurden zur Schonung zellulärer CA Rezeptoren auf chemischen Weg mit *Citric Saline* (Hitt, Bett et al. 1995) vom Kulturgefäß abgelöst.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen vom Kulturgefäß abgelöst, 5 Minuten bei 600 g pelletiert und nach Resuspendieren in FKS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und in einem Einfriergefäß (Nunc, Wiesbaden) 24 Stunden bei 80°C eingefroren. Danach wurden die Zellen zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das im Rahmen der Induktionsexperimente mit dem Tet-System eingesetzte Doxycylin wurde als Pulver bezogen und in H₂O (1 mg/ml Stocklösung) gelöst. In den dargestellten Experimenten wurde eine Endkonzentration von 1 µg/ml im Medium verwendet.

2.2.3.2 Transfektion eukaryontischer Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Transfektionen mit der Calciumphosphatmethode (Graham und van der Eb 1973) und den kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien DOTAP (Roche Diagnostics), Lipofectamine™ (Invitrogen, Eggenstein), GenePORTER® (Gene Therapy Systems, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Die Transfektionen mit den kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden nach Herstellerempfehlung durchgeführt.

2.2.3.3 Adenovirus Techniken

Aufgrund der Größe des adenoviralen Genoms von ca. 36 kb wäre eine Modifikation mit herkömmlichen molekularbiologischen Techniken nur sehr schwer möglich. Die im Folgenden beschriebenen Vorgehensweisen zur Generierung adenoviraler Vektoren beruhen daher auf Rekombination eines einfach zu handhabenden, kleinen, E1-deletierten Shuttleplasmids, mit einem Backboneplasmid, das E3-deletiert, Großteile des adenoviralen Genoms trägt. Neben prokaryontischen Regulationselementen trägt das Shuttleplasmid das 5' Ende des adenoviralen Genoms, das die deletierte E1-Region flankiert. In der vorliegenden Arbeit wurden adenovirale Vektoren durch spontane Rekombination in 293-Zellen, durch Rekombination in rekombinationskom-

petenten Bakterien (AdEasy™ Methode) und durch Cre-*lox* vermittelte Rekombination (AdMax™) generiert:

Die spontane homologe Rekombination eines E1-deletierten Vektors mit einem E1-, E3- und Ψ -deletierten Backbone-Vektor in 293-Zellen beruht auf einer von (Bett et al. 1994) vorgestellten Methode. In dieser Arbeit wurden als Shuttlevektoren Derivate des Parentalplasmids p Δ E1sp1A verwendet, die Expressionskassetten für unterschiedliche Transgene in der E1-Region trugen. Als Backboneplasmid diente pBHG10 (Bett et al. 1994). Nach Calciumphosphat-Transfektion der CsCl gereinigten Plasmide in die E1-transkomplementierende Zelllinie 293, wurden die Zellen mit einem Agarose-Overlay überschichtet (Hitt et al. 1995).

Im AdEasy™ System (QBiogene, Heidelberg) findet die Rekombination zwischen Shuttle- und Backboneplasmid im rekombinationskompetenten *E.coli* Stamm BJ5183 statt und wurde von (He et al. 1998) etabliert. Das Shuttleplasmid pShuttle und das Backboneplasmid pAdEasy wurden in elektrokompetente *E.coli* BJ5183 transformiert. Rekombinierte Plasmide, die neben den bakteriellen Regulationselementen das komplette rekombinante adenovirale Genom trugen, wurden nach Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse identifiziert und in *E.coli* DH10B amplifiziert. Nach CsCl Reinigung und Linearisierung wurde das entsprechende Plasmid mittels Lipofectamine (Invitrogen) in 293-Zellen transfiziert. Diese Schritte wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der anschließende Agarose-Overlay und alle weiteren Maßnahmen entsprachen der im Weiteren beschriebenen Vorgehensweise, die aus *Methods in Molecular Genetics* (Hitt et al. 1995) übernommen wurde.

Die AdMax™ Methode ist eine Weiterentwicklung der bereits beschriebenen spontanen Rekombination in 293-Zellen (Ng et al. 1999). Die Rekombination wird sequenzspezifisch durch die Cre-Rekombinase, die vom Backboneplasmid exprimiert wird, an *loxP*-Sequenzen im Backboneplasmid und im Shuttleplasmid vermittelt. Durch die so erleichterte Rekombination zum vollständigen, rekombinanten adenoviralen Genom wird die Expressionskassette für die Cre-Rekombinase eliminiert. Diese Methode erlaubte den Verzicht auf die CsCl-Reinigung des Shuttleplasmids. Es wurde gemeinsam mit dem CsCl gereinigten Backboneplasmid mit der Calciumphosphat-Methode (Graham und van der Eb 1973) in 293-Zellen kotransfiziert. Im Anschluss

wurden die Zellen ebenfalls mit einem Agarose-Overlay überschichtet (Hitt et al. 1995).

Nach erfolgreicher Kotransfektion bzw. Transfektion bilden sich nach frühestens vier Tagen Löcher im Zellrasen, die so genannten Plaques, die auf virale Replikation hinweisen. Im Lichtmikroskop erscheinen Plaques als runde zellfreie Bereiche, die von infizierten abgerundeten Zellen gesäumt werden, die bereits in den lytischen Zyklus eingetreten sind. Der Virusplaque wurde durch Ausstechen des lysierten Bereichs aus dem Agarose-Overlay mit einer Pasteurpipette geerntet und in PBS⁺⁺ mit einem Glycerolanteil von zehn Prozent aufgenommen. Nach der Ernte wurden 293-Zellen mit den erhaltenen Virussuspensionen infiziert (Hitt et al. 1995). Dazu wird das Kulturmedium entfernt und die in PBS⁺⁺ verdünnte Virussuspension in einem möglichst kleinen Volumen auf die Zellen aufgebracht. Die Inkubation erfolgt 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂. danach werden die Zellen mit herkömmlichen Medium weiterkultiviert. Nachdem die Zellen abgerundet waren, wurde der Mediumüberstand mit bereits freigesetzten Viren zur Kryokonservierung mit 0,1 Vol. Glycerol versetzt. Die im Kulturgefäß verbliebenen Zellen wurden mit SDS/Pronase-Puffer lysiert und die intrazelluläre DNA, die in diesem Stadium der viralen Lyse zu einem Großteil aus viraler DNA besteht, mittels Phenolextraktion isoliert (Sambrook et al. 1989). Durch Restriktionsverdau mit *HindIII* bzw. *PvuI* wurde das adenovirale Genom einschließlich der Transgenregion charakterisiert und auf mögliche Rekombinationen der zellulären E1-Region in das virale Genom untersucht. Das Entstehen viraler Mischpopulationen wurde durch *Plaque Purification* unterbunden. Dazu wurden 293-Zellen mit verdünntem Mediumüberstand aus der ersten Infektion des geernteten Plaques infiziert und mit Agarose-Overlay überschichtet. Nach Isolierung der entstandenen Virusplaques wurden erneut mehrere Kulturschalen 293-Zellen mit den Viren aus je einem Plaque infiziert. Die Charakterisierung und Konservierung des Überstands erfolgte analog zum bereits beschriebenen Vorgehen.

Nach positiver Charakterisierung erfolgte die Amplifikation eines viralen Vektorklons durch Infektion von 293-Zellen mit dem entsprechenden virushaltigen Mediumüberstand. Abgerundete, prälytische Zellen wurden geerntet. Die entstandene konzentrierte, virushaltige Zellsuspension kann nach Titration in der ungereinigten Form bereits für Infektionsexperimente verwendet werden. Aufgrund des hohen Anteils an Zelldebris und transgenen Proteinen, die nur in geringen Mengen von Zellen

toleriert werden, wurden die im Folgenden beschriebenen Vektoren in zwei Schritten in einem Cäsiumchloridgradienten gereinigt (Hitt et al. 1995).

Dazu wurden 293-Zellen, die nach Virusinfektion bereits in die prälytische Phase eingetreten waren, von den Zellkulturschalen abgeschabt, bei 800 g zentrifugiert und das Pellet in Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert (0,5 ml pro konfluent bewachsener Kulturschale von 15 cm Durchmesser). Die Zellen wurden chemisch durch Zugabe von 5% Na-Deoxycholat (0,1 Vol.) aufgebrochen (30 Minuten, RT). Die dadurch freigesetzte zelluläre DNA wurde anschließend durch Zugabe von DNase I Lösung (0,01 Vol.) und 2 M CaCl_2 (0,01 Vol.) hydrolysiert (ca 30 Minuten, 37°C). Die festen Bestandteile des Lysats wurden bei 4000 rpm in der Heraeus Varifuge abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden im ersten Reinigungsschritt in einem geschichteten CsCl-Gradienten (1,35 g/ml: und 1,25 g/ml) durch Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge Optima LE-80K, Beckman Coulter, Rotor 32Ti, 30000 rpm, 10°C, 3 Stunden) ein Großteil der Zellreste und der leeren Viruskapside abgetrennt. Die Bande, die sich an der Grenze der beiden unterschiedlich konzentrierten CsCl-Lösungen bildet, enthält das funktionale Virus. Diese Bande wird durch Anstechen mit einer Kanüle aus dem Zentrifugenröhrchen abgezogen. Im zweiten Reinigungsschritt wurde die bereits vorgereinigte Viruslösung in einer 1,35 g/ml CsCl-Lösung aufgenommen und in einem kontinuierlichen Gradienten ca. 18 Stunden zentrifugiert. Die Virusbande wurde analog dem ersten Reinigungsschritt abgenommen. CsCl wurde durch Dialyse der gereinigten Virussuspension in einer Dialysierkassette mit einem Molekulargewichtsausschluß (*Molecular Weight Cut Off*: MWCO) von 10000 (Pierce) entfernt, d.h. sämtliche Proteine >10000 kDa wurden von der Membran in der Dialysierkassette zurückgehalten. Bei der Zusammensetzung des Dialysepuffers und der Kryokonservierung des gereinigten Virus diente die Arbeiten von Hoganson et al. (2002) und Hitt et al. (1995) als Vorlage.

Zur Titerbestimmung wurde die gereinigte Virussuspension in PBS⁺⁺ in zwei unabhängigen Verdünnungsreihen verdünnt. 293-Zellen wurden mit einem definierten Volumen der Verdünnungen infiziert und nach 30 Minuten mit einem Agarose-Overlay überschichtet. Die entstandenen Plaques wurden am siebten Tag nach Titration kontrolliert. Am zehnten Tag nach Titrationsbeginn konnte auf Basis der Plaquezahl der Titer berechnet werden. Die Maßeinheit wird in *Plaque Forming Units* pro Milliliter (pfu/ml) angegeben. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Anleitung aus *Methods in Molecular Genetics* (Hitt et al. 1995) durchgeführt. Zusätzlich zur Be-

stimmung der pfu wurde photometrisch bei 260 nm die Gesamtzahl der viralen Partikel ermittelt (Mittereder et al. 1996). Virale Partikel schließen neben den pfu auch nichtinfektiöse Partikel und infektiöse Viren, die aufgrund unterschiedlicher Defekte 293-Zellen infizieren, aber nicht replizieren können, mit ein. Die Bestimmung der viralen Partikelanzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 1,1 \times 10^{12} \text{ Virale Partikel / ml}$$

Formel 2: Ermittlung von der Anzahl der viralen Partikel in einer Virussuspension

Für die beschriebenen Versuche wurden ausschließlich Viruspräparationen verwendet, deren pfu Anteil, bezogen auf die Gesamtzahl der viralen Partikel, $\geq 1\%$ war. Der adenovirale Gentransfer erfolgte bei etwa 70-80% Konfluenz des Zellrasens. Dazu wurde die Zellzahl in einem Referenzkulturgefäß, das analog der zu infizierenden Zellen ausgelegt wurde, durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die benötigte Virusanzahl errechnete sich aus der *Multiplicity of Infection* (MOI) und der Zellzahl. Die MOI entspricht der statistischen Anzahl an pfu, die pro Zelle zur Infektion eingesetzt wird. PBS⁺⁺ diente zur Verdünnung der Virussuspensionen und als Infektionslösung (Hitt et al. 1995).

Für die im Lauf dieser Arbeit etablierte Methode der „Infektion im Reaktionsgefäß“ wurden die Zellen mit *Citric Saline* aus dem Kulturgefäß abgelöst. Eine definierte Zellzahl wurde anschließend in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer definierten Virusmenge in PBS⁺⁺ versetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen in Medium aufgenommen und die entsprechenden Kulturgefäße überführt.

2.2.3.4 Cell Proliferation Kit II (XTT)

Die Lebendzellzahl wurde mit dem Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer Redoxreaktion, die von mitochondrialen Dehydrogenasen katalysiert wird. Durch Elektronenübergang wird das gelbe Tetrazoliumsalz XTT in ein orange gefärbtes wasserlösliches Formazansalz umgewandelt. Die OD wurde colorimetrisch als Absorptionsdifferenz von 492 nm und 650 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der XTT-Test parallel zu den untersuchten Proben mit einer Verdünnungsreihe der entsprechenden Zelllinie mit definierten Zellzahlen durchgeführt. Anhand der ermittelten OD konnte eine sigmoide Standardkurve generiert werden, die in ihrem linearen Abschnitt der Geradengleichung $y=mx+t$ folgt und die Quantifizierung der stoffwechselaktiven Zellen in der Probe erlaubte. Um gewährleisten zu können, dass sich die Anzahl der zu untersuchenden Zellen ebenfalls im linearen Bereich der Standardkurve bewegt, wurden die Proben seriell verdünnt und die XTT Reaktion in mehreren Verdünnungsstufen durchgeführt.

Die Sensitivitätstests gegen bsRNase und 5-FC bzw. 5-FU wurden in einer 96-well Platte durchgeführt. Diese Vorgehensweise setzt voraus, dass initial eine Anzahl von Zellen ausgesät wird, deren Absorption nach dem Inkubationszeitraum nach XTT Zugabe noch im linearen Bereich liegt. Aufgrund der unterschiedlichen mitochondrialen Aktivität und der unterschiedlichen Teilungsrates der ausgewählten Modellzelllinien, wurde für die Sensitivitätsuntersuchungen gegenüber bsRNase und 5-FC bzw. 5-FU, die jeweils vier Tage inkubierten, die Zellzahl ermittelt, die am Ende des Versuchs nach Zugabe des XTT-Reagenz noch eine Absorption im linearen Bereich zeigte. Folgende Ausgangszellzahlen wurden eingesetzt: LNCaP: 6250; HeLa: 3125; DU-145: 800.

2.2.3.5 Detektion EGFP-exprimierender Zellen im Fluoreszenzmikroskop

Die EGFP-Expression transduzierter Zellen wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Göttingen) bei 485 nm Anregung und 515 nm Emission festgestellt. Die photographische Dokumentation erfolgte mit der Digitalkamera Nikon Coolpix 990.

2.2.3.6 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Analyse apoptotischer und EGFP exprimierender Zellen wurde durchflusszytometrisch (FACSVantage, Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die Markierung der Zellen zur Apoptosedetektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Fluoresceinthiocyanat (FITC) konjugiertem Annexin V (Roche Diagnostics), das an apoptoseassoziierte Phosphatidylserinreste an der Außenseite der Zellmembran bindet. FITC wird im Durchflusszytometer von einem Laser mit 488 nm Wellenlänge angeregt und emittiert bei 525 nm. Im gleichen Ansatz wurde eine

Lebend/Totfärbung mit 10 μ l Propidiumjodid (50 μ g/ml) pro Probe durchgeführt. Die Emissionswellenlänge für PI liegt bei 617 nm. Aufgrund der Zellgröße und der Granularität der untersuchten Zellpopulation wurden im ersten Schritt Zelldebris und offensichtlich tote Zellen ausgeschlossen. Von den Zellen in dieser Region gingen ausschließlich lebende, i.e. propidiumjodidnegative Zellen in die Messung ein. Die Region, die die Annexin V positiven Zellen umfasst, wurde vor den eigentlichen Messungen mit ungefärbten Zellen definiert.

Die Detektion von EGFP exprimierenden Zellen wurde bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 507 nm durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemein

In der vorliegenden Arbeit sollen die Kandidatengene bsRNase, bCD und YB-1 auf eine mögliche Verwendung in der Krebstherapie charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt mehrere Expressionssysteme zur induzierbaren gewebespezifischen und universellen Expression auf Basis des Tet-Systems entwickelt. Die Charakterisierung der unterschiedlichen Konstrukte fand zunächst auf Plasmidebene mit Reportergenen statt (Tabelle 4). Von den Reporterkonstrukten, die gut regulierbar waren und über eine gute Expressionsstärke verfügten, wurden adenovirale Vektoren (Tabelle 5) generiert, deren Eigenschaften analysiert wurden. Auf dieser Basis wurden adenovirale Vektorkonstrukte für die oben genannten therapeutischen Transgene dargestellt, deren Anti-Tumor Eigenschaften abschließend charakterisiert wurden.

Tabelle 4: Im Lauf der Arbeit generierte und verwendete Plasmidvektoren. Vgl.: Abb. 15 und 16 für eine schematische Darstellung der Transgenregion. Die Transkriptionsrichtung ist durch Pfeile dargestellt (3'-5': ►; 5'-3': ◀). PSA P/E: PSA Promotor/Enhancer Konstrukt (vgl.: Abb. 10)

Plasmidvektor Promotor Transgen mit Transkriptionsrichtung

pCMVrtTA	CMV	Reverser transkriptioneller Tet-Transaktivator (rtTA) ►
pPSArtTA	PSA P/E	rtTA ►
pTREluc	P _{hCMV*-1}	Luciferase ►
pTRElucinv	P _{hCMV*-1}	Luciferase ◀
ptTSluc	CMV P _{hCMV*-1}	Transcriptional Tet-Silencer ► Luciferase ►
ptTSlucinv	CMV P _{hCMV*-1}	Transcriptional Tet-Silencer ► Luciferase ◀
pTRErinv	P _{hCMV*-1}	Bovine seminal RNase ◀
pPSArtTAlucinv	PSA P/E P _{hCMV*-1}	rtTA ◀ Luciferase ►
pPSArtTAluc	PSA P/E P _{hCMV*-1}	rtTA ► Luciferase ►
pCMVrtTAlucinv	CMV P _{hCMV*-1}	rtTA ◀ Luciferase ►
pCMVrtTAluc	CMV P _{hCMV*-1}	rtTA ► Luciferase ►
pPSAluc	PSA P/E	Luciferase ►

Tabelle 5: Im Lauf der Arbeit generierte und verwendete adenovirale Vektoren. Vgl. Abb. 15 und 16 für eine schematische Darstellung der Transgenregion. Die Namen der adenoviralen Vektoren stützen sich auf die analogen Plasmidkonstrukte. Die Transkriptionsrichtung ist durch Pfeile dargestellt (3'-5': ►; 5'-3': ◄).

Adenoviraler Vektor Promotor Transgen mit Transkriptionsrichtung

AdCMVrtTA	CMV	Reverser transkriptioneller Tet-Transaktivator (rtTA) ►
AdPSArtTA	PSA P/E	rtTA ►
AdTREluc	P _{hCMV*-1}	Luciferase ►
AdTRElucinv	P _{hCMV*-1}	Luciferase ◄
AdtTSluc	CMV P _{hCMV*-1}	Transkriptioneller Tet-Silencer ► Luciferase ►
AdtTSr	CMV P _{hCMV*-1}	Transkriptioneller Tet-Silencer ► Bovine seminale RNase ►
AdPSArtTArinv	PSA P/E P _{hCMV*-1}	rtTA ◄ Bovine seminale RNase ►
AdCMVcd	CMV	Cytosin Deaminase ►
AdTREcdinv	P _{hCMV*-1}	Cytosin Deaminase ◄
AdPSArtTAcdiv	PSA P/E P _{hCMV*-1}	rtTA ◄ Cytosin Deaminase ►
AdPSAcd	PSA P/E	Cytosin Deaminase ►
AdPSArtTAyb-1/einv	PSA P/E P _{hCMV*-1}	rtTA ◄ YB-1/NLS/EGFP ►

3.2 Voruntersuchungen zur Effizienz des Gentransfers

Für die Transfektionsversuche wurde das optimale Transfektionsreagenz für die Zelllinien LNCaP, HeLa, DU-145 und die Verpackungszelllinie 293 ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die cDNA von EGFP in das Expressionsplasmid pcDNA3.1 (+) kloniert. Das entstandene Plasmid pcDNAe wurde in LNCaP-, HeLa-, DU-145- und 293-Zellen mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamine, DOTAP und Geneporter sowie nach der CaPO₄ Methode transfiziert. Die Auswertung erfolgte visuell am Fluoreszenzmikroskop 24 Stunden nach Transfektion und ergab die in Tabelle 6 beschriebenen Ergebnisse.

Für LNCaP-Zellen wurde DOTAP als optimales Transfektionsreagenz bestimmt. Nach Transfektion mit Lipofectamine und CaPO₄ waren die Zellen so stark geschädigt, dass keine EGFP-Expression beobachtet werden konnte. HeLa-Zellen wurden von Lipofectamine am effizientesten transfiziert, DU-145-Zellen waren allgemein durch die verwendeten Transfektionsmitteln schlecht transfizierbar, wobei mit Lipofectamine die relativ besten Ergebnisse erzielt wurden. Die weiteren

Transfektionsexperimente wurden mit dem für die jeweilige Zelllinie optimalen Reagenz durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ermittlung der Transfektionseffizienzen unterschiedlicher Reagenzien in LNCaP, HeLa und DU-145 durch visuelle Beurteilung. +++: sehr gute Transfektionseffizienz; ++: gute Effizienz; + schwache Effizienz; o: sehr geringe bis keine Effizienz bzw. starke Zellschädigung.

Transfektionsreagenz	LNCaP	HeLa	DU-145
Lipofectamine	O	+++	++
DOTAP	+++	++	+
Geneporter	+	++	+
CaPO ₄	O	+	+

Bei der Demonstration einer gewebespezifischen Expression war bei der Auswahl der PSA-negativen Kontrollzelllinien eine mit LNCaP-Zellen vergleichbare Infizierbarkeit ein wichtiges Kriterium. Die Infizierbarkeit einzelner Zelllinien durch Adenoviren ist unter anderem stark abhängig von der Anzahl der Coxsackie-Adenovirus Rezeptoren (CAR) auf der Zelloberfläche, die zwischen einzelnen Zelllinien stark variieren kann. Die Infizierbarkeit der Zelllinien LNCaP, DU-145, PC3, HeLa und MCF7 wurde bestimmt und die MOI₅₀ festgelegt. Dabei handelt es sich um die Anzahl an *Plaque Forming Units* (pfu), die benötigt wird, 50% der Zellen in einem Versuchsansatz zu infizieren (vgl.:1.2.3).

In diesem Experiment wurden zudem zwei unterschiedliche Infektionstechniken untersucht:

- die Infektion im *Monolayer* im Kulturgefäß
- die Infektion einer definierten Anzahl von Zellen, die von der Kulturschale gelöst wurden und in einem Eppendorf Reaktionsgefäß infiziert wurden. Diese Infektionsmethode wurde im Verlauf dieser Arbeit entwickelt und etabliert.

Als Reportervirus diente hier AdCMVEGFP, ein E1/E3-deletiertes Adenovirus, das das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors in der E1-Region trägt. 24 Stunden nach Infektion mit den MOI 0,1; 0,32; 1; 3,2; 10; 32 und 100 wurde der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Um aus den beiden Einzelexperimenten vergleich-

bare Daten generieren zu können, wurde die Zellzahl des Infektionsansatzes im Reaktionsgefäß gleich der in der Kulturschale eingestellt, sodass beide mit denselben Virusverdünnungen infiziert werden konnten. Der prozentuale Anteil von EGFP exprimierenden Zellen wurde graphisch gegen die entsprechende MOI aufgetragen. Aus der entstandenen Kurve konnte die MOI_{50} abgeleitet werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: MOI_{50} der untersuchten Zelllinien nach Infektion im Monolayer und Infektion im Reaktionsgefäß. Die angegebenen Zelllinien wurden mit MOI 0,1; 0,32; 1; 3,2; 10; 32 und 100 mit AdCMVEGFP infiziert. Nach 24 h wurden die EGFP exprimierenden Zellen im Durchflusszytometer bestimmt und die MOI_{50} ermittelt.

Zelllinie	MOI_{50} nach Infektion im Monolayer [pfu]	MOI_{50} nach Infektion im Reaktionsgefäß [pfu]
LNCaP	0,19	0,08
DU-145	0,10	0,09
HeLa	0,18	0,05
MCF7	1,33	1,56
PC3	6,17	2,79

Aus der Bestimmung der MOI_{50} geht hervor, dass die Infizierbarkeit von HeLa- und DU-145-Zellen im Bereich von LNCaP-Zellen liegen. MCF7- und PC3-Zellen dagegen sind sehr viel schlechter infizierbar und können daher nicht als Negativkontrollen herangezogen werden. Im Vergleich der beiden Methoden erwies sich die modifizierte Infektion im Reaktionsgefäß mit Ausnahme von MCF7-Zellen als der effizientere Weg (Tabelle 7).

Die herkömmliche Methode, die Zellen durch Trypsin abzulösen, kann hier nicht angewandt werden, da Trypsin als Protease die CA-Rezeptoren zerstören würde. Die Zellen müssen bei der Infektion im Reaktionsgefäß daher mit *Citric Saline* vom Kulturgefäß abgelöst werden. Dieser Prozess wird von LNCaP-Zellen im Vergleich zu HeLa- und DU-145-Zellen schlechter toleriert, sodass diese Methode nur eingeschränkt genutzt werden kann. Wenn nicht explizit erwähnt, wurde bei weiteren Infektionsexperimenten die Infektion im Monolayer durchgeführt.

3.3 Charakterisierung der eingesetzten Expressionssysteme

3.3.1 Steuerung der PSA Promotor/Enhancer abhängigen Expression

Zur Minimierung der genomischen regulatorischen Sequenz des PSA-Gens wurde der Enhancer durch einen Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Bam*HI und der Promotor mit *Bgl*II und *Hind*III aus dem Plasmid CN0 ausgeschnitten und in pBSIIISK(+) subkloniert. CN0 enthält die komplette regulatorische Region des PSA-Gens innerhalb eines 5.8 kb großen *Hind*III Fragments (Abb. 10), das die Region –5834 bis +12 relativ zum Transkriptionsstart umfasst (Schoor et al. 1996).

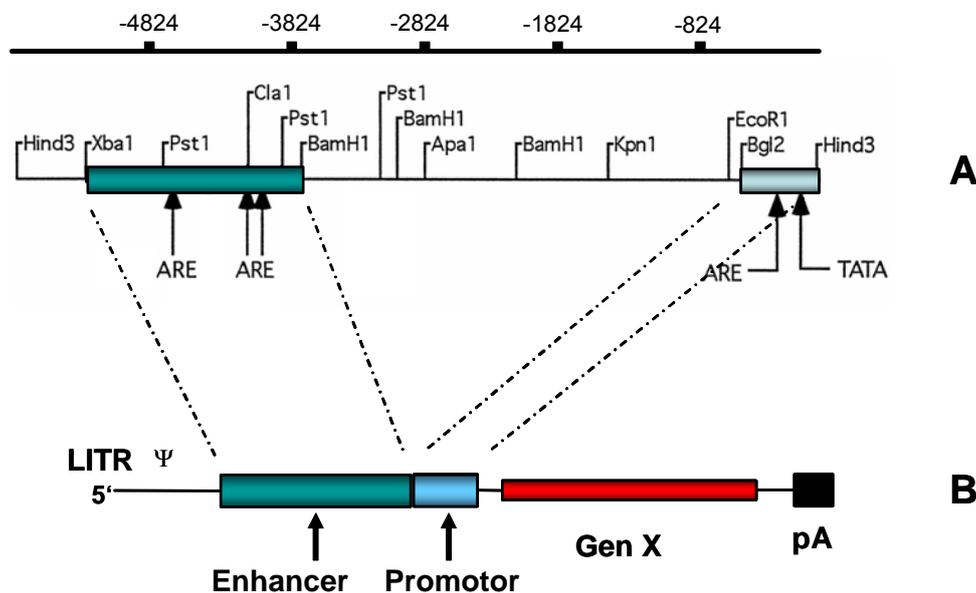


Abbildung 10: Minimierung der genomischen PSA-Regulatorregion durch Kombination der relevanten Promotor- und Enhancerbereiche im Shuttleplasmid A: Enhancer- und Promotorlokalisierung mit entsprechenden Restriktionsstellen und Positionsskala der Nukleotide vor Transkriptionsstart; B: PSA Promotor/Enhancer gesteuerte Expressionskassette im Shuttleplasmid. LITR: *Left Inverted Terminal Repeat*, Ψ : Verpackungssignal; pA: Polyadenylierungssequenz).

Das so kombinierte PSA-Promotor/Enhancer Konstrukt (PSA P/E) wurde zusätzlich mit einem SV40 Polyadenylierungssignal in den Shuttlevektor p Δ E1sp1A kloniert, der den linken Arm des adenoviralen Genoms 5' der E1 Region enthält (Abb. 10). Nach Einfügen eines Transgens in die entstandene Expressionskassette wird die Generierung eines AdV der ersten Generation ermöglicht, das dieses unter transkriptioneller Kontrolle des beschriebenen PSA P/E trägt.

Da der PSA-Promotor und damit auch die Expression von PSA stark androgenabhängig ist, wurde in einem initialen Experiment *in vitro* die endogene PSA-Expression in LNCaP-Zellen in Abhängigkeit der Androgenkonzentration bestimmt. Damit sollte die bereits in der Literatur beschriebene PSA-Expression, d. h., die Aktivierung der PSA Promotor/Enhancer (PSA P/E) Sequenz durch die Bindung von Androgenrezeptoren in der PSA-positiven LNCaP Zelllinie bestätigt werden und gleichzeitig für die folgenden Experimente die optimale Androgenkonzentration für die Expression vom PSA P/E Konstrukt ermittelt werden. Diese Notwendigkeit ergibt sich aus der sehr unphysiologischen *in vitro* Situation, in der der Androgengehalt des zur Zellkultur verwendeten fötalen Kälberserums (FKS), abhängig von Charge und Bezugsquelle, stark variieren und so zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen kann.

LNCaP-, sowie DU-145- und 293-Zellen als Negativkontrolle wurden in ihrem herkömmlichen Medium in 6 cm Kulturschalen zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert. Danach wurde das FKS im Medium der LNCaP-Zellen durch so genanntes *stripped* Serum ersetzt, dem die Steroidhormone entzogen wurden. Dem *stripped* Serum wurde das synthetische, nicht metabolisierbare Androgen Methyltrienolon (R1881) zu Endkonzentrationen von 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zugesetzt. Zusätzlich wurden LNCaP-Zellen auch in *stripped* Serum ohne Zusatz und mit herkömmlichen FKS inkubiert. Als Kontrolle wurden DU-145- und 293-Zellen in Medium mit herkömmlichen FKS und Medium mit *stripped* Serum und 100 nM R1881 kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert, um mögliche Androgeneffekte aus der vorausgegangenen Kultivierung mit Standard-FKS auszuschalten. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen und der Gehalt des sezernierten PSA mittels ELISA bestimmt.

In Abbildung 11A ist die Androgenabhängigkeit der PSA-Expression im Modellsystem LNCaP deutlich erkennbar. Der PSA Gehalt im Medium von 293- und DU-145-Zellen lag, sowohl nach Kultivierung mit herkömmlichen FKS als auch mit *stripped* Serum, das mit 100 nM R1881 substituiert war, unter der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Da die initial verwendete Charge FKS (Fa. Biochrom, Berlin) bereits ausreichend Androgene enthielt, konnte auf eine Substituierung des Kulturmediums mit Androgen im weiteren Verlauf der Experimente verzichtet werden (Abb.11A). Sämtliche beschriebenen Experimente mit Reporterplasmiden wurden mit dieser Serumcharge durchgeführt.

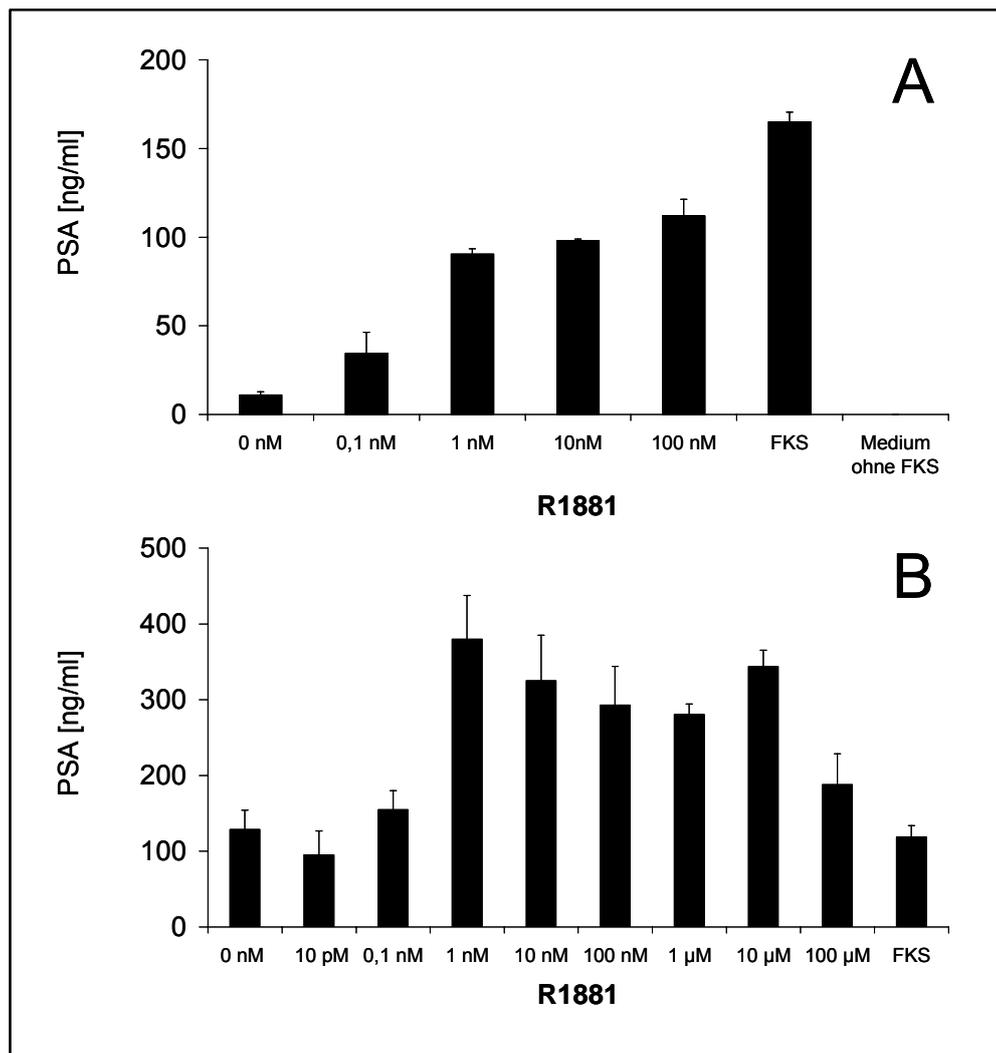


Abbildung 11: PSA Gehalt im Mediumüberstand von LNCaP-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen R1881 Konzentrationen nach 48 h. A: PSA Werte vor dem Wechsel der Serumcharge. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte aus Doppelansätzen mit den entsprechenden Standardabweichungen. B: PSA Werte nach dem Wechsel der Serumcharge. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte aus drei Ansätzen mit den entsprechenden Standardabweichungen

Die Bestimmung der Androgenabhängigkeit der PSA-Expression musste nach einem Wechsel der Bezugsquelle für das fötale Kälberserum wiederholt werden, da das Wachstum der LNCaP-Zellen gestört war und Ergebnisse aus den Versuchen mit dem gewebespezifischen Promotor zunehmend inkonsistenten Charakter annahmen. Dazu wurden erneut LNCaP-Zellen mit nordamerikanischem FKS und *stripped* Serum, supplementiert mit 10 pM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM und 100 µM R1881, inkubiert (Abb. 11B). Es muss angemerkt werden, dass die Ergebnisse der beiden Experimente aufgrund des großen zeitlichen Abstands und daraus resultierender Inkonsistenzen nicht verglichen werden können. Die Expression von PSA, die durch die genomische Promotor/Enhancer Region gesteuert wird, war in diesem Experiment nach wie vor androgenabhängig. Die PSA Spiegel waren aller-

dings nach Inkubation mit FKS sehr gering und vergleichbar mit den Werten der Inkubation mit *stripped* Serum ohne Androgenzusatz (Abb. 11B). Auffällig war die Abnahme der PSA-Konzentration im Medium bei Androgenkonzentrationen ab 100 nM. Dieser Effekt kann auf einen verlangsamten Stoffwechsel der Zellen unter hohen Androgenkonzentrationen zurückgeführt werden (Langeler et al. 1993).

Um den direkten Effekt von Androgenen auf die Genexpression unter der Kontrolle des hier verwendeten PSA P/E Konstrukts (Abb. 10) im Kontext der gewebespezifischen Aktivierung zu zeigen, wurden LNCaP-Zellen in einem parallelen Ansatz mit dem Plasmid pPSAluc transfiziert. Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und ist ein Derivat des Shuttleplasmids p Δ E1sp1A, das Luciferase unter der Kontrolle des PSA P/E in der E1-Region trägt (vgl.: Abb. 10). Die im Folgenden beschriebenen Transfektionen wurden alle mit Derivaten dieses Plasmids durchgeführt, das auch in der Virusgenerierung als Shuttleplasmid für Kotransfektionen diente. Es enthält mit Ausnahme der deletierten E1-Region, in die die entsprechenden Expressionskassetten kloniert werden können, adenovirale DNA vom 5' Ende des linearen, doppelsträngigen Virusgenoms. Im Unterschied zu reinen Expressionsplasmiden und Plasmiden zur Evaluierung unterschiedlicher Promotorkonstrukte werden hier virale Regulationselemente, wie z.B. Enhancer in unmittelbarer Nähe der E1-Region, berücksichtigt.

Die vom PSA P/E Konstrukt gesteuerte Luciferaseexpression war androgenabhängig (Abb. 12) und korrelierte mit dem zuvor gemessenen PSA Expressionsmuster, das vom genomischen PSA P/E reguliert wird (Abb. 11A und B). Die hier ebenfalls nur äußerst geringe Luciferaseexpression in Zellen, die mit herkömmlichem FKS inkubiert worden waren, machten es notwendig, für alle weiteren Experimente, in denen die gewebespezifische Expression untersucht wurde, zusätzlich R1881 ins Medium zu substituieren. Basierend auf den Daten aus den Abbildungen 11 und 12 und in Anlehnung an Literatur (Li et al. 2002) wurde eine Konzentration von 5 nM R1881 im Kulturmedium gewählt.

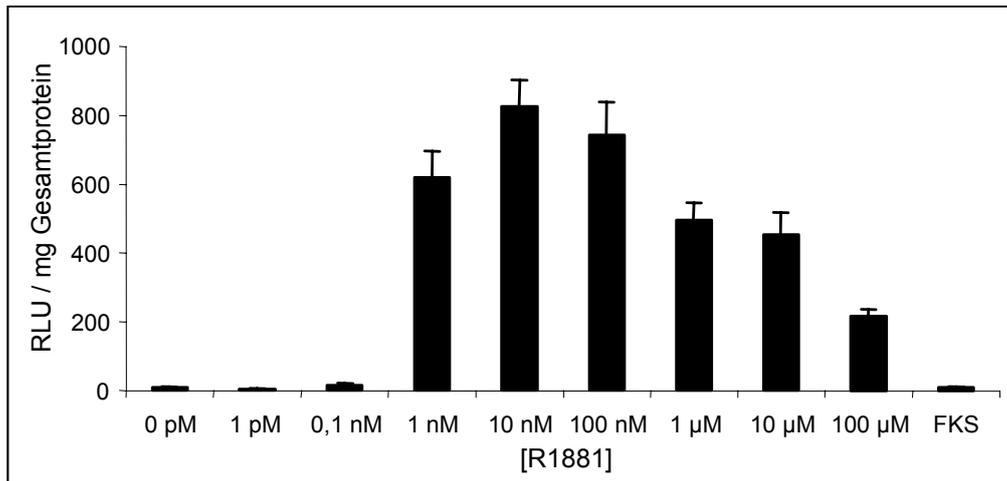


Abbildung 12: Androgenabhängige Luciferase-Expression nach Transfektion mit pPSALuc. Der Luciferasegehalt der transfizierten Zellen wurde 48 h nach Transfektion bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt normiert. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte aus drei Ansätzen mit denentsprechenden Standardabweichungen.

Sämtliche gezeigten Daten, die sich aus Transfektionen ableiten, basieren auf Experimenten, die mit der ersten Charge FKS durchgeführt wurden und ausreichend Androgene für die Aktivierung des PSA P/E Konstrukts enthielten. Nach dem FKS-Chargenwechsel wurde dem Medium in den weiteren Versuchen zur gewebespezifischen, adenoviral vermittelten Expression 5 nM R1881 zugesetzt.

3.3.2 Transfektionen zur Charakterisierung der verwendeten Vektoren

Im Laufe dieser Arbeit wurden unterschiedliche Konstrukte mit Reportergenen getestet. Da die Herstellung eines gebrauchsfertigen Virus sehr zeitaufwendig und teuer ist, wurden die Vektoren vorläufig auf Plasmidebene in Transfektionsexperimenten charakterisiert.

Zunächst wurde die Gewebespezifität des PSA P/E Konstrukts untersucht. Im Hinblick auf den optimalen Analysezeitpunkt der Transgenexpression vom PSA P/E Konstrukt und vom CMV-Promotor wurde eine vergleichende Kinetik durchgeführt. Dazu wurden LNCaP-Zellen mit den Plasmiden pPSALuc und pCMVluc, die das Reportergen Luciferase unter der Kontrolle von PSA P/E bzw. des CMV-Promotors exprimieren, transfiziert. Nach 12, 18, 21, 24, 27, 30 und 36 Stunden wurde aus den jeweiligen Ansätzen die Luciferaseaktivität bestimmt.

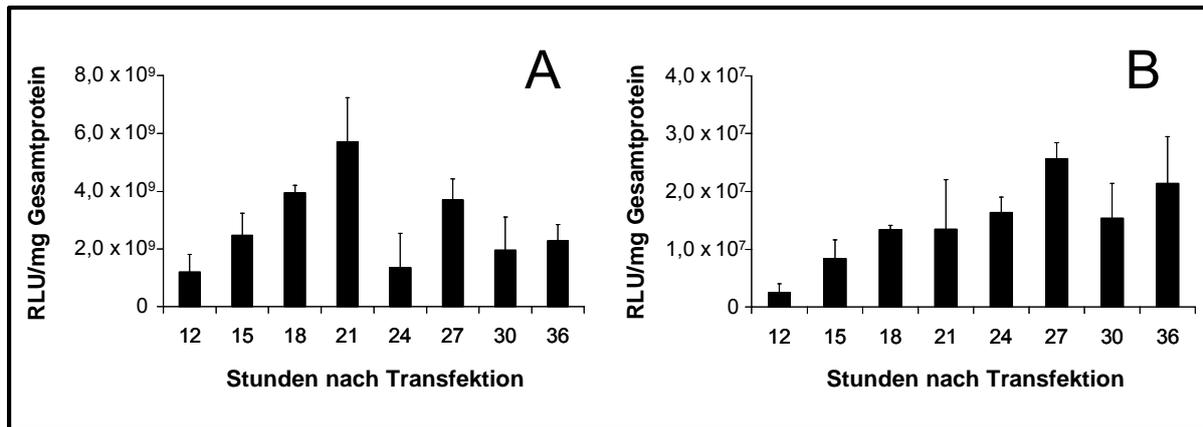


Abbildung 13: Kinetik des CMV-Promotors und des PSA Promotor/Enhancer Konstrukts in LNCaP. Die Zellen wurden in einer 6-well Platte mit DOTAP und je 2,5 μg pCMVluc (A) bzw. pPSAluc (B) transfiziert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt der entsprechenden Probe normalisiert. Die dargestellten Werte geben den Mittelwert aus drei Einzelversuchen wieder. Die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung.

In den Zellen, die mit pCMVluc transfiziert wurden, stellt sich das Expressionsoptimum 21 Stunden nach Transfektion ein (Abb. 13A). Die maximale Expression des PSA P/E Konstrukts ist nach ca. 27 Stunden erreicht (Abb. 13B). Basierend auf diesen Daten wurden die weiteren Experimente mit dem PSA P/E Konstrukt am zweiten Tag nach der Transfektion analysiert.

Zur Quantifizierung der Expressionsstärke des PSA P/E Konstrukts in den Modellzelllinien wurden LNCaP-Zellen und die Kontrollen HeLa- und DU-145-Zellen mit dem Plasmid pPSAluc gemäß der Anleitung der Hersteller der entsprechenden Transfektionsreagenzien transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Parallel wurde auch die Zelllinie 293 mit pPSAluc auf Hintergrundexpression untersucht, um den Einfluss einer erhöhten Basisaktivität auf die Generierung adenoviraler Vektoren, die ein toxisches Transgen tragen, einschätzen zu können.

Als Bezugsgröße für die Expressionsstärke wurde in diesem Experiment und auch in folgenden Versuchen die Luciferaseexpression unter der Kontrolle des CMV-Promotors gewählt, wobei die Expressionsstärke des CMV-Promotors als 100% definiert wurde. Experimente mit pCMVluc wurden parallel mit den oben beschriebenen Experimenten durchgeführt.

