

Aus dem Institut für Experimentelle Onkologie  
Klinikum rechts der Isar in München  
Technische Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Untersuchung des onkolytischen Effektes  
von dem YB-1 abhängigen Adenovirus dl520  
in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung bzw. Chemotherapie  
an Glioblastom-Zelllinien *in vitro* und *in vivo***

Alexa Bieler

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher
2. apl. Prof. Dr. A. Krüger
3. Univ.-Prof. Dr. M. Molls

Die Dissertation wurde am 03. Juli 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24. Januar 2007 angenommen.

meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.2	Vielfachresistenz	2
1.3	Das Y-Box bindende Protein YB-1	4
1.4	Adenoviren	7
1.5	Onkolytische Viren – dl520 im Speziellen	10
1.6	Bestrahlung, Chemotherapie und Histondeacetylase-Inhibitoren	13
1.7	Kombinationstherapie	15
1.8	Zielsetzung	17
2.	Methoden	18
2.1	Zelllinien, Zellkultur und Zellsplitting	18
2.2	Verwendete Viren	19
2.3	Verwendete Zytostatika	19
2.4	Polymerasekettenreaktion	20
2.5	Agarosegel-Elektrophorese	21
2.6	Fällung der DNA	22
2.7	Verdau von dl520 mit Restriktionsenzymen	22
2.8	Gelelution	24
2.9	Sonden-Herstellung	25
2.10	Virale Infektion ( <i>in vitro</i> )	25
2.11	Untersuchung der Infizierbarkeit von Zellen durch GFP mittels FACS-Analyse und Photographie	26
2.12	Wachstumskurve der Zelllinien U87 und U373 mit und ohne Bestrahlung	27
2.13	Untersuchung der Expression von YB-1 in Glioblastom-Zelllinien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	27
2.14	Sulforhodamin-Test zur Bestimmung von IC <sub>50</sub> -Werten nach Zytostatika bzw. Trichostatin A Inkubation	29
2.15	Vorbehandlung der untersuchten Zelllinien und Infektion mit Virus zur späteren DNA-Isolation	31
2.15.1	<i>In vitro</i> Zytostatika- bzw. Trichostatin A-Inkubation und Infektion mit dl520	31
2.15.2	<i>In vitro</i> Bestrahlung und Infektion mit dl520	32
2.16	DNA-Isolation aus <i>in vitro</i> Zellen	33
2.16.1	DNA-Extraktion und Deproteinisierung mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	33
2.16.2	Verwendung des QIAgen DNeasy Tissue Kits	34
2.16.3	DNA-Isolation aus <i>in vivo</i> Gewebe mittels QIAgen DNeasy Tissue Kit	34
2.17	Southern Blot Analyse	35
2.17.1	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	35
2.17.2	Gelelektrophorese der DNA-Proben	36
2.17.3	Southern Blotting	36
2.17.4	Hybridisierungs-Analyse	37
2.18	Northern Blot Analyse	39
2.18.1	Infektion der Zellen mit dl520	39
2.18.2	Isolation von RNA aus <i>in vitro</i> Zellen	39
2.18.3	Northern Blotting	40
2.19	Amplifikation von Viren	42
2.20	Virusaufreinigung	44