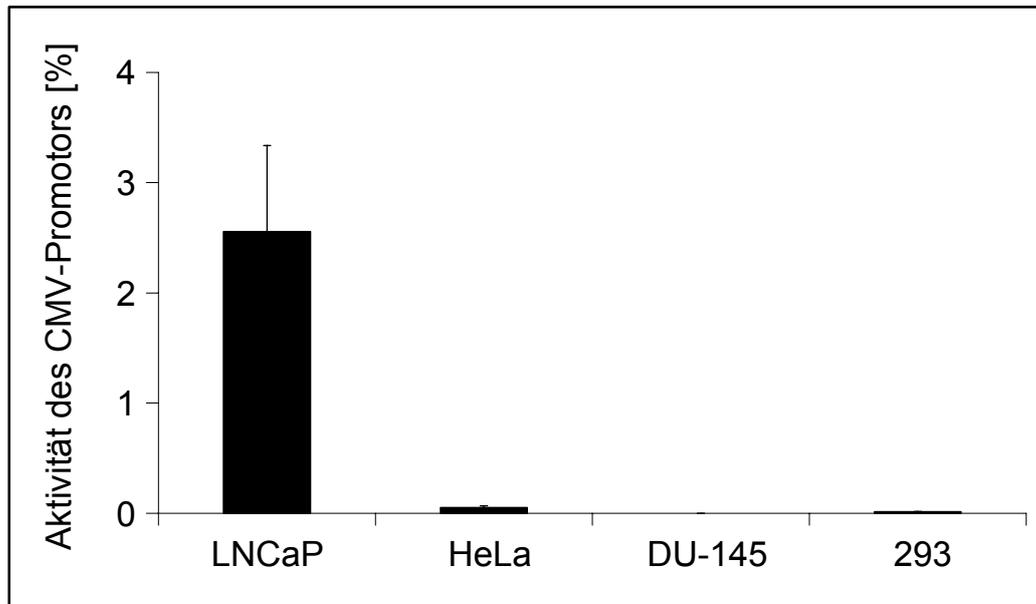


Abbildung 14: Luciferase Expression unter der Kontrolle des PSA Promotor/Enhancer Konstrukts (vgl.: Abb. 10) 48 h nach Transfektion in LNCaP, HeLa, DU-145 und 293. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Balken zeigen die Werte aus Transfektionsexperimenten, die im Dreifachansatz und mit dem für die einzelnen Zelllinien optimalen Reagenz (vgl.: 3.1.1.2) nach Herstellervorschrift durchgeführt wurden. Als Referenz diente jeweils der Wert, der analog nach Transfektion von pCMVluc in die entsprechenden Zelllinien ermittelt wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abbildung 14 zeigt, dass mit dem hier generierten PSA P/E Konstrukt gewebespezifische Expression von Luciferase in LNCaP-Zellen erreicht werden kann. Die Expressionsstärke betrug 2,6% der Expression des Referenzvektors pCMVluc. Die Werte in den Kontrollzelllinien lagen jeweils knapp über der Nachweisgrenze.

Die festgestellte Expressionsstärke des gewebespezifischen PSA P/E ist im Hinblick auf den Einsatz von Cytosin Desaminase und YB-1 als therapeutische Transgene zu gering, um eine zytotoxische Wirkung entfalten zu können (Yoshimura, Suzuki et al. 2001; Holm, Bergmann et al. 2002). Für bsRNase existieren diesbezüglich keine Daten. Es bestand daher die Notwendigkeit, die Transgenexpression unter Beibehaltung der Gewebespezifität zu steigern. Zu diesem Zweck wurde das gewebespezifische PSA P/E Konstrukt mit dem Tet-On System kombiniert. In dem hier vorgestellten Ansatz wird der reverse Tet-Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des PSA P/E Konstrukts exprimiert (Abb. 15A). In einem universellen Ansatz wurde das PSA P/E Konstrukt durch den CMV-Promotor ersetzt (Abb. 15B).

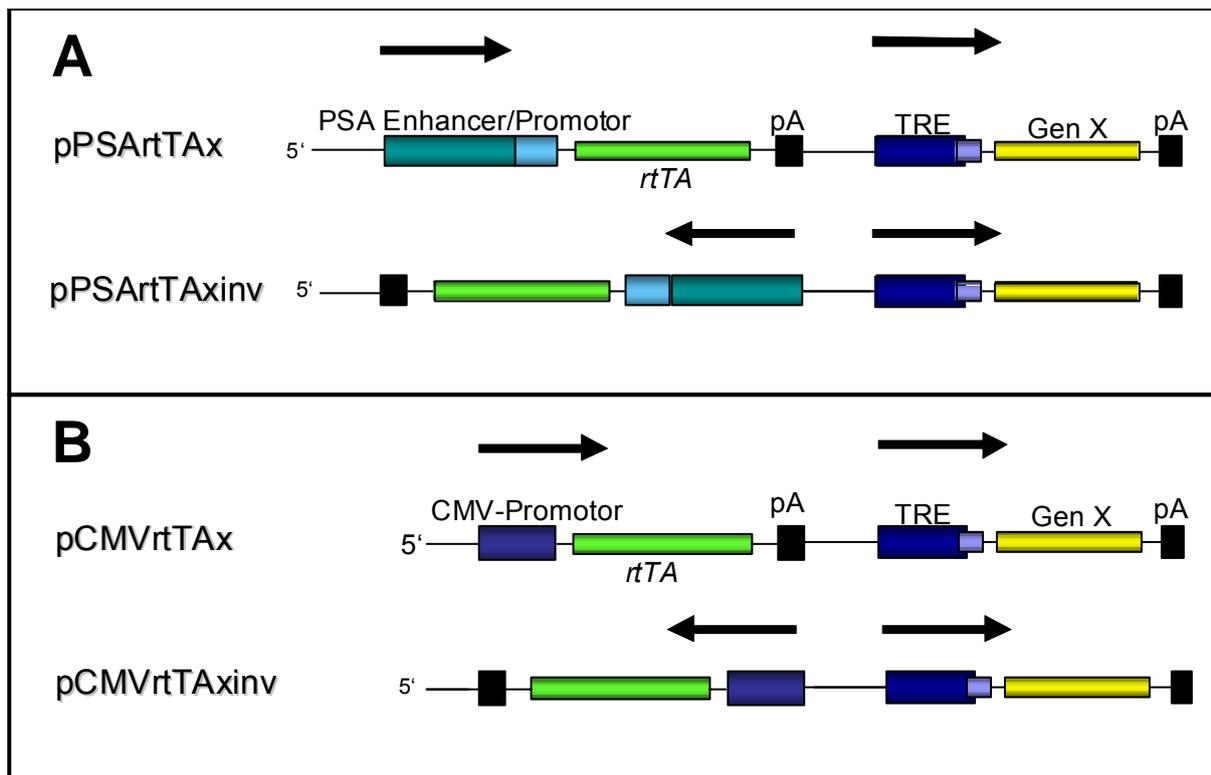


Abbildung 15: Cis-System: Die Expressionskassette für den reversen Tet-Transaktivator (rtTA) und die Transaktivator abhängige Expressionskassette mit $P_{hCMV^{*1}}$ sind auf einem Vektor lokalisiert. (A): gewebespezifisches Cis-System. (B) konstitutives Cis-System. Die Expressionskassetten für rtTA sind jeweils in 5'-3' Richtung und in 3'-5' Richtung kloniert. Die Pfeile geben die jeweilige Transkriptionsrichtung an. Das „x“ wird im weiteren Verlauf der Arbeit durch ein Kürzel des entsprechenden Transgens ersetzt.

Grundsätzlich ergibt sich hier die Möglichkeit der Kombination der Expressionskassette für den rtTA mit der Expressionskassette für das eigentliche Transgen unter der Kontrolle des Tet-Responsive Elements (TRE) auf einem Vektor (Cis-System) oder die Lokalisation beider Expressionskassetten auf jeweils einem Vektor (Trans-System). Um mögliche Interferenzen der viralen Enhancer 5' der E1-Region zu minimieren, wurden vorsorglich im Cis-System die Expressionskassetten für den rtTA zusätzlich zur 5'-3' Orientierung auch 3'-5' kloniert (Abb. 15A und B).

Im Trans-System wird die Expression des rtTA von einem CMV-Promotor bzw. von PSA P/E kontrolliert. rtTA bindet Doxycylin und aktiviert nach einer Konformationsänderung *in trans* die Expression vom $P_{hCMV^{*1}}$ der Effektorvektoren. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und im Hinblick auf minimale Hintergrundexpression und maximale Induktion untersuchten Effektorvektoren unterteilen sich in die zwei im Folgenden beschriebenen Gruppen (Abb. 16).

Die bicistronischen Vektoren ptTSx und ptTSxinv enthalten neben der Expressionskassette mit dem eigentlichen Transgen (Gen X) unter Kontrolle des $P_{hCMV^{*1}}$ eine

weitere Expressionskassette, von der der transkriptionelle Tet-Silencer (tTS) konstitutiv unter der Kontrolle eines CMV-Promotors transkribiert wird. In Vektor ptTSx ist dieses Element in 5'-3' Orientierung in den Vektor kloniert. Der Vektor ptTSxinv trägt das identische Element invertiert in 3'-5' Orientierung. Die tetrazyklinabhängige Expressionskassette liegt in beiden Fällen in 5'-3' Orientierung vor.

Die monocistronischen Vektoren pTREx und pTRExinv tragen jeweils nur eine Expressionskassette unter der Kontrolle von $P_{hCMV^{*1}}$. Im Vektor pTREx ist dieses Element 5'-3' orientiert, in Vektor pTRExinv 3'-5' invertiert (Abb. 16).

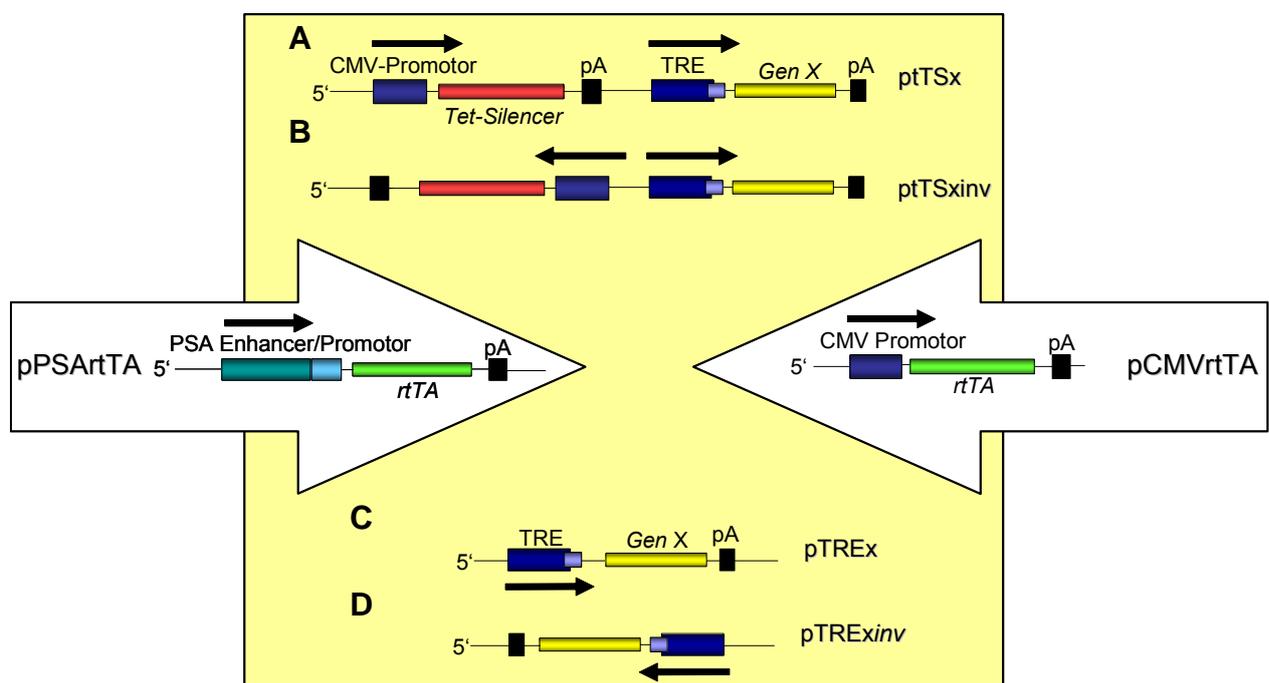


Abbildung 16: Trans-System: Die Effektorvektoren A-D (braunes Feld) werden *in trans* durch Expression des rtTA von den Transaktivatorvektoren pCMVrtTA bzw. pPSArtTA (weiße Pfeile) in Anwesenheit von Doxycyclin aktiviert. Die schwarzen Pfeile geben die jeweilige Transkriptionsrichtung des entsprechenden Promotors an. A und B sind bicistronische Konstrukte, wobei Vektor A beide Expressionskassetten in der gleichen Orientierung trägt, Vektor B trägt die Expressionskassette für den transkriptionellen Tet-Silencer in 3'-5' Orientierung. Vektor C trägt die Expressionskassette unter der Kontrolle von $P_{hCMV^{*1}}$ in 5'-3' Orientierung; in Vektor D ist diese invertiert.

In ersten Pilotexperimenten auf Reporterebene mit den in den Abbildungen 15 und 16 beschriebenen Konstrukten wurde die cDNA für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) kloniert. Diese Vektoren wurden in 293-, DU-145- und LNCaP-Zellen transfiziert und die EGFP-Expression im induzierten Zustand und nicht induzierten Zustand untersucht. Insbesondere aufgrund der hohen Halbwertszeit von EGFP und der starken Eigenfluoreszenz von LNCaP-Zellen war eine auswertbare durchflusszytometrische Quantifizierung der Expression nicht ausreichend möglich.

Die Promotorstudien wurden mit Vektoren, die anstelle von EGFP, Luciferase als Reporter genen trugen fortgesetzt.

Im Hinblick auf die beschriebene Zytotoxizität der bsRNase ist die Regulation der Genexpression von besonderer Bedeutung, da bsRNase während der viralen DNA-Replikation die Verpackungszelllinie 293 durch unspezifische Hintergrundexpression bereits so stark schädigen könnte, dass eine Virusgenerierung unmöglich werden würde. Um die Konstrukte mit der geringsten Hintergrundexpression herauszufiltern, wurden die Konstrukte aus den Abbildungen 15 und 16 mit Luciferase als Reporter genen in 293-Zellen transfiziert. Als Referenz wurden in einem Parallelansatz 293-Zellen mit pCMVluc transfiziert. Dieses Experiment wurde im uninduzierten Zustand durchgeführt, d. h., es wurde kein Doxycyclin zugegeben.

Das gewebespezifische Cis-Konstrukt pPSArtTAlucinv wies eine Basisexpression von 0,08% des CMV-Referenzwertes auf. pPSArtTAluc hatte mit 0,15% die fast zweifache Basisexpression. Die Hintergrundexpression von pCMVrtTAluc lag mit 0,1% weit unter der von pCMVrtTAlucinv mit 18,44% (Abb. 17A). Aufgrund der niedrigen Basisexpression wurden die Cis-Konstrukte pPSArtTAlucinv und pCMVrtTAluc zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

Von den bicistronischen Trans-Konstrukten war ptTSluc mit 0,03% der Aktivität der CMV-Referenz ptTSlucinv mit 0,51% bezüglich einer geringeren Hintergrundexpression überlegen. Bei den Trans-Vektoren, die ausschließlich die von P_{hCMV^*-1} abhängige Expressionskassette trugen, war die Basisexpression von pTRELuc mit 43,12% gegenüber 0,17% von pTRELucinv stark erhöht (Abb. 17B). Die Effektorstrukture des Trans-Systems pTRELucinv und ptTSluc erwiesen sich in 293-Zellen in Abwesenheit des rtTA als gut regulierte Konstrukte mit geringer Hintergrundaktivität.

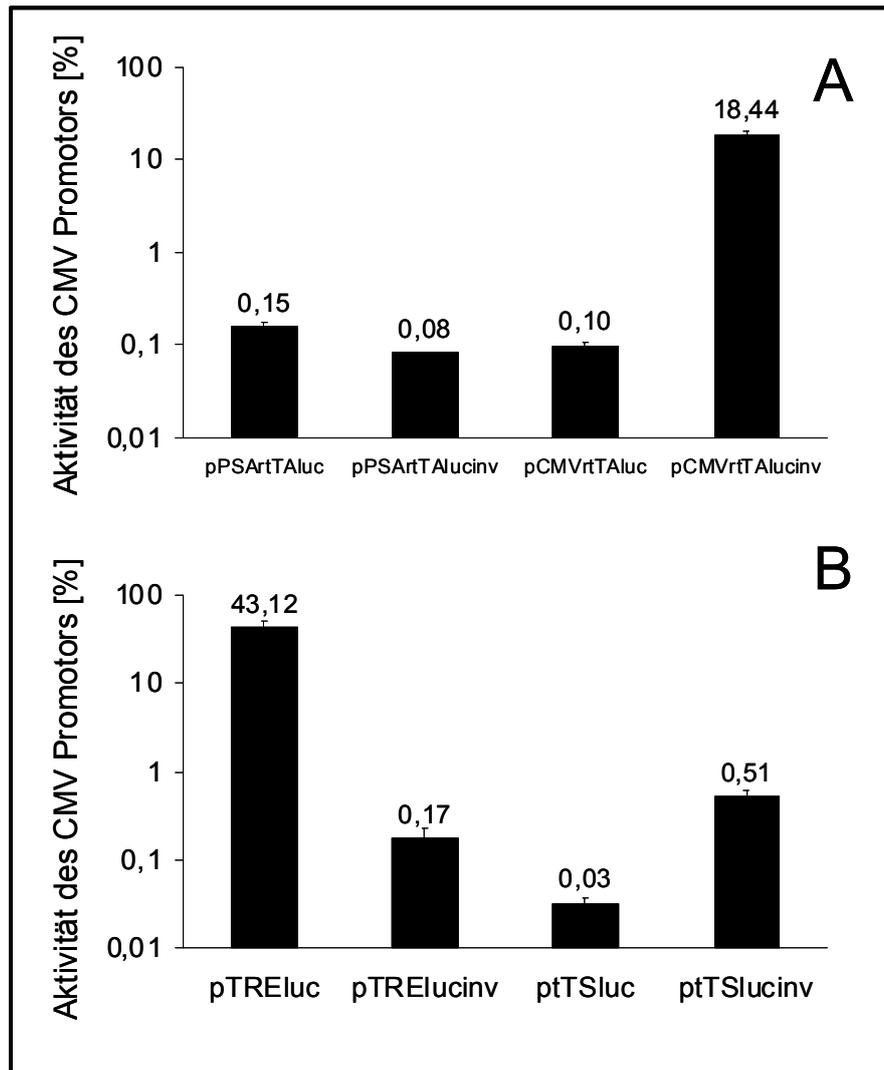


Abbildung 17: Basisexpression der Cis-Konstrukte (A) (vgl.: Abb. 15) und Trans-Konstrukte (B) (vgl.: Abb. 16) in 293-Zellen 24 h nach CaPO₄ Transfektion mit jeweils 2,5 µg Plasmid-DNA. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Die Funktionalität und Induzierbarkeit der Trans-Konstrukte aus Abbildung 16 wurde parallel in 293 Tet-On Zellen, die stabil rtTA unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimieren, untersucht. Als Referenz diente die Transfektion mit der gleichen Menge pCMVluc. In diesem und den folgenden Versuchen, wurden die Werte auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten CMV-Promotors bezogen. Um mögliche Einflüsse des Doxycyclins auf die Expression von pCMVluc zu eliminieren, wurden die Transfektionen mit pCMVluc ebenfalls jeweils mit und ohne Doxycyclin durchgeführt und die Werte entsprechend auf die induzierte und nicht induzierte Kontrolle normiert.

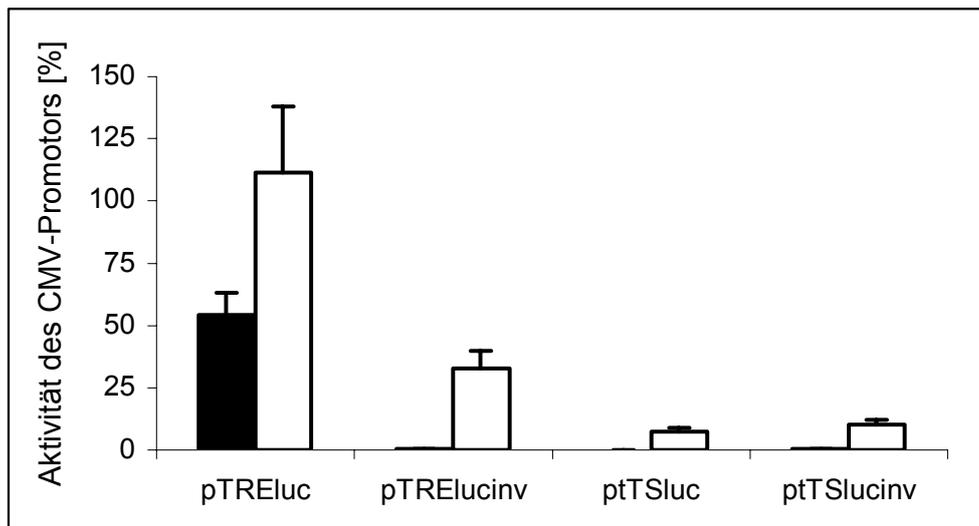


Abbildung 18: Expression der Trans-Konstrukte in 293 Tet-On Zellen nach CaPO_4 Transfektion von jeweils 2,5 μg Plasmid-DNA. Die Induktion erfolgte mit 1 μg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die Transfektionen wurden nach 24 h geerntet. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Bei allen untersuchten Konstrukten konnte Induktion nach Zugabe von Doxycyclin beobachtet werden (Abb. 18). Die Expression der Trans-Konstrukte pTRElucinv und ptTSluc ließ sich in in 293-Zellen Anwesenheit des rtTA durch Doxycyclin um den Faktor 84 von 0,39% der CMV-Referenz auf 32,59% bzw. um den Faktor 56 von 0,13% der CMV-Referenz auf 7,45% induzieren. pTREluc wies eine Basisexpression von 54,25% der CMV-Referenz auf. Nach Induktion wurden 111,24% erreicht, was einem Induktionsfaktor von zwei entspricht. Die Expressionsrate von ptTSlucinv lag bei 0,44% der CMV-Referenz und wurde nach Zugabe von Doxycyclin um den Faktor 23 auf 10,16% gesteigert. Auf Grundlage der guten Induzierbarkeit und der geringen Basisexpression wurden pTRElucinv und ptTSluc für eine weitergehende Charakterisierung bezüglich ihrer Induzierbarkeit und ihrer Hintergrundaktivität ausgewählt.

Soweit nicht anders beschrieben, wurden dazu in den folgenden Experimenten die transfizierten Zellen zwei Tage nach Transfektion geerntet, lysiert und der Luciferase- sowie der Gesamtproteingehalt des Lysats bestimmt. Bei den Transfektionen wurden im Rahmen der angegebenen maximalen DNA-Konzentration des jeweiligen Transfektionsreagenz äquimolare Mengen des Effektor- und des Transaktivatorplasmids eingesetzt. Die Experimente wurden zeitgleich und parallel durchgeführt.

Das Effektorplasmid ptTSluc, das konstitutiv den transkriptionellen Tet-Silencer exprimiert, wurde zusammen mit den Plasmiden pCMVrtTA bzw. pPSArtTA (vgl.: Abb. 16), die den reversen Tet-Transaktivator unter der Kontrolle des CMV-Promotors bzw. des PSA P/E Konstrukts tragen, in LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde, anstelle eines transaktivatorkodierenden Vektors, das Plasmid pcDNA3.1(+) transfiziert. Als Referenz wurden die entsprechenden Zelllinien mit pCMVluc transfiziert.

In LNCaP-Zellen zeigte sich die geringste Basalaktivität von ptTSluc (Abb. 19), wobei das Ansteigen der Expression von Luciferase in den drei untersuchten Zelllinien in der Kontrolle ohne Transaktivatorplasmid (pcDNA3.1(+)/ptTSluc) im induziertem Zustand auf das Abdissoziieren des Transaktivators vom Tet-Responsive Element hinweist (Abb. 19). Zusätzlich zu einer im Vergleich zu den Referenzzelllinien, sehr viel geringeren Basalexpression, sind nach Induktion sehr hohe Expressionslevel sowohl in Anwesenheit des gewebespezifisch als auch des konstitutiv exprimierenden Transaktivatorplasmids nachweisbar. So konnte mit der Plasmidkombination pCMVrtTA/ptTSluc die siebenfache Expressionsstärke der CMV-Referenz erreicht werden. Die Expression des gewebespezifischen Trans-Systems pPSArtTA/ptTSluc nach Induktion war sechsmal stärker als die der CMV-Referenz (Abb. 19).

In HeLa-Zellen ist in der Kontrolle ohne Transaktivator eine im induzierten Zustand schwache unspezifische Expression vom Effektorkonstrukt beobachtbar (Abb. 19). Sie bleibt jedoch unter der des konstitutiven Trans-Systems (pCMVrtTA/ptTSluc), das im induzierten Zustand 9,8% der Aktivität des CMV-Promotors erreicht. Im Ansatz mit der gewebespezifischen Plasmidkombination (pPSArtTA/ptTSluc) wurde eine unspezifische Induktion festgestellt, die 3,6% der CMV-Kontrolle beträgt. Die Basisexpression von DU-145-Zellen (Abb. 19), die mit der gewebespezifisch exprimierenden Kombination pPSArtTA/ptTSluc transfiziert wurden, stieg von 0,6% der Aktivität der CMV-Referenz nach Induktion auf 3,1%. In Anwesenheit des konstitutiv exprimierten Transaktivators wurde eine Expression von 7,7% der Referenz erreicht, die Induktion des gewebespezifischen Trans-Systems lag im Bereich der Kontrolltransfektion ohne Transaktivator (pcDNA3.1(+)/ptTSluc).

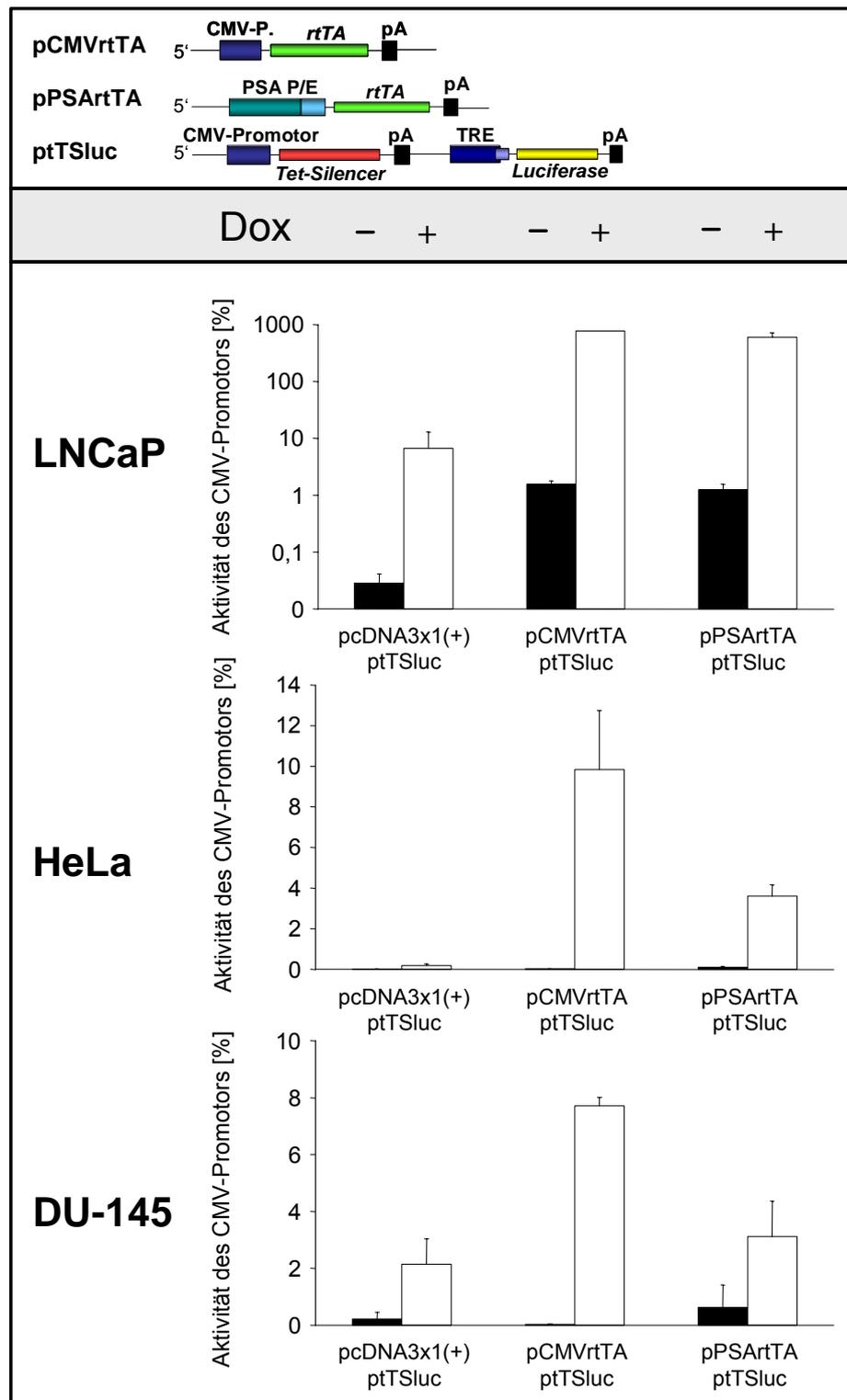


Abbildung 19: Kotransfektion von *ptTSluc* und *pcDNA3.1(+)*, *pCMVrtTA* bzw. *pPSArtTA* in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden in einer 6-well Platte mit den entsprechenden Plasmidkombinationen transfiziert (LNCaP: 2,5 µg Plasmid-DNA / DOTAP; HeLa und DU-145: 2 µg Plasmid-DNA / Lipofectamine). Die Induktion erfolgte unmittelbar nach der Transfektion mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Transfektionen wurden nach 48 h geerntet. Die schwarzen Balken zeigen die nicht induzierten Ansätze, die weißen Balken die induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten *pCMVluc*, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

In allen drei untersuchten Zelllinien ist die Aktivität von ptTSluc durch Doxycyclin induzierbar (Abb. 19). Das Abdissoziieren des transkriptionellen Tet-Silencers führt bereits ohne rtTA zu einer schwachen Induktion. Die Kotransfektion mit pCMVrtTA verursacht in allen drei Zelllinien eine substanzielle Induktion. Durch Kotransfektion mit pPSArtTA findet bei LNCaP-Zellen eine vergleichsweise stärkere Induktion als bei HeLa- und DU-145-Zellen statt, was auf eine gewebespezifische Aktivität schließen lässt.

Analog zu den beschriebenen Experimenten mit ptTSluc wurden Untersuchungen mit dem Effektorplasmid pTRELucinv durchgeführt, in dem die Tet-Expressionskassette invertiert vorliegt (Abb. 16D). In LNCaP-Zellen ist die Expression von pTRELucinv sowohl in Anwesenheit des konstitutiv als auch des gewebespezifisch exprimierten Transaktivators induzierbar (Abb. 20). Im nicht induzierten Zustand liegt die Expressionstärke aller drei Vektorkombinationen unter einem Prozent der CMV-Referenz. Mit dem konstitutiven Trans-System (pCMVrtTA/ptTSluc) wurde eine Expression von 8,8% der CMV-Referenz erreicht, mit dem gewebespezifischen Trans-System (pPSArtTA/ptTRELucinv) lag die Expressionsstärke 1,7-fach über der CMV-Kontrolle.

In HeLa-Zellen lagen die Expressionslevel im nicht induzierten Zustand unter einem Prozent der CMV-Kontrollexpression (Abb. 20). Im konstitutiven Trans-System war nach Induktion eine Expression von 2,2% der CMV-Kontrolle beobachtbar. Eine schwächere Induktion wurde im Ansatz mit dem gewebespezifischen Trans-System (pPSArtTA/pTRELucinv) nachgewiesen, die ebenfalls unter einem Prozent (0,8%) der CMV-Referenz lag.

In DU-145-Zellen fand im konstitutiven Trans-System eine Induktion auf 1,7% der CMV-Referenz statt. In der Kontrolltransfektion (pcDNA3.1(+)/pTRELucinv) und im gewebespezifischen Trans-System (pPSArtTA/pTRELucinv) lag die festgestellte Luciferaseexpression in Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin unter 0,2% der CMV-Referenz. Eine nennenswerte basale Aktivität des Effektorplasmids in der Kontrolle im induzierten Zustand war hier nicht erkennbar (Abb. 20).

Insgesamt zeigte sich in LNCaP-Zellen nach Kotransfektion von pCMVrtTA mit ptTSluc bzw. pTRELucinv eine starke Induktion, in HeLa- und DU-145-Zellen war dagegen nur eine vergleichsweise schwache Induktion erkennbar.

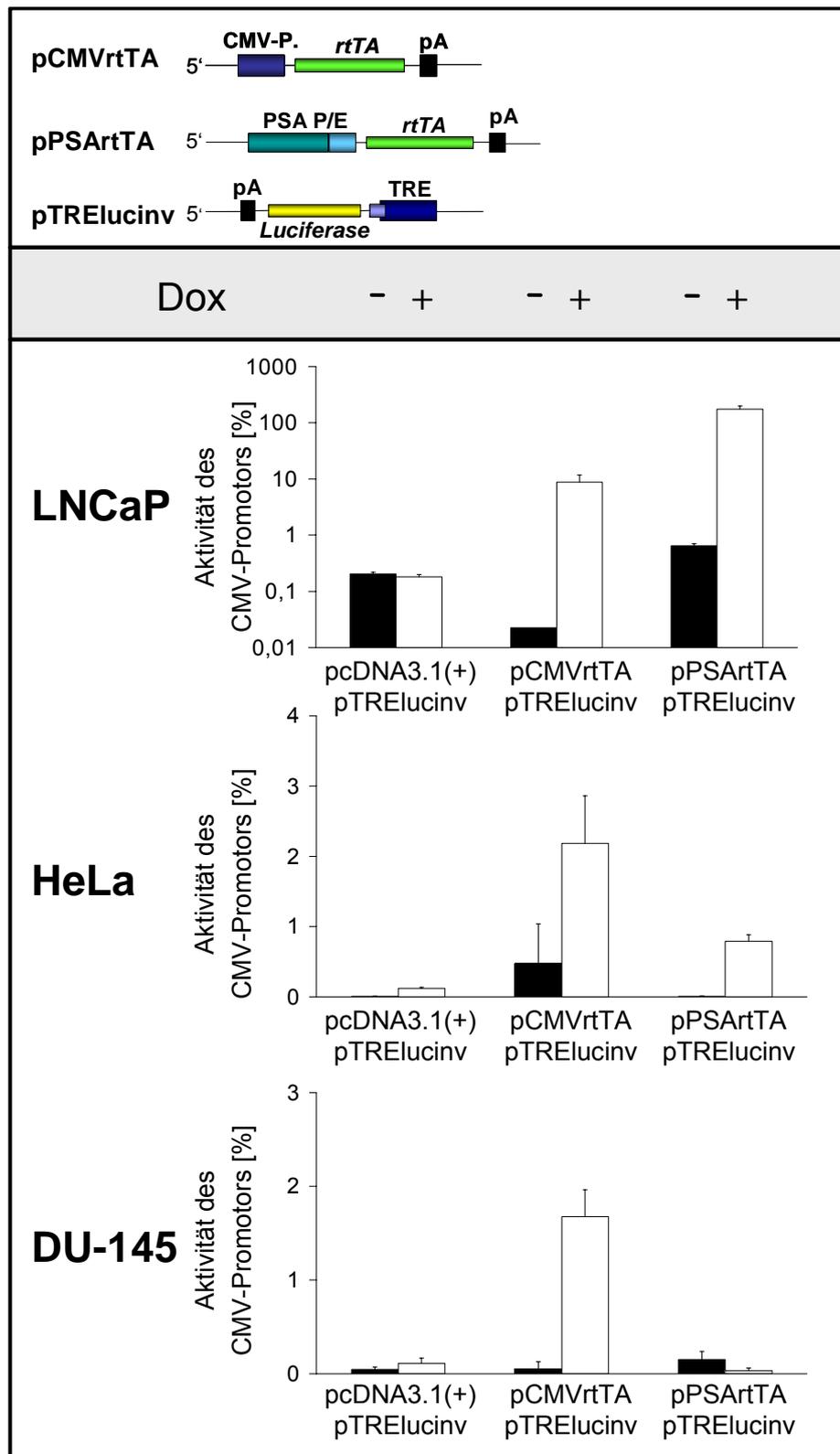


Abbildung 20: Kotransfektion von pTRELucinv und pcDNA3.1(+), pCMVrtTA bzw. pPSArtTA in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden in einer 6-well Platte mit den entsprechenden Plasmidkombinationen transfiziert (LNCaP: 2,5 µg Plasmid-DNA / DOTAP; HeLa und DU-145: 2 µg Plasmid-DNA / Lipofectamine). Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Transfektionen wurden nach 48 h geerntet. Die schwarzen Balken zeigen die nicht induzierten Ansätze, die weissen Balken die induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Zur Ermittlung des Zeitpunkts der maximalen Expression der Cis-Konstrukte wurde zunächst eine Kinetik mit dem gewebespezifischen Konstrukt pPSArtTALucinv und dem konstitutiven Konstrukt pCMVrtTALuc durchgeführt. Da der Fokus auf der gewebespezifischen Expression und damit auf dem, im Vergleich mit dem CMV-Promotor, weitaus schwächeren PSA P/E Konstrukt liegt, wurden LNCaP-Zellen hier als Modellsystem untersucht.

LNCaP-Zellen wurden mit pPSArtTALucinv und pCMVrtTALuc transfiziert. Als Referenz wurden die Zellen mit pCMVluc transfiziert. Unmittelbar nach der Transfektion wurde doxycyclinhaltiges und doxycyclinfreies Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 12, 18, 24 und 48 Stunden nach Transfektion analysiert.

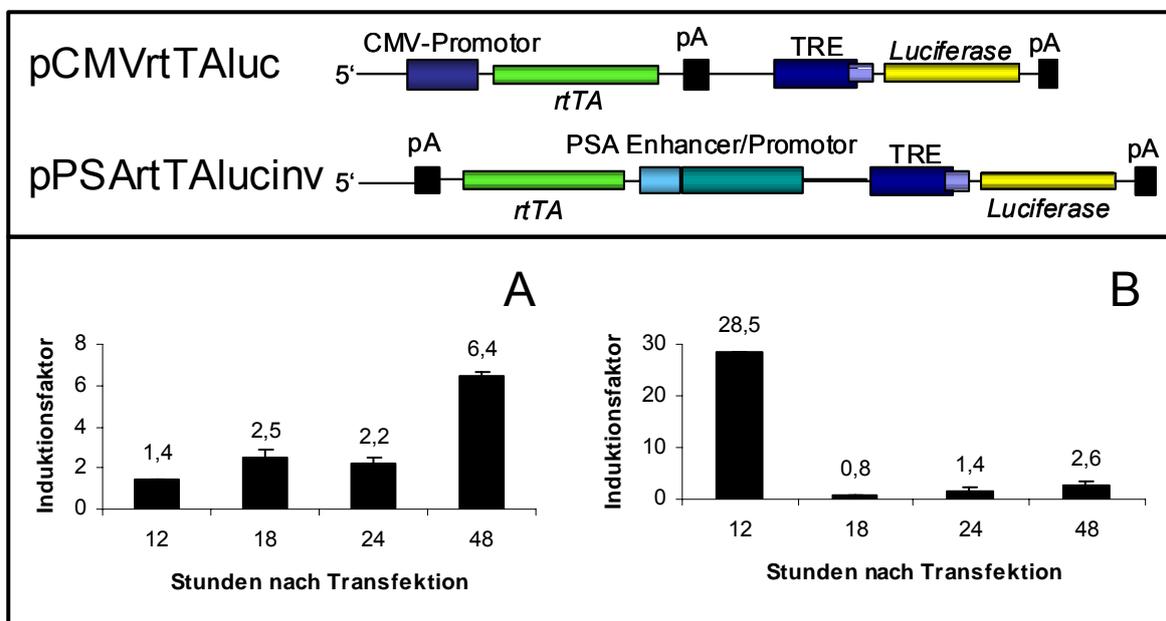


Abbildung 21: Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Induktion des gewebespezifischen Cis-Konstrukts pPSArtTALuc (A) und des konstitutiven Cis-Konstrukts pCMVrtTA (B) in LNCaP. Die Zellen wurden in einer 6-well Platte mit pPSArtTALuc bzw. pCMVrtTALuc (vgl.: Abb. 15) transfiziert (2,5 µg Plasmid-DNA; DOTAP) und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Einzelexperimente wurden parallel im Dreifachansatz durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert daraus dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Das gewebespezifische Cis-Konstrukt zeigt im Rahmen dieser Kinetik nach 48 Stunden eine nennenswerte Induktion mit dem Induktionsfaktor 6,4 (Abb. 21A). Der zeitliche Verlauf der Expression durch das konstitutive Cis-Konstrukt zeigt zwölf Stunden nach Transfektion eine frühe Spitze mit einem Induktionsfaktor von 28,5 im Vergleich mit der nicht induzierten Probe (Abb. 21B). Im weiteren Verlauf fällt die Induktion jedoch stark ab. Diese Expressionskinetiken stimmen weitestgehend mit den in Abbildung 13 ermittelten Kinetiken für die direkte Luciferaseexpression durch den CMV-

Promotor bzw. das PSA P/E Konstrukt überein. In den folgenden Experimenten zur gewebespezifischen Expression wurde, basierend auf diesen Daten, für die Endanalyse generell eine Inkubationszeit von 48 Stunden nach Transfektion festgelegt.

Zur Charakterisierung ihrer Hintergrundexpression und Induzierbarkeit wurden die beiden bicistronischen Plasmidvektoren pCMVrtTALuc und pPSArtTALuc in LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen transfiziert. Als Referenz wurden die entsprechenden Zelllinien mit pCMVluc transfiziert. Unmittelbar nach der Transfektion wurde doxycyclinhaltiges bzw. doxycyclinfreies Medium zu den Zellen gegeben.

In den mit dem gewebespezifischen Cis-Konstrukt pPSArtTALuc_{inv} transfizierten Kontrollzelllinien HeLa und DU-145 sind schwache Induktionen nach Doxycyclingabe beobachtbar (DU-145: Induktionsfaktor 1,7; HeLa: Induktionsfaktor 8,1), die jedoch nicht mit dem Induktionsfaktor 729,5 in der Zielzelllinie LNCaP vergleichbar sind (Abb. 22). Darüber hinaus liegen die Expressionslevel, die in HeLa- und DU-145-Zellen gemessen wurden, jeweils unter einem Prozent der Expression der pCMVluc transfizierten Referenz.

In LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen kann nach Transfektion mit dem konstitutiven Cis-Konstrukt pCMVrtTALuc eine geringfügige Induktion gezeigt werden, allerdings bleiben die Expressionslevel im Vergleich zu den Trans-Konstrukten sehr niedrig (Abb. 22). Wie aus den Abbildungen 19 und 20 hervorgeht, zeigen die Trans-Konstrukte im Vergleich eine höhere Expression und eine bessere Regulation der Genexpression. Dazu besteht im viralen System, im Vergleich zur Transfektion, eine bessere Möglichkeit, die Expression durch Infektion der Zellen mit unterschiedlichen Ratios von Transaktivatorvirus und Effektorvirus zu optimieren. Das konstitutive Cis-Konstrukt wurde daher im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht mehr berücksichtigt. Das gewebespezifische Cis-Konstrukt qualifizierte sich aufgrund seiner gewebespezifischen Induzierbarkeit und Expressionsstärke als Kandidat für weitere Untersuchungen.

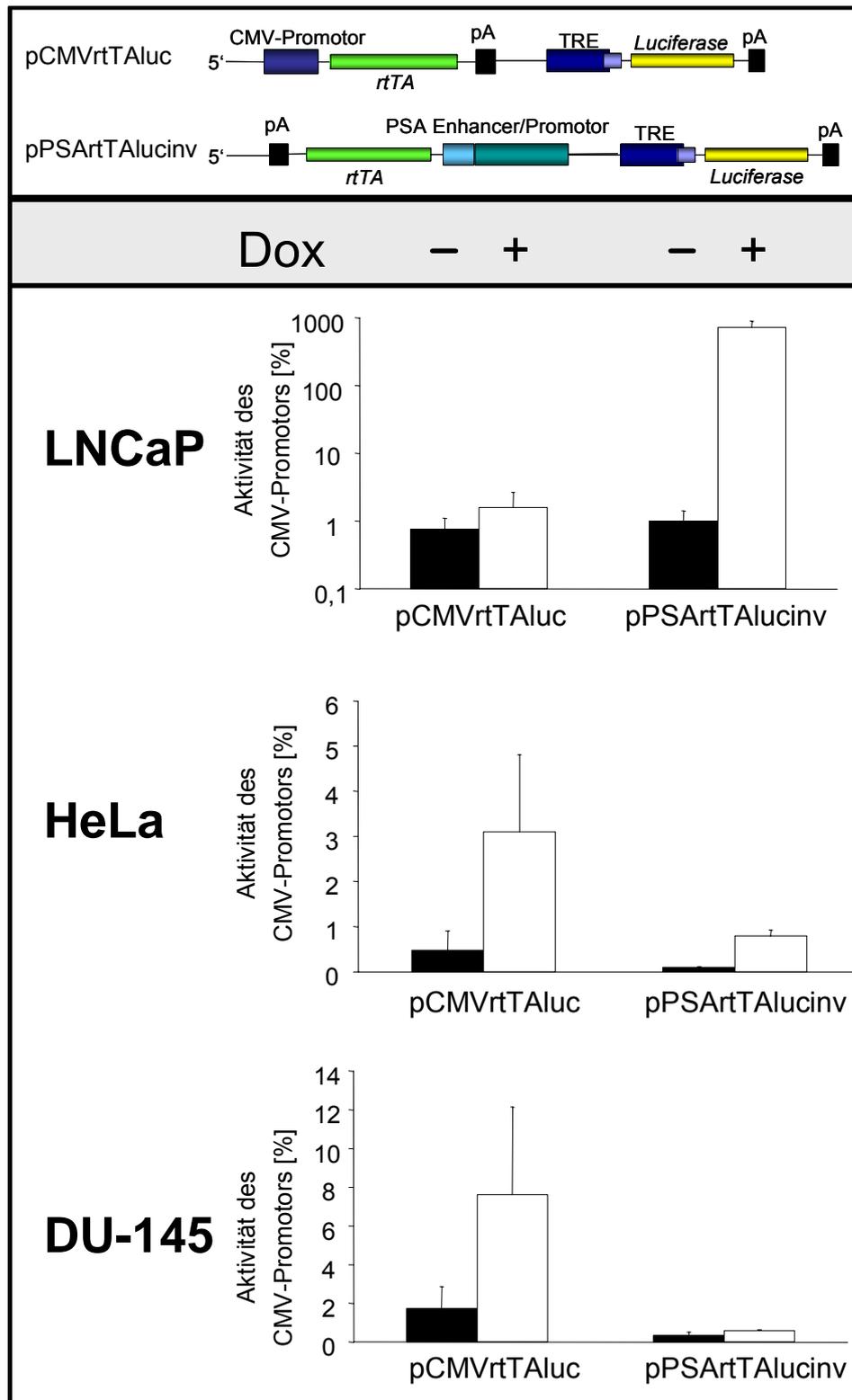


Abbildung 22: Transfektion von pCMVrtTALuc und pPSArtTALucinv in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden in einer 6-well Platte mit den angegebenen Plasmiden transfiziert (LNCaP: 2,5 µg Plasmid-DNA; DOTAP; HeLa und DU-145: 2 µg Plasmid-DNA; Lipofectamine). Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Transfektionen wurden nach 48 h geerntet. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

3.3.3 Übertragung der Transfektionsdaten auf Adenovirusebene

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Transfektionsversuchen dienen als Anhaltspunkte im Expressionsverhalten der einzelnen Konstrukte, können aber nur eingeschränkt auf die virale Ebene übertragen werden. Zur näheren Aufklärung wurden deshalb aus den entsprechenden Shuttleplasmiden die adenoviralen Transaktivatorvektoren AdPSArtTA und AdCMVrtTA sowie die entsprechenden Effektorvektoren AdTRELucinv, AdTRELuc und AdtTSluc generiert und getestet. Die Vektoren entsprachen exakt den Konstrukten, die bereits auf Plasmidebene getestet worden waren (Abb. 15). Die Daten aus den folgenden Experimenten wurden nach Infektion mit doppelt cäsiumchloridgereinigten Vektoren erhalten. Die Notwendigkeit zur Aufreinigung ergab sich aus der Sensitivität von LNCaP-Zellen gegenüber Zelldebris, der in ungereinigten Adenovirus-Suspensionen enthalten ist.

Von allen untersuchten Trans-Konstrukten zeigte ptTSluc im Transfektionsversuch die stärkste Expression. Allerdings war in allen drei Zelllinien auch in Abwesenheit des Transaktivators bereits Induktion durch Doxycyclinzugabe zu beobachten (Abb. 19). Da diese intrinsische Hintergrundexpression Induktionen durch viruskodierte Transaktivatoren überlagern könnte, wurde zusätzlich zu AdtTSluc, das sich direkt aus dem Shuttleplasmid ptTSluc ableitet, auch der adenovirale Vektor AdTRELucinv, der aus dem Shuttleplasmid pTRELucinv hervorgegangen war, hergestellt. Damit ließen sich auch geringe Induktionen durch gewebespezifisch exprimierte Transaktivatoren nachweisen. Daneben wurde der Vektor AdTRELuc aus pTRELuc generiert, dessen Produktion vor der Generierung von AdTRELucinv und AdtTSluc gelang. Dieser Vektor wurde in Experimenten zur Charakterisierung der gewebespezifischen Expression eingesetzt.

In Anbetracht der beschriebenen hohen Zytotoxizität der bsRNase war es für die Herstellung eines adenoviralen Vektors, der bsRNase als therapeutisches Gen trägt, notwendig, ein Konstrukt mit möglichst geringer Hintergrundexpression während der viralen Replikation in der Verpackungszelllinie 293 zu wählen. Zu diesem Zweck wurden 293-Zellen mit AdtTSluc, AdTRELucinv, AdTRELuc als schwach regulierte Kontrolle und AdCMVluc mit MOI 10 infiziert. Keiner der Ansätze enthielt einen Vektor, der für rtTA kodiert. Die Luciferaseexpression sollte nach 6, 12, 24 und 36 Stun-

den gemessen werden. Um den Einfluss des transkriptionellen Tet-Silencers zu untersuchen, wurden die mit den unterschiedlichen adenoviralen Vektoren infizierten Zellen in einem Parallelansatz mit Doxycyclin inkubiert.

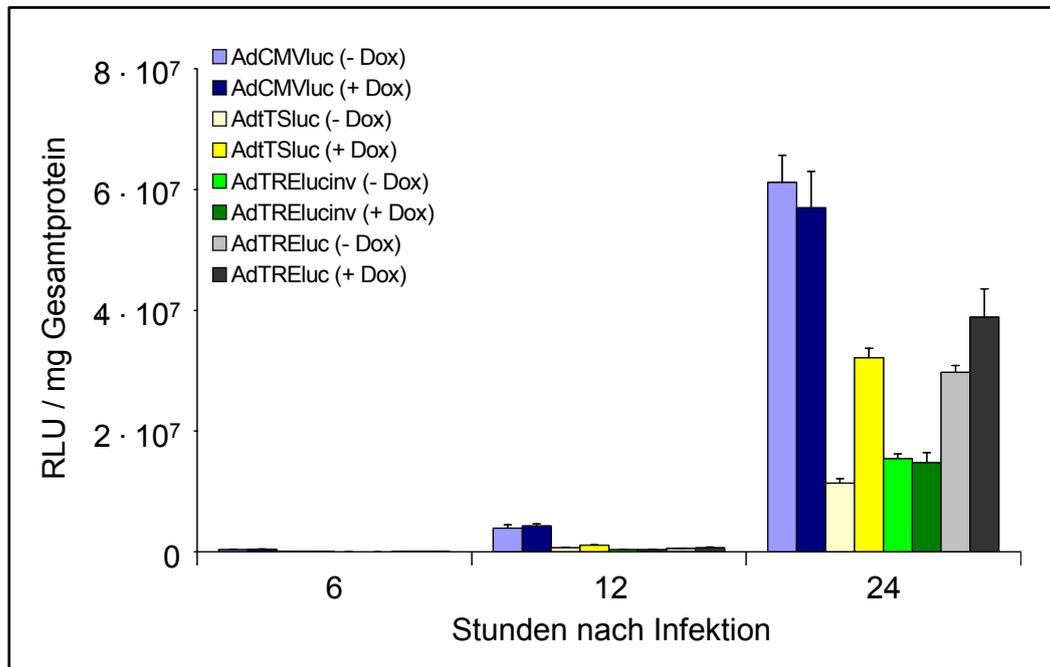


Abbildung 23: Luciferase Expression der beschriebenen adenoviralen Konstrukte während der viralen Replikationsphase in der Verpackungszelllinie 293. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit den angegebenen adenoviralen Vektoren mit MOI 10 infiziert. Die Induktion erfolgte mit $1 \mu\text{g}$ Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die einzelnen Ansätze wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Parallelansätzen zum jeweiligen Erntezeitpunkt dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

Da die meisten Zellen nach 24 Stunden bereits sehr stark abgerundet waren, wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt abgebrochen, da eine vorzeitige Lyse zu nicht verwertbaren Ergebnissen geführt hätte. Die mit AdCMVluc und AdTRELuc infizierten Zellen zeigten die aus den Transfektionsversuchen bekannte, hohe Expression, während AdtTSluc in Abwesenheit von Doxycyclin im Vergleich zu AdTRELucinv die geringere Expression aufwies (Abb. 23). In Anwesenheit von Doxycyclin dagegen stieg die Expression um das dreifache an, während die Transkription von AdTRELucinv durch Doxycyclingabe nicht beeinflussbar war (Abb. 23).

Aufgrund der nur geringfügig stärkeren Hintergrundexpression von AdTRElucinv im Vergleich zu AdtTSluc wurden beide Konstrukte ausgewählt, um adenovirale Vektoren zu generieren, die anstelle von Luciferase bsRNase als therapeutisches Gen tragen sollten. CD und YB-1 entfalten gegenüber der Verpackungszelllinie keine toxische Wirkung. Daher wurde für Experimente im Trans-System mit diesen Transgenen das Konstrukt AdTRExinv als Effektorvektor gewählt, da keine intrinsischen Induktionseffekte, die bei AdtTSx zu erwarten wären, zum Tragen kommen und so eine eindeutige Bestimmung der gewebespezifischen Aktivierung zulassen.

In den vorangegangenen Transfektionsexperimenten konnte die Genexpression mit äquimolar eingesetzten Mengen des Transaktivatorplasmids und des Effektorplasmids durch Zugabe von Doxycyclin induziert werden. Auf adenoviraler Ebene wurde laut Literatur bis auf wenige Ausnahmen (Mizuguchi und Hayakawa 2001; Xu et al. 2003) im Trans-System ebenso fast ausschließlich mit einem Verhältnis von 1:1 des Transaktivatorvirus zum Effektorvirus gearbeitet. Allerdings implizierte die sehr viel schwächere Expression des Transaktivators durch das PSA P/E Konstrukt im Vergleich zum CMV-Promotor und die unterschiedlich regulierte Expressionsaktivität der Effektorviren die Möglichkeit einer Optimierung des Trans-Systems in Bezug auf maximale Expression.

Dazu wurde die Expressionsaktivität der Trans-Kombinationen AdCMVrtTA mit dem Silencing-Konstrukt AdtTSluc bzw. dem Vektor mit invertierter Expressionskassette AdTRElucinv und des gewebespezifisch exprimierenden AdPSArtTA mit AdtTSluc bzw. AdTRElucinv bei unterschiedlichen Verhältnissen von Transaktivator- zu Effektorviren untersucht. Die Zellen wurden dazu im Reaktionsgefäß mit einer totalen MOI 10 infiziert, die der Gesamtzahl der Effektor- und Transaktivatorviren entspricht. Da von AdCMVrtTA eine höhere Expression des Transaktivators als von AdPSArtTA erwartet wurde, wurden Verhältnisse des Transaktivatorvirus zum Effektorvirus von 1:20, 1:10, 1:4, 1:1, 4:1 gewählt. Für die Kombinationen AdPSArtTA und AdtTSluc/AdTRElucinv wurden die Verhältnisse Transaktivatorvirus : Effektorvirus von 1:10, 1:4, 1:1, 4:1, 10:1 untersucht.

Die Expressionsanalyse für die einzelnen Zelllinien und Viruskombinationen wurde zeitlich nicht parallel durchgeführt, sodass aufgrund von Varianzen bei der Luciferasebestimmung die Ergebnisse nur isoliert innerhalb des entsprechenden Ex-

periments (Zelllinie, Vektorkombination und Verhältnis Transaktivatorvektor : Effektorvektor) betrachtet werden können. Vergleiche der Expressionsstärken der unterschiedlichen Zelllinien aufgrund der RLU/mg Gesamtprotein sind so nicht möglich. Eine vergleichende Bewertung der Expressionsstärken mit Referenz auf die Expressionsstärke des CMV-Promotors und Angaben zur Hintergrundexpression werden in den Abbildungen 28-31 gezeigt.

Zunächst wurde die Möglichkeit der Optimierung des Verhältnisses für die Kombination AdCMVrtTA und AdTRELucinv in LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen untersucht. Aus Abbildung 24 geht hervor, dass die durchschnittlich stärksten Expressionslevel in allen drei Zelllinien mit einem Verhältnis von 1:20 des Transaktivatorvirus zum Effektorvirus erreicht wurden.

In LNCaP-Zellen wurde die stärkste Luciferaseexpression beim Verhältnis 1:20 mit $6,7 \times 10^8$ RLU/mg Gesamtprotein ermittelt. In DU-145-Zellen lag die Expression beim Verhältnis 1:20 bei $1,6 \times 10^8$ RLU/mg Gesamtprotein. In HeLa-Zellen wurde mit diesem Verhältnis mit $4,9 \times 10^7$ RLU/mg Gesamtprotein im Vergleich die geringste Expression festgestellt. Der steigende Anteil des Transaktivatorvirus an der Gesamtvirusmenge führte in LNCaP- und DU-145-Zellen zu einer kontinuierlichen, aber langsamen Abnahme der Luciferaseexpression. Dagegen war in HeLa-Zellen bereits beim Verhältnis 1:10 eine Abnahme der Expression um mehr als die Hälfte im Vergleich zum Verhältnis 1:20 zu verzeichnen.

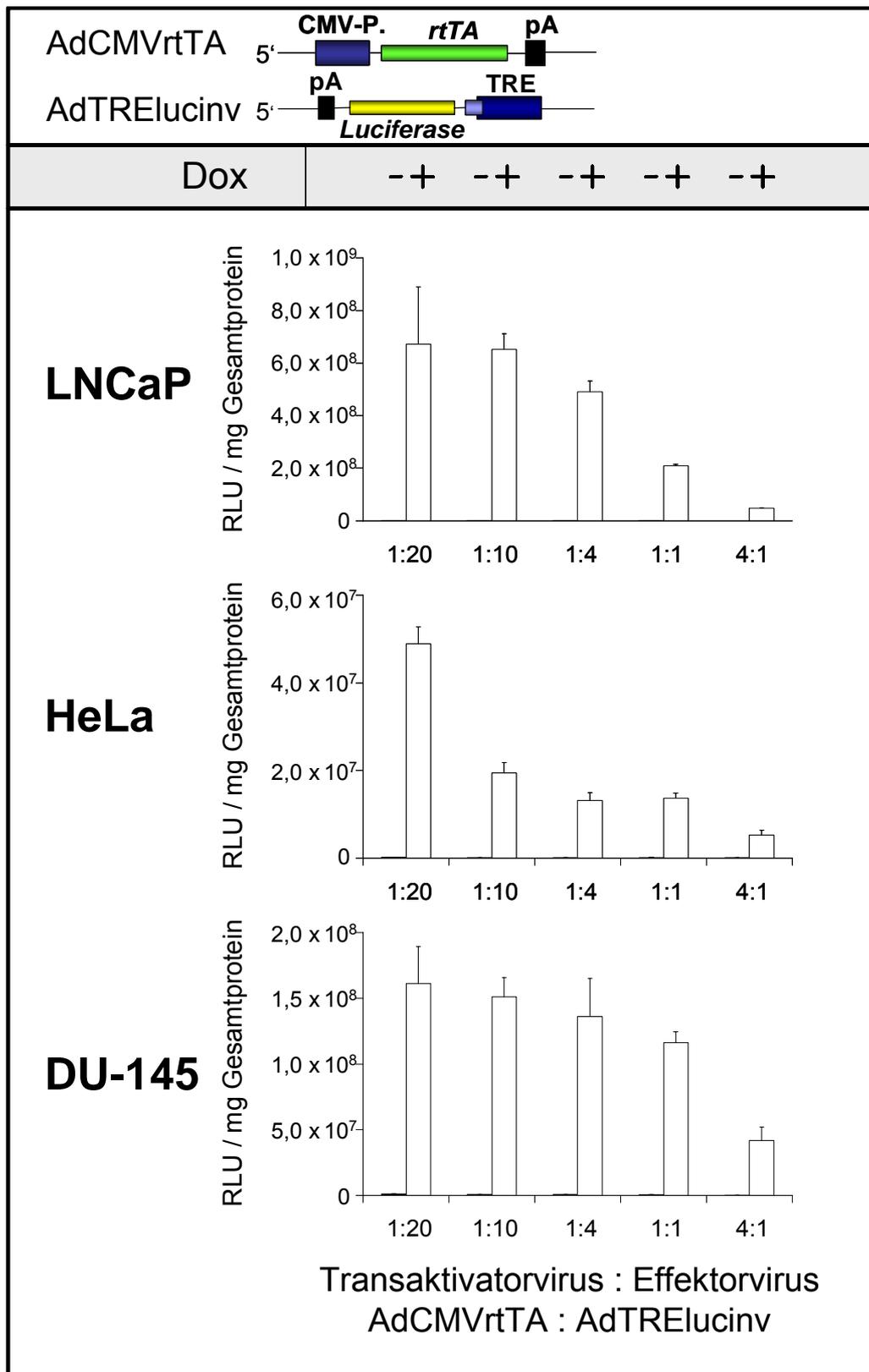


Abbildung 24: Luciferaseexpression nach Koinfektion mit unterschiedlichen Verhältnissen von AdCMVrtTA und AdTRELucinv in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit den angegebenen adenoviralen Vektoren mit der Gesamt-MOI 10 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Ansätze wurden nach 48 h geerntet. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Parallelansätzen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Schwarze Balken (hier aufgrund der geringen Luciferaseexpression kaum sichtbar) kennzeichnen die Ergebnisse aus den nicht induzierten Ansätzen, die weißen Balken geben die Werte aus den induzierten Ansätzen wieder.

Analog dazu wurde die Optimierung des Verhältnisses des Transaktivatorvektors AdCMVrtTA zum Effektorvektor AdtTSluc durchgeführt. Nach Koinfektion der Zelllinien LNCaP, HeLa und DU-145 mit den Ratios 1:20, 1:10, 1:4, 1:1 und 4:1 der Vektoren AdCMVrtTA und AdtTSluc war in LNCaP- und in HeLa-Zellen eine starke Luciferaseexpression bereits bei einem Verhältnis von 1:20 beobachtbar. Mit dem Verhältnis 1:10 konnte sie in diesen Zelllinien geringfügig auf $7,2 \times 10^8$ RLU/mg Gesamtprotein (LNCaP) bzw. auf $1,9 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein (HeLa) gesteigert werden (Abbildung 25). In LNCaP-Zellen nahm die Expression mit steigendem Anteil des Transaktivatorvirus kontinuierlich ab, in HeLa-Zellen ging die Expression bei den Ratios 1:4 und 4:1 mit steigendem Transaktivatoranteil zurück. Bei der Ratio von 1:1 war die höchste Expressionsrate erreicht, die mit $2,4 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein 16,1% über dem Niveau der Ratio 1:10 lag (Abbildung 25). In DU-145-Zellen stieg die Luciferaseexpression kontinuierlich von der Ratio 1:20 bis zur Ratio 1:1 um 64,6% auf das Maximum von $7,2 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein an. Mit Steigerung des Transaktivatorvirusanteils auf eine Ratio von 1:4 ging die Luciferaseexpression um mehr als die Hälfte zurück (Abb. 25).

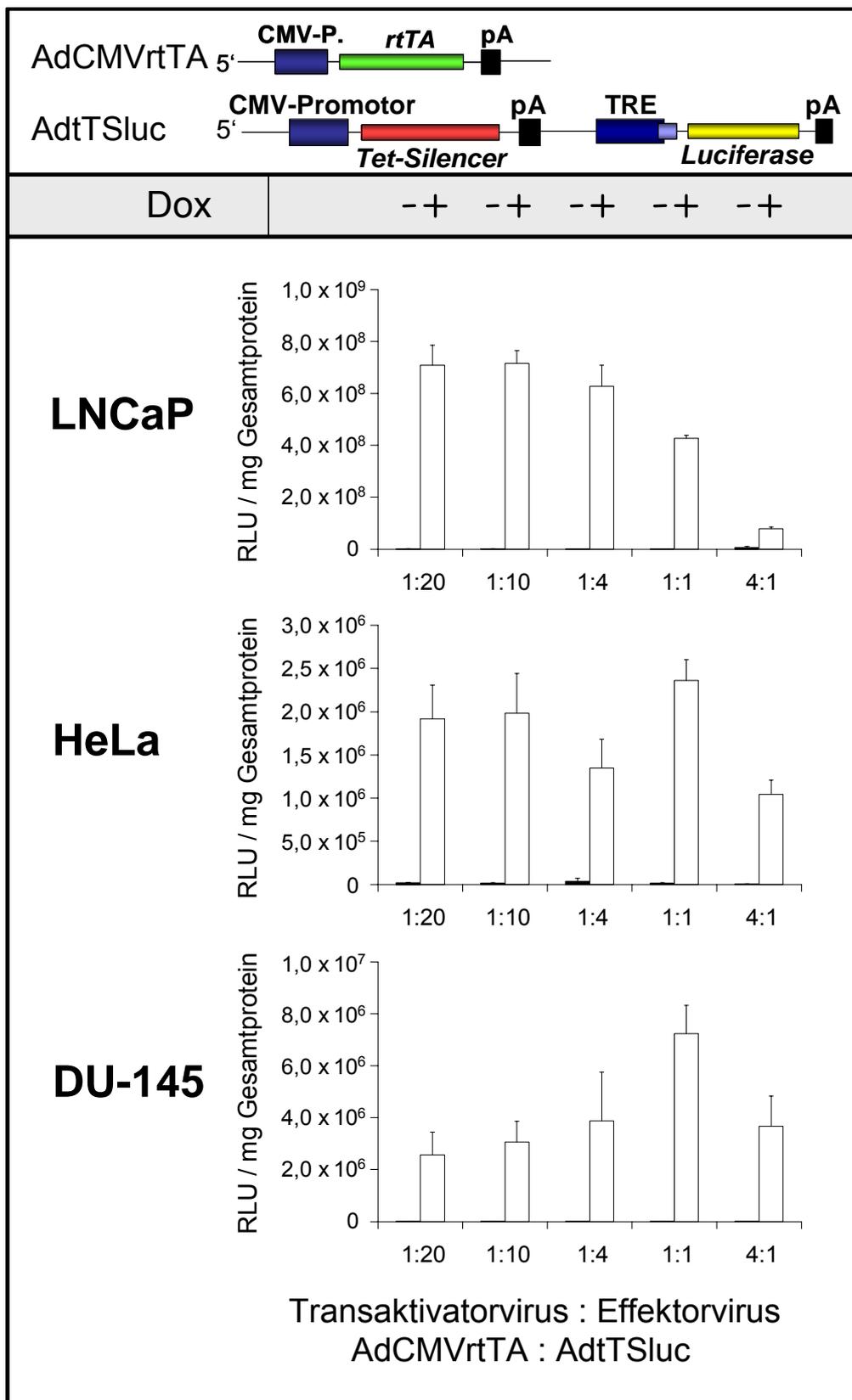


Abbildung 25: Luciferaseexpression nach Koinfektion mit unterschiedlichen Verhältnissen von AdCMVrtTA und AdtTSluc in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit den angegebenen adenoviralen Vektoren mit MOI 10 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Ansätze wurden nach 48 h geerntet. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Parallelansätzen dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Schwarze Balken (hier aufgrund der geringen Luciferaseexpression kaum sichtbar) kennzeichnen die Ergebnisse aus den nicht induzierten Ansätzen, die weißen Balken geben die Werte aus den induzierten Ansätzen wieder.

Die Untersuchungen mit dem gewebespezifischen Trans-System wurden im Hinblick auf die maximale gewebespezifische Expression in der Zielzelllinie LNCaP durchgeführt. Das Expressionsmuster der gewebespezifischen Trans-Vektorkombinationen in HeLa- und DU-145-Zellen wird in den Abbildungen 28 und 30 näher beschrieben.

Die stärkste Luciferaseexpression mit $8,5 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein in der Zielzelllinie LNCaP wurde nach Induktion mit einem Verhältnis von 1:4 des gewebespezifischen Transaktivatorvirus AdPSArtTA zum Effektorvirus AdtTSluc erreicht (Abb. 26A). Mit einem Verhältnis 1:10 war die Expression um mehr als die Hälfte geringer. Die Erhöhung des Anteils an Transaktivatorvirus resultierte bei den Ratios 1:1, 4:1 und 10:1 in einer kontinuierlichen Abnahme der Luciferaseexpression.

Ähnlich der Kombination AdPSArtTA/AdtTSluc steigt die Luciferaseexpression in LNCaP-Zellen nach Induktion für die Kombination AdPSArtTA/AdTRElucinv vom Verhältnis 1:10 zum Verhältnis 1:4 um mehr als das Doppelte von $1,4 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein auf $3,5 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein an. Mit steigendem Anteil des Transaktivatorvirus nimmt die Expression kontinuierlich ab und erreicht im Ansatz mit der Ratio 10:1 eine Luciferaseaktivität von $1,0 \times 10^6$ RLU/mg Gesamtprotein (Abb. 26B).

Aufgrund der konstrukt- und zelllinienspezifischen Variationen in der Expression konnte kein optimales, allgemein gültiges Verhältnis von Transaktivator- zu Effektorvirus bestimmt werden. Zur einheitlichen Gestaltung der folgenden Experimente wurde für das konstitutive Trans-System mit den Kombinationen AdCMVrtTA und AdtTSluc bzw. AdTRElucinv eine Konsensusratio des Transaktivatorvirus : Effektorvirus mit 1:10 festgelegt. Für das gewebespezifische Trans-System AdPSArtTA und AdtTSluc bzw. AdTRElucinv ergab ein Verhältnis von 1:4 in LNCaP-Zellen die stärkste Expression. Auf dieser Grundlage wurde für weitere Experimente mit der Kombinationen AdPSArtTA und AdTRExinv bzw. AdtTSx die Ratio 1:4 festgelegt.

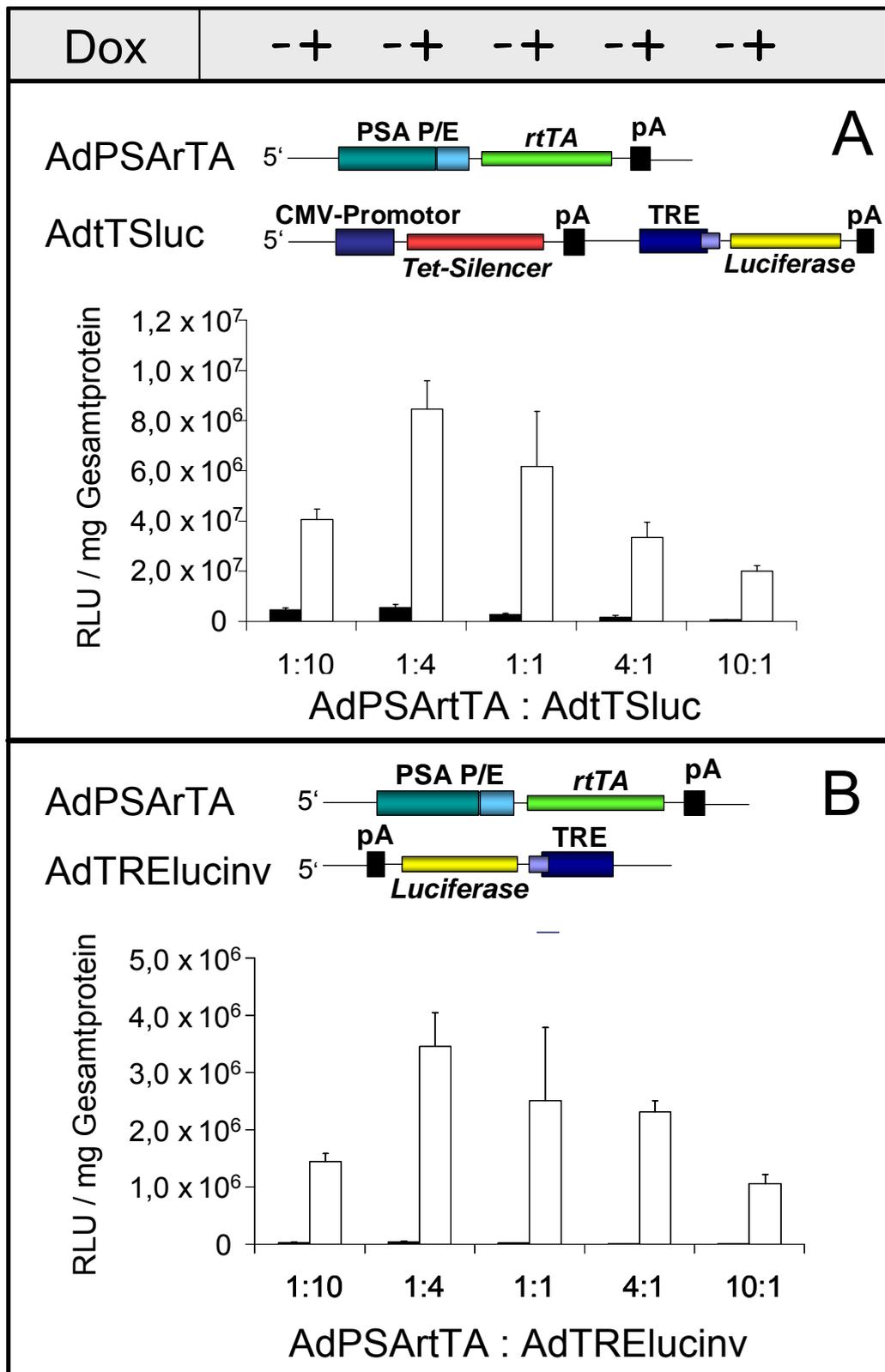


Abbildung 26: Luciferaseexpression nach Koinfektion mit unterschiedlichen Ratios von AdPSArTfA und AdtTSluc (A) bzw AdtTRELucinv (B) in LNCaP. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit den angegebenen adenoviralen Vektoren mit MOI 10 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Ansätze wurden nach 48 h geerntet. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Parallelansätzen zum jeweiligen Erntezeitpunkt dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Schwarze Balken (hier aufgrund der geringen Luciferaseexpression kaum sichtbar) kennzeichnen die Ergebnisse aus den nicht induzierten Ansätzen, die weißen Balken geben die Werte aus den induzierten Ansätzen wieder.

In den vorangegangenen Versuchen zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses des gewebespezifisch exprimierenden Transaktivatorvirus zu seinem Effektorvirus wurde für die Infektion die Gesamt-MOI 10 eingesetzt. Da für weitere Versuche mit den therapeutischen Genen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* höhere MOI angestrebt werden, muss die Gewebespezifität auch bei einer höheren Kopienzahl des Transaktivatorvirus in der Zelle gewahrt bleiben. Um eine Akkumulation von unspezifisch exprimierten Transaktivator und eine daraus resultierende mögliche Induktion auszuschließen, wurden die Modellzelllinien mit der Kombination AdPSArtTA und AdTRELuc in der Ratio 1:4 und den Gesamt-MOI 10, 20, 30, 40 und 50 infiziert. Nach der Infektion wurden die einzelnen Ansätze 48 Stunden in doxycyclinhaltigem bzw. doxycyclinfreiem Medium inkubiert und anschließend analysiert. Da zum Zeitpunkt dieses Experiments AdTRELucinv nicht gebrauchsfertig zur Verfügung stand, wurde der Versuch mit AdTRELuc (Abb. 16) durchgeführt. Auf den Einsatz von AdTSLuc wurde aufgrund der zelllinienspezifisch unterschiedlichen intrinsischen Basisaktivität nach Abdissozieren des tTS (Abb. 19 und 26A) verzichtet.

In allen drei Zelllinien wurde mit steigender MOI ein Ansteigen der Luciferaseexpression nach Zugabe des Induktors festgestellt (Abb. 27). In LNCaP-Zellen war im induzierten Zustand bei jeder MOI eine deutliche Induktion zu verzeichnen. Die schwächste Induktion war bei MOI 30 mit einem Faktor von 30 zu beobachten. Bereits bei MOI 20 lag der Induktionsfaktor bei 400, bei den MOI 30, 40 und 50 steigerte er sich auf ca. 600. In HeLa- und DU-145-Zellen war keine Induktion erkennbar, sodass der Anstieg der Luciferaseaktivität auf die zunehmende Zahl von Effektorviren pro Zelle und deren intrinsische Hintergrundaktivität zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die Kombination AdPSArtTA mit einem entsprechenden Effektorvirus auch bei einer steigenden Kopienzahl von AdPSArtTA gewebespezifische Expression zulässt. Die gemessenen RLU/mg Gesamtprotein können allerdings nicht mit den folgenden Daten der Reportervektoren in Bezug auf den Induktionsfaktor verglichen werden, da sie mit dem Effektorvirus AdTRELuc erzielt wurden, den eine beträchtliche intrinsische Basisaktivität kennzeichnet (Abbildung 18).

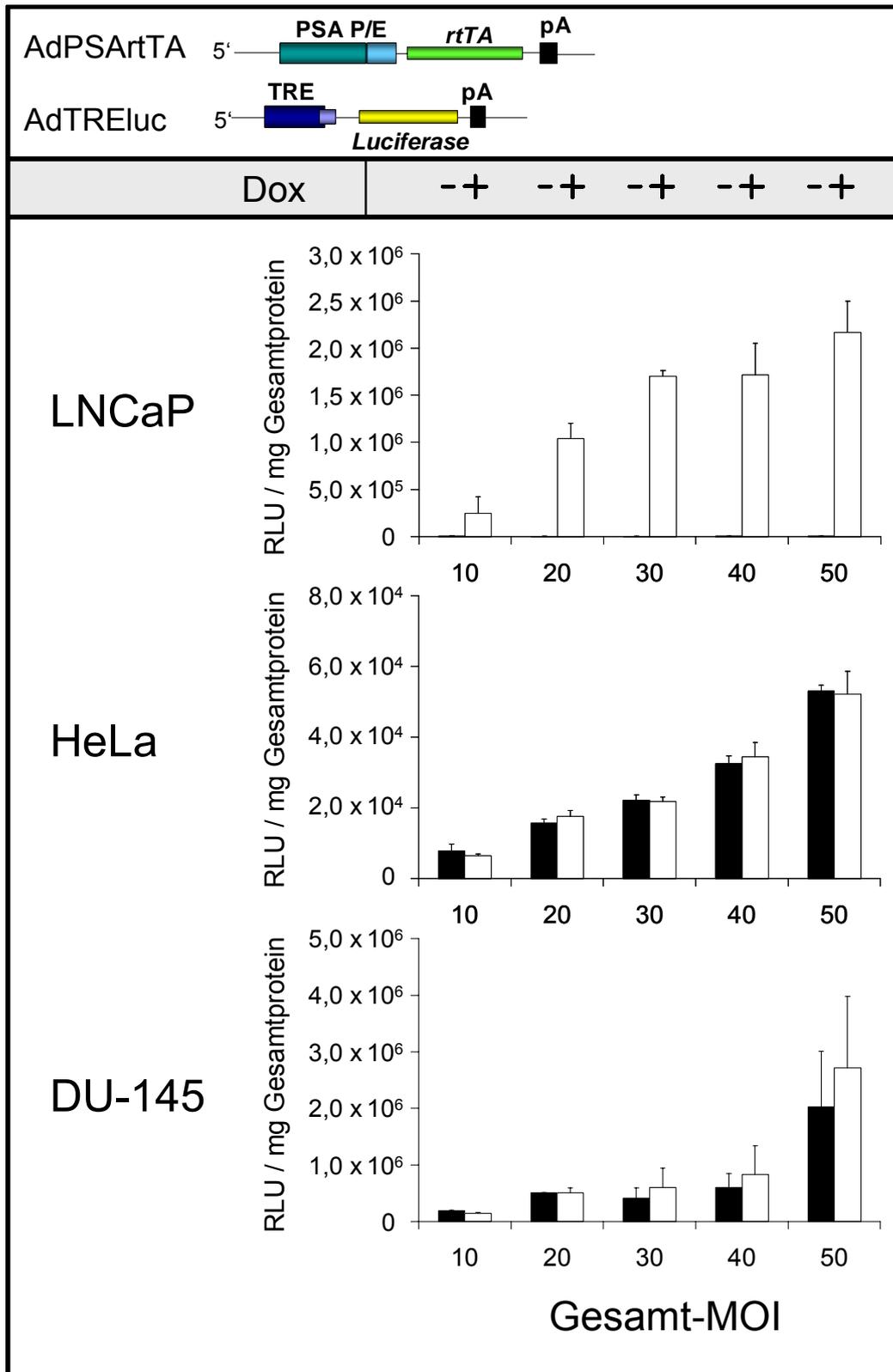


Abbildung 27: Luciferase Expression in LNCaP, HeLa und DU-145 nach Infektion mit AdPSArtTA und AdTRELuc (1:4) bei steigender MOI. Die Zellen wurden in einer 24-well Platte mit den angegebenen adenoviralen Vektoren mit den angegebenen MOI infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die einzelnen Ansätze wurden nach 48 h geerntet. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Parallelansätzen zum jeweiligen Erntezeitpunkt dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Schwarze Balken kennzeichnen die Ergebnisse aus den nicht induzierten Ansätzen, die weißen Balken geben die Werte aus den induzierten Ansätzen wieder.

Zur besseren Einschätzung der Expressionsstärke der einzelnen Vektorkombinationen wurden LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen parallel mit dem gewebespezifischen Trans-System AdPSArtTA/AdTRELucinv bzw. AdtTSluc und dem konstitutiven Transsystem AdCMVrtTA/AdTRELucinv bzw. AdtTSluc infiziert. Als Referenz wurden die Zellen in einem weiteren Parallelansatz mit AdCMVluc infiziert. Da in den vorangegangenen Versuchen eine substantielle Basalaktivität festzustellen war, wurde als Kontrolle eine Infektion eingeschlossen, in der die Transaktivatorvektoren AdPSArtTA bzw. AdCMVrtTA durch das Adenovirus Addl70-3 ersetzt wurde. Addl70-3 ist ein E1/E3-deletiertes Adenovirus, das in der E1-Region keine Fremdsequenzen trägt. Damit kann eindeutig von einer transaktivatorvermittelten und einer effektorvirusintrinsic Expression unterschieden werden. Die Verhältnisse 1:4 für das gewebespezifische Trans-System und 1:10 für das konstitutive Trans-System wurden auch mit Addl70-3 eingehalten. Die Infektion erfolgte nach Vorschrift der Infektion im Reaktionsgefäß (2.2.3.3). Die Zellen wurden zwei Tage nach Infektion geerntet und analysiert. Die Analyse erfolgte für alle Versuchsansätze parallel.

Zunächst wurde der Effektorvektor AdtTSluc im gewebespezifischen Trans-System untersucht. Im Kontrollansatz mit Addl70-3, d. h., ohne Transaktivator zeigten HeLa- und DU-145-Zellen nach Doxycyclinzugabe ins Medium einen starken Expressionsanstieg um den Faktor 2,9 bzw. 6,9. Dieser Effekt war in LNCaP-Zellen mit einem Induktionsfaktor von 1,3 nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 28A). Im Ansatz mit AdPSArtTA war die Induktion in DU-145-Zellen vergleichbar mit der Kontrolle ohne Transaktivatorvirus, in HeLa-Zellen war sie leicht angestiegen. LNCaP-Zellen zeigten mit dem Faktor 2,6 die vergleichsweise stärkste Induktion (Abb. 28B).

In der Zelllinie LNCaP konnte nach Infektion mit AdPSArtTA und AdtTSluc eine gewebespezifische Expression gezeigt werden. Das Silencing-Konstrukt AdtTSluc seines in Bezug auf Zelllinie und Induktionszustand sehr heterogenen Expressionsmusters nicht als optimales Modellsystem für die Darstellung einer gewebespezifischen Expression geeignet.

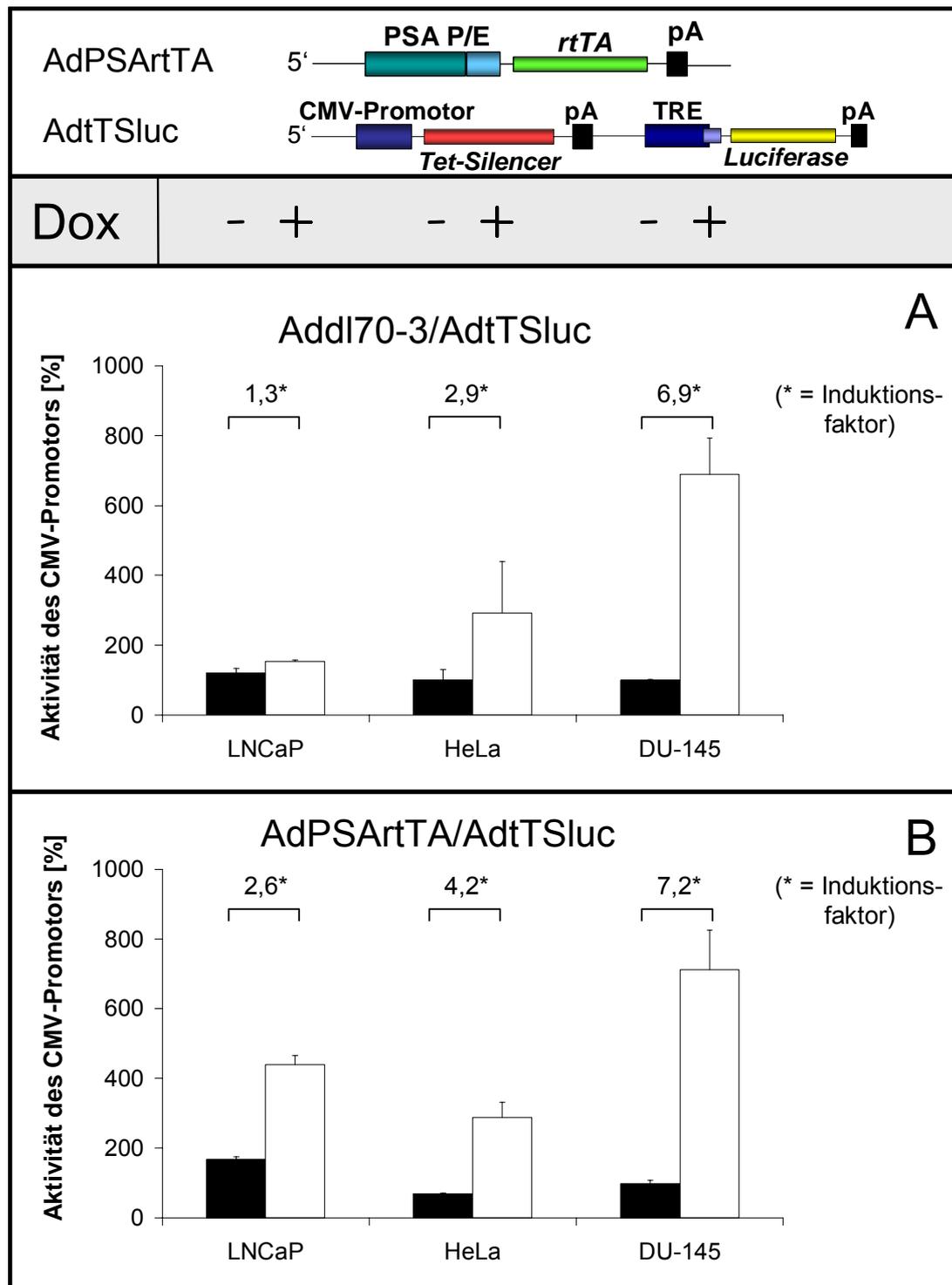


Abbildung 28: Gewebespezifität der Vektorkombination AdPSArtTA und AdtTSluc in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden mit MOI 10 mit den Trans-System Kombinationen Add170-3/AdtTSluc (A) und AdPSArtTA/AdtTSluc (B) jeweils mit der Ratio 1:4 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Infektionen wurden nach 48 h geerntet. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel infizierten AdCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Der Induktionsfaktor ist als Zahlenwert über den entsprechenden Balken für den nicht induzierten und den induzierten Ansatz angegeben.

Der Effektorvektor AdtTSluc wurde zudem im konstitutiven Trans-System charakterisiert. Nach Infektion mit der Viruskombination Addl70-3/AdtTSluc im Verhältnis 1:10 war eine doxycyclininduzierte Expressionssteigerung in Abwesenheit des Transaktivators in HeLa-Zellen, und besonders ausprägt in DU-145-Zellen, um das 2,3- bzw. 10,3-fache zu beobachten. In LNCaP-Zellen war nur eine geringe Induktion festzustellen (Abb. 29A).

In Anwesenheit des konstitutiv exprimierten Transaktivators ist in allen drei Zelllinien im nicht induzierten Zustand ein leichter Anstieg der Expression im Vergleich zur Kontrolle ohne Transaktivatorvirus zu verzeichnen, der auf unspezifische Bindung der rtTA am TRE zurückzuführen ist. Nach Induktion mit Doxycyclin war in den drei Zelllinien eine im Vergleich zur Expression des CMV-Promotors sehr starke Luciferaseaktivität zu verzeichnen, die in LNCaP-Zellen um den Faktor 1965 stärker als die CMV-Referenz war. In HeLa-Zellen lag die Expression 41-fach, in DU-145-Zellen 306-fach höher als die CMV-Referenz.