2.21	Bestimmung der Gesamtpartikelzahl bzw. des viralen Titers mit Hilfe des Plaquetests .....	46
2.22	Partikelbestimmung von dl520 und Ad5-WT im Vergleich .....	47
2.23	Partikelbestimmung von dl520 mit und ohne Irinotecan-Inkubation bzw. Bestrahlung.....	48
2.24	Bestimmung der Viralen Freisetzung von dl520 mit und ohne Bestrahlung .....	48
2.25	Zytopathischer Effekt Test .....	49
2.25.1	CPE-Test zum Vergleich von in der E1-Region deletierter Viren.....	49
2.25.2	CPE-Test von dl520 und Ad5-WT in Glioblastom-Zellen im Vergleich .....	50
2.25.3	CPE-Test mit Bestrahlung.....	50
2.25.4	CPE-Test mit Zytostatika- und Trichostatin A-Gabe.....	50
2.25.5	Quantifizierung der CPE-Tests .....	51
2.26	Sonden-Klonierung von 3646bp in pUC18 und Transformation von DH10B .....	51
2.27	Bestimmung der CAR-Expression mittels FACS-Analyse.....	54
2.28	<i>In vivo</i> Xenograft Mausmodell mit subkutanen U87-Glioblastomen .....	55
2.29	<i>In vivo</i> Xenograft-Mausmodell mit subkutanen U373-Glioblastomen .....	58
2.30	Statistische Auswertung der Xenograft-Mausmodelle.....	59
2.31	Histologie .....	59
2.32	Immunhistochemie .....	60
3.	Ergebnisse .....	63
3.1	Nachweis der 11-bp Deletion von dl520 und Ausschluss einer Wildtyp-Kontamination.....	63
3.2	Hohe Transkriptionsrate von dl520 in vielfachresistenten Tumorzellen, stark verringerte in MDR-sensiblen Zellen.....	64
3.3	Qualitativ und quantitativ nachgewiesene Transduktionseffizienz in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 .....	66
3.3.1	Effektive Infektionsfähigkeit von Ad-GFP in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, aber nicht in T98-G.....	66
3.3.2	Adenovirale Transduktionseffizienz in den Glioblastom-Zellen U87 und U373, jedoch nicht in T98-G .....	68
3.4	YB-1 Lokalisation im Kern der Glioblastom-Zellen nach Bestrahlung und Irinotecan-Inkubation .....	73
3.5	Effektive Zelllyse der Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch dl520.....	75
3.6	Erhöhung der Glioblastom-Zelllyse von dl520 durch niedrig-dosierte Bestrahlung, Chemotherapie und Trichostatin A-Behandlung.....	78
3.7	Vergleichbare Expression der adenoviralen <i>Early Genes</i> in den Glioblastom-Zelllinien nach Infektion mit dl520 und Ad5-WT .....	81
3.8	Vergleichbare Virusproduktion von dl520 und Ad5-WT in U373, höhere Partikelbildung von dl520 in U87 und vielfachresistenten Tumorzellen.....	82
3.9	Effektive Lyse der Glioblastom-Zellen durch dl520, jedoch etwas schwächer als Zelllyse durch Ad5-WT .....	83
3.10	Verbesserter onkolytischer Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch Bestrahlung.....	84
3.10.1	Moderate Wachstumsinhibition der U87- und U373-Zellen durch Bestrahlung .....	84
3.10.2	Erhöhter zytopathischer Effekt von dl520 durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zellen .....	85
3.10.3	Erhöhte Replikation von dl520 durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zellen.....	87
3.10.4	Erhöhung der Virusproduktion von dl520 nach Bestrahlung in den Glioblastom-Zellen .....	88

3.10.5	Erhöhung der viralen Freisetzung von dl520 aus den Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung .....	90
3.10.6	Hemmung des Wachstums von subkutanen U87-Tumoren im <i>in vivo</i> Xenograft-Modell der Maus durch dl520 .....	91
3.10.7	<i>Proof of Principle</i> der verbesserten Wachstumsinhibition durch die Kombination aus dl520 mit Bestrahlung im <i>in vivo</i> Xenograft-Modell mit U373-Tumoren .....	95
3.10.8	Nachweis von adenoviraler DNA in allen mit Virus behandelten U87-Tumoren, jedoch nicht in den nur bestrahlten und den Kontrolltumoren.....	99
3.10.9	Nachweis des adenoviralen Hexonproteins in den mit Virus behandelten U87-Tumoren, jedoch nicht in den bestrahlten und den Kontrolltumoren.....	99
3.10.10	Makroskopisch sichtbare Verkleinerung der U87-Tumoren nach Therapie mit dl520 alleine, mit RTx und mit der Kombination aus dl520 + RTx.....	101
3.10.11	Inhomogene Struktur der mit dl520 behandelten U87-Tumoren im Gegensatz zur homogenen Struktur der bestrahlten und Kontrolltumoren.....	101
3.11	Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation durch Zytostatika – Erhöhung der CAR-Expression durch Histondeacetylase-Inhibitoren.....	105
3.11.1	Höchste Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber der Einzelgabe von Trichostatin A und der Kombination aus Trichostatin A + Irinotecan in der Untersuchung der IC <sub>50</sub> -Werte .....	105
3.11.2	Verstärkung des zytopathischen Effektes von dl520 durch Zytostatika .....	114
3.11.3	Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen mittels Zytostatika – keine Erhöhung in den MDR-positiven 257RDBs .....	121
3.11.4	Kein bzw. nur ein gering inhibitorischer Effekt von Irinotecan auf die Virusproduktion von dl520.....	131
3.11.5	Erhöhung der CAR Expression in den Glioblastom-Zellen durch Trichostatin A .....	132
4.	Diskussion .....	134
4.1	YB-1 abhängige Replikation des Adenovirus dl520 in vielfachresistenten Tumoren. ....	134
4.2	YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Bestrahlung.....	137
4.3	YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Zytostatika und Verbesserung der Transduktionseffizienz durch einen Histondeacetylase-Inhibitor .....	141
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick - Möglichkeiten der Verbesserung eines über YB-1 replizierenden Adenovirus .....	145
5.	Zusammenfassung .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.	Summary .....	II
7.	Literaturverzeichnis.....	III
8.	Materialien .....	XIX
8.1	Angefertigte Lösungen .....	XIX
8.2	Materialien .....	XXI
8.3	Tiere .....	XXIV
9.	Abbildungsverzeichnis .....	XXV
10.	Abkürzungsverzeichnis .....	XXVIII
11.	Danksagung.....	XXXI
12.	Curriculum Vitae.....	XXXII