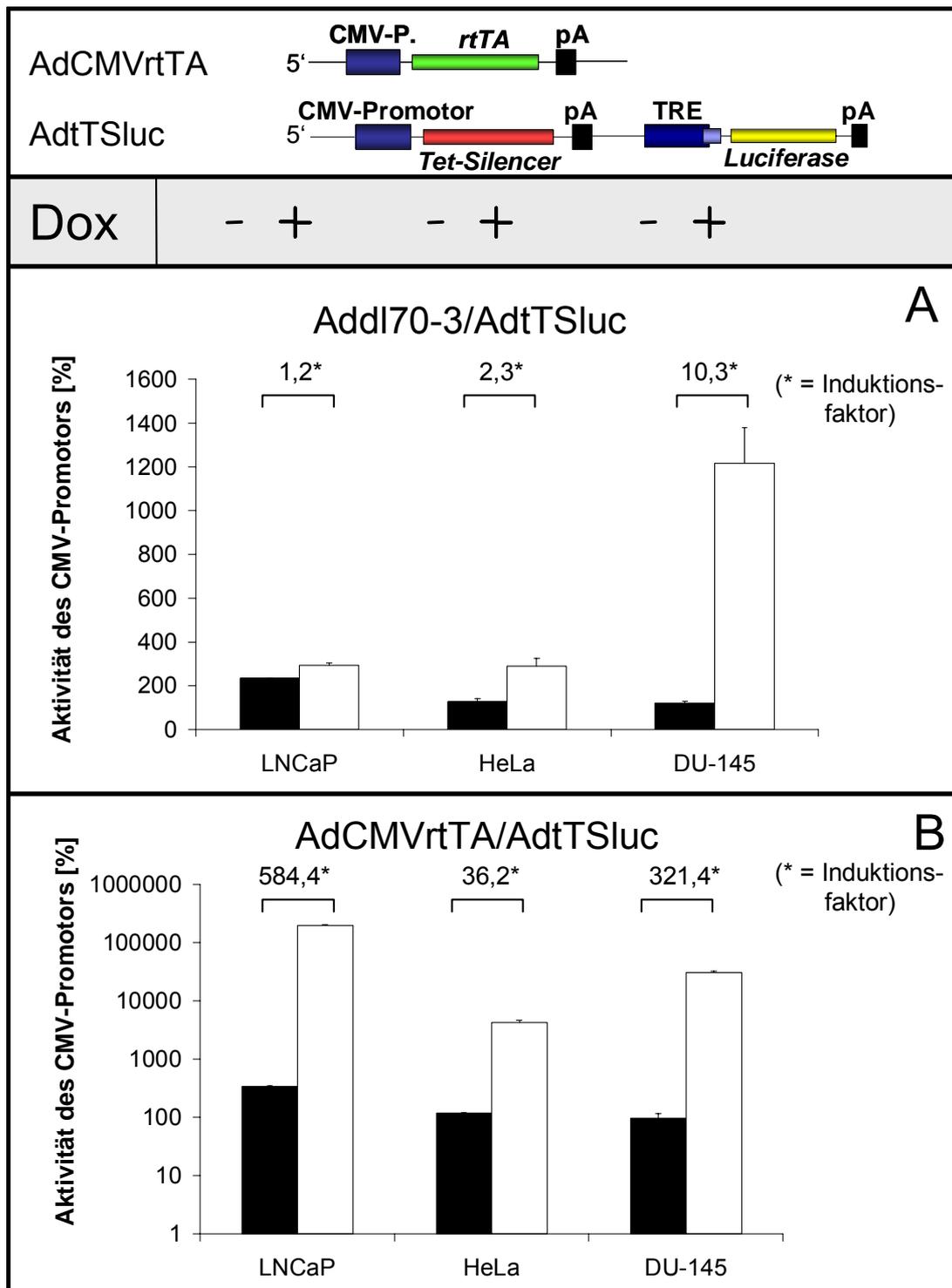


Abbildung 29: Expressionsstärke der Vektorkombination AdCMVrtTA und AdtTSluc in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden mit MOI 10 mit den Trans-System Kombinationen Add170-3/AdtTSluc (A) und AdCMVrtTA/AdtTSluc (B) (logarithmische Skalierung) jeweils mit der Ratio 1:10 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Infektionen wurden nach 48 h geerntet. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Der Induktionsfaktor ist als Zahlenwert über den entsprechenden Balken für den nicht induzierten und den induzierten Ansatz angegeben.

Bei der Charakterisierung des Effektorvektors AdTRELucinv im gewebespezifischen Trans-System zeigte sich zunächst im Kontrollansatz, der mit Addl70-3 und AdTRELucinv koinfiziert worden war, bei LNCaP- und HeLa-Zellen im Vergleich mit DU-145-Zellen eine relativ schwache Hintergrundexpression, die bei LNCaP bei ca. 10% und bei HeLa bei ca. 50% der Aktivität des CMV-Promotors lag. Die Aktivität in DU-145-Zellen lag etwa bei der vierzehnfachen Expressionsstärke des CMV-Promotors.

Nach Koinfektion von AdPSArtTA mit AdTRELucinv war nach Induktion mit Doxycyclin in LNCaP-Zellen ein substantieller Anstieg der Expression mit einem Induktionsfaktor von 109 beobachtbar, die der dreizehnfachen Aktivität des CMV-Promotors entsprach. In HeLa- und DU-145-Zellen war keine Induktion nachweisbar (Abb. 30).

Der Effektorvektor AdTRELucinv im konstitutiven Trans-System zeigte nach Koinfektion mit Addl70-3 in LNCaP-Zellen induziert wie nicht induziert eine Basisexpression, die im Bereich von 17% der Aktivität des CMV-Promotors lag. Nach Ersetzen von Addl70-3 mit AdCMVrtTA stieg die Expression im nicht induzierten Zustand um das 32-fache auf 581% der CMV-Promotoraktivität (Abb. 31). In HeLa- und DU-145-Zellen hatte die Anwesenheit des Transaktivators und damit eine mögliche unspezifische Bindung am TRE im Vergleich zum Kontrollansatz ohne AdCMVrtTA keine Auswirkungen auf die Hintergrundexpression.

Die Transkription ließ sich in allen drei Zelllinien nach Doxycylinzugabe induzieren, wobei die stärkste Expression in DU-145-Zellen beobachtet wurde, die ca. 2831-fach über dem Niveau des CMV-Promotors lag. Die Aktivität des induzierten konstitutiven Trans-Systems in LNCaP-Zellen lag fast 2472-fach, in HeLa-Zellen 47-fach über der CMV-Referenz (Abb. 31B).

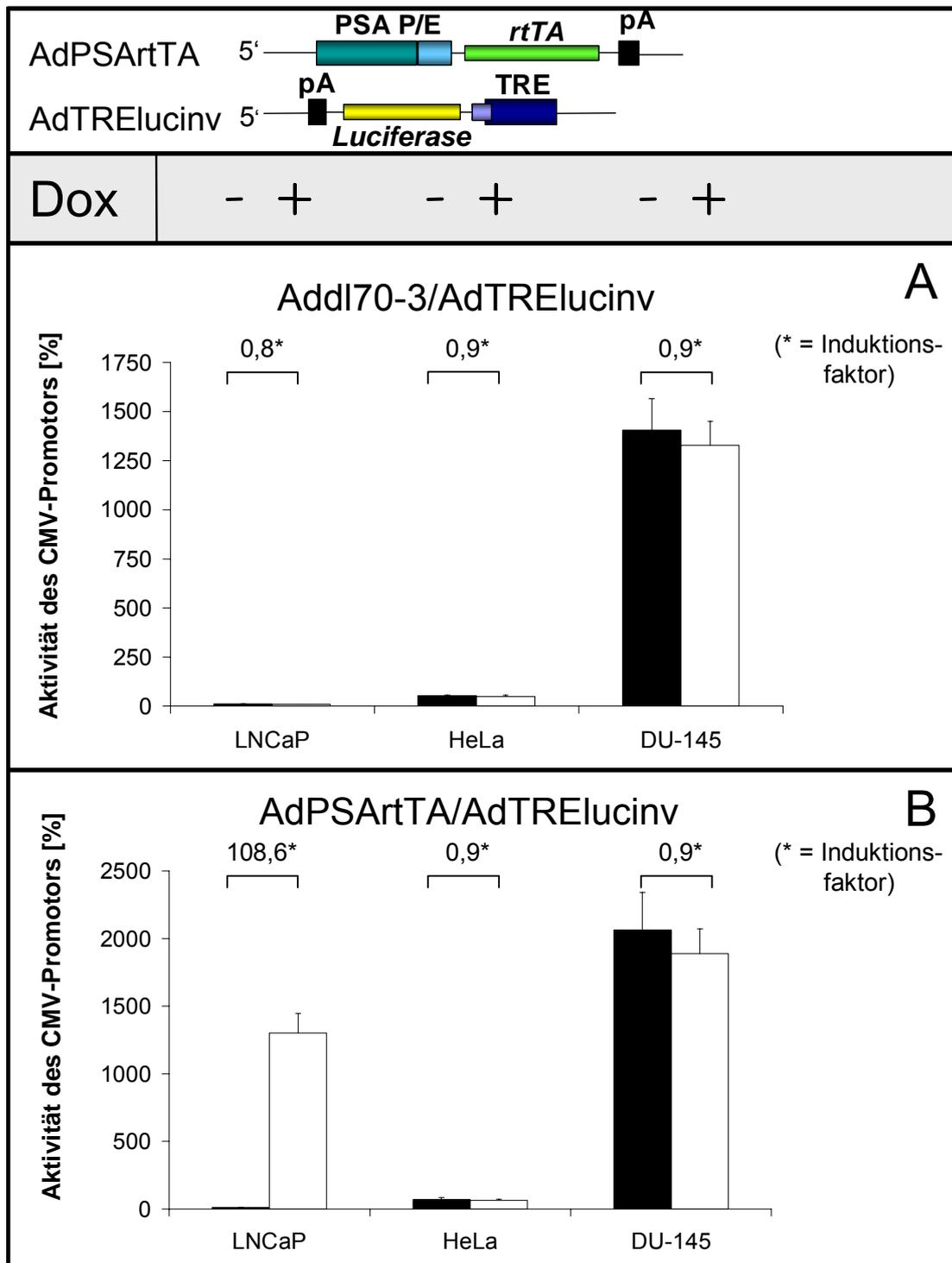


Abbildung 30: Gewebespezifität der Vektorkombination AdPSArtTA und AdTRELucinv in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden mit MOI 10 mit den Trans-System Kombinationen Add170-3/AdTRELucinv (A) und AdPSArtTA/ AdTRELucinv (B) jeweils mit der Ratio 1:4 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 μ g Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Infektionen wurden nach 48 h geerntet. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Der Induktionsfaktor ist als Zahlenwert über den entsprechenden Balken für den nicht induzierten und den induzierten Ansatz angegeben.

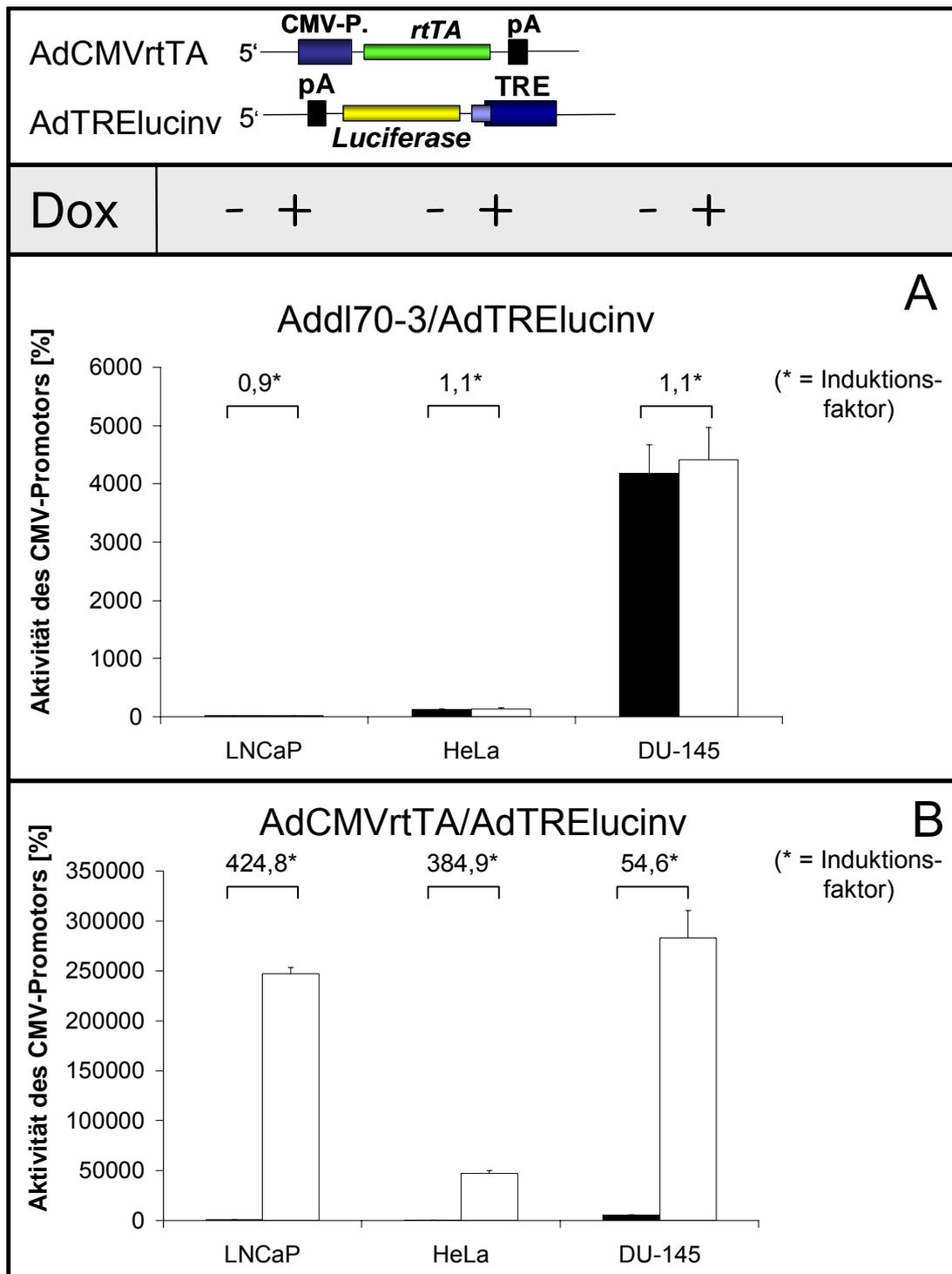


Abbildung 31: Expressionsstärke der Vektorkombination AdCMVrtTA AdTRELucinv in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden mit MOI 10 mit den Trans-System Kombinationen Add170-3/ AdTRELucinv (A) und AdCMVrtTA/AdTRELucinv jeweils mit der Ratio 1:10 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Infektionen wurden nach 48 h geerntet. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert und auf die Expressionsstärke des parallel transfizierten pCMVluc bezogen, die als 100% definiert wurde. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten dar, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Der Induktionsfaktor ist als Zahlenwert über den entsprechenden Balken für den nicht induzierten und den induzierten Ansatz angegeben.

Die Gewebespezifität des Cis-Konstrukts pPSArtTAlucinv musste, da kein entsprechendes Reportervirus generiert werden konnte, indirekt evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen mit der Kombination aus AdTRELuc und AdPSArtTAcdivn infiziert. Bei AdPSArtTAcdivn handelt es sich um das in Abbildung 15 beschriebene Cis-Konstrukt, das die *per se* in der Zelle inerte Cytosin Desaminase als Transgen trägt. Durch den Transaktivator, der von diesem Konstrukt exprimiert wird, kann *in trans* die Expression von Luciferase von AdTRELuc induziert werden. So kann indirekt Aufschluss über die gewebespezifische Expression des reversen Tet-Transaktivators vom viralen Cis-Konstrukt erhalten werden.

Um die Möglichkeit der unspezifischen Induktion der durch Hintergrundexpression akkumulierten Transaktivatormoleküle bei höheren MOI zu untersuchen, wurde AdTRELuc konstant mit MOI 5 infiziert, AdPSArtTAcdivn wurde mit den MOI 0, 10, 20, 30 und 40 infiziert. Um die Anzahl der adenoviralen Vektoren pro Zelle gleich zu halten, wurde jeweils mit Addl70-3 auf die Gesamt-MOI 45 aufgefüllt. Die Zellen wurden, nachdem sie zwei Tage in doxycyclinhaltigem, bzw. doxycyclinfreiem Medium inkubiert worden waren, auf ihren Luciferasegehalt untersucht.

Tabelle 8: Induktion der Expression von AdTRELuc *in trans* durch rtTA Expression von AdPSArtTAcdivn in LNCaP, HeLa und DU-145. Die Zelllinien wurden mit MOI 0, 10, 20, 30 und 40 mit AdPSArtTAcdivn und mit AdTRELuc mit konstanter MOI 5 infiziert. Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium. Die Infektionen wurden nach 48 h geerntet. Der Induktionsfaktor errechnet sich aus dem Quotienten des induzierten und des nicht induzierten Ansatzes. In der Tabelle sind die jeweiligen Induktionsfaktoren mit Standardabweichung angegeben. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung dar.

	MOI 0	MOI 10	MOI 20	MOI 30	MOI 40
LNCaP	0,84 ± 0,32	1001,92 ± 561,59	1678,33 ± 358,75	2883,45 ± 1405,62	728,94± 316,86
HeLa	1,14 ± 0,27	1,16 ± 0,21	1,06 ± 0,09	1,42 ± 0,46	1,17± 0,64
DU-145	0,97 ± 0,33	1,43 ± 0,41	2,20 ± 0,73	3,42 ± 2,53	2,47± 0,84

Diese indirekte Untersuchung zeigte eine gewebespezifische Expression des Transaktivators von AdPSArtTAcdivn, die im induzierten Zustand in LNCaP-Zellen zu einer maximalen Induktion bei MOI 30 mit einem Faktor von 2883 führten. In DU-145-Zellen war keine, in HeLa-Zellen nur eine sehr geringfügige Induktion mit dem Faktor 3,4 bei MOI 30 feststellbar (Tabelle 8). Diese Daten lassen auf eine PSA gesteuerte gewebespezifische Expression des rtTA im Cis-System schließen.

Aufgrund der Daten, die mit den Reportervektoren gewonnen wurden, erschienen die Derivate von AdTRELucinv für die Generierung von Effektorvektoren im Trans-System am geeignetsten. Abgesehen von zelllinienspezifischen Varianzen im Expressionsmuster, war AdTRELucinv hinsichtlich Expressionsstärke und Hintergrundexpression dem Konstrukt AdtTSluc überlegen. Daher wurde dieses Vektorkonstrukt zur Darstellung adenoviraler Effektorvektoren, die die therapeutischen Transgene Cytosin Desaminase und bsRNase tragen sollten, ausgewählt. Aufgrund einer möglichen Schädigung der Verpackungszelllinie bei der Virusproduktion wurde zusätzlich ein Shuttleplasmid zur Generierung des bsRNase tragenden Vektors AdtTSr hergestellt, der sich von AdtTSluc ableitet. Dieses Konstrukt zeigte nach Infektion der Verpackungszelllinie 293 im Vergleich mit AdTRELucinv die geringere Hintergrundaktivität (Abb. 23).

Zur Generierung eines gewebespezifisch exprimierenden adenoviralen Cis-Vektors für die therapeutischen Transgene Cytosin Desaminase, bsRNase und YB-1 wurden ebenfalls entsprechende Shuttlevektoren auf der Basis von pPSArtALucinv hergestellt.

3.4 Charakterisierung der eingesetzten therapeutischen Gene nach adenoviralem Gentransfer

3.4.1 *bsRNase*

Um die Zytotoxizität von *bsRNase* auf die unterschiedlichen Zelllinien einschätzen zu können, wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen des gereinigten Enzyms inkubiert (freundlicherweise überlassen durch Dr. J. Matousek, Libechov, Tschechische Republik). Zusätzlich zu den bereits besprochenen Modellzelllinien wurde die Zelllinie 293 in den Versuch eingeschlossen, da ihre Sensitivität gegenüber *bsRNase* für die Adenovirusbildung ausschlaggebend ist. Die Bestimmung der Toleranz gegen dieses Agens erfolgte im Dreifachansatz. Da gereinigte *bsRNase* nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stand, wurde der Versuch in einer 96-well Platte durchgeführt. Die Zellen wurden in 90 μl Medium ausgelegt und drei Tage mit jeweils 10 μl *bsRNase* Lösung in Endkonzentrationen 0,025 mg/ml bis 1000 mg/ml inkubiert. Der Anteil der lebenden Zellen wurde mittels des XTT-Assays gemessen (2.2.3.4). Anhand von Abbildung 32 konnte eine IC_{50} von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ in LNCaP-Zellen, 40 $\mu\text{g/ml}$ in HeLa-Zellen, 36 $\mu\text{g/ml}$ in DU-145-Zellen und 4,5 $\mu\text{g/ml}$ in 293-Zellen bestimmt werden.

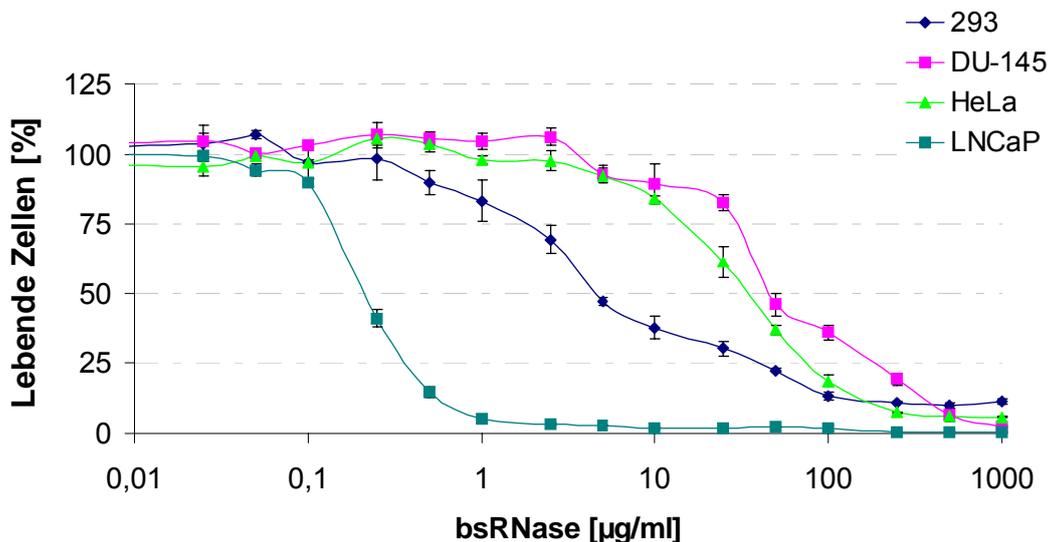


Abbildung 32: Sensitivität der Zelllinien LNCaP, HeLa, DU-145 und 293 gegenüber *bsRNase*. Die Zellen wurden in einer 96-well-Platte ausgesät und nach 24 h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte nach 72h nach Zugabe der *bsRNase* mittels XTT-Assay. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung dar.

Daraus ergibt sich eine 22,5-fach höhere Toleranz der 293-Zellen im Vergleich mit LNCaP-Zellen. HeLa- und DU-145-Zellen wiesen eine 180- bzw. 200-fach höhere Toleranz als LNCaP auf. Durch die im Vergleich zu den Referenzzelllinien sehr viel höhere Sensitivität wurden LNCaP-Zellen sehr effizient abgetötet. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten der Referenzzelllinien und der uneinheitlichen Regulierbarkeit des Tet-Konstrukts ptTSr, das aus dem Reportervektor AdtTSluc hervorgegangen war, ist jedoch eine gewebespezifische Abtötung der Zielzelllinie LNCaP vermutlich nicht darstellbar. Dennoch schien der erstmalige Einsatz von bsRNase als therapeutisches Transgen im adenoviral vermittelten Gentransfer ein viel versprechender Ansatz, sodass im weiteren Verlauf der Arbeit für Zytotoxizitätsstudien mit bsRNase mit dem konstitutiven Trans-System gearbeitet wurde. Zur Generierung dieser adenoviraler Vektoren wurde die Cre-/lox-vermittelte, intrazelluläre Rekombination des Shuttleplasmids mit dem Backboneplasmid pBHGlox nach Kotransfektion (AdMax™, vgl.: 2.2.3.3) genutzt. Dabei wurden die adenoviralen Vektoren AdPSArtArinv und AdtTSr (vgl.: Abb. 15 und 16) erhalten. Die Kotransfektion des Shuttleplasmids pTRErinv (vgl.: Abb. 16) mit dem Backboneplasmid pBHGlox führte trotz mehrmaliger Versuche nicht zur Virusbildung.

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA für bsRNase wurde mittels PCR aus dem Plasmid pBSV5 mit der genomischen Exportsequenz am 5' Ende amplifiziert (freundlicherweise überlassen von der Arbeitsgruppe K.-H. Scheit, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen). Für den ersten Nachweis der Expression von bsRNase wurden im Doppelansatz 293-Zellen und 293 Tet-On Zellen mit AdtTSr mit MOI 10 infiziert und jeweils mit und ohne Doxycyclin inkubiert. Dieses System wurde gewählt, da die E1-defizienten Adenoviren in der E1 *trans*-komplementierenden 293 bzw. 293 Tet-On Zelllinie replizieren und aufgrund der resultierenden hohen Kopienzahl adenoviraler DNA eine starke Expression stattfindet. Parallel dazu wurden 293 Tet-On Zellen, die rtTA stabil und konstitutiv exprimieren, mit AdtTSr infiziert, um die Induzierbarkeit dieses Konstrukts zu demonstrieren. Als Kontrolle dienten 293 und 293 Tet-On Zellen, die mit Addl70-3 infiziert wurden. Nach 24 Stunden waren die Zellen in allen Ansätzen weit gehend abgerundet. Zum Nachweis des Proteins im Western Blot wurden Medium und Zellen geerntet und untersucht. Für die Untersuchung der Transkription wurde die Gesamt-RNA der Zellen des zweiten Parallelansatzes isoliert.

Hinweise auf die Transkription von bsRNase und seine Funktionalität konnten durch Anwendung der Northern Blot Technik gewonnen werden. Aufgrund der katalytischen Aktivität der bsRNase gegen doppelsträngige RNA war eine stichhaltige Northern Blot Analyse zum Beweis der Transkription von bsRNase nicht möglich. Die notwendige interne Kontrolle und Normierung auf ribosomale RNA oder Haushaltsgene kann nicht zuverlässig durchgeführt werden.

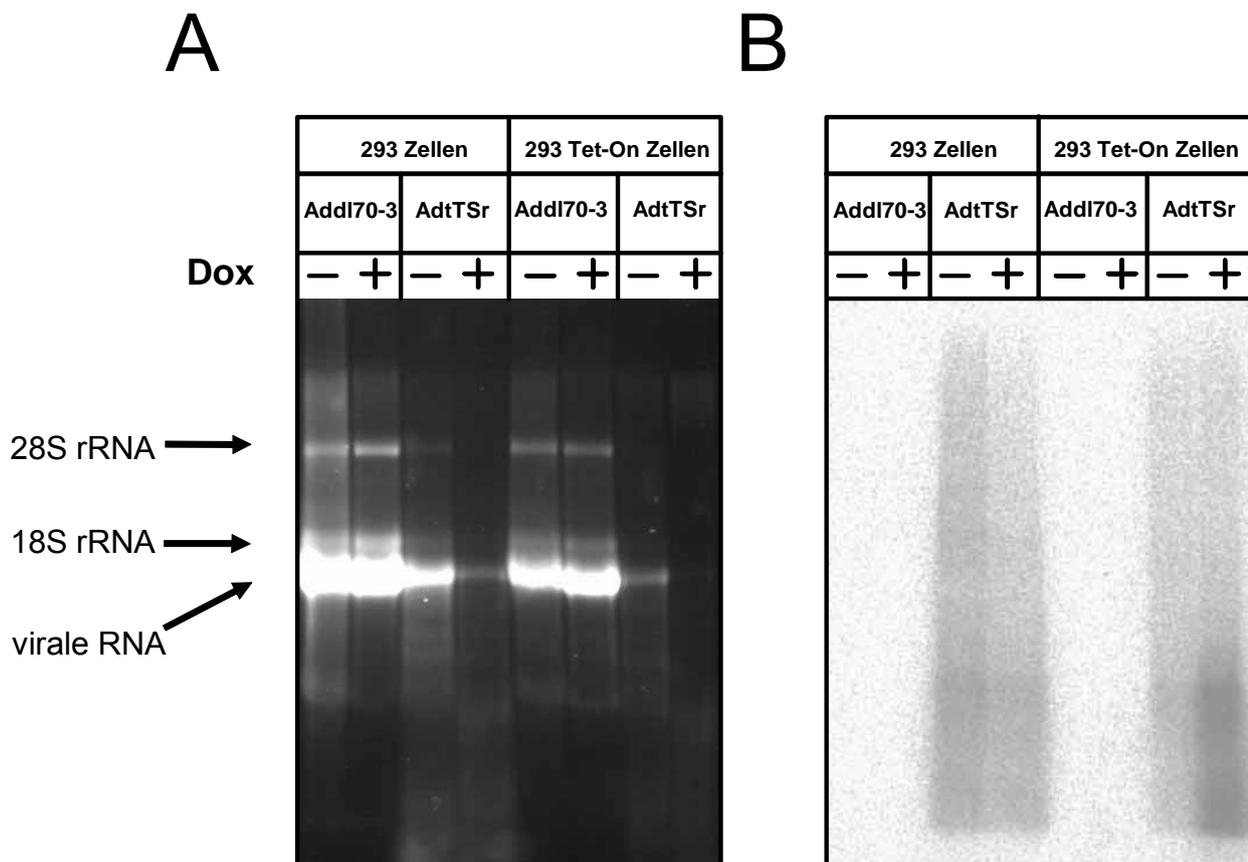


Abbildung 33: Transkriptions- und Funktionalitätsuntersuchungen von bsRNase nach Gentransfer mit AdtTSr in 293 bzw. 293 Tet-On Zellen mit und ohne Induktion. Als Negativkontrolle wurden die beiden Zelllinien mit dem Leervektor Addl70-3 infiziert. Auftrennung von 10 µg Gesamt-RNA der entsprechenden Ansätze im 1% Agarose Gel (A). Hybridisierung nach Auftrennung und Immobilisierung von 10 µg Gesamt-RNA mit einer ³²P markierten Sonde für bsRNase. Zur Synthese der Sonde diente die Gesamt-cDNA (550 bp) für bsRNase als Template. (B)

In 293 und in 293 Tet-On Zellen, die als Negativkontrolle mit Addl70-3 infiziert worden waren, war die ribosomale RNA in den Ansätzen mit Doxycyclin und ohne Doxycyclin intakt. Die Gesamt RNA der mit AdtTSr infizierten 293-Zellen zeigte im nicht induzierten Zustand bereits Degradation, die im induzierten Ansatz stark zunahm. In den 293 Tet-On Zellen war bereits uninduziert RNA-Degradation feststellbar. Nach

bar. Nach Induktion war in 293 Tet-On Zellen nur ein sehr schwaches RNA Signal nachweisbar (Abb. 33A).

Nach Hybridisierung der aufgetrennten und immobilisierten Gesamt-RNA mit einer radioaktiv markierten Sonde für bsRNase konnten, in den mit AdtTSr infizierten Ansätzen, nur sehr diffuse Signale detektiert werden, die auf starke Degradation hindeuten. Das mit Abstand stärkste Signal zeigten 293 Tet-On Zellen nach Induktion, sodass eine Korrelation zwischen Transkription von bsRNase und RNA Degradation sehr wahrscheinlich scheint (Abb. 33B). Dies kann jedoch aufgrund der fehlenden Kontrollen, die sich aus der Natur dieses Experiments ergeben, nicht endgültig bewiesen werden.

Nach Gentransfer mit dem adenoviralen Vektor AdtTSr in 293- und 293 Tet-On Zellen findet nach Induktion die Expression von bsRNase statt. In 293-Zellen ist die Gesamt-RNA im Vergleich zu den Add170-3 infizierten Zellen noch weitgehend intakt. Nach Doxycyclingabe, dem daraus resultierendem Abdissoziieren des tTS und der folgenden bsRNase-Expression, ist die rRNA im Gel größtenteils degradiert. In 293 Tet-On Zellen war bereits im nicht induzierten Zustand stärkere Degradation zu erkennen. Dies deutet auf eine kompetitive unspezifische Bindung des rtTA an das TRE hin. Nach Induktion war keine ribosomale RNA mehr vorhanden. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten aus den Experimenten mit Reportervektoren, die mit AdtTSluc in den Modellzelllinien und in 293-Zellen ermittelt wurden (Abb. 23).

Im Western Blot konnte ein schwaches Signal für bsRNase im Überstand der Infektion der mit doxycyclinhaltigem Medium kultivierten 293-Zellen nachgewiesen werden. Ein stärkeres Signal konnte aus dem Überstand der Infektion der induzierten 293 Tet-On Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34). Diese Resultate korrelieren mit den Ergebnissen, die in der Transkriptionsanalyse und der Untersuchung der Integrität der dafür aufgetrennten RNA erzielt wurden. In den entsprechenden Zellextrakten konnte in keiner Probe ein Signal für bsRNase festgestellt werden (Blot nicht gezeigt).

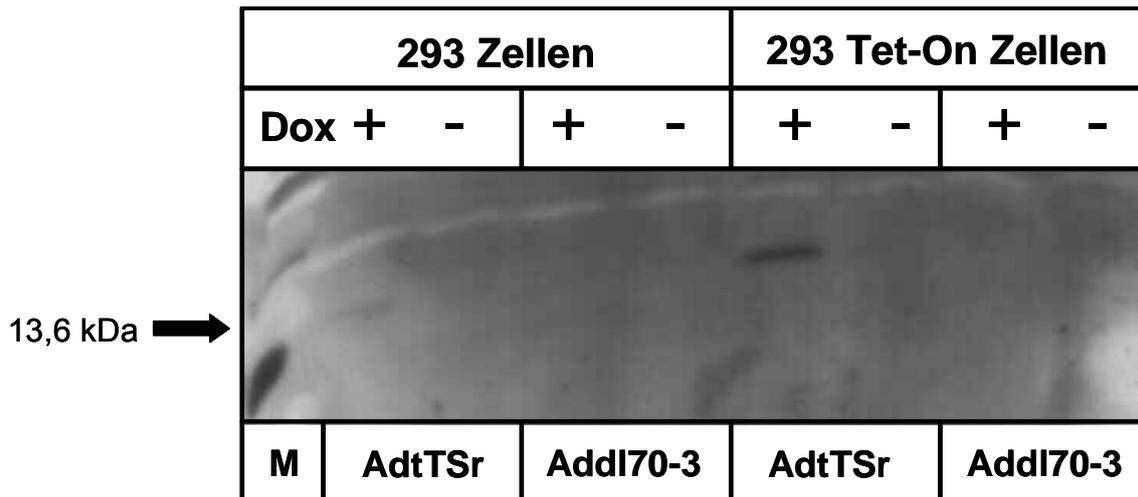


Abbildung 34: Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase aus Überständen von AdtTSr bzw. Addl70-3 infizierten 293 und 293 Tet-On Zellen. Die Überstände wurden 24 h nach Infektion mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren mit MOI 10 abgenommen. Jeweils 18 μ l wurden im 15% SDS PAGE aufgetrennt. bsRNase wurde mit einem polyklonalem Antiserum nachgewiesen. Links flankierend ist der Größenstandard aufgetragen (M).

Zum Nachweis der Expression von bsRNase in den Modellzelllinien LNCaP, HeLa und DU-145 wurden die Zellen in einer 24-well Platte ausgelegt und nach 24 Stunden bei einer Konfluenz von ca. 80% im Dreifachansatz mit den Adenoviruskombinationen für das konstitutive Trans-System AdCMVrtTA bzw. Addl70-3 als Kontrolle und AdtTSr (Verhältnis 1:10) und für das gewebespezifische Trans-System AdPSArTA bzw. Addl70-3 als Kontrolle mit AdtTSr (Verhältnis 1:4) mit der Gesamt-MOI 30 im Monolayer infiziert. Parallel dazu wurden die Zelllinien mit dem gewebespezifischen Cis-Konstrukt AdPSArTArinv und der Kontrolle Addl70-3 infiziert. Die Zellen wurden nach der Infektion für 36 Stunden in 500 μ l doxycyclinfreiem bzw. doxycyclinhaltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie zusammen mit dem Kulturmedium in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Medium der einzelnen Dreifachversuche vereinigt. Die Lysate der Zellpellets wurden ebenfalls vereinigt.

Im Western Blot wurden die Zellüberstände und die entsprechenden Lysate untersucht. bsRNase konnte in Mediumüberständen nachgewiesen werden. Ebenso wie im vorangegangenen Western Blot (Abb. 34) konnte in den Zelllysaten nur sehr schwach das Vorhandensein von bsRNase gezeigt werden. Sämtliche folgenden Abbildungen stellen Western Blots aus dem Mediumüberstand dar.

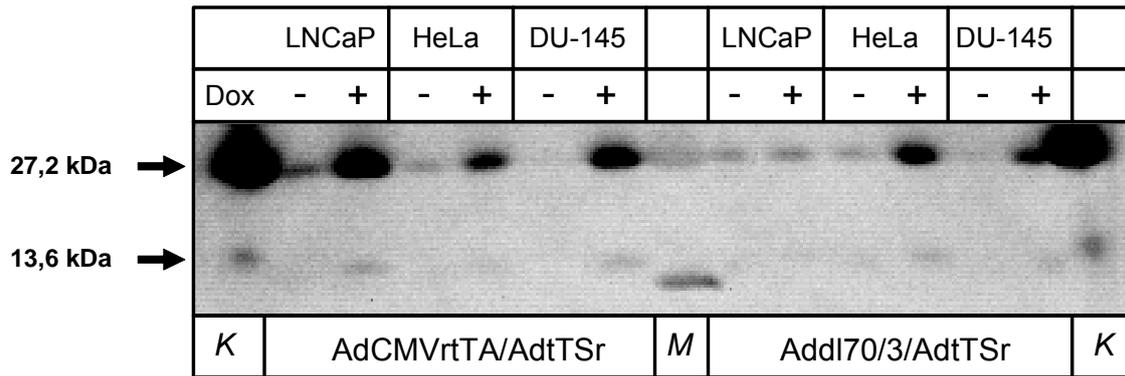


Abbildung 35: Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase im konstitutiven Trans-System. Die Zellen wurden mit der Gesamt MOI 30 der Vektorkombination AdCMVrtTA/AdtTSr bzw. Add170-3/AdtTSr mit der Ratio 1:10 infiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Die Überstände wurden 36 h nach Infektion abgenommen. Jeweils 60 µl wurden im 15% SDS PAGE aufgetrennt. bsRNase wurde mit einem polyklonalem Antiserum nachgewiesen. K: gereinigte bsRNase (5 ng) als Kontrolle; M: Größenstandard

In allen Zelllinien, die mit der Kombination AdCMVrtTA/AdtTSr infiziert wurden, waren im induzierten Zustand in den Überständen starke Signale vorhanden (Abb. 35). Es konnten Banden im Bereich 13,6 kDa und 27,2 kDa nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich jeweils um die monomere bzw. dimere Form des Proteins. Hier, wie auch in den nachfolgend gezeigten Western Blots (Abb. 36 und 37) tritt vor allem die dimere, katalytisch aktive Form der bsRNase auf. Das weist darauf hin, dass das transgene Protein posttranslational modifiziert wird, was zur Dimerisierung und zum effektiven Export aus der Zelle führt. Auch in der Kontrolle, in der AdCMVrtTA durch den Leervektor Add170-3 ersetzt wurde, war in HeLa- und DU-145-Zellen eine Induktion sichtbar, die von der intrinsischen Aktivität der Tet-abhängigen Expressionskassette in AdtTSr nach Abdissoziieren des tTS herrührte (Abb. 35). Wie bereits in den Experimenten mit den Reporterviren beobachtet worden war, trat dieser Effekt bei LNCaP-Zellen nur sehr schwach auf.

In der Kombination von AdtTSr mit dem gewebespezifisch exprimierenden Transaktivatorvektor AdPSArtTA war in LNCaP-Zellen im Vergleich mit AdtTSr und Add170-3 eine Induktion zu beobachten (Abb. 36). Allerdings waren die Signale in HeLa- und DU-145-Zellen nach Induktion sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Transaktivators stärker, als die Signale von LNCaP-Zellen nach gewebespezifischer Expressionsinduktion. Dies verifiziert die Daten aus den Versuchen mit den Reportervektoren (Abb. 28), mit denen bereits gezeigt wurde, dass in LNCaP-Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Transaktivatorvirus eine gewebespezifische

Induktion stattfindet. In HeLa- und DU-145-Zellen zeigt AdtTSr bereits in der Koinfektion mit AddI70-3 nach Induktion eine starke intrinsische Aktivität. Nach Koinfektion mit AdPSArtTA ist keine erkennbare Steigerung der Expression von bsRNase im Vergleich zur Kontrollinfektion erkennbar. Somit kann in diesem System von einer gewebespezifischen Expression gesprochen werden.

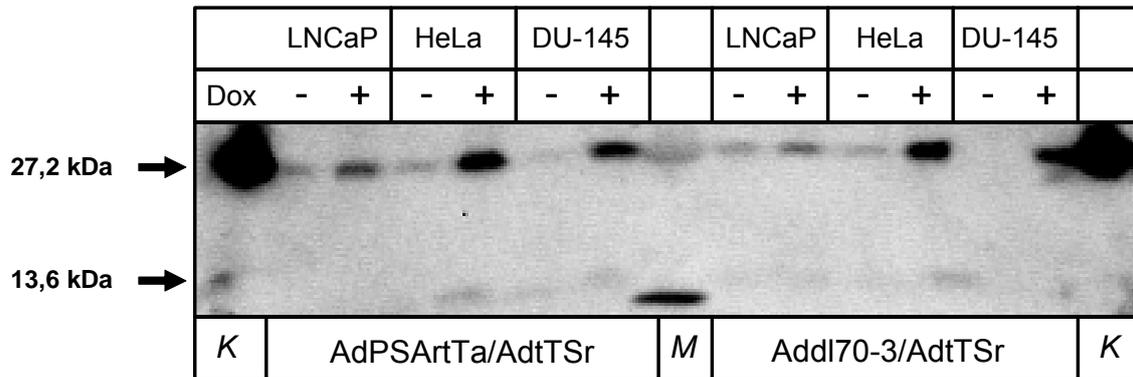


Abbildung 36: Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase im gewebespezifischen Trans-System. Die Zellen wurden mit der Gesamt MOI 30 der Vektorkombination AdPSArtTA/AdtTSr bzw. AddI70-3/AdtTSr mit der Ratio 1:4 infiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Die Überstände wurden 36 h nach Infektion abgenommen. Jeweils 60 µl wurden im 15% SDS PAGE aufgetrennt. bsRNase wurde mit einem polyklonalem Antiserum nachgewiesen. K: gereinigte bsRNase als Kontrolle; M: Größenstandard

In den Versuchen mit dem Cis-Konstrukt AdPSArtTarinV konnte bsRNase im Überstand von LNCaP-Zellen im induzierten und nicht induzierten Zustand nachgewiesen werden. Eine deutliche Induktion durch Doxycyclin war allerdings hier nicht feststellbar. In HeLa- und DU-145-Zellen, wie auch im Überstand der Zellen, die zur Kontrolle mit AddI70-3 infiziert worden waren, war kein Signal zu erkennen (Abb. 37).

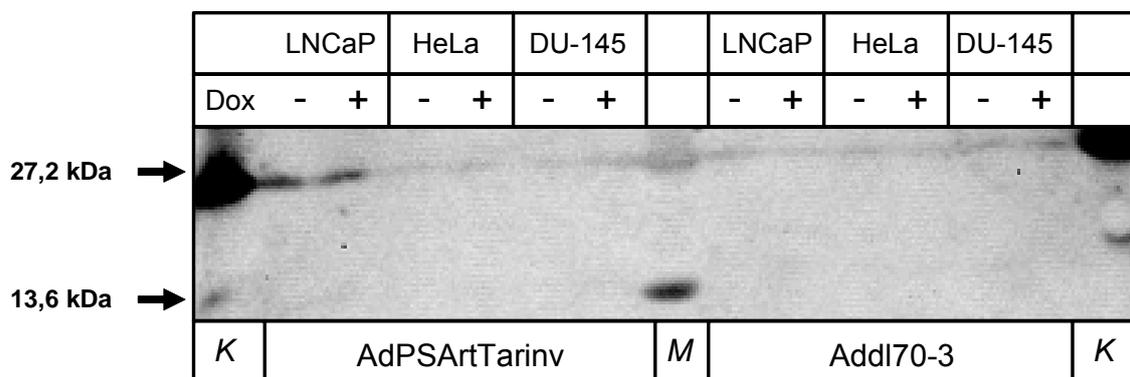


Abbildung 37: Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase im gewebespezifischen Cis-System. Die Zellen wurden mit MOI 30 AdPSArtTarinV und AddI70-3 als Kontrolle infiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Die Überstände wurden 36 h nach Infektion abgenommen. Jeweils 60 µl wurden im 15% SDS PAGE aufgetrennt. bsRNase wurde mit einem polyklonalem Antiserum nachgewiesen. K: gereinigte bsRNase als Kontrolle; M: Größenstandard

Generell korrelierten die Expressionsstärken aus diesen Versuchen stark mit den Daten, die mit den entsprechenden Reporterviren gewonnen wurden. Auf eine Quantifizierung der einzelnen Expressionsstärken wurde verzichtet, da eine verlässliche Normierung aufgrund grundsätzlich fehlender interner Kontrollen im hier untersuchten Medienüberstand nicht möglich ist.

Im nächsten Schritt wurde die katalytische Aktivität der exprimierten bsRNase untersucht. bsRNase katalysiert die Hydrolyse ribosomaler RNA und treibt die Zelle dadurch in den programmierten Zelltod (Apoptose). Um die dem Absterben der Zellen vorhergehende Schädigung der Proteinbiosynthese zu untersuchen, wurden die Zellen mit den Adenoviruskombinationen AdCMVrtTA bzw. dem Kontrollvirus Addl70-3 und dem Effektorvirus AdtTSr mit Gesamt-MOI 30 infiziert. Zusätzlich dazu wurden die einzelnen Ansätze jeweils mit dem adenoviralen Vektor AdCMVluc, der Luciferase konstitutiv unter einem CMV-Promotor exprimiert, mit MOI 5 koinfiziert. Die Infektion erfolgte jeweils für den nicht induzierten und den induzierten Zustand im Dreifachansatz. Da Luciferase eine Halbwertszeit von ca. drei Stunden hat, lassen sich mögliche Schädigungen des Proteinbiosyntheseapparats sehr sensitiv über eine veränderte Expression von Luciferase als Surrogatmarker für die Proteinbiosynthese verfolgen (Li et al. 2002). Diese Methode wurde aufgrund der einfacheren Handhabung dem Proteinbiosynthesenachweis durch ^{35}S -Methionin-Einbau vorgezogen. Für diesen Versuch wurde eine Kinetik durchgeführt. Die Luciferaseexpression wurde 36 Stunden und 80 Stunden nach der Infektion untersucht.

36 Stunden nach Infektion war der Luciferasegehalt in LNCaP-Zellen, die mit der Kombination AdCMVrtTA und AdtTSr infiziert und induziert worden waren, bereits um mehr als das vierzigfache auf 1,5% der Aktivität der nicht induzierten Kontrolle gefallen (Abb. 38A). In DU-145-Zellen war eine 9-fache Abnahme des Luciferasegehalts zu beobachten, in HeLa-Zellen ging die Luciferaseexpression um etwa die Hälfte auf 51,6% zurück. In den Kontrollen, die mit Addl70-3/AdtTSr und AdCMVluc koinfiziert waren, war nach 36 Stunden kein Rückgang der Luciferaseaktivität im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 38A).

80 Stunden nach Infektion nahm der Luciferasegehalt in LNCaP-Zellen um den Faktor 39, in DU-145-Zellen um den Faktor 28 im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle ab, in HeLa-Zellen konnte kein Abnahmefaktor bestimmt werden, da keine leben-

den Zellen und damit auch keine Luciferaseaktivität mehr beobachtet werden konnten (Abb. 38B). Die Luciferaseexpression wurde in den Kontrollinfektionen mit Add170-3/AdtTSr in LNCaP- und HeLa-Zellen durch Zugabe von Doxycyclin nicht beeinflusst. In DU-145-Zellen war hier ein leichter Rückgang zu verzeichnen, der auf die hohe Hintergrundexpression des Effektorvektors, die bereits auf Luciferaseebene gezeigt wurde, zurückgeführt werden kann.

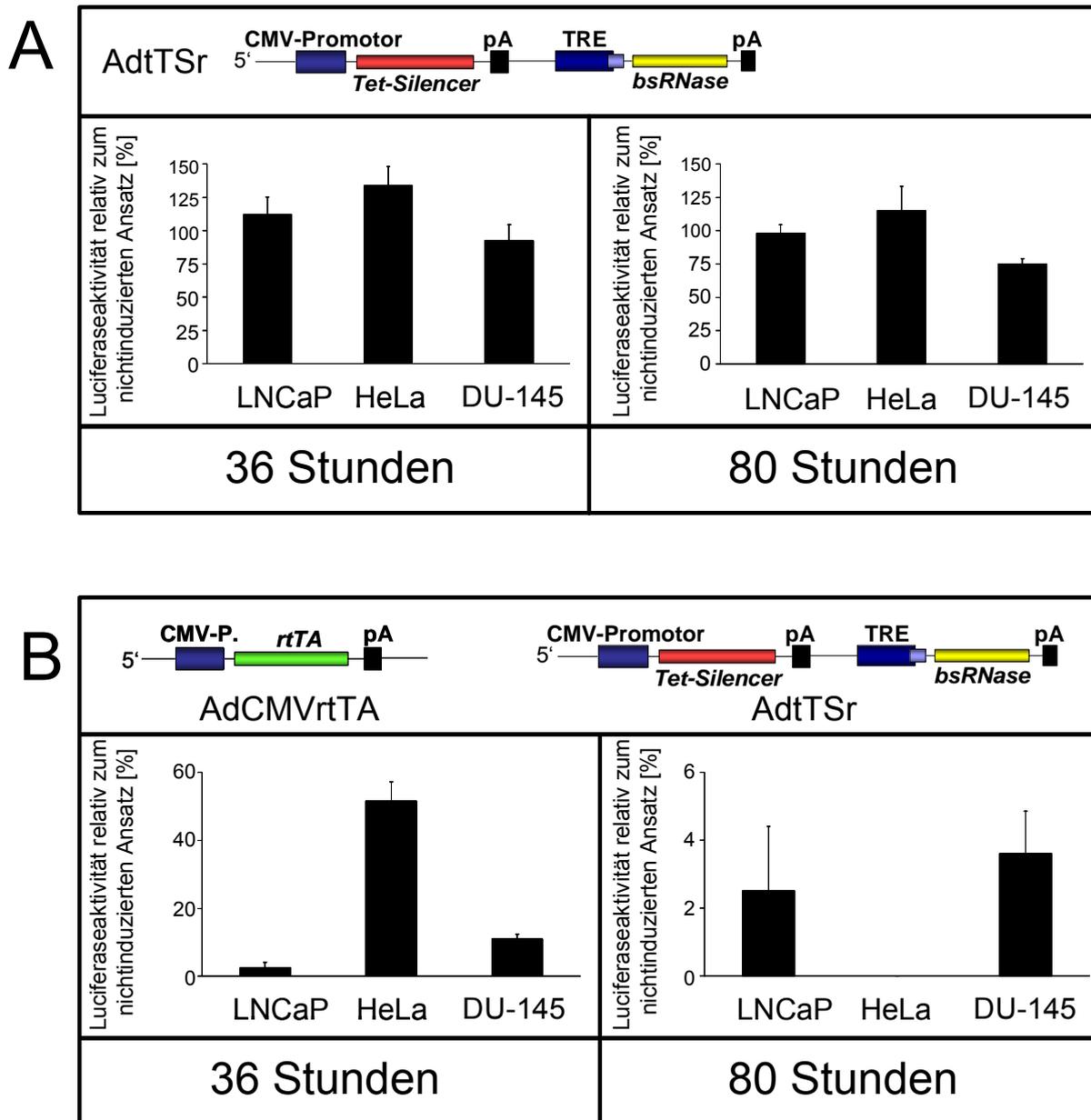


Abbildung 38: Abnahme der Luciferaseaktivität 36 h bzw. 80 h nach Koinfektion von Add170-3/AdtTSr und AdCMVluc (A) bzw. AdCMVrtTA/AdtTSr und AdCMVluc (B) und Induktion der Expression von bsRNase. Gezeigt wird die prozentuale Aktivität bezogen auf den jeweiligen nicht induzierten Ansatz, dessen Aktivität als 100% festgelegt wurde. LNCaP, HeLa und DU-145 wurden in einer 24-well Platte mit Add170-3 bzw. AdCMVrtTA und AdtTSr (Gesamt-MOI 30) und AdCMVluc (MOI 5) koinfiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Die Bestimmung des Luciferasegehalts der entsprechenden Ansätze erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die ermittelten RLU wurden auf den jeweiligen Gehalt an Gesamtprotein in der Probe normiert. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung dar.

Die Expression von bsRNase nach Gentransfer mit den adenoviralen Vektoren AdCMVrtTA und AdtTSr und Induktion mit Doxycyclin verursachte nach Infektion in allen hier untersuchten Zelllinien einen starken Rückgang der Proteinbiosynthese, der hier indirekt durch die Abnahme der Luciferaseaktivität gezeigt werden konnte.

Im folgenden Schritt wurde untersucht, inwieweit die demonstrierte Abnahme der Proteinbiosynthese zum Absterben der Zellen führt. Dazu wurden in ersten Vorversuchen die Zielzelllinien im Reaktionsgefäß mit AdCMVrtTA/AdtTSr und als Kontrolle mit Addl70-3 oder Addl70-3/AdtTSr in einer 24-well Platte infiziert und über vier Tage beobachtet. Die Auswertung erfolgte visuell. Für diese Versuche wurde im Hinblick auf eine spätere *in vivo* Anwendung die MOI 30 gewählt. Höhere MOI können *in vivo* sonst nur lokal erreicht werden. Durch Infektion im Reaktionsgefäß wurden die LNCaP-Zellen, im Vergleich zu HeLa- und DU-145-Zellen, die diese Methode sehr gut tolerierten, stark geschädigt. Auf diese Weise konnten in LNCaP keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, da die Konzentration von bsRNase im Medium bei einer geringen Anzahl von metabolisch aktiven, bsRNase produzierenden Zellen nur vergleichsweise schwache zytotoxische Level erreichen. In HeLa- und DU-145-Zellen waren bei den mit Doxycyclin induzierten Ansätzen im Vergleich zu den Kontrollen (AdCMVrtTA/AdtTSr nicht induziert, Addl70-3/AdtTSr induziert und nicht induziert) viele tote und abgerundete Zellen zu beobachten.

Zur weiteren Bestimmung der Zytotoxizität der bsRNase wurden daraufhin die Zellen im Monolayer bei einer Konfluenz von 80% mit MOI 30 mit AdCMVrtTA/AdtTSr bzw. Addl70-3/AdtTSr infiziert. Die Induktion erfolgte durch Doxycyclinzugabe in das Medium der entsprechenden Ansätze unmittelbar nach der Infektion. Bereits 24 Stunden nach Infektion war bei in den induzierten Ansätzen in allen Zelllinien, die mit AdCMVrtTA/AdtTSr infiziert worden waren, ein Absterben der Zellen zu erkennen. Nach vier Tagen waren in DU-145-Zellen nur noch vereinzelt, in LNCaP- und HeLa-Zellen keine adhärennten Zellen sichtbar. Die Zellen in den Ansätzen, die nicht induziert waren, bildeten, ebenso wie die Addl70-3/AdtTSr infizierten Ansätze, induziert und nicht induziert, weitgehend intakte Monolayer.

Für eine genaue Quantifizierung des zytotoxischen Effekts wurden die untersuchten Zelllinien analog zum vorhergehenden Experiment mit AdCMVrtTA/AdtTSr und als Kontrolle mit Addl70-3/AdtTSr und Addl70-3 (MOI 30) im Monolayer infiziert. Die Infektion erfolgte für den nicht induzierten und den induzierten Zustand jeweils im Drei-

fachansatz. Um eine genauere zeitliche Aufschlüsselung der Expression und der zytotoxischen Wirkung von bsRNase zu erhalten, wurde dieser Versuch in zwei Parallelansätzen durchgeführt: Nach zwei Tagen bzw. vier Tagen wurde mittels XTT Test die Lebendzellzahl bestimmt. Die Zytotoxizität nach Induktion in Anwesenheit des Transaktivators und die unspezifische Hintergrundinduktion ohne Transaktivator wurden durch die Normierung auf die jeweilige Addl70-3 infizierte Kontrolle (+/- Doxycyclin) charakterisiert.

In allen drei Zelllinien ist 36 Stunden nach Infektion eine Abnahme der lebenden Zellen im induzierten Ansatz im Vergleich zu den nicht induzierten Proben nach Infektion mit AdtTSr/AdCMVrtTA sichtbar (Abb. 39). In LNCaP-Zellen wurde im nicht induzierten Zustand bereits ein deutlicher Rückgang der lebenden Zellen um 36% festgestellt, was auf eine unspezifische kompetitive Bindung am TRE hinweist. In HeLa-Zellen war im nicht induzierten Ansatz im Vergleich mit der Addl70-3 infizierten Kontrolle kein Rückgang der Zellzahl feststellbar. Die Zahl der lebenden DU-145-Zellen nahm nicht induziert im Vergleich zu den Kontrollinfektionen mit Addl70-3 leicht um 16% ab. Nach Induktion hatte die Lebendzellzahl in Referenz zur Kontrolle bei LNCaP um 76%, bei HeLa um 69% und bei DU-145 um 55% abgenommen. In den Kontrollansätzen, die mit Addl70-3/AdtTSr infiziert wurden, konnte keine induktionsbedingte Abnahme der Anzahl der lebenden Zellen beobachtet werden (Abb. 39).

80 Stunden nach Infektion und Induktion waren im induzierten Ansatz mit AdCMVrtTA/AdtTSr im Vergleich zur Kontrolle noch 6% der LNCaP- und 4% der DU-145-Zellen metabolisch aktiv (Abb. 39). Es konnten keine lebenden HeLa-Zellen mehr nachgewiesen werden. Im nicht induzierten Zustand überlebten 69% der HeLa-Zellen und 65% der DU-145-Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Der Prozentsatz der überlebenden LNCaP-Zellen lag mit 45% deutlich niedriger.

Ohne Transaktivatorvirus war bei LNCaP-Zellen ein genereller Rückgang der überlebenden Zellen auf 54% induziert und 64% nicht induziert zu beobachten. Bei den HeLa-Zellen nahm die Lebendzellzahl nach Induktion auf 28% ab. Im nicht induzierten Ansatz überlebten 80% der Zellen. Bei DU-145-Zellen bewirkte die Induktion nur eine geringfügige Abnahme der Lebendzellzahl (Abb. 39).

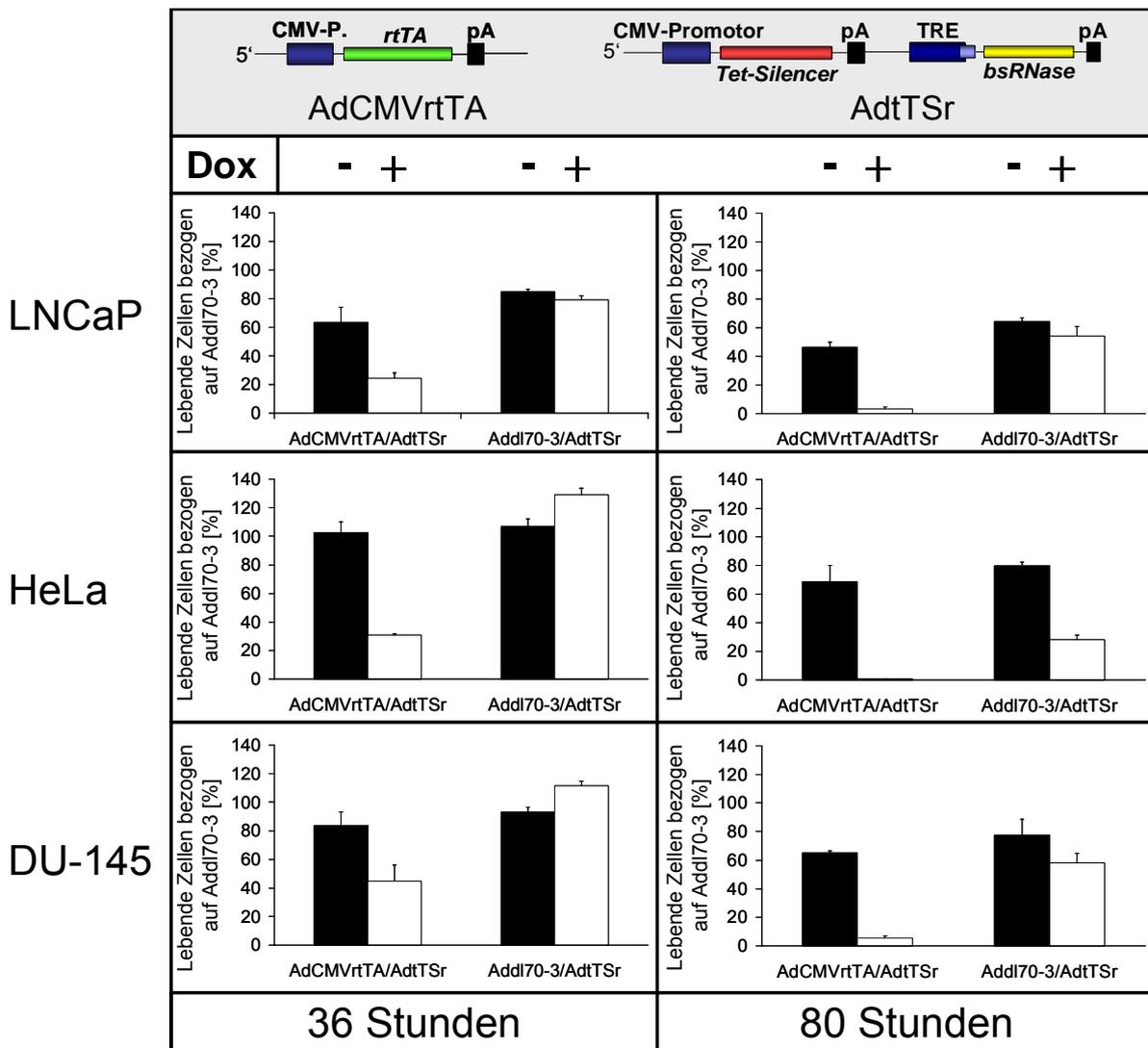


Abbildung 39: Zytotoxizität von bsRNase nach Infektion mit für bsRNase kodierenden adenoviralen Vektoren. LNCaP, HeLa und DU-145 wurden mit der Gesamt-MOI 30 mit der Vektorkombination AdCMVrtTA/AdtTSr bzw. Add170-3/AdtTSr (Ratio: 1:10) infiziert. Als Referenz diente eine Infektion mit Add170-3 (MOI 30). Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Die weißen Balken zeigen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze. Die Lebendzellzahl wurde mittels XTT Assay 36 h nach Infektion und Induktion bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung dar.

Die Expression von bsRNase nach Gentransfer mit den adenoviralen Vektoren AdCMVrtTA und AdtTSr und Induktion mit Doxycyclin resultierte in allen drei Zelllinien in einer starken Abnahme der Lebendzellzahl in Abhängigkeit der Inkubationszeit, was auf eine Anreicherung des zytotoxischen Agens im Medium schließen lässt. Die Daten, die nach 80 Stunden erhoben wurden, korrelieren in Bezug auf die Promotoraktivität sehr gut mit denen, die mit den Reportervektoren und im Western Blot erzielt wurden. Durch den Rückgang der Proteinbiosynthese kann eine Kausalität zur Verringerung der Lebendzellzahl abgeleitet werden, die einer zeitlich versetzten Kinetik in Bezug auf die Proteinbiosynthese folgt.

Der hier gezeigte zytotoxische Effekt der bsRNase wird durch Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) vermittelt. Der Eintritt in die Apoptose führt zu einer Translokation von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran. Das Protein Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin und kann so genutzt werden, um apoptoseinduzierte Membranveränderungen nachzuweisen. In diesem Fall wurden diese Veränderungen durch Annexin V auf Zellebene mittels Durchflusszytometrie gezeigt und quantifiziert.

Um die Apoptoseinduktion durch bsRNase zu zeigen, wurden die einzelnen Zelllinien im Monolayer im Doppelansatz mit den Adenoviruskombinationen AdCMVrtTA/AdtTSr, AdCMVrtTA/Addl70-3 und Addl70-3/AdtTSr bzw. Addl70-3 (vgl.: Abb. 40) mit MOI 30 infiziert. Die Inkubation erfolgte für jeden Ansatz in doxycylinhaltigen und doxycylinfreiem Medium. Die Translokation der Phosphatidylreste ist ein sehr frühes Ereignis in der Apoptose. Deshalb wurden die Zellen bereits nach 24 Stunden geerntet und mit FITC-markierten Annexin V gefärbt. Da die LNCaP Proben nach der Annexin V Markierung stark verklumpt waren, wurden diese mit einem Zellsieb vereinzelt. Unmittelbar nach dieser Prozedur setzte ein erneutes Verklumpen ein, sodass diese Zelllinie auch in einem zweiten Versuch unter diesen Bedingungen durchflusszytometrisch nicht analysiert werden konnte.

24 Stunden nach Infektion mit AdCMVrtTA/AdtTSr und Induktion konnten in den untersuchten Zelllinien im Vergleich zu den nicht induzierten Ansätzen und den beschriebenen Kontrollen erhöhte Anteile apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (Abb. 40). In HeLa-Zellen war nach Induktion im AdCMVrtTA/AdtTSr infizierten Ansatz ein starker Anstieg des Anteils der apoptotischen Zellen von 15% auf 39,9% zu beobachten. Darüber hinaus war in den Zellen, die mit Addl70-3/AdtTSr infiziert wurden, nach Doxycyclingabe ein schwacher Induktionseffekt zu verzeichnen. Auch in DU-145-Zellen findet sich dieser Effekt mit dieser Vektorkombination, wobei sich hier allein durch die Transduktion mit Addl70-3/AdtTSr der Prozentsatz der apoptotischen Zellen erhöhte. Durch Transduktion mit AdCMVrtTA/AdtTSr und Induktion stieg der Anteil der apoptotischen Zellen von 35% auf 65% (Abb. 40).

Diese Daten lassen auf Apoptoseinduktion nach Infektion mit bsRNase kodierenden Vektoren bzw. Vektorkombinationen und Induktion der Expression schließen.

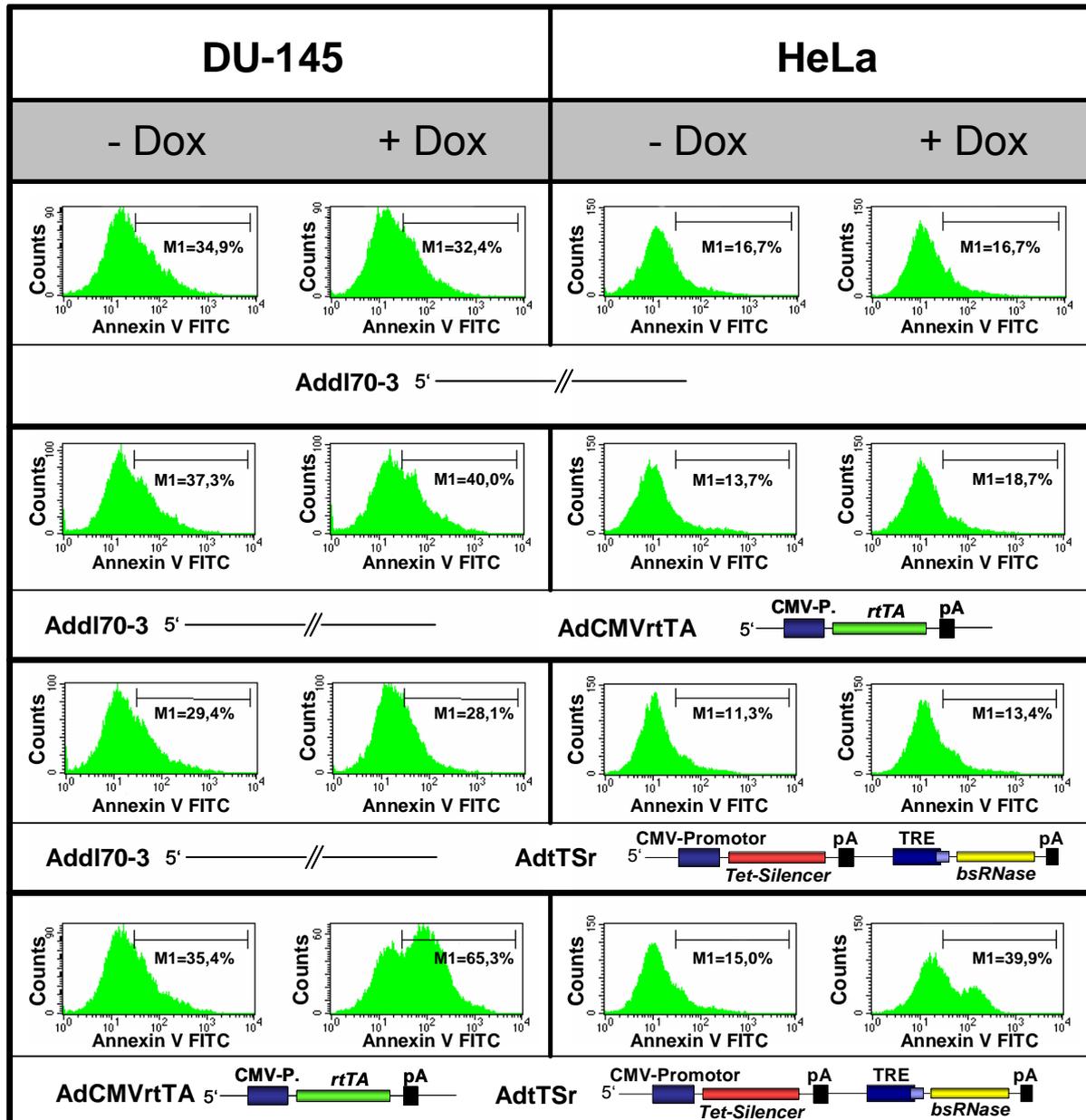


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen nach Infektion mit bsRNase kodierenden Viruskombinationen bzw. Kontrollen. Graphische Darstellung der Analyse. Die Region M1 schliesst die Annexin V positiven Zellen ein. Jeweiliger prozentualer Anteil der Annexin V positiven Zellen nach Infektion mit angegebenen Viruskombinationen bzw. Kontrollen. HeLa und DU-145 wurden mit den beschriebenen Viruskombinationen in der 6 cm Kulturschale mit MOI 30 infiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Nach 24 h wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt und der Prozentsatz der apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

3.4.2 Cytosin Desaminase

Cytosin Desaminase katalysiert die Umwandlung der nicht toxischen *Prodrug* 5-Fluorcytosin (5-FC) in das zytotoxische 5-Fluoruracil (5-FU), einem heute weit verbreiteten Chemotherapeutikum. In den ersten Vorversuchen wurde die Zytotoxizität dieser beiden Komponenten untersucht. Damit sollte für die drei Modellzelllinien die maximal mögliche Konzentration 5-FC ermittelt werden, mit der keine Zellschädigung erfolgt, die aber nach Umwandlung eine möglichst starke Zytotoxizität erreicht. Um weitere Ergebnisse entsprechend interpretieren zu können, wurde zunächst die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Suizidsubstrats und seinem Metaboliten durch Inkubation mit 5-FC bzw. 5-FU bestimmt.

In ersten Versuchen erwies sich die Reinsubstanz 5-FC als sehr schlecht löslich. Da 5-FC in Wasser nur durch Erwärmen gelöst werden konnte, das allerdings auch zu einer teilweisen Umwandlung in 5-FU führt, wurde für die weiteren Versuche gelöstes 5-FC in Form des Arzneimittels Ancotil verwendet (2.1.1). Zur Untersuchung des Effekts von 5-FU wurde ebenfalls die als Arzneimittel erhältliche, bereits gelöste Substanz verwendet, die unter dem Handelsnamen Ribofluor therapeutisch eingesetzt wird. 24 Stunden nach dem Auslegen wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen 5-FC bzw. 5-FU 3 Tage lang inkubiert. Im Kontrollansatz wurde Lösungsmittel ohne 5-FC bzw. 5-FU Anteil zugegeben.

Nach Bestimmung der Lebendzellzahl und deren grafischer Auftragung in Abhängigkeit der 5-FC bzw. 5-FU Konzentration (Abb. 41) konnte die IC_{50} für beide Substanzen in der entsprechende Zelllinie abgeleitet werden. Aus den ermittelten IC_{50} (LNCaP: 5000 μ M; HeLa, 4500 μ M; DU-145: 5000 μ M) ging hervor, dass die drei Zelllinien 5-FC in vergleichbarem Maß tolerierten, wobei bis zu einer Konzentration von 1000 μ M in keiner Zelllinie eine Schädigung beobachtet werden konnte. Gegenüber 5-FU waren LNCaP-Zellen mit einer IC_{50} von 6 μ M am sensitivsten und waren vergleichbar mit DU-145-Zellen, deren IC_{50} bei 15 μ M lag. HeLa-Zellen waren mit 100 μ M im Vergleich zu LNCaP- und DU-145-Zellen ca. zwanzigmal bzw. fast siebenmal weniger sensitiv gegen 5-FU (Abb. 41). In den folgenden Experimenten zur Untersuchung der Wirkung von CD wurde eine 5-FC Konzentration von 50 μ M gewählt, die für die Zellen nicht toxisch ist, aber zu 5-FU metabolisiert und unter der

Annahme einer vollständigen Umsetzung einen nachweisbaren zytotoxischen Effekt entfaltet.

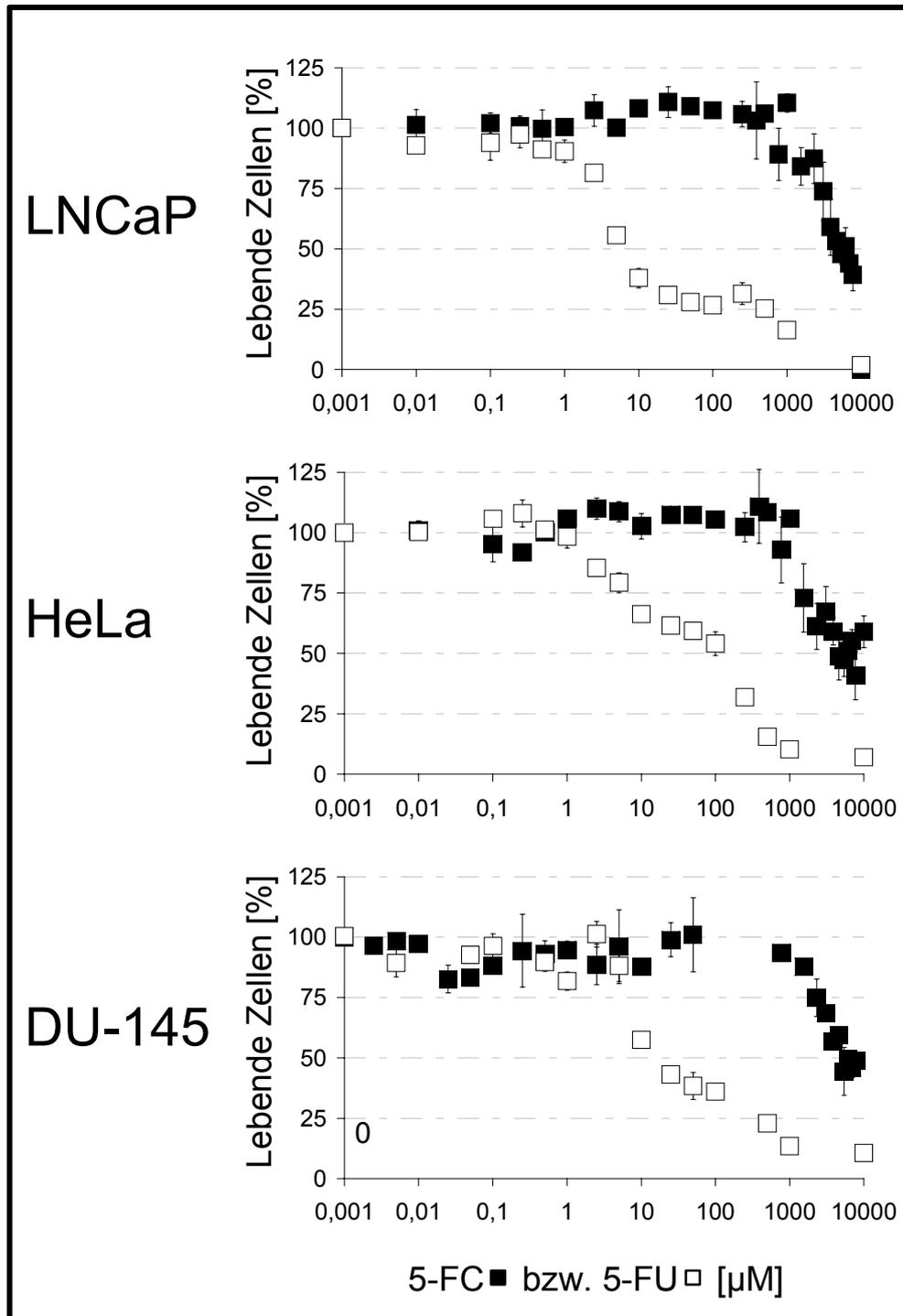


Abbildung 41: Sensitivität von LNCaP, HeLa und DU-145 gegenüber 5-Fc und 5-FU. Die Zellen wurden 24 h nach Auslegen mit den angegebenen Konzentrationen 5-Fc (■) und 5-FU (□) bzw. mit dem Lösungsmittel inkubiert. Drei Tage nach Beginn der Inkubation wurde die Lebendzellzahl mittels XTT Test bestimmt. Die angegebenen Werte geben den Prozentsatz der überlebenden Zellen in Bezug auf die nicht behandelte Kontrolle wieder. Der Versuch wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Aus den Daten wurde für die einzelnen Zelllinien die IC₅₀ für 5-Fc und 5-FU abgeleitet (D).

In den Infektionsexperimenten mit Cytosin Desaminase wurde als Effektor Komponente im Trans-System der adenovirale Vektor AdTREcdinv (vgl.: Abb. 16) gewählt. Das Konstrukt AdTRExinv weist im Gegensatz zu AdtTSx keine intrinsische Aktivität nach Doxycyclinexposition auf (Abb. 31). Daher wurde AdTREcdinv konstruiert und die Trans-Kombination AdPSArtTA/AdTREcdinv auf Gewebespezifität getestet. Zudem war aufgrund des nicht toxischen Charakters der Cytosin Desaminase keine Einschränkung bei der Generierung des adenoviralen Vektors zu erwarten.

Zunächst wurde die Funktionalität der nach Infektion exprimierten CD *in vitro* an Extrakten transduzierter Zellen untersucht. Dazu wurden die Modellzelllinien mit den Adenoviruskombinationen der Trans-Systeme AdCMVrtTA/AdTREcdinv und AdPSArtTA/AdTREcdinv, sowie AdCMVcd und Add170-3 im Dreifachansatz mit MOI 30 infiziert. Nach 48 Stunden wurden Zellextrakte gewonnen und der jeweilige Proteingehalt bestimmt. Die Lysate der einzelnen Infektionsansätze wurden vereinigt und mit 5-FC versetzt. Die Umsetzung in 5-FU wurde anschließend photometrisch bestimmt. Die erhaltenen Werte der enzymatischen Aktivität wurden um den prozentualen Anteil der Umsetzung, der im Ansatz mit dem Lysat der Add170-3 infizierten Zellen bestimmt wurde, korrigiert, da in der verwendeten Formulierung von 5-FC eine thermoinduzierte Umwandlung in 5-FU beschrieben ist (mündliche Auskunft, medizinisch-wissenschaftlicher Dienst, ICN Pharma, Eschwege).

Nach Infektion und Induktion mit Doxycyclin konnte die stärkste Umsetzung in allen drei Zelllinien mit der Vektorkombination AdCMVrtTA/AdTREcdinv beobachtet werden, wobei in HeLa-Zellen eine zweifache Steigerung gegenüber der AdCMVcd infizierten Kontrolle, in DU-145-Zellen dagegen eine zehnfache Steigerung detektierbar war. Aufgrund der nahezu vollständigen Umwandlung in LNCaP-Zellen von 94% kann dieser Wert nicht in Beziehung zu der AdCMVcd infizierten Kontrolle gesetzt werden (Abb. 42), da eine Substratlimitierung nicht ausgeschlossen werden kann. Unter Verwendung des PSA kontrollierten Trans-Systems AdPSArtTA/AdTREcdinv ergab sich nach Induktion mit Doxycyclin eine gewebespezifische Umwandlung von 33% in LNCaP-Zellen, die um den Faktor 1,6 geringer als im entsprechenden Ansatz mit AdCMVcd ausfiel. In HeLa- und DU-145-Zellen war keine gesteigerte Aktivität feststellbar (Abb. 42).

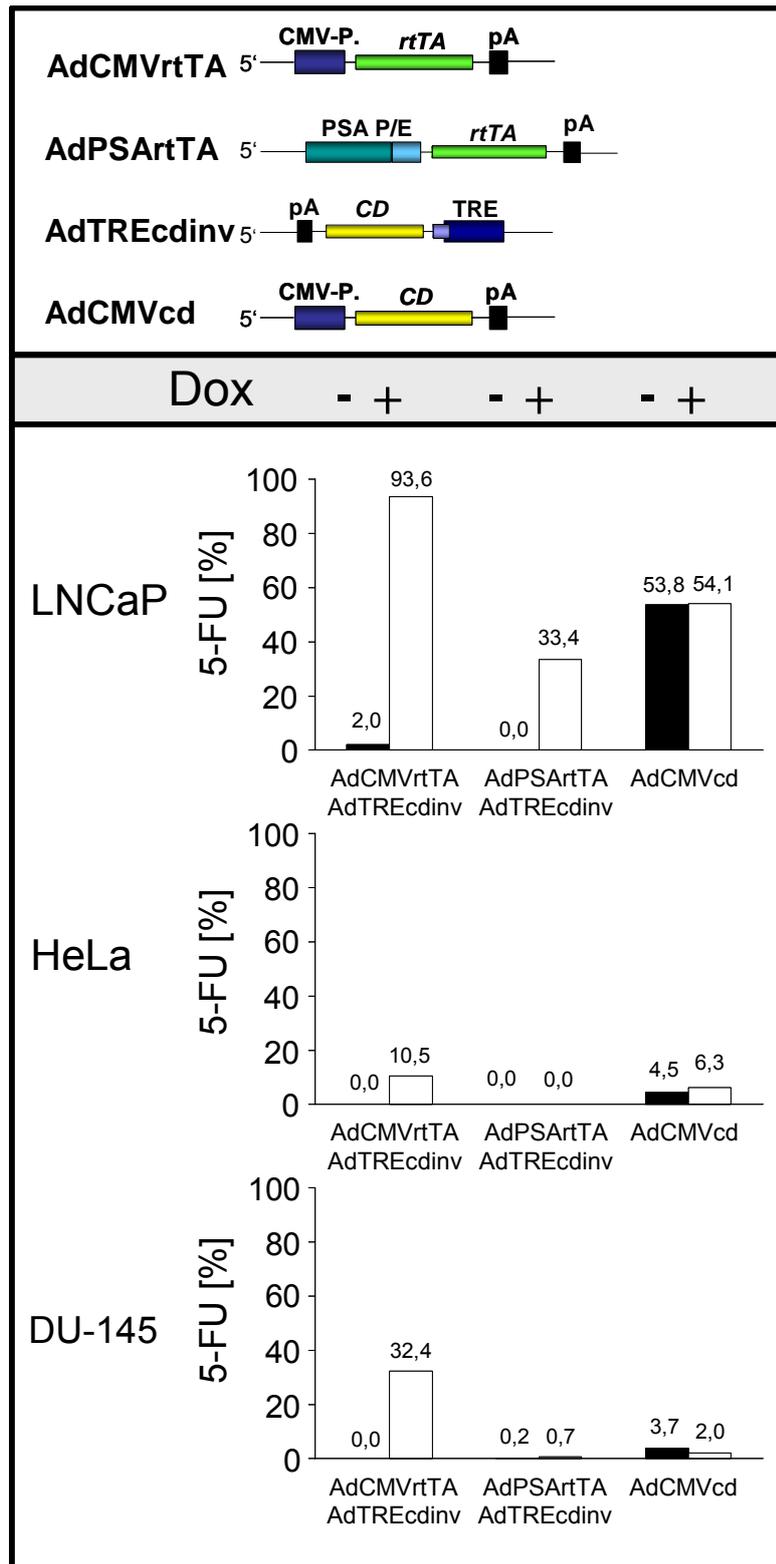


Abbildung 42: *In vitro* Umwandlung von 5-FC zu 5-FU. LNCaP, HeLa und DU-145 wurden mit AdCMVcd und Add170-3 und den Viruskombinationen Add170-3/AdTREcdinv und AdCMVrtTA/AdTREcdinv mit MOI 30 im Dreifachansatz infiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Nach 48 h Inkubation wurden Zellysate gewonnen und die Lysate der einzelnen Parallelinfektionen vereinigt. Die Lysate wurden 24 h bei 37°C mit 5-FC inkubiert. Die anschließende Bestimmung von 5-FC bzw. 5-FU erfolgte photometrisch (vgl.: Formel 1). Die erhaltenen Werte wurden um die Umsetzung, die in mit Add170-3 infizierten Zellen gemessen wurden aufgrund thermoinduzierter Umwandlung von 5-FC in 5-FU während der Inkubation korrigiert. Die weißen Balken stellen die induzierten Ansätze, die schwarzen Balken die nicht induzierten Ansätze dar. Aufgrund der Einzelbestimmung entfallen hier die Fehlerbalken (siehe Text).

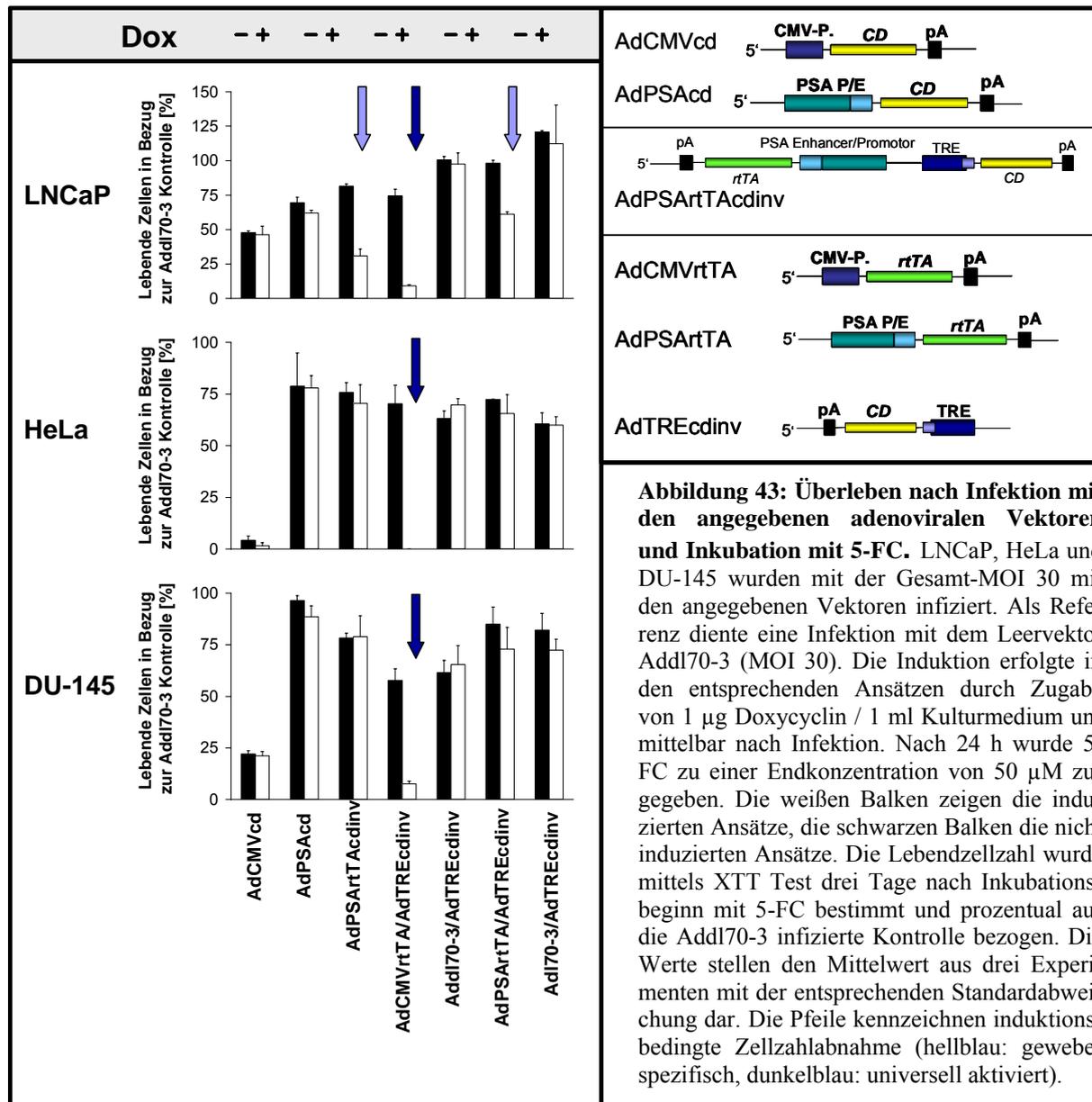
Die aus den Umsetzungen abgeleitete Expressionsstärke des konstitutiven Trans-Systems ist der des CMV-Promotors weit überlegen. Die Kombination AdPSArtTA/AdTREcdinv exprimiert in LNCaP-Zellen gewebespezifisch CD. Diese beiden Resultate sind mit den Luciferase Reporterdaten konsistent.

Zur Evaluierung der therapeutischen Aktivität der Kombination CD/5-FC wurden die Zielzelllinien mit dem Leervektor Addl70-3, mit AdCMVcd, AdPSAc, AdPSArtTAc-dinv und den Kombinationen AdCMVrtTA/AdTREcdinv (1:10) und AdPSArtTA/AdTREcdinv (1:4) im Monolayer mit MOI 30 infiziert. Die Transaktivatorvektoren wurden im Kontrollansatz jeweils mit dem Leervektor Addl70-3 ersetzt. Die Vektoren des konstitutiven Trans-Systems AdCMVrtTA und AdTREcdinv wurden im Verhältnis 1:10, die Vektoren des gewebespezifischen Trans-Systems AdPSArtTA und AdTREcdinv im Verhältnis 1:4 eingesetzt. 24 Stunden nach Infektion wurden dem Medium 5-FC zu einer Endkonzentration im Medium von 50 μ M zugegeben. In den Kontrollinfektionen wurde anstelle von 5-FC das identische Volumen PBS zugegeben. Nach drei Tagen wurde die Zahl der überlebenden Zellen anhand des XTT Assays festgestellt. Die hier angegebenen Überlebensraten wurden prozentual auf das jeweilige Überleben der mit Addl70-3 infizierten Zellen in doxycyclinfreiem bzw. doxycyclinhaltigem Medium angegeben.

Allgemein war in allen Zelllinien, die mit 5-FC inkubiert worden waren, die stärkste Abnahme mit der Kombination AdCMVrtTA/AdTREcdinv im induzierten Zustand zu beobachten. In Bezug auf den jeweiligen nicht induzierten Ansatz betrug die Abnahme bei LNCaP- und DU-145-Zellen 88% bzw. 86%. Nach Induktion waren keine lebenden HeLa-Zellen vorhanden (Abb. 43, dunkelblauer Pfeil).

Eine signifikante, induktionsbedingte Abnahme der Lebendzellzahl konnte, bezogen auf den nicht induzierten Ansatz, in LNCaP-Zellen sowohl mit dem gewebespezifischen Trans-System (Abnahme um 38%), als auch mit dem gewebespezifischen Cis-System (Abnahme um 61%) erreicht werden (Abb. 43, hellblaue Pfeile). In den Kontrollzelllinien war in beiden Fällen keine induktionsspezifische Abnahme der Lebendzellzahl nachweisbar. Die Infektion mit AdCMVcd verringerte in allen drei Zelllinien die Lebendzellzahl. Die Anwesenheit von Doxycyclin hatte hier erwartungsgemäß keinen Einfluss.

Die Notwendigkeit der Potenzierung der gewebespezifischen Expression zeigte sich nach der Infektion mit AdPSAc. Auch hier war nur eine sehr schwache gewebespezifische Zytotoxizität in LNCaP-Zellen im Vergleich mit den Überlebensraten aus anderen Infektionsansätzen nachweisbar (Abb. 43). In HeLa- und DU-145-Zellen zeigte die Infektion mit AdPSAc mit darauffolgender Exposition mit 5-FC keinerlei Effekt.



Bei den Zellen, die nach der Infektion ohne 5-FC inkubiert worden waren, war die Zellzahl in allen Ansätzen konstant geblieben (Daten nicht gezeigt). Lediglich nach Infektion mit der Kombination AdCMVrtTA/AdTREcdinv zeigte sich nach Induktion mit Doxycyclin eine Abnahme der Lebendzellzahl in allen untersuchten Zelllinien. Um ein Artefakt auszuschließen, wurde diese Infektion mit allen drei Zelllinien wiederholt, wobei sich dieser Effekt bestätigte. In LNCaP-Zellen war ein Rückgang der Lebendzellzahl um 67%, in HeLa-Zellen um 23% und in DU-145-Zellen um 79% zu verzeichnen. Bislang ist die Verwendung von CD in extrem potenten Expressionssystemen, wie dem hier beschriebenen, in der Literatur nicht dokumentiert, sodass unspezifische Desaminierungen bei einer hohen Enzymkonzentration in der Zelle eine mögliche Ursache für letale Schädigungen darstellen könnten.

3.4.3 YB-1

YB-1 wurde erst in einem späten Abschnitt der vorliegenden Arbeit als therapeutisches Transgen aufgenommen. Wie Holm et al. (2002) zeigen konnten, führt eine Überexpression und Akkumulation des Transkriptionsfaktors YB-1 im Kern zur Replikation E1-defizienter Adenoviren durch direkte Aktivierung des E2 *late* Promotors. In dieser Arbeit konnte die Replikation eines E1-defizienten Adenovirus, das *YB-1* in der E1-Region unter Kontrolle eines CMV-Promotors trug, mit dem Ziel der Onkolyse bereits gezeigt werden. Allerdings waren sehr hohe MOI nötig, um adenovirale Replikation *in vitro* zu initiieren. Aufgrund der gezeigten Potenzierung der gewebespezifischen Expression durch das Tet-System bestand so die Möglichkeit, neben dem zytotoxischen therapeutischen Transgen bsRNase und dem *Prodrug*-Ansatz mit Cytosin Desaminase und 5-FC, ein gewebespezifisch und induzierbar replizierendes Adenovirus zu generieren.

Die cDNA, die für YB-1 als Fusionsprotein mit NLS und EGFP kodiert, wurde freundlicherweise von Stephan Bergmann (Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) für diese Versuche zur Verfügung gestellt. Die Akkumulation des Proteins im Kern war durch das NLS erleichtert. Daneben war auch eine visuelle Lokalisation des Fusionsproteins sowie die Expressionskontrolle durch EGFP möglich. Die cDNA wurde sequenziert, wobei im Vergleich zur publizierten YB-1 Sequenz eine Mutation an Position 485 festgestellt wurde, die in der so genannten „*Cold Shock Domain*“ liegt. Es handelt sich hier zwar um keine stille Mutation (A→E), sie hat aber keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins (Holm, P.S., persönliche Information). Diese cDNA wurde in ein Shuttleplasmid kloniert, aus dem der bicistronische gewebespezifische adenovirale Vektor AdPSArtAyb1-einv generiert werden konnte (Abb. 44).



Abbildung 44: Schematische Organisation der Expressionskassetten in der E1-Region von AdPSArtAyb1-einv. Die Pfeile stellen die jeweilige Transkriptionsrichtung dar.

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Expression des Fusionsproteins wurden LNCaP-, HeLa- und DU-145-Zellen mit AdPSArtAyb1-einv infiziert. Zur Verstärkung der Transgenexpression und zur universellen Induktion der Onkolyse in PSA negati-

ven Zellen wurde AdPSArtTayb1-einv mit AdCMVrtTA koinfiziert. So kann *in trans* die zur Aktivierung von P_{hCMV*1} ausreichende Menge an rtTA auch in PSA-negativen Zellen zur Verfügung gestellt werden. In beiden Infektionsansätzen wurde die Gesamt-MOI 30 verwendet, für die Koinfektion mit AdCMVrtTA wurde die Ratio 1:10 für AdCMVrtTA : AdPSArtTayb1-einv gewählt.

Im nicht induzierten Zustand konnte visuell in keiner der mit AdPSArtTayb-1e infizierten Zelllinien Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 45). Nach Induktion war die gewebespezifische Expression des Fusionsproteins nur in LNCaP-Zellen feststellbar. Bei HeLa- und DU-145-Zellen war nach Infektion mit dem gewebespezifisch exprimierenden Vektor keine Fluoreszenz zu erkennen.

Die Koinfektion mit AdPSArtTayb-1einv und AdCMVrtTA resultierte uninduziert in einer schwachen Hintergrundexpression in HeLa- und DU-145-Zellen. Nach Induktion war in LNCaP-Zellen eine starke EGFP-Expression erkennbar. In Anwesenheit des konstitutiv von AdCMVrtTA exprimierten rtTA war auch in HeLa- und DU-145-Zellen nach Induktion EGFP Expression nachweisbar (Abb. 46).

Abgesehen von der EGFP-Expression konnte in LNCaP-Zellen nach Infektion mit AdPSArtTayb-1/einv ein starker zytopathischer Effekt (**Cytopathic Effect**: CPE) beobachtet werden, der auf eine, durch virale Replikation bedingte Lyse hinweist. Bei den Kontrollzelllinien HeLa und DU-145 war kein CPE beobachtbar. Nach Koinfektion mit AdCMVrtTA zeigten LNCaP-Zellen nach Induktion einen massiven CPE, bei DU-145-Zellen war dieser Effekt schwächer ausgeprägt und bei HeLa-Zellen kaum mehr zu erkennen (Abb. 46).

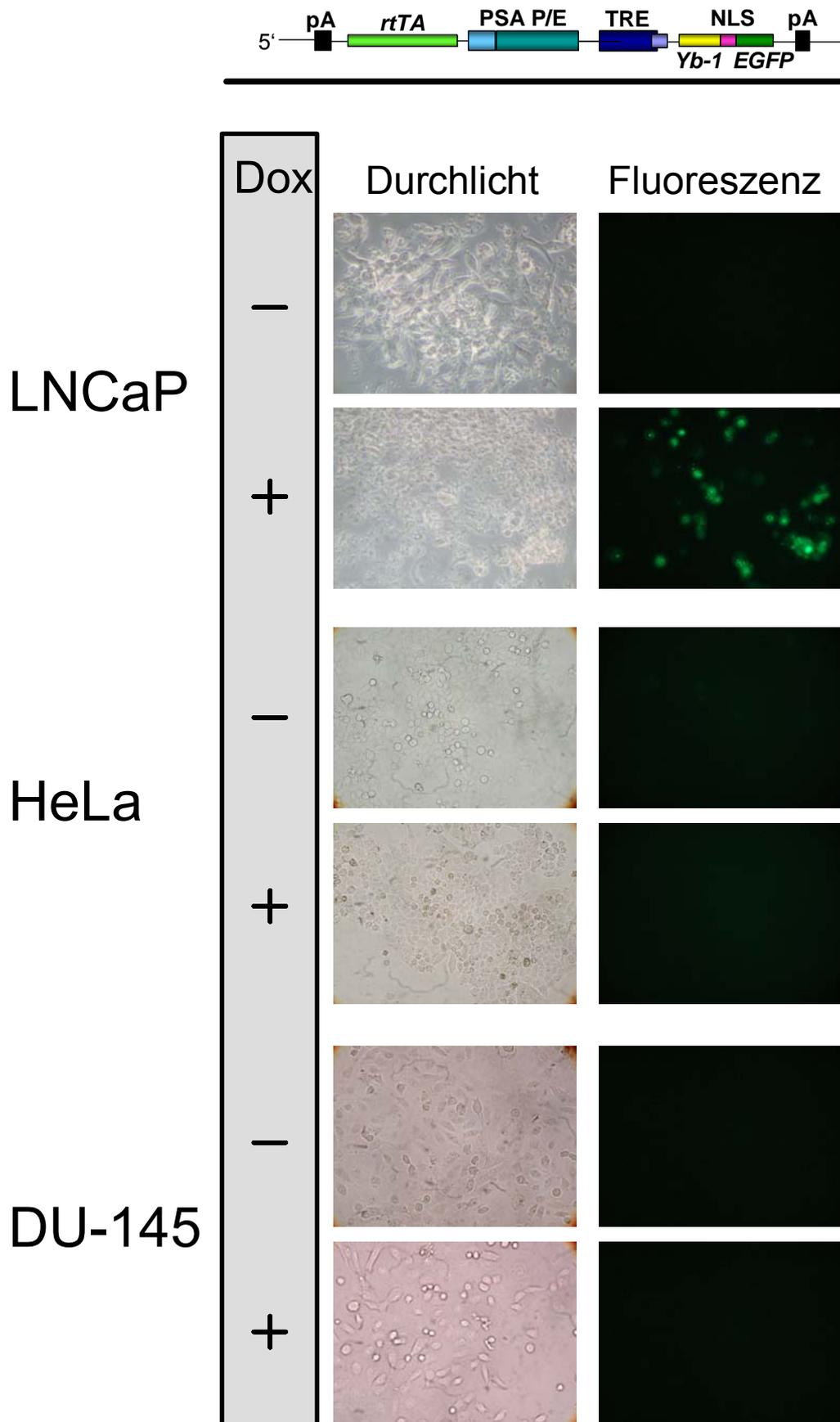


Abbildung 45: LNCaP, HeLa und DU-145-Zellen nach Infektion mit AdPSArtYb-1einv. Die Zellen wurden 72 Stunden nach Infektion aufgenommen (200 x Originalvergrößerung; identische Gesichtsfelder bei Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen). Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium.

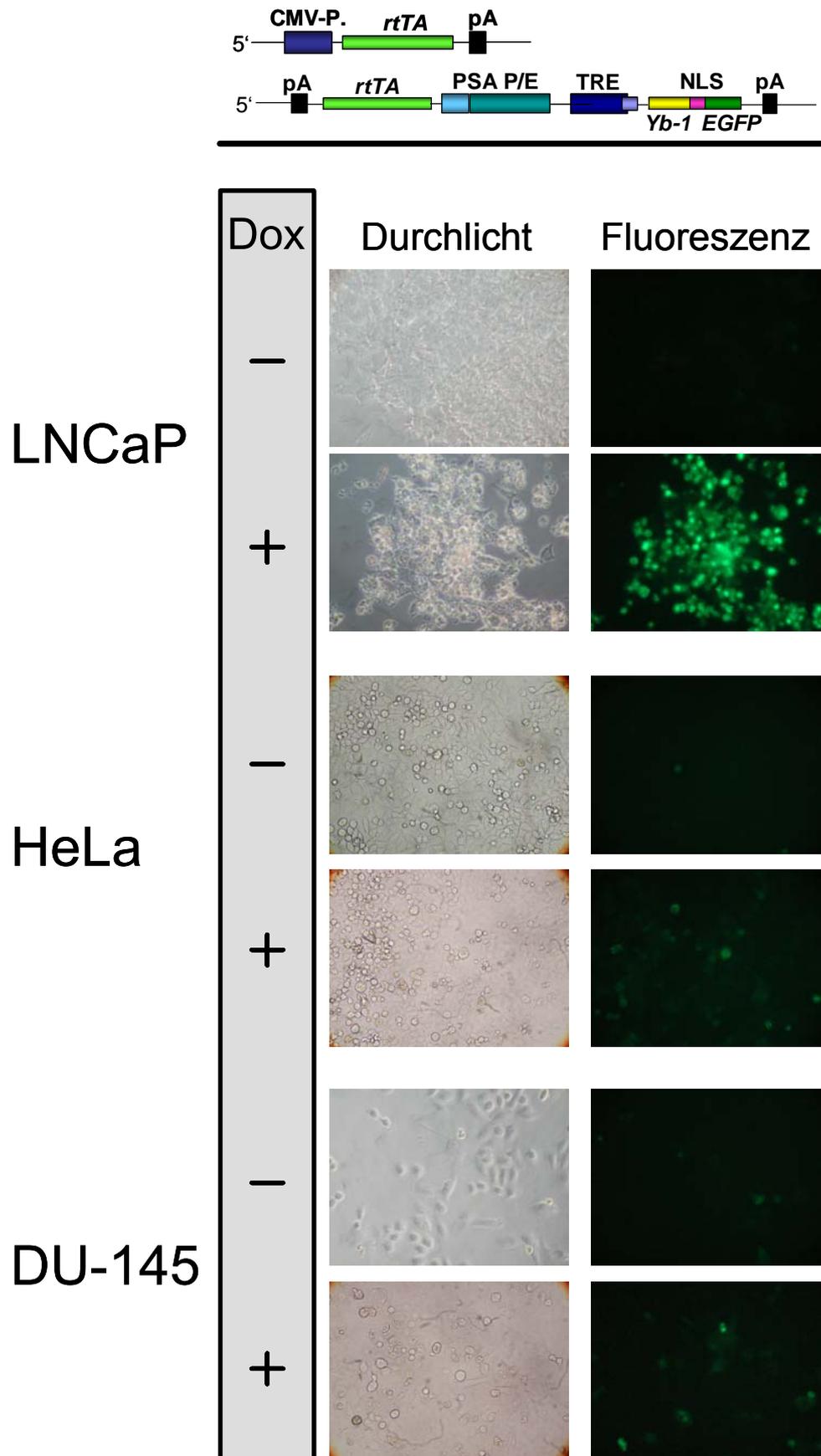


Abbildung 46: LNCaP, HeLa und DU-145-Zellen nach Infektion mit der Kombination AdPSArtYb-1einv/AdCMVrtTA. Die Zellen wurden 72 Stunden nach Infektion aufgenommen (200 x Originalvergrößerung; identische Gesichtsfelder bei Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen). Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium.

Die Lokalisation des Fusionsproteins YB-1/NLS/EGFP wurde in den einzelnen Zelllinien 36 Stunden nach Infektion mit AdPSArtTAYb-1/einv und AdCMVrtTA und Induktion bestimmt (Abb. 47). In LNCaP-Zellen war neben einem schwach grünen Zytoplasma eine eindeutige Akkumulation des Fusionsproteins im Zellkern beobachtbar. Bei DU-145- und HeLa-Zellen war uniform keine derart starke Translokation ins Zytoplasma beobachtbar. In einzelnen Zellen konnten zwar starke Signale im Nukleus detektiert werden, in anderen Zellen lag das Fusionsprotein jedoch ausschliesslich zytoplasmatisch vor (Abb. 47).

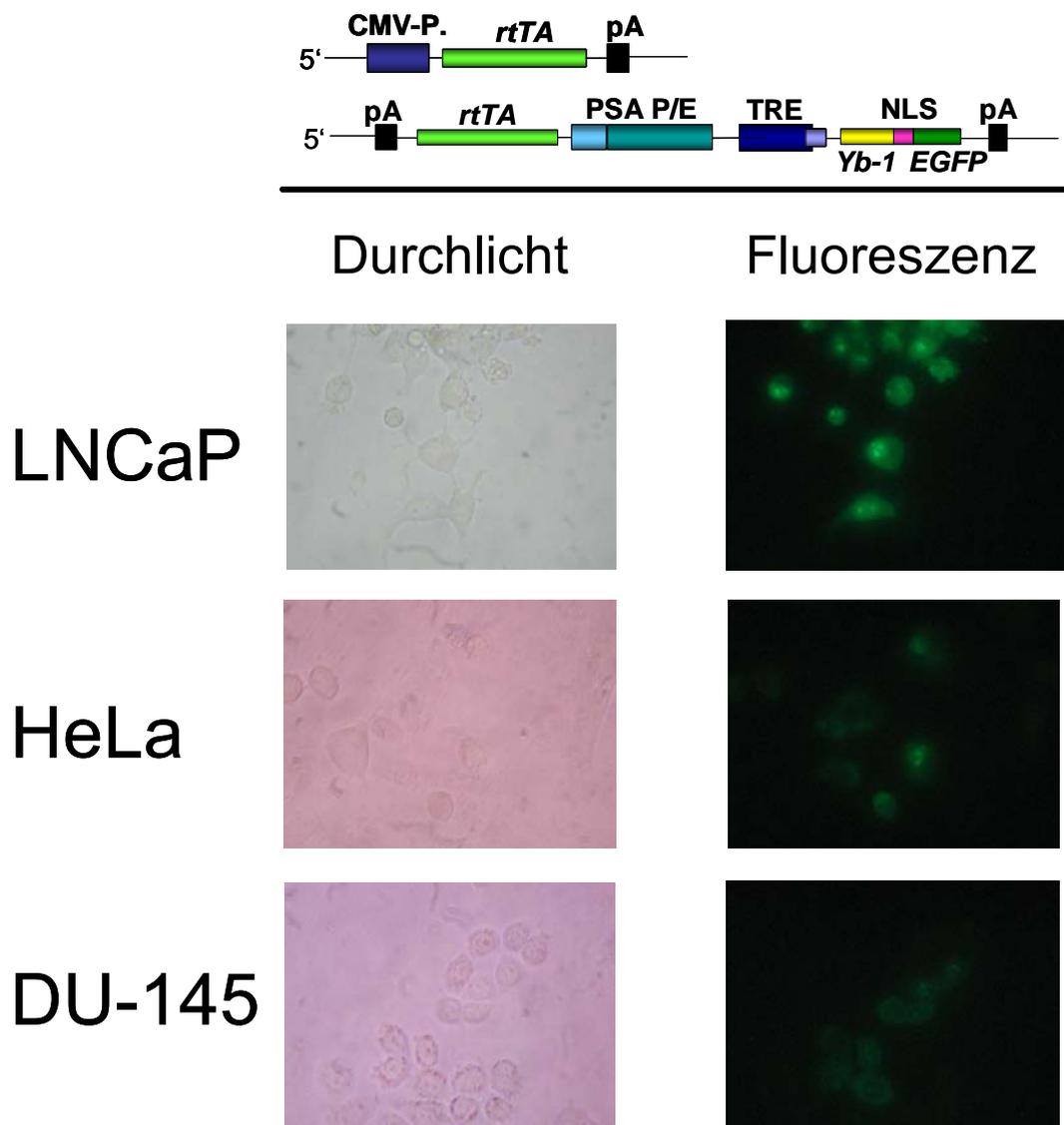


Abbildung 47: LNCaP, HeLa und DU-145-Zellen nach Infektion mit der Kombination AdPSArtTAYb-1einv/AdCMVrtTA im induzierten und nicht induzierten Zustand. Die Zellen wurden 36 Stunden nach Infektion aufgenommen (400 x Originalvergrößerung; identische Gesichtsfelder bei Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen). Die Induktion erfolgte mit 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium.

3.4.3.1 Onkolyse durch YB-1

In dem hier beschriebenen Experiment wurde die onkolytische Wirkung von YB-1 gemeinsam mit einem E1-deletierten Adenovirus untersucht. Dazu wurden die drei Zelllinien jeweils im Dreifachansatz mit AdPSArtTAyb-1/einv (Abb. 44) infiziert.

Daneben wurde die Möglichkeit einer universellen, auch in PSA-negativen Zellen möglichen Aktivierung untersucht. Dazu wurden die Zellen mit AdCMVrtTA und AdPSArtTAyb-1einv in einer Ratio von 1:10 infiziert. Als Kontrolle diente die Infektion mit Addl70-3. Bei allen Infektionen wurde eine Gesamt-MOI von 30 eingesetzt. Die Ansätze wurden jeweils parallel mit doxycyclinhaltigem und doxycyclinfreiem Medium durchgeführt. Vier Tage nach Infektion wurde die Anzahl der überlebenden Zellen mittels XTT Test bestimmt. In allen drei Zelllinien zeigte die Infektion mit Addl70-3 weder mit noch ohne doxycyclinhaltigen Medium Einfluss auf das Überleben der Zellen. Die Infektion mit AdPSArtTAyb-1einv führte nur im induzierten Zustand in LNCaP-Zellen zu einer Abnahme der Lebendzellzahl um 40%. Bei HeLa- und DU-145-Zellen war keine Änderung zu beobachten (Abb. 48). Diese Daten lassen auf die gewebespezifische Abtötung der LNCaP-Zellen durch die Induktion der Transgenexpression von AdPSArtTAyb-1einv schließen.

Die Koinfektion von AdPSArtTAyb-1/einv mit AdCMVrtTA verursachte bereits uninduziert in LNCaP- und HeLa-Zellen einen Rückgang der Lebendzellzahl im Vergleich zur Addl70/3 infizierten Kontrolle. Bei DU-145-Zellen zeigten sich dagegen keine Auswirkungen. Nach Doxycyclingabe waren keine lebenden LNCaP-Zellen mehr nachweisbar, in HeLa hatte die Lebendzellzahl um 74%, in DU-145 um 67% im Vergleich zu den nicht induzierten Proben abgenommen (Abb. 48).

Der Vektor AdPSArtTAyb-1einv kann als induzierbares, gewebespezifisch selektiv replizierendes Virus zur Abtötung von Zellen durch Onkolyse genutzt werden. Zusätzlich entfaltet der Vektor nach Koinfektion mit AdCMVrtTA, unabhängig vom PSA Status der untersuchten Zelllinien, universell einen toxischen Effekt, der ebenfalls auf die onkolytische Wirkung von YB-1 zurückgeführt werden kann.

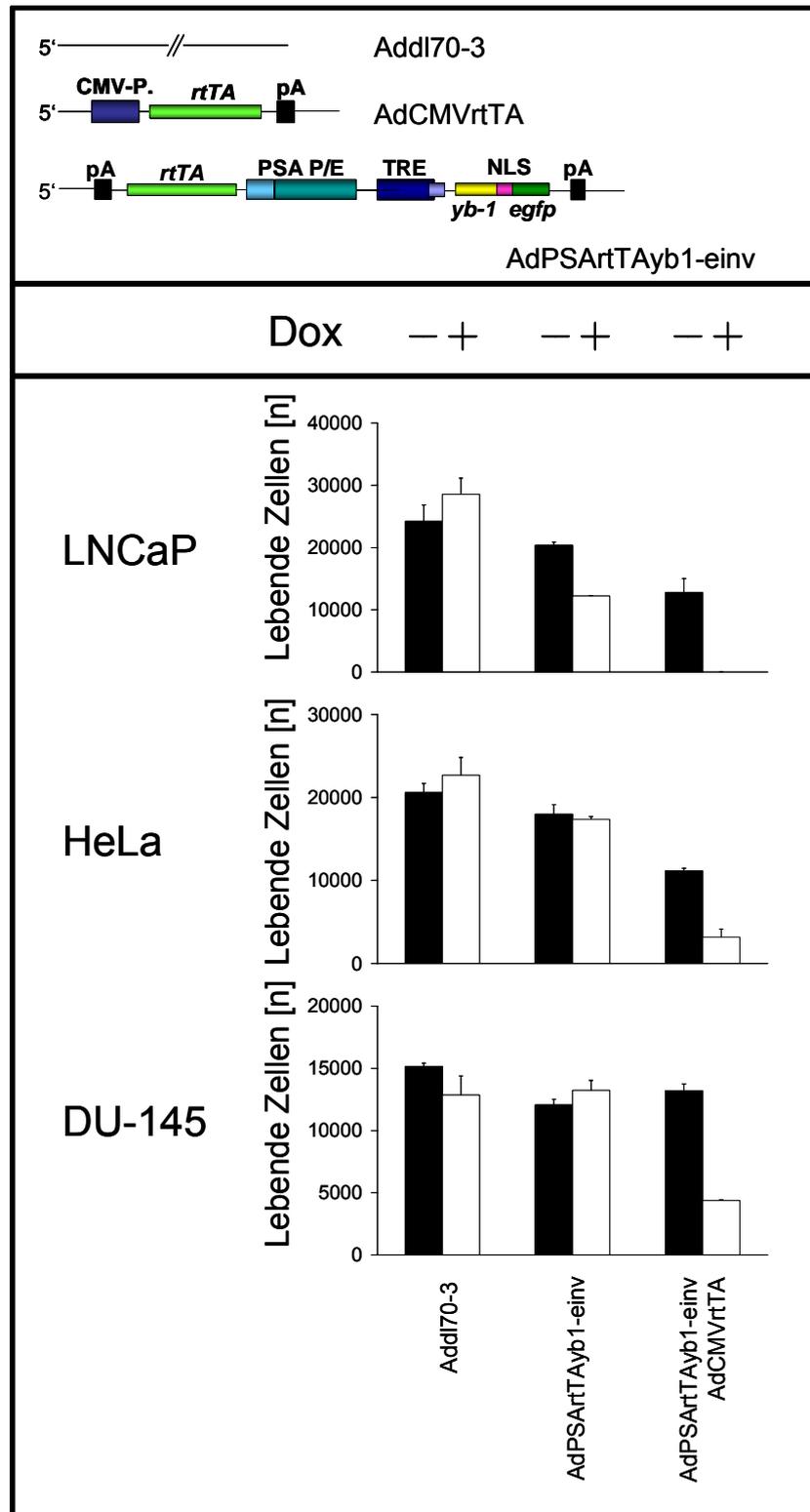


Abbildung 48: Zellyse nach Infektion mit AdPSArtTAyb1-einv und AdPSArtTAyb1-einv/AdCMVrtTA und Induktion. LNCaP (A), HeLa (B) und DU-145 (C) Zellen wurden mit Gesamt-MOI 30 mit mit AdPSArtTAyb1-e und AdPSArtTAyb1-einv/AdCMVrtTA (Ratio 1:10) infiziert. Die Induktion erfolgte in den entsprechenden Ansätzen durch Zugabe von 1 µg Doxycyclin / 1 ml Kulturmedium unmittelbar nach Infektion. Die schwarzen Balken zeigen die nicht induzierten Ansätze, die weißen Balken die induzierten Ansätze. Die Lebendzellzahl wurde mittels XTT Assay (Roche Diagnostics, Mannheim) vier Tage nach Infektion und Induktion bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit der entsprechenden Standardabweichung dar.

4 Diskussion

Das Prostatakarzinom ist in den meisten diagnostizierten Fällen eine unheilbare, progressiv verlaufende Erkrankung, für die es in der konventionellen Medizin nach wie vor keine effektive Therapie gibt. In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung und die *in vitro* Anwendung eines adenoviralen Expressionssystems mit dem Ziel der prostataspezifischen Zytoreduktion beschrieben. Sie wurde durch den Einsatz von bsRNase, bCD und YB-1 als therapeutische Transgene erreicht.

Bei der bsRNase handelt es sich um eine Ribonuklease, die aus der Samenflüssigkeit von Rindern isoliert wurde. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Enzym in gereinigter Form *in vitro* und *in vivo* effektiv und selektiv Tumorzellen abtötet (Matousek 2001). Die Cytosin Desaminase ist ein klassischer Suizidgen-Ansatz, durch deren Expression das nicht toxische 5-FC in den hochtoxische Metaboliten 5-FU umgewandelt wird (Austin und Huber 1993). Der Transkriptionsfaktor YB-1 erlaubt die Replikation E1-defizienter rekombinanter Adenoviren und stellt einen onkolytischen Ansatz dar (Holm et al. 2002).

Aus den Charakteristika der einzelnen Transgene ergibt sich zur effizienten Zytoreduktion die Notwendigkeit einer starken Expression. Eine weitere Anforderung an das Expressionssystem im Fall der bsRNase ist eine möglichst minimierte Expression der Transgene in der Verpackungszelllinie während der Virusbildung und der viralen Replikation, da eine Schädigung dieser Zellen die Virusbildung und die Virusamplifikation stark beeinträchtigen kann.

Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der beschriebenen Genprodukte muss die Expression auf das Zielgewebe limitiert sein, da nach einer Applikation der adenoviralen Vektoren auch die Infektion tumorproximaler Bereiche bzw. die systemische Verbreitung der Vektoren über den Blutstrom nicht auszuschließen ist. Zur Gewährleistung der gewebespezifischen Expression wurden Promotor und Enhancer, die die Expression des prostataspezifischen Antigens regulieren, gewählt (Schuur et al. 1996). Aufgrund der relativen Schwäche dieses Promotors und im Hinblick auf die gewählten therapeutischen Transgene bestand die Notwendigkeit, die Expression unter Beibehaltung der Gewebespezifität zu amplifizieren. Durch die Kopplung des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstandenen PSA Promotor/Enhancer Konstrukts mit dem Tet-On System konnte bei gleichzeitiger Beibehaltung der PSA

tung der PSA P/E vermittelten Gewebespezifität eine induzierbare Amplifikation der Expression erreicht werden.

4.1 Vektorentwicklung

4.1.1 Gewebespezifische Transkriptionskontrolle durch das PSA Promotor/Enhancer Konstrukt.

Rekombinante Adenoviren der ersten Generation verfügen über eine Aufnahmekapazität für ca. acht Kilobasen Fremd-DNA. Die genomische PSA-Promotor/Enhancer Region umfasst ca. 5,8 kb. Daher erschien zu Anfang der Experimente eine Minimierung der regulatorischen Region angebracht, um in Bezug auf die Größe der eingesetzten Transgene und eventueller weiterer einzufügender Sequenzelemente keine unnötigen Einschränkungen zu generieren. Die Charakterisierung der regulatorischen Sequenzen (Schoor et al. 1996) lieferte die Grundlage der Minimierungsstrategie für das in der vorliegenden Arbeit benutzte PSA Promotor/Enhancer Konstrukt (Abb. 10). Dieses PSA P/E Konstrukt zeigte in den durchgeführten Experimenten Androgenabhängigkeit, die mit der endogenen PSA-Expression korrelierte (Abb. 11). Die Expression im adenoviralen Shuttleplasmid war gewebespezifisch und lag bei 2,6% der Expressionsstärke eines CMV-Promotors (Abb. 14). Dieser Wert liegt höher als in der Literatur publizierte Werte (Latham et al. 2000), wobei anzumerken ist, dass bei dem verwendeten Plasmid eine verstärkende Interferenz adenoviraler Regulationselemente 5' der Expressionskassette nicht auszuschließen ist (Leza und Hearing 1988; Hatfield und Hearing 1991).

Diese Expressionsstärke ist für die Anwendung im *Prodrug*-System Cytosin Desaminase/5-Fluorcytosin nicht ausreichend (Yoshimura et al. 2001) und auch die effektive Überexpression von YB-1 mit dem Ziel der Onkolyse erscheint mit diesem Konstrukt unrealistisch (Holm et al. 2002). Für die Expression von bsRNase mit dem Hintergrund einer therapeutischen Anwendung existieren keine Daten, jedoch scheint auch hier die Anreicherung im Zellkulturüberstand bzw. im Tumorgewebe bis zu einer effektiven Konzentration fraglich.

Bislang sind klassische, gewebespezifisch-zytoreduktive Gentherapieansätze mit dem PSA P/E nur unter Verwendung hochtoxischer Transgene, wie etwa der katalytischen Domäne des Diphtherietoxins, erfolgreich realisiert worden (Li et al. 2002).

Gewebespezifische Onkolyse durch virale Replikation konnte durch den Austausch des Promotors des adenoviralen E1A Proteins durch PSA P/E, erreicht werden (Rodriguez et al. 1997). In beiden Fällen ist allerdings, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten therapeutischen Transgenen, die sehr geringe Expressionsstärke des PSA P/E ausreichend, um einen effektiven zytoreduktiven Effekt zu bewirken.

4.1.2 Verstärkung der PSA P/E abhängigen Expression

Ansätze zur Verstärkung der PSA-abhängigen, prostataspezifischen Expression schließen eine parallele Überexpression von mutierten Androgenrezeptoren oder die Modifikation der Enhancer Region ein (Latham et al. 2000; Zhang et al. 2002a). Diese Ansätze waren aber vor dem Hintergrund einer zukünftigen praktikablen gentherapeutischen Anwendung zu komplex bzw. erzielten trotz Expressionsverstärkung keine ausreichenden Expressionslevel und wurden nicht berücksichtigt. Weitere prostataspezifische Promotoren, die im Vergleich zum PSA P/E Konstrukt stärker exprimieren, die Expressionsstärke des CMV-Promotors jedoch nicht erreichen, wurden nach Projektierung dieser Arbeit publiziert, sodass diese im Verlauf nicht berücksichtigt werden konnten (O'Keefe et al. 2000; Zhang et al. 2000; Xie et al. 2001; Gabril et al. 2002; Li et al. 2005)).

Da eine effektive Überexpression therapeutischer Transgene unter alleiniger Kontrolle des PSA P/E Konstrukts unwahrscheinlich erschien, wurden unterschiedliche Möglichkeiten zur Expressionsamplifizierung unter Beibehaltung der Gewebespezifität erwogen. So stellt die Anwendung des Cre-Lox Systems im adenoviralen Hintergrund eine Möglichkeit der gewebespezifischen Induktion dar (Anton und Graham 1995). Durch die gewebespezifisch exprimierte Cre-Rekombinase wird in den Zielzellen eine isolierende DNA-Sequenz deletiert, die zwischen zwei Erkennungsstellen der Rekombinase (*loxP*-Sequenzen) liegt. 5' und 3' der *loxP*-Sequenzen sind Promotor und Transgen lokalisiert, die durch das Rekombinationsereignis die Transkription einleiten können. Dieses System ist in Bezug auf die Generierung eines bicistronischen Vektors nicht geeignet. In 293-Zellen wurde während der Replikation eines adenoviralen Vektors mit EGFP als Reporter gen unter Kontrolle von PSA P/E aufgrund der hohen Kopienzahl viraler DNA eine relativ starke Hintergrundexpression festgestellt (Daten nicht gezeigt). Diese Hintergrundexpression

würde bereits vor Verpacken der viralen DNA zur Expression der Cre-Rekombinase und damit zum Ausschneiden der isolierenden DNA-Sequenz und zur Aktivierung der Transkription führen. Damit kann eine heterogene Viruspopulation entstehen, in der in einem Teil bereits die Transkriptionsaktivierung während der Virusherstellung erfolgt ist.

Zur Expressionspotenzierung wurde schließlich das Tet-On System (Gossen et al. 1995) gewählt. Wie bei einer Reihe ähnlicher Systeme beruht dieses auf der Expression eines Transaktivators, der nach Bindung an spezifische Operatorsequenzen die Transkription des eigentlichen Transgens initiiert. Dies kann konstitutiv oder in Abhängigkeit der Gabe eines Induktors geschehen (Fussenegger 2001). Im Vergleich zu anderen induzierbaren Systemen bietet das Tet-On System neben seiner extensiven Charakterisierung den Vorteil des nicht toxischen Induktors Doxycyclin, der *in vitro* und *in vivo* nur minimale Interferenzen mit dem zu untersuchenden Modell zeigt und zusätzlich eine ausgezeichnete Bioverfügbarkeit besitzt (Nakagawa et al. 2001).

Bei der Realisierung eines adenoviralen gewebespezifischen Expressionssystems, das auf dem Tet-System basiert, besteht die Möglichkeit, die Expressionskassetten des Transaktivators und des therapeutischen Transgens bzw. eines Reportergens auf einem Vektor als bicistronisches Cis-System (Corti et al. 1999) und auf zwei Vektoren als Trans-System zu lokalisieren (Massie et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden im adenoviralen Vektor beide Ansätze mit unterschiedlichen Orientierungen und Kombinationen von Expressionskassetten charakterisiert (Abb. 15 und 16). Da 293-Zellen sensitiv gegenüber dem therapeutischen Transgen bsRNase sind (Abb. 32), wurde zu Beginn das Expressionsverhalten der Vektoren in 293-Zellen untersucht. Vor dem Hintergrund der Generierung eines adenoviralen Vektorsystems in dieser Verpackungszelllinie war eine möglichst minimierte Hintergrundexpression des Transgens essenziell, da eine mögliche Schädigung der Zellen während der viralen Replikation nicht auszuschließen war. Daten in Bezug auf adenoviral vermittelte Expression von bsRNase bzw. Vektorgenerierung existieren nicht. Bisher ist die Expression von bsRNase in selektierten, stabil transfizierten CHO-Zellen unter der Kontrolle des induzierbaren Metallothionein Promotors dokumentiert (Russo et al. 1993).

In den initialen Transfektionsexperimenten zur Charakterisierung der Tet-Konstrukte wurde in den Zellen, die mit dem Cis-Konstrukt pCMVrtALucinv transfiziert waren,

eine hohe Hintergrundexpression beobachtet. Als Ursache kann ein *Cross-Talk* zwischen den Enhancer- und promotorproximalen Elementen des CMV-Promotors mit $P_{hCMV^{*-1}}$ vermutet werden. Die schwache Hintergrundexpression in pPSArtTALuc, pPSArtTAinvluc und pCMVrtTALuc (Abb. 17A) ist auf die räumliche Distanz des TRE zu den Enhancer- und promotorproximalen Elementen der Expressionskassetten des Transaktivators zurückzuführen. So wurde bei adenoviralen Vektoren der dritten Generation und bei der Anwendung von Vektoren auf Plasmidebene, in denen die Expression vom TRE nicht durch virale Regulationselemente beeinflusst wird, nur eine minimale Hintergrundexpression beobachtet (Lamartina et al. 2002; Salucci et al. 2002).

Bei der Untersuchung der Effektorvektoren des Trans-Systems fiel die extrem hohe Hintergrundaktivität von pTREluc in 293-Zellen auf (Abb. 17B). Wenn $P_{hCMV^{*-1}}$ episomal vorliegt, zeichnet sich das Konstrukt in 293-Zellen generell durch eine hohe Basisexpression aus (Freundlieb et al. 1999). Diese konnte durch Invertierung der Expressionskassette stark verringert, aber nicht eliminiert werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Aktivierung von $P_{hCMV^{*-1}}$ durch die bereits erwähnten viralen Regulationselemente schließen, die 5' der Expressionskassette lokalisiert sind, (Leza und Hearing 1988; Hatfield und Hearing 1991; Salucci et al. 2002).

Zu einer weiteren Minimierung der Transgenexpression in Effektorvektoren des Trans-Systems wurde die Tet-abhängige Expressionskassette mit einer Expressionskassette für den transkriptionellen Tet-Silencer (Freundlieb et al. 1999) unter der Kontrolle des CMV-Promotors kombiniert (Abb. 16A und B). Die Basisexpression ist in ptTSluc die geringste der untersuchten Trans-Effektorkonstrukte (Abb. 17B). Wie in einem ähnlichen System beschrieben (Salucci et al. 2002), lag die Basisexpression in ptTSlucinv trotz konstitutiver Expression des tTS weit über den Werten von ptTSluc. Dieser Effekt kann, wie im Konstrukt pCMVrtTALucinv, einem *Cross Talk* zwischen TRE und den proximalen Elementen des CMV-Promotors zugeschrieben werden. Die bicistronischen Vektoren ptTSx bzw. später AdtTSx wurden in der vorliegenden Arbeit als Teil des Trans-Systems eingesetzt.

Eine weitere interessante Strategie für die Generierung eines bicistronischen Vektors ist die Verbindung von rtTA und tTS durch eine *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) Sequenz unter der Kontrolle eines CMV-Promotors in Kombination mit einer Expressionskassette für das eigentliche Transgen (Lamartina et al. 2003). Nachdem das in

das in dieser Arbeit verwendete PSA P/E Konstrukt nur eine sehr schwache Expression aufweist und das Gen *downstream* der IRES Sequenz schwächer als das promotorproximale Gen exprimiert wird (Mizuguchi et al. 2000), würde eine Anwendung im PSA-spezifischen System möglicherweise zu einem abgeschwächten Silencing bzw. einer unzureichenden Aktivierung des TRE führen (Gardaneh und O'Malley 2004).

Die Unterdrückung der Hintergrundexpression durch Einsatz des transkriptionellen Silencers im Rahmen des in dieser Arbeit entstandenen Konstrukts war so effektiv, dass mit AdtTSr erfolgreich ein Vektor generiert werden konnte, der das Transgen für die zytotoxische bsRNase trägt. Ein adenoviraler Vektor mit bsRNase als Transgen, der auf dem Konstruktionsprinzip des Reportervektors AdTRElucinv basieren sollte, konnte dagegen trotz mehrmaliger Versuche nicht realisiert werden. Experimentell wurde diesbezüglich auch eine höhere Hintergrundaktivität von AdTRElucinv im Vergleich zu AdtTSluc während der viralen Replikation festgestellt (Abb. 23).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass mit diesem Ansatz aufgrund der hohen Hintergrundexpression von AdtTSr in HeLa- und DU-145-Zellen vor und insbesondere nach Abdissoszieren des tTS vom TRE und der im Vergleich hohen Empfindlichkeit von LNCaP-Zellen gegenüber bsRNase, keine eindeutig gewebespezifische Abtötung gezeigt werden konnte. Der Einsatz von AdtTSr war hier auf das konstitutive Trans-System beschränkt.

Zu der in der vorliegenden Arbeit angewandten Invertierung der Expressionskassette und der aktiven Reduktion der Hintergrundexpression durch den tTS wurden im Verlauf der Arbeit weitere Strategien zur Generierung adenoviraler Vektoren mit dem Ziel der Minimierung unspezifischer Expression publiziert. So inhibiert die Verwendung von Isolatorsequenzen effektiv den Einfluss von 5' und von 3' Enhancer-Elementen (Steinwaerder und Lieber 2000; Qu et al. 2004). Durch die Insertion einer Expressionskassette unter Kontrolle von $P_{hCMV^{*-1}}$ in der interferenzarmen Nähe des rechten ITR konnte ein binärer adenoviraler Vektor generiert werden, der zusätzlich den Transaktivator unter gewebespezifischer Kontrolle in der E1-Region trägt (Rubinchik et al. 2001a; Rubinchik et al. 2001b). Die Hintergrundaktivität konnte außerdem durch Kombination der Expressionskassetten für rtTA und das TRE-kontrollierte Transgen mit der Expressionskassette für den transkriptionellen Tet-Silencer stark minimiert werden (Rubinchik et al. 2005). In einem weiteren Ansatz

gelang die Reduktion der Hintergrundaktivität durch die Optimierung des P_{hCMV^*-1} (Agha-Mohammadi et al. 2004). Durch diese Ansätze kann die unspezifische Expression nach adenoviral vermittelten Gentransfer tet-abhängiger Expressionskassetten allenfalls verringert werden. Der Hauptgrund dafür ist das episomale Vorliegen der adenoviralen DNA, da nur durch eine Einbettung in die Chromatinstruktur eine optimale Regulation erreicht werden kann (Baron und Bujard 2000). In transgenen Tieren, die das Gen für das hochgiftige Diphtherietoxin unter Kontrolle von P_{hCMV^*-1} tragen, konnte dies ohne jegliche Hintergrundexpression gezeigt werden (Lee et al. 1998).

Die anhand der geringsten Hintergrundaktivität ausgewählten Plasmidkonstrukte zeigten in Transfektionsexperimenten in den unterschiedlichen Zielzelllinien die erwartete Regulation (Abb. 19, 20 und 22), wobei das Cis-Konstrukt pCMVrtTA_{luc} nur sehr geringe Induktions- und Expressionslevel aufwies und daraufhin verworfen wurde. In diesem Stadium wurden die Transfektionen im Trans-System mit äquimolaren Ratios von Transaktivator- und Effektorplasmid durchgeführt. Auf eine empfohlenen Optimierung der Ratios (Baron und Bujard 2000) wurde verzichtet, da für das weitere Vorgehen eine finale Charakterisierung auf adenoviraler Basis notwendig war.

In Arbeiten, die ein adenovirales Zwei-Vektor-System beschreiben, wurde bis auf wenige Ausnahmen (Mizuguchi und Hayakawa 2001; Xu et al. 2003) die gleiche Anzahl Transaktivator- und Effektorviren eingesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen optimalen Verhältnisse (Abb. 24-26) stimmen allerdings nicht mit den zitierten überein. Es ist anzumerken, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten rtTA um die modifizierte, im Hinblick auf Induzierbarkeit und Doxycyclinsensitivität verbesserte Variante rtTA2^S-M2 handelt (Urlinger et al. 2000). So war es möglich, den Anteil des Effektorvirus zu erhöhen, was eine gesteigerte Expression bei einer unwesentlichen Erhöhung der nicht induzierten Hintergrundexpression mit sich brachte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Trans-System gewebespezifische und konstitutive Aktivierung gezeigt werden. Allerdings blieb die gewebespezifisch induzierte Expression in LNCaP-Zellen auch mit einem optimierten Transaktivator/Effektorvirus Verhältnis weit unter den Werten, die mit dem rtTA erzielt wurden, dessen Expression durch den CMV-Promotor gesteuert wurde (Abb. 28-31). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte im Tet-System die gewebespezifische Aktivierung im Rahmen einer positiven Rückkopplungsschleife durch Kombination des ge-

webespezifischen Promotors mit dem TRE massiv verstärkt werden (Woratanadharm et al. 2004).

Die hier gezeigten, durch Anpassung der Ratio von Effektor- und Transaktivatorvektor optimierten Expressionslevel übersteigen die des CMV-Promotors im gewebespezifischen wie auch im konstitutiven Trans-System bei Weitem. In HeLa-Zellen, der Zelllinie, die in Bezug auf die Anwendung im Tet-System am ausführlichsten charakterisiert ist, lag die maximale Expression im Trans-System mit AdtTSluc 41-fach höher, mit AdTRElucinv 47-fach höher als in AdCMVluc infizierten Kontrollen. Diese verstärkte Expression konnte in adenoviralen Expressionssystemen (Massie et al. 1998), wie auch in stabil transfizierten Zellen gezeigt werden (Yin et al. 1996). So wurde in HeLa-Zellen, die unter der Prämisse der minimalen Hintergrundexpression selektiert wurden, eine Expressionsstärke nachgewiesen, die 35-fach über der des CMV-Promotors lag.

In DU-145- und LNCaP-Zellen wurde im Vergleich zu HeLa-Zellen mit dem konstitutiven Trans-System mit beiden Effektorvektoren eine noch stärkere Expression festgestellt (Abb. 29 und 31). Dies korreliert mit Erkenntnissen, dass bereits die Aktivität des TRE in unterschiedlichen Zelllinien sehr stark variiert (Ackland-Berglund und Leib 1995; Hoffmann et al. 1997; Freundlieb et al. 1999) und auch die Expressionsstärken und Induktionsfaktoren von der jeweiligen Zelllinie abhängen (Hoffmann et al. 1997). In diesem Zusammenhang wird die unspezifische Aktivierung des $P_{hCMV^{*-1}}$ durch die in unterschiedlichen Zelllinien differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren diskutiert (Baron und Bujard 2000).

Neben der dem $P_{hCMV^{*-1}}$ -intrinsischen Hintergrundaktivität wurde auch die möglicherweise ebenfalls zelltypabhängige unspezifische Aktivierung des TRE durch den rtTA in Abwesenheit von Doxycyclin beobachtet, die jedoch im Kontext dieser Arbeit nur von geringer Bedeutung ist. Im Trans-System wurde nach Koinfektion mit AdCMVrtTA und AdTRElucinv in DU-145- und LNCaP-Zellen uninduziert im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne AdCMVrtTA ein Anstieg der Luciferaseexpression beobachtet (Abb. 31). Im Trans-System mit AdtTSluc als Effektor Komponente war nur noch in LNCaP-Zellen eine gesteigerte Expression im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (Abb. 29).

Das in dieser Arbeit verwendete rtTA2^S-M2 (Urlinger et al. 2000) zeichnet sich im Gegensatz zur ursprünglichen Variante des rtTA (Gossen et al. 1995) durch eine erhöhte Induktionsspezifität aus. In rtTA2^S-M2 ist die unspezifische Bindung an das TRE in Abwesenheit von Doxycyclin bei gleichzeitig erhöhter Bindungsaffinität gegenüber dem Induktor minimiert, sodass bereits Spuren von Tetra- bzw. Doxycyclin, dessen Einsatz in der Veterinärmedizin weit verbreitet ist, im FKS des Zellkulturmediums Ursache für die unspezifische Bindung und Transkriptionsaktivierung sein können (Meyer-Ficca et al. 2004).

Im Verlauf dieser Arbeit gelang die Entwicklung und Charakterisierung induzierbarer Expressionssysteme. Durch transkriptionelle Kontrolle des rtTA durch entsprechende Promotoren kann die Induktion gewebespezifisch und konstitutiv-universell erfolgen. Ein weiteres, auffälliges Merkmal dieser Expressionssysteme sind die außerordentlich starken Expressionslevel, die sowohl im gewebespezifischen als auch im konstitutiv-universellen Kontext erreicht werden und teilweise weit über denen des CMV-Promotors liegen. Durch die Möglichkeit der Modulation der Expressionsstärke durch Anpassung der Doxycyclinkonzentration (Urlinger et al. 2000) eröffnet sich für diese Vektorsysteme ein weites Anwendungsspektrum.

4.2 Therapeutische Transgene

4.2.1 *bsRNase*

Die Behandlung von Krebs war, neben chirurgischen Eingriffen, bis vor wenigen Jahren fast vollständig auf den Einsatz von aggressiven Chemotherapeutika und auf Strahlentherapie beschränkt. Durch den rapiden Fortschritt der Biotechnologie und ihrer zunehmenden Anwendung in der modernen Medizin eröffnen sich radikal neue Möglichkeiten in der Tumorthherapie, wie etwa Antikörpertherapien (Stern und Herrmann 2005) oder das breite Anwendungsfeld der somatischen Gentherapie (vgl.: 1.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines gentherapeutischen Ansatzes das zytotoxische Potenzial von *bsRNase*, einer Ribonuklease, die originär in der Samenflüssigkeit von Rindern vorkommt, gegenüber Tumorzellen untersucht. *bsRNase* gehört zur Gruppe der so genannten RISBasen (*Ribonucleases with Special Biological Activity*). Der am intensivsten charakterisierte Vertreter dieser Gruppe

ist die OnconaseTM, eine Ribonuklease, die aus dem Laich des Frosches *Rana pipiens* isoliert wurde und deren Antitumoraktivität derzeit in klinischen Studien der Phase III untersucht wird (Gorbatyuk et al. 2004). OnconaseTM zeigt zwar im Vergleich mit bsRNase eine stärkere Wirkung gegenüber Tumoren, allerdings wurde im Mausmodell nach systemischer Gabe auch eine stark erhöhte Toxizität gegen Knochenmarkszellen und testikuläres Gewebe festgestellt (Matousek et al. 2003). Im Hinblick auf diese ernststen Nebenwirkungen wurde in der vorliegenden Arbeit das therapeutische Potenzial von bsRNase untersucht, die transgen nach adenoviral vermitteltem Gentransfer in den Zielzellen exprimiert wurde.

Ein zentrales und generelles Problem bei der systemischen Gabe von RISBAEn in der experimentellen Tumorthherapie ist die geringe Stabilität im Blutstrom. Therapeutisch effektive Konzentrationen im Tumor können so nur schwer erreicht werden (Soucek et al. 2001). Vor diesem Hintergrund konnte die Stabilität und die Effizienz von RISBAEn, darunter auch die der bsRNase, durch Kopplung an Polymere gesteigert werden (Soucek et al. 2001; Soucek et al. 2002; Pouckova et al. 2004). In weiteren Ansätzen wurden RISBAEn im Hinblick auf eine verbesserte Akkumulation im Zielgewebe mit Antikörpern gekoppelt (Newton et al. 2001; De Lorenzo et al. 2002) oder rekombinant als Fusionsproteine spezifischer Antikörper dargestellt (Deonarain und Epenetos 1998). Mit der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten gentherapeutischen Strategie einer adenoviral vermittelten Expression von bsRNase *in situ* könnten über einen längeren Zeitraum intratumoral bzw. tumorproximal therapeutisch ausreichende Spiegel gewährleistet werden.

In dem hier beschriebenen Ansatz konnte erstmals die transgene Expression von bsRNase nach adenoviralem Gentransfer in Tumorzellen und die Zytotoxizität gegenüber den Produzentenzellen demonstriert werden. Alle bisher beschriebenen Untersuchungen zur Zytotoxizität von bsRNase wurden ausschließlich mit nativer gereinigter bsRNase oder mit dem in *E. coli* exprimiertem Protein durchgeführt. Bislang ist nur ein Ansatz dokumentiert, in dem bsRNase in einem eukaryontischen System exprimiert worden war (Russo et al. 1993). In dieser Arbeit lag der Fokus allerdings auf der Expression des funktionalen rekombinanten Proteins und nicht auf der Zytotoxizität bzw. dem therapeutischen Potenzial der bsRNase.

In Reinsubstanz tötet dieses Enzym sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Krebszellen effektiv ab (Matousek 2001), wobei allerdings Unterschiede in der Sensitivität der Ziel-

zellen gegenüber der bsRNase beobachtet wurden (Kim et al. 1995c; Kotchetkov et al. 2001). Diese Beobachtungen konnten mit den hier untersuchten Zelllinien bestätigt werden (Abb. 32), wobei HeLa- und DU-145-Zellen eine ähnliche Sensitivität gegenüber bsRNase zeigten. Weitaus empfindlicher reagierten LNCaP-Zellen. Die im Hinblick auf die Generierung eines adenoviralen Vektors mit bsRNase als Transgen ebenfalls untersuchten 293-Zellen waren im Vergleich zu DU-145 und HeLa-Zellen weitaus sensitiver, was die Entwicklung eines besonders dicht regulierten Vektors implizierte. Bereits in den Arbeiten, in denen bsRNase als Transgen in einer stabil transfizierten Zelllinie exprimiert wurde, musste die Genexpression während der Klonselktion und der Zellamplifikation, in diesem Fall mit dem durch Zinksulfat induzierbaren Metallothionein IIA Promotor, unterdrückt werden (Russo et al. 1993). Ein weiteres Indiz für die Notwendigkeit einer induzierbaren bzw. regulierbaren Expression zeigte sich auch in der direkten Generierung adenoviraler Vektoren mit bsRNase als Transgen. In dieser Arbeit konnte ein solcher Vektor im Trans-System nur in Kombination mit dem transkriptionellen Tet-Silencer (tTS) generiert werden. Versuche, adenovirale Vektoren in Konstrukten auf Basis von AdTREx und AdTRExinv zu generieren, schlugen trotz mehrmaliger Versuche fehl, was auf die erhöhte Hintergrundexpression des toxischen Transgens während der adenoviralen Replikation zurückzuführen sein könnte. Die Expressionsaktivität des Cis-Vektors AdPSArTArinv konnte diesbezüglich auf Reporterebene nicht in 293-Zellen getestet werden, allerdings lassen die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten mit dem entsprechenden Plasmid auf eine verhältnismäßig schwache Hintergrundaktivität schließen.

Die Funktionalität der bsRNase kodierenden Vektoren AdtTSr und AdPSArTArinv konnte hinsichtlich der Expression des Transgens in allen drei Zelllinien im Western Blot gezeigt werden (Abb. 35, 36 und 37), darüber hinaus bestätigte die Intensität der erhaltenen Signale der einzelnen Vektorkombinationen die Daten, die in den Versuchen mit den Reporterviren erhoben wurden.

Bislang konnte der Abbau von rRNA *in vitro* nach Exposition mit geringter bsRNase dokumentiert werden (Mastronicola et al. 1995; Wu et al. 1995). Die katalytische Funktion der transgen exprimierten bsRNase konnte in einem initialen Experiment gezeigt werden. Ribosmale RNA aus einer Gesamt-RNA Präparation aus 293 Tet-On Zellen, in denen AdtTSr replizierte, war bereits im nicht induzierten Zustand im Vergleich mit einem Ansatz mit dem Leervirus Add170/3 degradiert (Abb. 33). Nach Zu-

gabe von Doxycyclin waren keine Signale für ribosomale RNA im Gel erkennbar. In diesem Experiment konnten keine sinnvollen Kontrollen in Bezug auf die Integrität der RNA-Präparation durchgeführt werden. Allerdings korrelieren die nach Northern Hybridisierung mit einer Sonde gegen bsRNase erhaltenen Signale stark mit dem Degradationsgrad der rRNA. Damit kann durchaus ein starker Zusammenhang zwischen der Transkription von bsRNase, dem Nachweis des Enzyms im Medienüberstand im Western Blot und der Degradation der rRNA vermutet werden.

Die Signale für bsRNase aus dem Zellkulturüberstand im Western Blot, entsprechen den aus den Versuchen mit den Reporterviren erhaltenen Expressionsmustern (Abb. 35-37). Eine gewebespezifische Induktion der Expression von bsRNase konnte im Trans-System unter Verwendung der Vektorkombination AdPSArtTA/AdtTSr in LNCaP-Zellen gezeigt werden. In den PSA negativen Zelllinien HeLa und DU-145 entsprachen die Expressionsmuster der mit AdPSArtTA/AdtTSr infizierten Ansätze denen der Kontrolle ohne Transaktivatorvektor, sodass die beobachteten Induktionseffekte dem Abdissoziieren des transkriptionellen Tet-Silencers zuzuschreiben sind. In LNCaP-Zellen hingegen war eine Induktion in der Kombination AdPSArtTA/AdtTSr im Vergleich mit dem Ansatz ohne Transaktivator zu beobachten (Abb. 36).

Da die Zielzelllinie LNCaP im Vergleich zu HeLa-Zellen 80-mal sensitiver und im Vergleich zu DU-145-Zellen 72-mal sensitiver gegenüber der Exposition mit gereinigter bsRNase reagierten, konnte in diesem System eine gewebespezifische Abtötung von LNCaP-Zellen trotz gezeigter Gewebespezifität der Expression nicht nachvollziehbar und plausibel demonstriert werden. Ein weiterer Grund dafür sind die zelltypabhängigen Unterschiede in den Expressionsstärken im induzierten und im nicht induzierten Zustand. Aufgrund dieser Fakten, die sich im Laufe der Arbeit ergaben, wurde bei den weiteren Experimenten zu einer erstmaligen Charakterisierung von bsRNase als Transgen im adenoviralen Vektorhintergrund die Strategie einer konstitutiven Expression verfolgt.

Die eigentliche katalytische Wirkung entfaltet bsRNase an ribosomaler RNA und beeinträchtigt in der Folge die Proteinbiosynthese bzw. bringt diese zum Erliegen. In diesem Zusammenhang wurden bereits Untersuchungen zur Proteinbiosynthese in Zellen, die mit bsRNase als Reinsubstanz inkubiert worden waren, durchgeführt (Wu et al. 1995; Bracale et al. 2002). Die Beeinflussung der Proteinbiosynthese durch bsRNase wurde in diesen Arbeiten durch den Einbau radioaktiver Aminosäuren cha-

rakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine alternative Methode zur Bestimmung der Proteinbiosyntheserate entwickelt. Diese indirekte Methode beruht auf dem Einsatz eines Surrogatmarkers für die Proteinbiosynthese, in diesem Fall der Luciferaseexpression. Die untersuchten Zellen wurden, zusätzlich zu den eigentlich zu charakterisierenden adenoviralen Vektoren, mit einem adenoviralen Vektor infiziert, der Luciferase aus *Photinus pyralis* unter Kontrolle des CMV-Promotors als Transgen trägt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit dieses Reporterproteins war es möglich, Schädigungen an den Ribosomen und damit Änderungen in der Proteinbiosynthese anhand der Luciferaseexpression sehr sensitiv zu nachzuweisen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch Li und Kollegen (2002) bei der Charakterisierung der Ribosomenschädigung während der transgen vermittelten Expression von Diphtherietoxin durch Transfektion eines für Luciferase kodierenden Plasmids. Diesem Prinzip unterliegt auch die Methode, die toxizitätsbedingte Schädigung von Ribosomen in einem zellfreien Ansatz durch Translation von Luciferase zu demonstrieren (Hale 2001).

In allen drei Zelllinien konnte 36 Stunden nach Infektion mit der Vektorkombination AdCMVrtTA/AdtTSr und Induktion eine Abnahme der Luciferaseexpression im Vergleich zum nichtinfizierten Ansatz festgestellt werden (Abb. 38). Damit wurde die Schädigung der Ribosomen nach Expression von bsRNase, zusätzlich zur gezeigten Degradation, auch funktional nachgewiesen. Gleichzeitig konnte, wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt (Wu et al. 1995), die Zytotoxizität der bsRNase durch die Abnahme der Lebenszellzahl in den induzierten Ansätzen demonstriert werden (Abb. 39).

Die Quantifizierung der zelllinienspezifischen Abnahme der Luciferaseexpression und des Zellüberlebens untermauern die Ergebnisse aus den Vorversuchen bezüglich der Infizierbarkeit der Zelllinien, ihrer Sensitivität gegenüber bsRNase sowie den Expressionsstärken und der Hintergrundaktivität der Vektorkombination. Allerdings sind diese Zusammenhänge außerordentlich komplex, sodass eine Gewichtung der erwähnten Einzelfaktoren schwer möglich ist. Um die erhaltenen Daten zur Proteinbiosynthese und der letalen Zellschädigung nach 80 Stunden (Abb. 38) sinnvoll interpretieren zu können, wäre zusätzlich eine Bestimmung der Konzentration effektiver bsRNase während der Inkubation im Medium notwendig. So könnte in LNCaP-Zellen bei hoher Sensitivität eine schnelle partielle Inaktivierung der Ribosomenaktivität die Syntheserate der bsRNase stark verringern und so im Zu-

sammenspiel mit aus dem Zytosol abgetöteter Zellen freigesetzter Proteasen die Spiegel effektiver bsRNase gering halten. In HeLa-Zellen, die sich im Vergleich mit LNCaP-Zellen gegenüber der Reinsubstanz als weit weniger sensitiv erwiesen, kann dagegen das Transgen so lange effizient synthetisiert werden, bis die Konzentration im Medium ein Schwellenwert überschritten hat und so eine hocheffiziente Schädigung der Ribosomen und schließlich die Abtötung der Zellen erfolgt. Aufgrund der fehlenden Daten zur Konzentration der bsRNase im Medium können die erhaltenen Ergebnisse aus den Gentransferexperimenten nicht direkt mit bereits publizierten Experimenten zur ribosomalen Schädigung und zur Toxizität verglichen werden, da in diesen Versuchen ausschließlich die Reinsubstanz in definierten Konzentrationen verwendet wurde.

Die Exposition von Tumorzellen mit bsRNase kann Apoptose induzieren (Piccoli et al. 1999; Marinov und Soucek 2000; Spalletti-Cernia et al. 2003). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit mit HeLa- und DU-145-Zellen demonstriert werden (Abb. 40), wobei die Induktion von Apoptose nicht ausschließlich auf das Erliegen der Proteinbiosynthese zurückgeführt werden kann. Die in diesem Zusammenhang wird die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase und die Akt-Phosphorylierung (Spalletti-Cernia et al. 2003) diskutiert. Auf die Untersuchung dieser Aspekte wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die adenoviral vermittelte transgene Expression von bsRNase verursacht *in vitro* eine effektive Störung der Proteinbiosynthese und eine stark zytotoxische Wirkung gegenüber den Tumorzelllinien LNCaP, HeLa und DU-145. Die hier dargestellten Experimente zeigen einen neuen möglichen Weg auf, die bisher dokumentierte Antitumoraktivität von bsRNase (Matousek 2001) in einem innovativen gentherapeutischen Ansatz zu nutzen. Durch die Möglichkeit der *in situ* Applikation der Vektoren könnte das therapeutische Potenzial von bsRNase in Reinsubstanz, das bislang *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte, lokalisiert und über einen längeren Expressionszeitraum im Tumor besser ausgeschöpft werden.

Neben der Anwendung der dimeren Form der bsRNase als Transgen im adenoviralen Hintergrund ist mit dem vorgestellten Vektorsystem auch die Expression der modifizierten tumortoxischen monomeren Form von bsRNase (Lee und Raines 2005) und anderer RISBasen wie etwa der OnconaseTM und weiterer in Bezug auf

Immunogenität und Effizienz gentechnisch optimierter Ribonukleasen denkbar (Huber et al. 1994; Lawrence et al. 1998).

4.2.2 Cytosin Desaminase

Zur weiteren Charakterisierung der vorgestellten Vektorsysteme hinsichtlich der gewebespezifischen Zellabtötung wurde das Suizidgen Cytosin Desaminase aus *Escherichia coli* (bCD) als Transgen gewählt.

bCD katalysiert die Desaminierung der nicht toxischen Vorläufersubstanz (*Prodrug*) 5-Fluorcytosin (5-FC) zu 5-Fluoruracil (5-FU), einem etablierten Wirkstoff in der Krebstherapie. 5-FU wird systemisch eingesetzt, wobei allerdings die therapeutisch effektive Dosis zu starken systemischen Nebenwirkungen führt. Eine Möglichkeit, die systemische Toxizität zu verringern, ist die Expression von bCD im Tumor, sodass nach Gabe von 5-FC in den infizierten Tumorzellen lokal 5-FU gebildet werden kann. 5-FU kann nach seiner Bildung passiv aus der Zelle diffundieren und durch den so genannten *Bystander*-Effekt benachbarte, nicht infizierte Zellen schädigen (Huber et al. 1994; Lawrence et al. 1998). bCD ist damit anderen Suizidgenen hinsichtlich des entfalteten *Bystander*-Effekts, wie etwa der herpesviralen Thymidinkinase (Mesnil et al. 1996), weit überlegen.

bCD ist in der Literatur als nicht toxisches Transgen beschrieben und schädigt, im Gegensatz zu bsRNase, abgesehen von replikationsbedingten Beeinträchtigungen, die Verpackungszelllinie bei der Generierung von adenoviralen Vektoren nicht. Dieser Umstand erlaubte für das Trans-System die Generierung des monocistronischen Effektorvektors AdTREcdinv, der sich von dem Reportervektor AdTRElucinv ableitet. Im Gegensatz zu den beschriebenen bicistronischen Effektorvektoren AdtTSluc bzw. AdtTSr, die zusätzlich den transkriptionellen Tet-Silencer (tTS) tragen, kann hier durch das Fehlen des tTS keine intrinsische Aktivierung stattfinden. Alle Expressionsaktivierungen nach Induktorgabe werden in diesen Vektoren durch Bindung des Transaktivators bedingt, der im vorliegenden Kontext konstitutiv bzw. gewebespezifisch vom entsprechenden Vektor AdCMVrtTA bzw. AdPSArtTA exprimiert wird. Die PSA-spezifische Abtötung ist in diesem Modell, auch unter Berücksichtigung der Infizierbarkeit und der IC_{50} von 5-FC und 5-FU, gegenüber den einzelnen Zelllinien, vergleichbar darstellbar.

5-FC wird in der Klinik als Antimykotikum eingesetzt, ist somit im Hinblick auf seine Toxizität extensiv charakterisiert und verfügt über ein gut dokumentiertes Sicherheitsprofil. Die sehr geringe Toxizität der *Prodrug* 5-FC spiegelt sich in den drei untersuchten Zelllinien wieder. Die IC_{50} lag für LNCaP-Zellen und DU-145-Zellen bei 5000 μM , in HeLa-Zellen war sie mit 4500 μM geringfügig niedriger (Abb. 41). Die Ergebnisse aus den Sensitivitätsuntersuchungen der einzelnen Zelllinien gegenüber 5-FC korrelieren mit der aktuellen Dosierungsempfehlung für die Anwendung im Menschen von 385 μM , die Toxizitätsgrenze wird mit 770 μM definiert (Bourbeau et al. 2004). In den hier charakterisierten Zelllinien war die Toxizitätsgrenze noch höher angesiedelt ($>1000 \mu\text{M}$). Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Arbeitskonzentration von 50 μM wurde aufgrund der Potenz der hier entwickelten Expressionssysteme im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen (Liu et al. 2002; Miyagi et al. 2003) besonders niedrig gewählt. Sie ist für die hier charakterisierten Zellen nicht toxisch und entfaltet, zu 5-FU metabolisiert, unter der Annahme einer vollständigen Umsetzung, einen nachweisbaren zytotoxischen Effekt.

Die festgestellte IC_{50} für 5-FU variiert innerhalb der untersuchten Zelllinien (Abb. 41). HeLa- und DU-145-Zellen sind gegenüber 5-FU weniger sensitiv als LNCaP-Zellen. Allerdings waren die Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber 5-FU nicht so stark ausgeprägt wie gegenüber der bsRNase. Die kontrovers diskutierte Korrelation der Sensitivität der Zellen gegenüber 5-FU mit ihrem p53 Status konnte hier nicht gefunden werden (Xie et al. 1999; Bourbeau et al. 2004).

Zur Darstellung der PSA-spezifischen Expression des Transgens wurde daher, neben der eigentlichen Untersuchung der Zytotoxizität von CD zusammen mit 5-FC, die intrazelluläre, transgen exprimierte bCD mittels eines enzymatischen Aktivitätstests quantifiziert. Durch die photometrische Quantifizierung der Edukt- und der Produktkonzentration konnte, verglichen mit der Expression von AdCMVcd und dem konstitutiven Trans-System AdCMVrtTA/AdTREcdinv eine eindeutige gewebespezifische Expression von bCD in LNCaP-Zellen nach Infektion mit dem Trans-System AdPSArtTA/AdTREcdinv nachgewiesen werden (Abb. 42).

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Experimenten zur Zytotoxizität der Kombination bCD/5-FC wieder. Nach Induktion konnte in LNCaP-Zellen, die mit dem PSA-spezifischen Cis-Konstrukt AdPSArtTAcdinv und mit dem PSA-spezifischen Trans-Vektorsystem AdPSArtTA/AdTREcdinv infiziert waren, die gewebespezifische

Abtötung von LNCaP-Zellen gezeigt werden (Abb. 43). Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch die Daten aus den *in vitro* Konversionsexperimenten untermauert. Nach aktueller Literaturlage konnte damit zum ersten Mal bCD unter der Kontrolle eines PSA-regulierten Expressionssystems gewebespezifisch in effizienten Konzentrationen in PSA-positiven Zellen exprimiert werden. Bisherige Versuche, allein mit dem PSA-Promotor/Enhancer Konstrukt gewebespezifisch substantielle Konzentrationen von bCD in Zellen zu erreichen, waren im Hinblick auf den beobachteten zytotoxischen Effekt nicht erfolgreich (Yoshimura, Suzuki et al. 2001). Diese Beobachtung konnte mit dem im Verlauf dieser Arbeit entstandenen Vektor AdPSAcD bestätigt werden (Abb. 43).

Es existieren mehrere Ansätze zur prostataspezifischen Expressionssteigerung im Zusammenhang mit einer effizienten Expression von bCD. Durch Anwendung eines PSA-kontrollierten *Cre-lox* Expressionssystems gelang eine Amplifizierung der Genexpression (Yoshimura et al. 2002). Allerdings scheint der Einsatz des *Cre-lox* Systems in diesem Zusammenhang unter Sicherheitsgesichtspunkten bedenklich, da PSA auch in anderen Geweben in geringem Maß exprimiert wird (Olsson et al. 2005) und eine *Cre-lox* vermittelte Rekombination selbst in sehr schwach PSA-exprimierenden Geweben nicht ausgeschlossen werden kann.

In Untersuchungen mit dem ebenfalls prostataspezifischen PSMA-Promotor konnte nach adenoviraler Transduktion mit bCD *in vitro* und *in vivo* spezifische Zytotoxizität gezeigt werden (O'Keefe et al. 2000; Uchida et al. 2001). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten 50 μM 5-FC bewirkte mit dem PSMA-Konstrukt bei transduzierten LNCaP eine Abnahme der Lebenszellzahl von weniger als zehn Prozent. Mit ansteigender 5-FC Konzentration verringerte sich die Lebenszellzahl kontinuierlich, wobei die IC_{50} in Zellen, die mit diesen Konstrukten transduziert waren, bei weit über 1000 μM festgestellt wurde. Mit dem vorliegenden potenten Expressionssystem könnte der in dieser Arbeit gezeigte zytotoxische Effekt im gewebepezifischen Kontext möglicherweise durch Erhöhung der 5-FC Konzentration dosisabhängig weiter verstärkt werden.

Mit dem konstitutiven Trans-System wurde nach Messung der enzymatischen Aktivität in allen drei Zelllinien eine höhere Umsetzungsrate von 5-FC zu 5-FU als in AdCMVcd infizierten Zellen festgestellt (Abb. 42). In LNCaP-Zellen kann sogar von einer vollständigen Konversion von 5-FC ausgegangen werden, da der angegebene

Wert bereits um die Umsetzung der Kontrollinfektion bereinigt dargestellt ist. Die dokumentierte enzymatische Aktivität der Zelllysate korreliert stark mit der Abtötung der infizierten Zellen nach 5-FC Exposition. Auch hier ist das konstitutive Trans-System dem Vektor AdCMVcd weit überlegen.

In Zellen, die mit dem konstitutiven Trans-System AdCMVrtTA/AdTREcdinv infiziert worden waren, konnte nach Induktion in Abwesenheit von 5-FC ein reproduzierbarer zytotoxischer Effekt festgestellt werden. Nach aktueller Literaturlage gibt es keine Anhaltspunkte für eine mögliche Zytotoxizität von bCD, wobei für die Expression dieses Transgens bislang aber die Verwendung eines derart potenten Expressionssystems nicht dokumentiert ist. Nachdem im nichtinduzierten Zustand keine Toxizität der Vektorkombination aufgetreten war und damit ein möglicher toxischer Einfluss des rtTA ausgeschlossen werden kann, muss diese Wirkung der exprimierten bCD zugeschrieben werden. Ein Erklärungsansatz könnte eine unspezifische Desaminierung zellulärer Nukleinsäuren sein, die durch die hohe intrazelluläre Enzymkonzentration verursacht wird und so zu letalen Schädigungen führen könnte. Die Aktivität von bCD wird zwar als substratspezifisch beschrieben, allerdings konnte bei der zu bCD hochhomologen Adenosin Desaminase (ADA) die Desaminierung des Nukleosids Adenin beobachtet werden (Ireton et al. 2002). Eine unspezifische Aktivität von bCD unter den beschriebenen Bedingungen kann nicht unbedingt ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Transgen bCD mit den hier vorgestellten Vektorsystemen effizient exprimiert werden kann. In der gewebespezifischen Anwendung besteht die Möglichkeit, die experimentelle Vorgehensweise bezüglich der eingesetzten MOI, der 5-FC Konzentration und der Inkubationsdauer weiter zu optimieren.

Eine Effizienzsteigerung wäre auch durch den Einsatz von Cytosin Desaminase aus *Saccharomyces cerevisiae* (yCD) denkbar, die vor dem Hintergrund einer potenziellen gentherapeutischen Anwendung in zunehmenden Maß untersucht wird. yCD katalysiert analog zu bCD die Desaminierung von 5-FC zu 5-FU, besitzt aber keine Homologien zu bCD (Ireton et al. 2003). Der Vorteil von yCD gegenüber bCD besteht in der bis zu 22-fach stärkeren enzymatischen Aktivität (Kievit et al. 1999), die in Verbindung mit den hier beschriebenen und verwendeten Expressionssystemen eine effiziente Konversion von 5-FC in 5-FU bei einer verhältnismäßig geringen Virusdosis

erlauben könnte. Als weitere Option zur Effizienzsteigerung der 5-FC Umwandlung wird der Einsatz replikationskompetenter AdV, die CD als Transgen tragen, diskutiert (Zhan et al. 2005). Tumorspezifität wird in diesem Modell über die tumorselektive Replikation vermittelt.

Die optimale Umwandlung von 5-FC zu 5-FU wäre besonders hinsichtlich einer *in vivo* Anwendung erstrebenswert, da sich bei nur unzureichender Konversion der *Prodrug* in 5-FU Resistenzen gegenüber 5-FU entwickeln können, die auf Ebene der Thymidylatsynthase (Bapat et al. 1983; Berger et al. 1985) und der 5-FU anabolisierenden Enzyme (Mulkins und Heidelberger 1982a; Mulkins und Heidelberger 1982b) ablaufen. Dieser Effekt wird bei der i.v. Therapie mit 5-FU, die aufgrund der systemischen Toxizität nur mit relativ niedrigen Dosen durchgeführt werden kann, in der Klinik beobachtet.

Resistenzen können neben dem schnellen Erreichen einer hohen Konzentration von 5-FU im Tumor auch durch die transgene Expression des 5-FU anabolisierenden Enzyms Uracilphosphoribosyltransferase (UPRT) im Zielgewebe umgangen werden (Seo et al. 2005). Daneben wird in einer Reihe von Arbeiten die Koexpression von UPRT mit CD beschrieben (Erbs et al. 2000; Miyagi et al. 2003; Bourbeau et al. 2004), die eine Erhöhung der 5-FC Sensitivität und eine Umgehung der Resistenz gegen den Metaboliten 5-FU bewirkt.

Eine weitere Möglichkeit zur Potenzierung des Anti-Tumoreffekts des hier beschriebenen CD-Expressionssystems bietet die gleichzeitige Bestrahlung des Tumors. Durch Applikation der Vektoren mit 5-FC und Bestrahlung konnte synergistisch ein Anti-Tumoreffekt gezeigt werden (Zhang et al. 2003). In einer klinischen Studie der Phase I wurde bereits erfolgreich die Synergie von Bestrahlung und gentherapeutisch vermittelter Koexpression von CD und HSV-TK gezeigt (Freytag et al. 2003).

4.2.3 YB-1

Die Onkolyse durch replikationskompetente Viren ist ein relativ neuer, viel versprechender Weg in der adenoviral vermittelten Gentherapie von Tumoren. Mehrere Therapieansätze mit dem Ziel der Onkolyse befinden sich derzeit in klinischen Studien der Phasen I und II (Ries und Brandts 2004). Die verwendeten Viren sind konditional replikationskompetent, d. h. sie replizieren nur im Zielgewebe. Die Selektivität der beschriebenen Viren ergibt sich zum Einen aus adenoviral intrinsischen Mecha-

nismen, die die virale Replikation nur in Zellpopulationen mit tumorspezifischen Mutationen zulässt (Bischoff et al. 1996; Lamfers et al. 2002) oder aus der transkriptionellen Kontrolle adenoviraler, für den lytischen Zyklus essenzieller Gene durch gewebe- bzw. tumorspezifische Promotoren. Bisher wurden bereits eine Reihe prostata-selektiv replizierender Adenoviren konstruiert und charakterisiert (Rodriguez et al. 1997; Yu et al. 1999; Chen et al. 2001; DeWeese et al. 2001; Lanson et al. 2003; Lee et al. 2004; Sova et al. 2004; Li et al. 2005), darunter ein Adenovirus, das sich derzeit bereits in einer kombinierten klinischen Studie der Phase I und II befindet (Dilley et al. 2005).

Einen neuen Ansatz bei der Entwicklung selektiv replikationskompetenter Adenoviren stellt die Verwendung des Transkriptionsfaktors YB-1 dar. YB-1 ermöglicht in E1-deletierten, *per se* replikationsdefizienten Adenoviren die Replikation durch Aktivierung des E2 *late* Promotors unter Umgehung der sonst essenziellen Genprodukte der E1-Region (Holm et al. 2002). Mit einem E1-deletierten Adenovirus, das YB-1 unter Kontrolle eines CMV-Promotors trägt, konnte in HeLa-Zellen ein onkolytischer Effekt beobachtet werden, der sich allerdings erst mit der relativ hohen MOI 100 einstellte (Holm et al. 2002). Mit den in dieser Arbeit entwickelten, stark exprimierenden Vektorsystemen ergab sich die Möglichkeit, YB-1 vermittelte Onkolyse auch bei geringeren MOI zu induzieren. YB-1 wurde an EGFP und ein *Nuclear Localisation Signal* (NLS) fusioniert (Abb. 44). Das Fusionsprotein kann somit intrazellulär detektiert werden. Zudem ermöglicht die NLS eine Akkumulation im Kern, die für die Replikation E1-defizienter AdV notwendig ist (Holm et al. 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des YB-1/EGFP Fusionsproteins mit den hier vorgestellten Vektorsystemen gewebespezifisch und in einem universellen Ansatz, ausgehend vom koinfizierten AdCMVrtTA, zytotoxisch wirkte (Abb. 48). Durch die Kopplung von EGFP an YB-1 konnte darüber hinaus die PSA-spezifische Expression durch den Vektor AdPSArtTayb-1_{env} in LNCaP-Zellen bestätigt werden (Abb. 45). Die Infektion bewirkte außerdem in LNCaP-Zellen nach Induktion mit dem Abrunden der Zellen einen zytopathischen Effekt, der auf eine bevorstehende viral vermittelte Lyse hinweist (Abb. 45).

Die Koinfektion mit AdCMVrtTA bewirkte *in trans* die Expressionsaktivierung von AdPSArtTayb-1_{env} auch in HeLa- und DU-145-Zellen, was zu einer, wenn auch im Vergleich mit LNCaP-Zellen schwächeren Expression führte (Abb. 46). Dies kann in

der endogenen zusätzlichen Expression von rtTA im Cis-Konstrukt bedingt sein. Da weder Daten zur Halbwertszeit des rtTA (H. Bujard, persönliche Auskunft) noch des YB-1/EGFP Fusionsproteins vorliegen, kann über mögliche Anreicherungseffekte des rtTA und des Transgens nur spekuliert werden.

48 Stunden nach Infektion mit AdPSArtTayb-1_{in vivo} in Kombination mit AdCMVrtTA und Induktion war in LNCaP-Zellen eine starke Akkumulation des Transgenprodukts im Kern sichtbar, wohingegen in DU-145- und HeLa-Zellen sowohl zytoplasmatische als auch eine beginnende nukleäre Lokalisation festgestellt werden konnte (Abb. 47). Diese Beobachtungen spiegeln sich auch im Überleben der infizierten und induzierten Zellen wieder.

Die Überexpression von YB-1 mit einem konstitutiven Expressionssystem zeigt *in vitro* sehr gute Ergebnisse, allerdings ist eine Anwendung *in vivo* aufgrund einer fehlenden Selektivität bezüglich der Replikation problematisch. Bisher wurde YB-1 abhängige Onkolyse vor dem Hintergrund einer gentherapeutischen Anwendung nur in *Multi Drug Resistant* (mdr) Zelllinien und *in vivo* in daraus abgeleiteten Tumoren gezeigt. YB-1 wird hier nicht transgen vermittelt, sondern ist in vielen mdr Zelllinien intrinsisch vorhanden und ermöglicht so tumorspezifisch die Replikation von Adenoviren, die in der E1-Region modifiziert sind (Holm et al. 2004).

Das hier vorgestellte Expressionssystem verfügt aufgrund der Selektivität für stark PSA-positive Gewebe ebenfalls über ein adäquates Sicherheitsprofil. Die Replikation im Vektor AdPSArtTayb-1_{in vivo} kann durch die Kopplung eines gewebespezifischen Promotors mit einem induzierbaren System sowohl auf Transkriptionsebene wie auch auf Induktionsebene kontrolliert werden (Abb. 49). Einen weiteren Sicherheitsaspekt stellt die Möglichkeit der topischen Applikation im Tumor dar.

Die hier gezeigten Untersuchungen sind als viel versprechende Pilotexperimente zur Verwendung von YB-1 als Onkolyse induzierendes Transgen zu bewerten. Dennoch bedarf es weiterer Forschungsarbeit zur genaueren Charakterisierung des durch Überexpression von YB-1 ausgelösten Zelltods. Das wichtigste zu klärende Problem ist die genaue Quantifizierung der neu gebildeten Viren, da erst dann von Onkolyse gesprochen werden kann. Bisher konnte in allen drei Zelllinien nur annähernd die Zunahme von Adenoviren im Kulturüberstand der induzierten im Vergleich mit nicht-induzierten Ansätzen bestimmt werden.

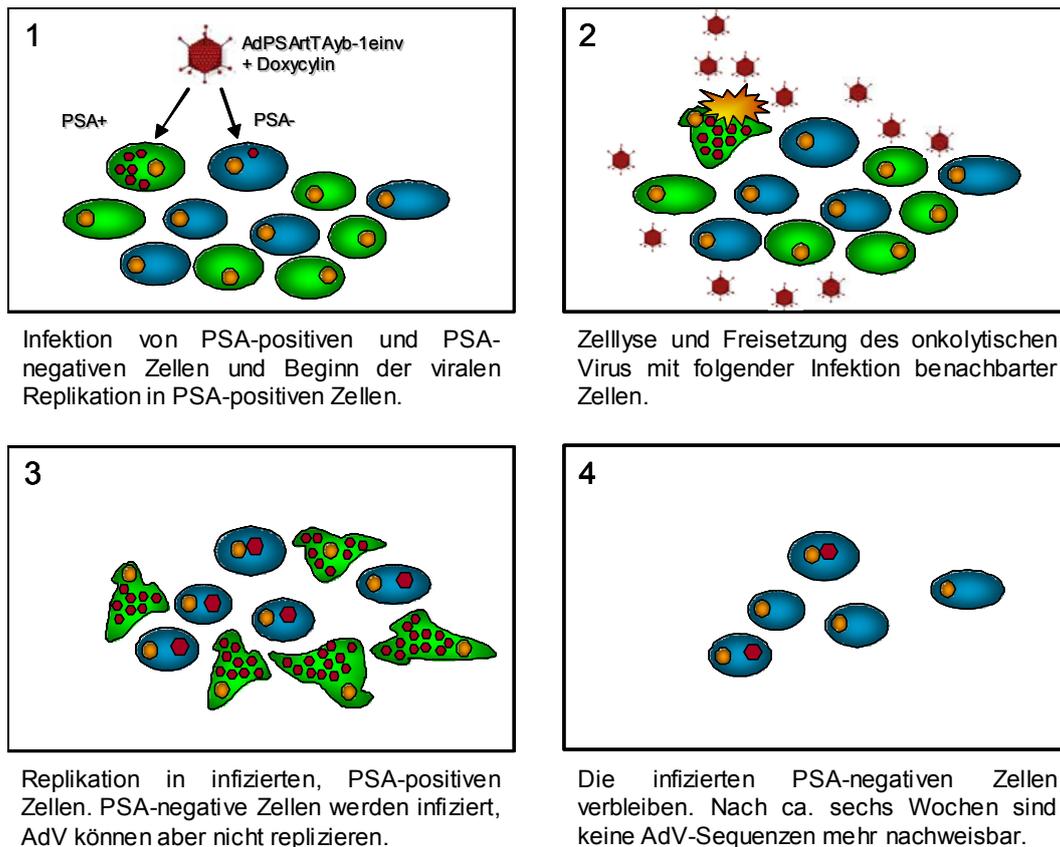


Abbildung 49: Modell der AdPSArTAYb-1einV vermittelten gewebespezifischen Onkolyse PSA-positiver Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer Weg in der prostataspezifischen Tumorthherapie durch Onkolyse beschrieben. In bisher publizierten Ansätzen zur selektiven Onkolyse PSA positiver Zellen wurde die lytische Aktivität des rekombinanten Adenovirus transkriptionell durch den PSA-Promotor (Rodriguez et al. 1997; Dilley et al. 2005) und in weiteren Ansätzen zur Erhöhung der Selektivität zusätzlich durch den Probasin Promotor gesteuert (Yu et al. 1999). Das hier entwickelte Konstrukt verfügt im Vergleich dazu durch die zweistufige Aktivierung der Lyse durch die PSA Promotor abhängige Expression des Transaktivators und der nachgeschalteten induzierbaren Expression von YB-1 über ein wichtiges Sicherheitsmerkmal, da die Lyse über Induktordepletion bzw. Induktorgabe reguliert werden kann. Zudem bietet dieses System die Möglichkeit der Potenzierung des Anti-Tumoreffekts durch Synergie mit weiteren Therapieoptionen. Speziell vor dem Hintergrund der YB-1 vermittelten Replikation besteht die Möglichkeit, intrazelluläres YB-1 durch Stressinduktion in den Zellkern zu translozieren, das die virale Replikation zusätzlich zum transgen vermittelten YB-1 verstärkt. Dies kann durch Zytostatika (Bargou et al. 1997), Hyperthermie

(Stein et al. 2001) oder Bestrahlung (Koike et al. 1997) geschehen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass allgemein die adenovirale Replikation in Kombination mit Bestrahlung den Therapieerfolg steigern kann (Chen et al. 2001; Lamfers et al. 2002; Geoerger et al. 2003).

4.3 Abschließende Betrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die effiziente adenoviral vermittelte Expression von der zytotoxischen Genprodukte bsRNase, bCD und YB-1. Die Transgene bsRNase und YB-1 wurden hier erstmals erfolgreich mit dem Hintergrund einer gentherapeutischen Anwendung *in vitro* exprimiert und charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde ein modulares, induzierbares Expressionssystem entwickelt, das gewebespezifisch und universell-gewebeunabhängig aktiviert werden kann.

Unter Anwendung des Tet-Systems konnten Effektorvektoren generiert werden, die individuell mit gewebespezifisch oder konstitutiv exprimierenden Transaktivatorvektoren kombiniert werden können und außerordentlich starke Expressionslevel erreichten. Die Expression der eingesetzten Transgene war in den Effektorvektoren darüber hinaus sehr gut regulierbar, eine Hauptvoraussetzung bei der Darstellung eines adenoviralen Vektors, der toxische bzw. potenziell toxische Transgene trägt. Ausserdem konnten die Expressionskassetten für die PSA-kontrollierte Expression des rtTA und für das therapeutische Transgen in einem gewebespezifischen Vektor kombiniert werden.

Mit den drei vorgestellten therapeutischen Transgenen wurde universelle und gewebespezifische Zytotoxizität erreicht. Im Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung sind die Expressionssysteme durch die gewebespezifische und zusätzlich induktorabhängige Aktivierung gut kontrollierbar. Nach einer topischen Applikation der Vektoren können lokal sehr hohe, persistierende und vor allem therapeutisch wirksame Expressionslevel erreicht werden. Im Fall von bsRNase und von 5-FU, das in die Umgebung sezerniert wird bzw. aus der Zelle diffundiert, kann eine Verteilung über den Blutstrom nicht ausgeschlossen werden. Allerdings wirken beide Agenzien gegenüber nichtmalignen Zellen nur geringfügig (5-FU) bzw. nicht toxisch (bsRNase). Abschließend kann festgestellt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Vektoren nach Weiterentwicklung und Verfeinerung sowie unter Berücksichtigung möglicher

Berücksichtigung möglicher Synergieeffekte das Sicherheitsprofil und das Potenzial für eine gentherapeutische Anwendung besitzen.

4.4 Ausblick

Die eingesetzten Transgene bsRNase, bCD und YB-1 haben gewebespezifisch bzw. universell aktiviert, einen starken zytotoxischen Effekt gegenüber den untersuchten Zelllinien entfaltet. Der nächste logische Schritt wäre eine Erprobung der Vektorsysteme *in vivo*. Ein verhältnismäßig kostengünstiges und gut etabliertes Modell in der Krebsgentherapie sind Nacktmäuse. In diese Mäuse, die nur über ein sehr eingeschränktes Immunsystem verfügen, werden üblicherweise durch subkutane Injektion von Krebszellen Tumoren gesetzt. Dies kann mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien durchgeführt werden, die alle über ein belegtes tumorigenes Potenzial in der Nacktmaus verfügen. Nach Anwachsen des Tumors können die Vektoren direkt intratumoral appliziert werden. Doxycyclin zur Induktion der Transkription wird über das Trinkwasser verabreicht. Die Effizienz der Therapie wird in der Abnahme des Tumorumens quantifiziert. Da für alle drei untersuchten Transgene gewebespezifische Cis-Systeme und gewebespezifische bzw. universell regulierte Trans-Systeme zur Verfügung stehen, wäre ein *in vivo* Vergleich der beiden gewebespezifischen Ansätze notwendig, da eine Koinfektion der Effektorvektoren und Transaktivatorvektoren *in vitro* nicht mit der Situation in einem soliden Tumor verglichen werden kann.

Im Fall der bsRNase wäre im Tiermodell neben der topischen Injektion der Vektoren (Abb. 50A) auch die Applikation des konstitutiven Expressionssystems über die Schwanzvene denkbar. Die viralen Vektoren akkumulieren so in der Leber, sodass bsRNase nach Induktion systemisch in den Blutstrom abgegeben werden könnte, d.h. die Leber würde durch die Infektion temporär als Bioreaktor zur Synthese von bsRNase genutzt werden können (Abb. 50B).

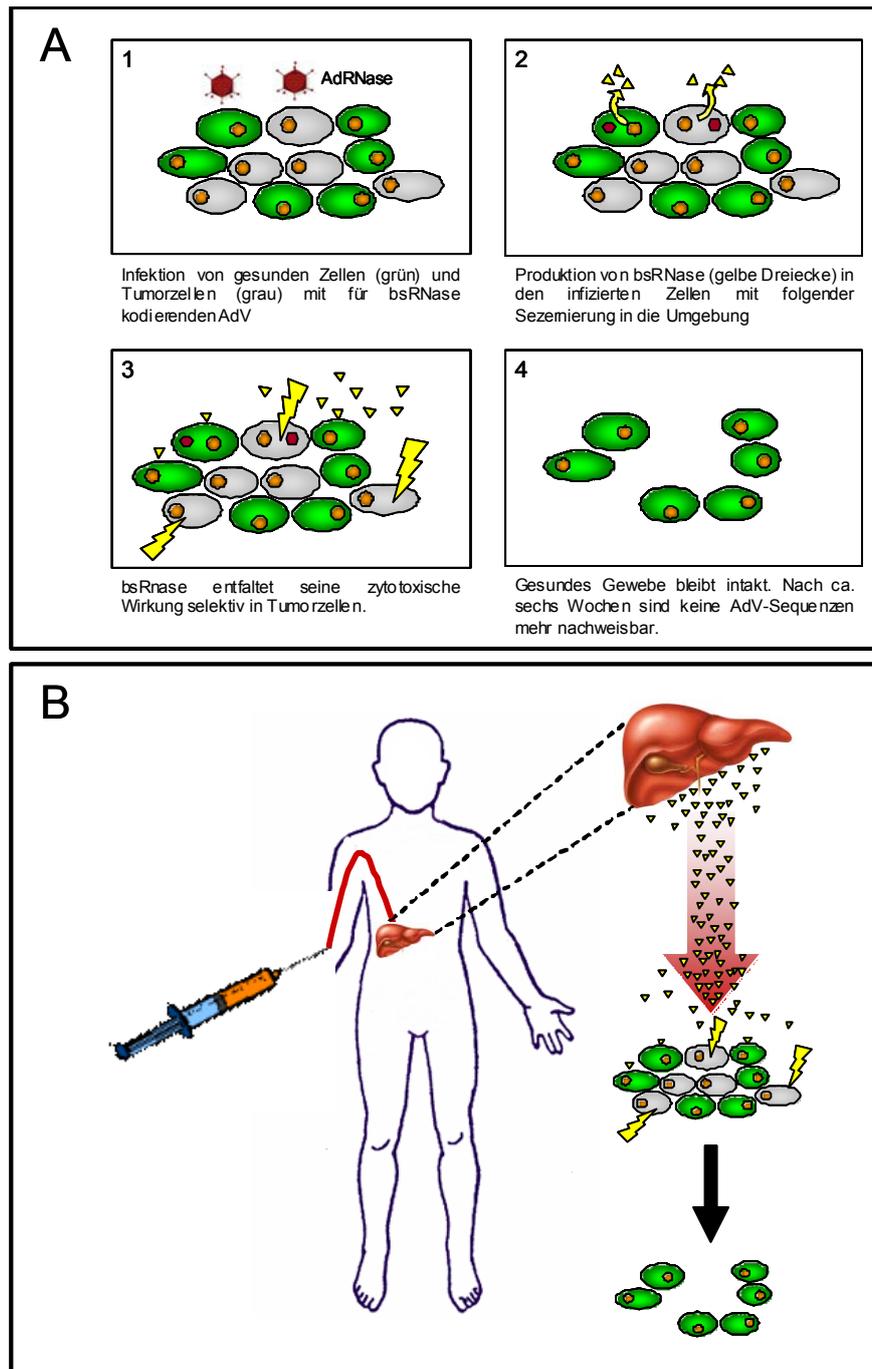


Abbildung 50: Modell der Antitumorwirkung von bsRNase nach direkter Applikation der adenoviralen Vektoren in das Tumorgewebe (A) bzw. nach intravenöser Applikation (B). Nach i.v. Gabe des adenoviralen Vektors produziert die Leber bsRNase und gibt diese in den Blutstrom ab. Tumor- bzw. Metastasenzellen (grau dargestellt) können so selektiv systemisch abgetötet werden.

Dieser Ansatz wäre auf Grund der selektiven Zytotoxizität gegenüber malignen bzw. schnell proliferierenden Zellen insbesondere in Metastasierungsmodellen sehr interessant. Darüber hinaus würden die Produzentenzellen bei diesem Ansatz - im Gegensatz zu einer intratumoralen Vektorinjektion - nicht durch bsRNase abgetötet werden, so dass eine längere und damit effizientere Transgenexpression zu erwarten

wäre. Abgesehen von der Anti-Tumorwirkung der bsRNase könnten in diesem Zusammenhang auch die immunsuppressiven Qualitäten der bsRNase als eine weitere gentherapeutische Anwendung im Rahmen der Transplantationsmedizin untersucht werden.

Insbesondere die in der vorliegenden Arbeit erstmals im Zusammenhang mit einem gentherapeutischen Hintergrund charakterisierten Transgene bsRNase und YB-1 besitzen das Potenzial für eine weitere Charakterisierung und eine spätere Anwendung.

Literaturverzeichnis

- Ackland-Berglund, C. E. und D. A. Leib** (1995). Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* **18**: 196-200.
- Agha-Mohammadi, S. und M. T. Lotze** (2000). Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest* **105**: 1177-83.
- Agha-Mohammadi, S., et mult. al.** (2004). Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med* **6**: 817-28.
- Amalfitano, A., et mult. al.** (1998). Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol* **72**: 926-33.
- Andersen, L., M. Kilstrup, J. Neuhard** (1989). Pyrimidine, purine and nitrogen control of cytosine deaminase synthesis in *Escherichia coli* K 12. Involvement of the *glnLG* and *purR* genes in the regulation of *codA* expression. *Arch Microbiol* **152**: 115-8.
- Anton, M. und F. L. Graham** (1995). Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J Virol* **69**: 4600-6.
- Austin, E. A. und B. E. Huber** (1993). A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Mol Pharmacol* **43**: 380-7.
- Bankhead, C.** (2003). Clinical trials test bisphosphonates in hormone-sensitive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **95**: 1273-4.
- Bapat, A. R., C. Zarow, P. V. Danenberg** (1983). Human leukemic cells resistant to 5-fluoro-2'-deoxyuridine contain a thymidylate synthetase with lower affinity for nucleotides. *J Biol Chem* **258**: 4130-6.
- Bargou, R. C., et mult. al.** (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* **3**: 447-50.
- Baron, U. und H. Bujard** (2000). Tet Repressor-Based System for Regulated Gene Expression in Eucaryotic Cells: Principles and Advances. *Methods in enzymology* ; v. 327. J. Thorner, S. Emr and J. Abelson. San Diego, CA, Academic Press: xxxvii, 672
- Baron, U., M. Gossen, H. Bujard** (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* **25**: 2723-9.
- Bast, R. C.** (2003). *Cancer medicine*. Hamilton, BC Decker.
- Bergelson, J. M., et mult. al.** (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**: 1320-3.
- Berger, S. H., C. H. Jenh, L. F. Johnson, F. G. Berger** (1985). Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Mol Pharmacol* **28**: 461-7.

- Berkner, K. L. und P. A. Sharp** (1983). Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic Acids Res* **11**: 6003-20.
- Bett, A. J., W. Haddara, L. Prevec, F. L. Graham** (1994). An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8802-6.
- Bett, A. J., L. Prevec, F. L. Graham** (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**: 5911-21.
- Bischoff, J. R., et mult. al.** (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**: 373-6.
- Blades, R. A., P. J. Keating, L. J. McWilliam, N. J. George, P. L. Stern** (1995). Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* **46**: 681-6; discussion 686-7.
- Bostwick, D. G.** (1989). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *Urology* **34**: 16-22.
- Bourbeau, D., G. Lavoie, J. Nalbantoglu, B. Massie** (2004). Suicide gene therapy with an adenovirus expressing the fusion gene CD::UPRT in human glioblastomas: different sensitivities correlate with p53 status. *J Gene Med* **6**: 1320-32.
- Bracale, A., et mult. al.** (2002). Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease. *Biochem J* **362**: 553-60.
- Cavazzana-Calvo, M., et mult. al.** (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669-72.
- Chen, H. H., et mult. al.** (1997). Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1645-50.
- Chen, Y., et mult. al.** (2001). CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. *Cancer Res* **61**: 5453-60.
- Chi, K. N.** (2005). Targeting Bcl-2 with oblimersen for patients with hormone refractory prostate cancer. *World J Urol* **23**: 33-7.
- Chi, K. N. und M. E. Gleave** (2004). Antisense approaches in prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther* **4**: 927-36.
- Cinatl, J., Jr., et mult. al.** (1999). Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis. *Int J Oncol* **15**: 1001-9.
- Clackson, T.** (2000). Regulated gene expression systems. *Gene Ther* **7**: 120-5.
- Corti, O., et mult. al.** (1999). A single adenovirus vector mediates doxycycline-controlled expression of tyrosine hydroxylase in brain grafts of human neural progenitors. *Nat Biotechnol* **17**: 349-54.
- Dachs, G. U., J. Tupper, G. M. Tozer** (2005). From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anticancer Drugs* **16**: 349-59.
- D'Alessio, G.** (1963). [Research on Ribonuclease]. *Boll Soc Ital Biol Sper* **39**: 1174-8.
- D'Alessio, G.** (1999). Evolution of oligomeric proteins. The unusual case of a dimeric ribonuclease. *Eur J Biochem* **266**: 699-708.

- De Lorenzo, C., A. Nigro, R. Piccoli, G. D'Alessio** (2002). A new RNase-based immunoconjugate selectively cytotoxic for ErbB2-overexpressing cells. *FEBS Lett* **516**: 208-12.
- De Marzo, A. M., et mult. al.** (2004). Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem* **91**: 459-77.
- Deonarain, M. P. und A. A. Epenetos** (1998). Design, characterization and anti-tumour cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian ribonuclease-based immunotoxins. *Br J Cancer* **77**: 537-46.
- Devi, G. R., et mult. al.** (2005). In vivo bioavailability and pharmacokinetics of a c-MYC antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer, AVI-4126, in solid tumors. *Clin Cancer Res* **11**: 3930-8.
- DeWeese, T. L., et mult. al.** (2001). A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* **61**: 7464-72.
- Dilley, J., et mult. al.** (2005). Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity. *Cancer Gene Ther* **12**: 715-22.
- Engelhardt, J. F., X. Ye, B. Doranz, J. M. Wilson** (1994). Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6196-200.
- Evoy, D., et mult. al.** (1997). In vivo adenoviral-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *J Surg Res* **69**: 226-31.
- Fortier, A. H., B. J. Nelson, D. K. Grella, J. W. Holaday** (1999). Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1635-40.
- Frampton, A. R., Jr., W. F. Goins, K. Nakano, E. A. Burton, J. C. Glorioso** (2005). HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. *Gene Ther* **12**: 891-901.
- Freundlieb, S., U. Baron, A. L. Bonin, M. Gossen, H. Bujard** (1997). Use of tetracycline-controlled gene expression systems to study mammalian cell cycle. *Methods Enzymol* **283**: 159-73.
- Freundlieb, S., C. Schirra-Muller, H. Bujard** (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* **1**: 4-12.
- Freytag, S. O., et mult. al.** (2003). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. *Cancer Res* **63**: 7497-506.
- Fussenegger, M.** (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog* **17**: 1-51.
- Futami, T., M. Miyagishi, M. Seki, K. Taira** (2002). Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. *Nucleic Acids Res Suppl*: 251-2.

- Gabril, M. Y., et mult. al.** (2002). Prostate targeting: PSP94 gene promoter/enhancer region directed prostate tissue-specific expression in a transgenic mouse prostate cancer model. *Gene Ther* **9**: 1589-99.
- Gardaneh, M. und K. L. O'Malley** (2004). Rat tyrosine hydroxylase promoter directs tetracycline-inducible foreign gene expression in dopaminergic cell types. *Brain Res Mol Brain Res* **126**: 173-80.
- Garnick, M. B. und W. R. Fair** (1996). Prostate cancer: emerging concepts. Part I. *Ann Intern Med* **125**: 118-25.
- Georger, B., et mult. al.** (2003). Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (ONYX-015) in human malignant glioma xenografts. *Br J Cancer* **89**: 577-84.
- Gorbatyuk, V. Y., C. K. Tsai, C. F. Chang, T. H. Huang** (2004). Effect of N-terminal and Met23 mutations on the structure and dynamics of onconase. *J Biol Chem* **279**: 5772-80.
- Gossen, M., A. L. Bonin, H. Bujard** (1993). Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem Sci* **18**: 471-5.
- Gossen, M. und H. Bujard** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5547-51.
- Gossen, M. und H. Bujard** (2002). Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* **36**: 153-73.
- Gossen, M., et mult. al.** (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**: 1766-9.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Graham, F. L. und A. J. van der Eb** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-67.
- Greene, D. R., T. M. Wheeler, S. Egawa, R. P. Weaver, P. T. Scardino** (1991). Relationship between clinical stage and histological zone of origin in early prostate cancer: morphometric analysis. *Br J Urol* **68**: 499-509.
- Greenlee, R. T., T. Murray, S. Bolden, P. A. Wingo** (2000). Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* **50**: 7-33.
- Grzmil, M., et mult. al.** (2003). Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am J Pathol* **163**: 543-52.
- Gu, J., et mult. al.** (2002). A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing in vitro and in vivo. *Oncogene* **21**: 4757-64.
- Haag, P., J. Bektic, G. Bartsch, H. Klocker, I. E. Eder** (2005). Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **96**: 251-8.
- Haeberli, A.** (1992). Human protein data. Weinheim Basel, VCH Verlagsges.

- Haj-Ahmad, Y. und F. L. Graham** (1986). Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *J Virol* **57**: 267-74.
- Hale, M. L.** (2001). Microtiter-based assay for evaluating the biological activity of ribosome-inactivating proteins. *Pharmacol Toxicol* **88**: 255-60.
- Hamstra, D. A., D. J. Rice, S. Fahmy, B. D. Ross, A. Rehemtulla** (1999). Enzyme/prodrug therapy for head and neck cancer using a catalytically superior cytosine deaminase. *Hum Gene Ther* **10**: 1993-2003.
- Harrington, K. J., C. Spitzweg, A. R. Bateman, J. C. Morris, R. G. Vile** (2001). Gene therapy for prostate cancer: current status and future prospects. *J Urol* **166**: 1220-33.
- Hatfield, L. und P. Hearing** (1991). Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. *Virology* **184**: 265-76.
- He, T. C., et mult. al.** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2509-14.
- Hearing, P., R. J. Samulski, W. L. Wishart, T. Shenk** (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* **61**: 2555-8.
- Hirko, A., F. Tang, J. A. Hughes** (2003). Cationic lipid vectors for plasmid DNA delivery. *Curr Med Chem* **10**: 1185-93.
- Hitt, M., et mult. al.** (1995). *Viral gene techniques*. San Diego, Academic Press.
- Hoffmann, A., M. Villalba, L. Journot, D. Spengler** (1997). A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res* **25**: 1078-9.
- Hoganson, D. K., et mult. al.** (2002). Development of a stable adenoviral vector formulation. *Bioprocessing J.* **1**: 43-48.
- Holm, P. S., et mult. al.** (2002). YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J Biol Chem* **277**: 10427-34.
- Holm, P. S., et mult. al.** (2004). Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy. *Cancer Res* **64**: 322-8.
- Hu, Y. C.** (2005). Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin* **26**: 405-16.
- Huber, B. E., E. A. Austin, C. A. Richards, S. T. Davis, S. S. Good** (1994). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8302-6.
- Hughes, C., A. Murphy, C. Martin, O. Sheils, J. O'Leary** (2005). Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* **58**: 673-84.

- Hussain, M., et mult. al.** (2005). Ixabepilone (Epothilone B Analogue BMS-247550) Is Active in Chemotherapy-Naive Patients With Hormone-Refractory Prostate Cancer: A Southwest Oncology Group Trial S0111. *J Clin Oncol* **23**: 8724-9.
- Ireton, G. C., M. E. Black, B. L. Stoddard** (2003). The 1.14 Å crystal structure of yeast cytosine deaminase: evolution of nucleotide salvage enzymes and implications for genetic chemotherapy. *Structure (Camb)* **11**: 961-72.
- Ireton, G. C., G. McDermott, M. E. Black, B. L. Stoddard** (2002). The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *J Mol Biol* **315**: 687-97.
- Isaacs, J. T.** (1983). Prostatic structure and function in relation to the etiology of prostatic cancer. *Prostate* **4**: 351-66.
- Isaacs, W. B.** (1995). Molecular genetics of prostate cancer. *Cancer Surv* **25**: 357-79.
- Isaacs, W. B., et mult. al.** (1994). Genetic alterations in prostate cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 653-9.
- Jurchott, K., et mult. al.** (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* **278**: 27988-96.
- Kakinuma, H., et mult. al.** (2003). Probasin promoter (ARR(2)PB)-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter (h-NIS) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer. *Cancer Res* **63**: 7840-4.
- Kievit, E., et mult. al.** (1999). Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res* **59**: 1417-21.
- Kim, J. S., J. Soucek, J. Matousek, R. T. Raines** (1995a). Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities. *Biochem J* **308 (Pt 2)**: 547-50.
- Kim, J. S., J. Soucek, J. Matousek, R. T. Raines** (1995b). Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J Biol Chem* **270**: 31097-102.
- Kim, J. S., J. Soucek, J. Matousek, R. T. Raines** (1995c). Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease. *J Biol Chem* **270**: 10525-30.
- Kirn, D.** (2002). Virotherapy for cancer: current status, hurdles, and future directions. *Cancer Gene Ther* **9**: 959-60.
- Kohno, K., H. Izumi, T. Uchiumi, M. Ashizuka, M. Kuwano** (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* **25**: 691-8.
- Koike, K., et mult. al.** (1997). Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* **417**: 390-4.
- Kotchetkov, R., et mult. al.** (2001). Selective activity of BS-RNase against anaplastic thyroid cancer. *Anticancer Res* **21**: 1035-42.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lamartina, S., et mult. al.** (2002). Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* **13**: 199-210.

- Lamartina, S., et mult. al.** (2003). Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol Ther* **7**: 271-80.
- Lamfers, M. L., et mult. al.** (2002). Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy. *Cancer Res* **62**: 5736-42.
- Langelier, E. G., C. J. van Uffelen, M. A. Blankenstein, G. J. van Steenbrugge, E. Mulder** (1993). Effect of culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Prostate* **23**: 213-23.
- Lanson, N. A., Jr., P. L. Friedlander, P. Schwarzenberger, J. K. Kolls, G. Wang** (2003). Replication of an adenoviral vector controlled by the human telomerase reverse transcriptase promoter causes tumor-selective tumor lysis. *Cancer Res* **63**: 7936-41.
- Latham, J. P., P. F. Searle, V. Mautner, N. D. James** (2000). Prostate-specific antigen promoter/enhancer driven gene therapy for prostate cancer: construction and testing of a tissue-specific adenovirus vector. *Cancer Res* **60**: 334-41.
- Lawrence, T. S., et mult. al.** (1998). Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-flucytosine. *Cancer Res* **58**: 2588-93.
- Lee, P., et mult. al.** (1998). Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11371-6.
- Lee, S. J., et mult. al.** (2004). Targeting prostate cancer with conditionally replicative adenovirus using PSMA enhancer. *Mol Ther* **10**: 1051-8.
- Lee, J. E. und R.T. Raines** (2005). Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer. *Biochemistry*. 2005 **44**:15760-7.
- Leza, M. A. und P. Hearing** (1988). Cellular transcription factor binds to adenovirus early region promoters and to a cyclic AMP response element. *J Virol* **62**: 3003-13.
- Li, X., et mult. al.** (2005). Gene therapy for prostate cancer by controlling adenovirus E1a and E4 gene expression with PSES enhancer. *Cancer Res* **65**: 1941-51.
- Li, Y., et mult. al.** (2002). Prostate-specific expression of the diphtheria toxin A chain (DT-A): studies of inducibility and specificity of expression of prostate-specific antigen promoter-driven DT-A adenoviral-mediated gene transfer. *Cancer Res* **62**: 2576-82.
- Libonati, M. und A. Floridi** (1969). Breakdown of double-stranded RNA by bull semen ribonuclease. *Eur J Biochem* **8**: 81-7.
- Liu, J., et mult. al.** (2002). Cancer-specific killing by the CD suicide gene using the human telomerase reverse transcriptase promoter. *Int J Oncol* **21**: 661-6.
- Longoria, R. L., M. C. Cox, W. D. Figg** (2005). Antiangiogenesis: a possible treatment option for prostate cancer? *Clin Genitourin Cancer* **4**: 197-202.
- Lowe, S. L., et mult. al.** (2001). Prostate-specific expression of Bax delivered by an adenoviral vector induces apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Gene Ther* **8**: 1363-71.
- Lundstrom, K.** (2005). Biology and application of alphaviruses in gene therapy. *Gene Ther* **12 Suppl 1**: S92-7.

- Mancheno, J. M., M. Gasset, M. Onaderra, J. G. Gavilanes, G. D'Alessio** (1994). Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 119-24.
- Marinov, I. und J. Soucek** (2000). Bovine seminal ribonuclease induces in vitro concentration dependent apoptosis in stimulated human lymphocytes and cells from human tumor cell lines. *Neoplasma* **47**: 294-8.
- Martiniello-Wilks, R., et mult. al.** (2002). Transcription-targeted gene therapy for androgen-independent prostate cancer. *Cancer Gene Ther* **9**: 443-52.
- Massie, B., et mult. al.** (1998). Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* **72**: 2289-96.
- Mastronicola, M. R., R. Piccoli, G. D'Alessio** (1995). Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. *Eur J Biochem* **230**: 242-9.
- Matousek, J.** (1975). Embryotoxic effect of bull seminal ribonuclease and tissue absorption studies in rats. *J Reprod Fertil* **43**: 171-4.
- Matousek, J.** (2001). Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **129**: 175-91.
- Matousek, J., et mult. al.** (2003). Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **136**: 343-56.
- Matsumoto, K. und A. P. Wolffe** (1998). Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol* **8**: 318-23.
- McNeal, J. E.** (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* **12**: 619-33.
- Meier, I., L. V. Wray, W. Hillen** (1988). Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* by the tandem *tet* operators O1 and O2. *Embo J* **7**: 567-72.
- Meier, O. und U. F. Greber** (2004). Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S152-63.
- Mesnil, M., C. Piccoli, G. Tiraby, K. Willecke, H. Yamasaki** (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1831-5.
- Meyer-Ficca, M. L., et mult. al.** (2004). Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Anal Biochem* **334**: 9-19.
- Mittereder, N., K. L. March, B. C. Trapnell** (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* **70**: 7498-509.
- Miyagi, T., et mult. al.** (2003). Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med* **5**: 30-7.
- Mizuguchi, H. und T. Hayakawa** (2001). Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* **1568**: 21-9.
- Mizuguchi, H., Z. Xu, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, T. Hayakawa** (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* **1**: 376-82.

- Moroziwicz, D. und H. L. Kaufman** (2005). Gene therapy with poxvirus vectors. *Curr Opin Mol Ther* **7**: 317-25.
- Mulkins, M. A. und C. Heidelberger** (1982a). Biochemical characterization of fluoropyrimidine-resistant murine leukemic cell lines. *Cancer Res* **42**: 965-73.
- Mulkins, M. A. und C. Heidelberger** (1982b). Isolation of fluoropyrimidine-resistant murine leukemic cell lines by one-step mutation and selection. *Cancer Res* **42**: 956-64.
- Nakagawa, S., B. Massie, R. G. Hawley** (2001). Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: pharmacologic properties and clinical potential. *Eur J Pharm Sci* **13**: 53-60.
- Nelson, W. G., et mult. al.** (2000). Cancer cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer as vaccines for the treatment of genitourinary malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* **46 Suppl**: S67-72.
- Newton, D. L., H. J. Hansen, S. M. Mikulski, D. M. Goldenberg, S. M. Rybak** (2001). Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**: 528-35.
- Ng, P., et mult. al.** (1999). A high-efficiency Cre//oxP-based system for construction of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **10**: 2667-72.
- Norris, J. S., et mult. al.** (2001). The use of Fas Ligand, TRAIL and Bax in gene therapy of prostate cancer. *Curr Gene Ther* **1**: 123-36.
- O'Keefe, D. S., et mult. al.** (2000). Prostate-specific suicide gene therapy using the prostate-specific membrane antigen promoter and enhancer. *Prostate* **45**: 149-57.
- Olsson, A. Y., A. Bjartell, H. Lilja, A. Lundwall** (2005). Expression of prostate-specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) in ileum and other extraprostatic tissues. *Int J Cancer* **113**: 290-7.
- Onik, G.** (2001). Image-guided prostate cryosurgery: state of the art. *Cancer Control* **8**: 522-31.
- Pareek, G. und S. Y. Nakada** (2005). The current role of cryotherapy for renal and prostate tumors. *Urol Oncol* **23**: 361-6.
- Park, H. S., et mult. al.** (2003). In vivo characterization of a prostate-specific antigen promoter-based suicide gene therapy for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Gene Ther* **10**: 1129-34.
- Parks, R. J., et mult. al.** (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13565-70.
- Peng, W., A. Verbitsky, Y. Bao, J. Sawicki** (2002). Regulated expression of diphtheria toxin in prostate cancer cells. *Mol Ther* **6**: 537-45.
- Peplinski, G. R., K. Tsung, J. A. Norton** (1998). Vaccinia virus for human gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* **7**: 575-88.
- Pesche, S., et mult. al.** (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* **16**: 2879-83.

- Petrylak, D. P., et mult. al.** (2004). Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* **351**: 1513-20.
- Piccoli, R., et mult. al.** (1999). A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7768-73.
- Piccoli, R., et mult. al.** (1992). The dual-mode quaternary structure of seminal RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1870-4.
- Pisters, L. L., et mult. al.** (2004). Evidence that transfer of functional p53 protein results in increased apoptosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 2587-93.
- Pouckova, P., et mult. al.** (2004). Polymer-conjugated bovine pancreatic and seminal ribonucleases inhibit growth of human tumors in nude mice. *J Control Release* **95**: 83-92.
- Preuss, K. D., S. Wagner, J. Freudenstein, K. H. Scheit** (1990). Cloning of cDNA encoding the complete precursor for bovine seminal ribonuclease. *Nucleic Acids Res* **18**: 1057.
- Prince, H. M.** (1998). Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* **30**: 335-47.
- Qu, Z., et mult. al.** (2004). Homogeneity and long-term stability of tetracycline-regulated gene expression with low basal activity by using the rtTA2S-M2 transactivator and insulator-flanked reporter vectors. *Gene* **327**: 61-73.
- Ries, S. J. und C. H. Brandts** (2004). Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. *Drug Discov Today* **9**: 759-68.
- Rodriguez, R., et mult. al.** (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* **57**: 2559-63.
- Roelvink, P. W., et mult. al.** (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* **72**: 7909-15.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, T. G. Ward** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**: 570-3.
- Rubin, M. A. und A. M. De Marzo** (2004). Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* **17**: 380-8.
- Rubinchik, S., S. Lowe, Z. Jia, J. Norris, J. Dong** (2001a). Creation of a new transgene cloning site near the right ITR of Ad5 results in reduced enhancer interference with tissue-specific and regulatable promoters. *Gene Ther* **8**: 247-53.
- Rubinchik, S., et mult. al.** (2001b). A complex adenovirus vector that delivers FASL-GFP with combined prostate-specific and tetracycline-regulated expression. *Mol Ther* **4**: 416-26.
- Rubinchik, S., J. Woraratanadharm, H. Yu, J. Y. Dong** (2005). New complex Ad vectors incorporating both rtTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both in vitro and in vivo. *Gene Ther* **12**: 504-11.

- Russo, N., M. De Nigris, A. Di Donato, G. D'Alessio** (1993). Expression of native dimers of bovine seminal ribonuclease in a eukaryotic cell system. *FEBS Lett* **318**: 242-4.
- Saez, E., D. No, A. West, R. M. Evans** (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol* **8**: 608-16.
- Salucci, V., et mult. al.** (2002). Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther* **9**: 1415-21.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Sarkis, C., et mult. al.** (2000). Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14638-43.
- Scherer, F., et mult. al.** (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* **9**: 102-9.
- Schuur, E. R., et mult. al.** (1996). Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J Biol Chem* **271**: 7043-51.
- Segawa, T., et mult. al.** (1998). Prostate-specific amplification of expanded polyglutamine expression: a novel approach for cancer gene therapy. *Cancer Res* **58**: 2282-7.
- Seidman, C. E., K. Struhl, J. Sheen, T. Jessen** (1993). Introduction of Plasmid DNA into Cells. *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. e. a. e. Ausubel. New York, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc. **Vol. 1**: 1.1.1.1.
- Seo, E., et mult. al.** (2005). Effective gene therapy of biliary tract cancers by a conditionally replicative adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase: significance of timing of 5-fluorouracil administration. *Cancer Res* **65**: 546-52.
- Shenk, T.** (1996). *Fields Virology. Adenoviridae: The Viruses and their Replication*. F.B.N. and K. D. M. u. H. P.M. Philadelphia, Raven Publishers: 2111-2148.
- Shimizu-Sato, S., E. Huq, J. M. Tepperman, P. H. Quail** (2002). A light-switchable gene promoter system. *Nat Biotechnol* **20**: 1041-4.
- Sinatra, F., et mult. al.** (2000). Bovine seminal RNase induces apoptosis in normal proliferating lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* **30**: 191-6.
- Sotos, G. A., L. Grogan, C. J. Allegra** (1994). Preclinical and clinical aspects of biomodulation of 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rev* **20**: 11-49.
- Soucek, J., et mult. al.** (2002). Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] conjugates of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) inhibit growth of human melanoma in nude mice. *J Drug Target* **10**: 175-83.
- Soucek, J., et mult. al.** (2001). Polymer conjugated bovine seminal ribonuclease inhibits growth of solid tumors and development of metastases in mice. *Neoplasma* **48**: 127-32.
- Sova, P., et mult. al.** (2004). A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases. *Mol Ther* **9**: 496-509.

- Spalletti-Cernia, D., et mult. al.** (2003). Antineoplastic ribonucleases selectively kill thyroid carcinoma cells via caspase-mediated induction of apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 2900-7.
- Springer, C. J. und I. Niculescu-Duvaz** (1996). Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT): choice of prodrugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **22**: 351-364.
- Stein, U., et mult. al.** (2001). Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem* **276**: 28562-9.
- Steinwaerder, D. S. und A. Lieber** (2000). Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* **7**: 556-67.
- Stern, M. und R. Herrmann** (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol* **54**: 11-29.
- Sweeney, P. und L. L. Pisters** (2000). Ad5CMVp53 gene therapy for locally advanced prostate cancer--where do we stand? *World J Urol* **18**: 121-4.
- Syed, S., D. P. Petrylak, I. M. Thompson** (2003). Management of high-risk localized prostate cancer: the integration of local and systemic therapy approaches. *Urol Oncol* **21**: 235-43.
- Taniguchi, T. und M. Libonati** (1974). Action of ribonuclease BS-1 on a DNA-RNA hybrid. *Biochem Biophys Res Commun* **58**: 280-6.
- Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury, S. L. McKnight** (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* **2**: 718-29.
- Trinh, Q. T., E. A. Austin, D. M. Murray, V. C. Knick, B. E. Huber** (1995). Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res* **55**: 4808-12.
- Uchida, A., D. S. O'Keefe, D. J. Bacich, P. L. Molloy, W. D. Heston** (2001). In vivo suicide gene therapy model using a newly discovered prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer: a potential alternative approach to androgen deprivation therapy. *Urology* **58**: 132-9.
- Urlinger, S., et mult. al.** (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7963-8.
- Verma, I. M. und M. D. Weitzman** (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **74**: 711-38.
- Wannenes, F., S. A. Ciafre, F. Niola, G. Frajese, M. G. Farace** (2005). Vector-based RNA interference against vascular endothelial growth factor-A significantly limits vascularization and growth of prostate cancer in vivo. *Cancer Gene Ther* **12**: 926-34.
- Webster, W. S., E. J. Small, B. I. Rini, E. D. Kwon** (2005). Prostate cancer immunology: biology, therapeutics, and challenges. *J Clin Oncol* **23**: 8262-9.
- Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresch, G. R. Nemerow** (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**: 309-19.

- Witzgall, R., E. O'Leary, A. Leaf, D. Onaldi, J. V. Bonventre** (1994). The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4514-8.
- Wolff, J. A. und V. Budker** (2005). The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* **54**: 3-20.
- Woraratanadharm, J., et mult. al.** (2004). Highly specific transgene expression mediated by a complex adenovirus vector incorporating a prostate-specific amplification feedback loop. *Gene Ther* **11**: 1399-407.
- Wu, Y., et mult. al.** (1995). A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem* **270**: 17476-81.
- Xie, X., et mult. al.** (2001). Robust prostate-specific expression for targeted gene therapy based on the human kallikrein 2 promoter. *Hum Gene Ther* **12**: 549-61.
- Xie, Y., J. D. Gilbert, J. H. Kim, S. O. Freytag** (1999). Efficacy of adenovirus-mediated CD/5-FC and HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapies concomitant with p53 gene therapy. *Clin Cancer Res* **5**: 4224-32.
- Xu, Z. L., H. Mizuguchi, T. Mayumi, T. Hayakawa** (2003). Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* **309**: 145-51.
- Yakovlev, G., G. P. Moiseyev, S. Sorrentino, R. De Prisco, M. Libonati** (1997). Single-strand-preferring RNases degrade double-stranded RNAs by destabilizing its secondary structure. *J Biomol Struct Dyn* **15**: 243-50.
- Yeh, P., et mult. al.** (1996). Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J Virol* **70**: 559-65.
- Yin, D. X., L. Zhu, R. T. Schimke** (1996). Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* **235**: 195-201.
- Yoshimura, I., S. Ikegami, S. Suzuki, T. Tadakuma, M. Hayakawa** (2002). Adenovirus mediated prostate specific enzyme prodrug gene therapy using prostate specific antigen promoter enhanced by the Cre-*loxP* system. *J Urol* **168**: 2659-64.
- Yoshimura, I., S. Suzuki, T. Tadakuma, M. Hayakawa** (2001). Suicide gene therapy on LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Urol* **8**: S5-8.
- Yu, D. C., Y. Chen, M. Seng, J. Dilley, D. R. Henderson** (1999). The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res* **59**: 4200-3.
- Zeng, H., et mult. al.** (2005). Construction of prostate-specific expressed recombinant plasmids with high transcriptional activity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) promoter/enhancer. *J Androl* **26**: 215-21.
- Zhan, J., et mult. al.** (2005). Tumor-specific intravenous gene delivery using oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther* **12**: 19-25.
- Zhang, J., T. Z. Thomas, S. Kasper, R. J. Matusik** (2000). A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. *Endocrinology* **141**: 4698-710.

Zhang, L., et mult. al. (2002a). Molecular engineering of a two-step transcription amplification (TSTA) system for transgene delivery in prostate cancer. *Mol Ther* **5**: 223-32.

Zhang, Y., et mult. al. (2002b). Monogene and polygene therapy for the treatment of experimental prostate cancers by use of apoptotic genes bax and bad driven by the prostate-specific promoter ARR(2)PB. *Hum Gene Ther* **13**: 2051-64.

Zhang, Z., et mult. al. (2003). Combination with CD/5-FC gene therapy enhances killing of human bladder-cancer cells by radiation. *J Gene Med* **5**: 860-7.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1:	Überblick über den anatomischen Aufbau der Prostata.....	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung eines Adenovirus	10
Abbildung 3:	Schematische genomische Organisation des Adenovirus.	11
Abbildung 4:	Tet-On System.....	17
Abbildung 5:	Kombination des Tet-On Systems mit dem Tet-Silencer.....	19
Abbildung 6:	Genomische Organisation der Promotorregion des PSA Gens	20
Abbildung 7:	Vereinfachte Darstellung der beiden möglichen Quartärstrukturen M=M und MxM der bsRNase	22
Abbildung 8:	Stabilität der MxM und der M=M Konformation der bsRNase während der Aufnahme in die Zelle.	23
Abbildung 9:	Umwandlung von 5-FU in seine zytotoxischen Metaboliten 5-FdUMP, 5-FdUTP und 5-FUTP	26
Abbildung 10:	Minimierung der genomischen PSA-Regulatorregion durch Kombination der relevanten Promotor- und Enhancerbereiche im Shuttleplasmid	55
Abbildung 11:	PSA Gehalt im Mediumüberstand von LNCaP-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen R1881 Konzentrationen.....	57
Abbildung 12:	Androgenabhängige Luciferase-Expression nach Transfektion mit pPSAluc.	59
Abbildung 13:	Kinetik des CMV-Promotors und des PSA Promotor/Enhancer Konstrukts in LNCaP.....	60
Abbildung 14:	Luciferase Expression unter der Kontrolle des PSA Promotor/Enhancer Konstrukts.....	61
Abbildung 15:	Cis-System.....	62
Abbildung 16:	Trans-System.....	63
Abbildung 17:	Basisexpression der Cis-Konstrukte und Trans-Konstrukte in 293-Zellen	65
Abbildung 18:	Expression der Trans-Konstrukte in 293 Tet-On Zellen	66
Abbildung 19:	Kotransfektion von pTSluc und pcDNA3.1(+), pCMVrtTA bzw. pPSArtTA in LNCaP, HeLa und DU-145.	68
Abbildung 20:	Kotransfektion von pTRElucinv und pcDNA3.1(+), pCMVrtTA bzw. pPSArtTA in LNCaP, HeLa und DU-145.	70
Abbildung 21:	Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Induktion des gewebespezifischen Cis-Konstrukts pPSArtAluc und des konstitutiven Cis-Konstrukts pCMVrtTA in LNCaP.....	71

Abbildung 22:	Transfektion von pCMVrtTA _{luc} und pPSArtTA _{luc} in LNCaP, HeLa und DU-145.	73
Abbildung 23:	Luciferase Expression der beschriebenen adenoviralen Konstrukte während der viralen Replikationsphase in der Verpackungszelllinie 293.	75
Abbildung 24:	Luciferaseexpression nach Koinfektion mit unterschiedlichen Verhältnissen von AdCMVrtTA und AdTREL _{luc} in LNCaP, HeLa und DU-145.	78
Abbildung 25:	Luciferaseexpression nach Koinfektion mit unterschiedlichen Verhältnissen von AdCMVrtTA und AdtTSluc in LNCaP, HeLa und DU-145.	80
Abbildung 26:	Luciferaseexpression nach Koinfektion mit unterschiedlichen Ratios von AdPSArtTA und AdtTSluc bzw AdtTREL _{luc} in LNCaP.	82
Abbildung 27:	Luciferase Expression in LNCaP, HeLa und DU-145 nach Infektion mit AdPSArtTA und AdTREL _{luc} (1:4) bei steigender MOI.	84
Abbildung 28:	Gewebespezifität der Vektorkombination AdPSArtTA und AdtTSluc in LNCaP, HeLa und DU-145.	86
Abbildung 29:	Expressionsstärke der Vektorkombination AdCMVrtTA und AdtTSluc in LNCaP, HeLa und DU-145.	88
Abbildung 30:	Gewebespezifität der Vektorkombination AdPSArtTA und AdTREL _{luc} in LNCaP, HeLa und DU-145.	90
Abbildung 31:	Expressionsstärke der Vektorkombination AdCMVrtTA AdTREL _{luc} in LNCaP, HeLa und DU-145.	91
Abbildung 32:	Sensitivität der Zelllinien LNCaP, HeLa, DU-145 und 293 gegenüber bsRNase.	94
Abbildung 33:	Transkriptions- und Funktionalitätsuntersuchungen von bsRNase nach Gentransfer mit AdtTSr in 293 bzw. 293 Tet-On Zellen mit und ohne Induktion.	96
Abbildung 34:	Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase aus Überständen von AdtTSr bzw Addl70-3 infizierten 293 und 293 Tet-On Zellen.	98
Abbildung 35:	Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase im konstitutiven Trans-System. abgenommen.	99
Abbildung 36:	Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase im gewebespezifischen Trans-System.	100
Abbildung 37:	Western Blot zur Expressionsanalyse von bsRNase im gewebespezifischen Cis-System.	100
Abbildung 38:	Abnahme der Luciferaseaktivität 36 h bzw. 80 h nach Koinfektion von Addl70-3 AdtTSr und AdCMVluc (A) bzw. AdCMVrtTA/AdtTSr und AdCMVluc (B) und Induktion der Expression von bsRNase.	102
Abbildung 39:	Zytotoxizität von bsRNase nach Infektion mit für bsRNase kodierenden adenoviralen Vektoren.	105
Abbildung 40:	Durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen nach Infektion mit bsRNase kodierenden Viruskombinationen bzw. Kontrollen.	107
Abbildung 41:	Sensitivität von LNCaP, HeLa und DU-145 gegenüber 5-FC und 5-FU.	109
Abbildung 42:	<i>In vitro</i> Umwandlung von 5-FC zu 5-FU.	111

Abbildung 43:	Überleben nach Infektion mit den angegebenen adenoviralen Vektoren und Inkubation mit 5-FC.....	113
Abbildung 44:	Schematische Organisation der Expressionskassetten in der E1-Region von AdPSArtTAyb1-einv. Die Pfeile stellen die jeweilige Transkriptionsrichtung dar.	114
Abbildung 45:	LNCaP, HeLa und DU-145-Zellen nach Infektion mit AdPSArtTAyb-1einv.....	116
Abbildung 46:	LNCaP, HeLa und DU-145-Zellen nach Infektion mit der Kombination AdPSArtTAyb-1einv/AdCMVrtTA.....	117
Abbildung 47:	LNCaP, HeLa und DU-145-Zellen nach Infektion mit der Kombination AdPSArtTAyb-1einv/AdCMVrtTA im induzierten und nicht induzierten Zustand.	118
Abbildung 48:	Zelllyse nach Infektion mit AdPSArtTAyb-1einv und AdPSArtTAyb-1einv und AdCMVrtTA und Induktion.	120
Abbildung 49:	Modell der AdPSArtTAyb-1einv vermittelten gewebespezifischen Onkolyse PSA-positiver Zellen.....	120
Abbildung 50:	Modell der Antitumorwirkung von bsRNase nach direkter Applikation der adenoviralen Vektoren in das Tumorgewebe bzw. nach intravenöser Applikation.....	120

Tabellen

Tabelle 1:	Im Rahmen der Arbeit verwendete, nicht selbst hergestellte Plasmide	30
Tabelle 2:	Im Rahmen der Arbeit verwendete Zelllinien.....	31
Tabelle 3:	Temperaturprofil für die Polymerase-Kettenreaktion	36
Tabelle 4:	Im Lauf der Arbeit generierte und verwendete Plasmidvektoren.....	51
Tabelle 5:	Im Lauf der Arbeit generierte und verwendete adenovirale Vektoren	52
Tabelle 6:	Ermittlung der Transfektionseffizienzen unterschiedlicher Reagenzien in LNCaP, HeLa und DU-145 durch visuelle Beurteilung.....	53
Tabelle 7:	MOI ₅₀ der untersuchten Zelllinien nach Infektion im Monolayer und Infektion im Reaktionsgefäß	54
Tabelle 8:	Induktion der Expression von AdTRELuc <i>in trans</i> durch rtTA Expression von AdPSArtTAcdinv in LNCaP, HeLa und DU-145.....	92

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlichst danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn apl. Prof. Dr. J. Graw danke ich für die Betreuung dieser Arbeit als Erstgutachter, sein Interesse und seine konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Dr. Bernd Gänsbacher gebührt mein Dank für die Aufnahme an seinem Institut und seinem kontinuierlichen Interesse am Fortgang der Arbeit.

Vielen Dank meiner Gruppenleiterin Frau Dr. Martina Anton für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Betreuung und die Freiheit, eigene Ideen entwickeln und verwirklichen zu können.

Herrn Prof. Dr. A. Gierl möchte ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danken.

Bei Herr Prof. Dr. H. H. D Meyer bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens

Ganz besonders möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung bedanken, die es geschafft haben, ihre menschliche Seite im nicht immer einfachen Arbeitsalltag zu behalten. Hierbei seien ganz besonders erwähnt: Katja Ahrens, (*just for being there...*, und natürlich für diverse Nachtschichten im Dienste der RNase), PD Dr. Per Holm für die enthusiastische Unterstützung bei YB-1 Fragen, Sepp Strassmayr für viele Liter Puffer und Nährmedien, Eva Schmalzl für viele Maxipreps und noch viel mehr Minipreps, Franz Scherer und Dr. Claas Hinze.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Peter Klatt, Dr. Andrea Gnirke, Dr. Tobias Hildebrandt und Herrn Dipl. Chem. Josef Preiherr danken. Ihr wart, jeder auf seine Weise, ein großes Vorbild für mich!

Ein ganz großes Dankeschön an alle meine Freunde für ihre Geduld und ihre Unterstützung!

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die durch Ihre fortlaufende Unterstützung in jeder Lebenslage zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!