# 1. Einleitung

## 1.1 Krebs

Jeder dritte Einwohner der Bundesrepublik Deutschland erkrankt an einem malignen Tumor, welcher durch seinen bösartigen Verlauf nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den hochzivilisierten Industrieländern darstellt. Die meisten soliden Tumoren befinden sich durchschnittlich 5 bis 10 Jahre im „präklinischen Tumorwachstum“ und entziehen sich der Diagnostik, was dazu führt, dass die Vorsorge häufig schwer realisierbar ist, und die Hauptbemühungen in der Therapie maligner Tumoren liegen<sup>22</sup>. Jedoch können nur ungefähr 40 % der Tumorpatienten durch die derzeitigen therapeutischen Maßnahmen für länger als zehn Jahre geheilt werden. Viele solide Tumorerkrankungen haben nur eine sehr niedrige Überlebensrate, weil sie lange unbemerkt bleiben und erst in späten Stadien diagnostiziert werden. So fehlen bei dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas in den überwiegenden Fällen die Frühsymptome, so dass nur bei 10 bis 20 % der Patienten das Pankreaskarzinom reseziert werden kann, und auch dann im Durchschnitt nur eine 5-Jahresüberlebenschance von 5 % besteht<sup>86, 207</sup>. Ebenso fehlen bei Magenkarzinomen klinische Symptome häufig gänzlich oder sind nur sehr unbestimmt, so dass sie mit exogenen Ursachen assoziiert werden. Diese Tumoren haben dann selbst bei einer R<sub>0</sub>-Resektion im Durchschnitt nur noch eine 5-Jahresüberlebensrate von 45 %<sup>51, 85</sup>. Die Klinik eines soliden Tumors beschrieb Theodor Storm, der an einem Magenkarzinom verstarb, wie folgt: „Ein Punkt nur ist es, kaum ein Schmerz, nur ein Gefühl, empfunden eben; und dennoch spricht es stets darein und dennoch stört es dich zu leben.“ Die 5-Jahresüberlebensrate aller Patienten mit Bronchialkarzinomen, der häufigsten Krebstodesursache von Männern, beträgt nur 5 %, und  $\frac{2}{3}$  der Fälle sind bereits bei Aufnahme in die Klinik inoperabel<sup>84, 98</sup>. Die primäre Behandlungstechnik solider Tumoren ist die chirurgische Tumorsektion, die meist mit Bestrahlung und / oder Chemotherapie kombiniert wird.

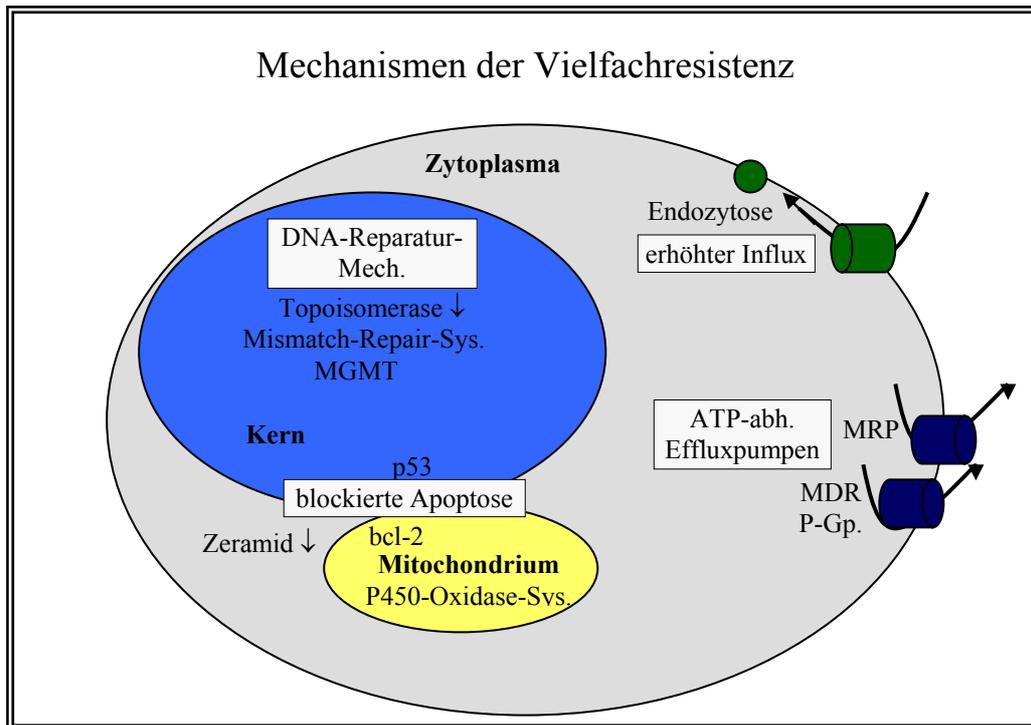
Bezogen auf Hirntumoren bleibt trotz Fortschritten in neurochirurgischen Techniken, Strahlentherapie und Chemotherapie die Prognose von Patienten mit Glioblastomen unbefriedigend. Obwohl individuelle Tumorzellen innerhalb des Gehirns weit entfernt vom Primärtumor streuen<sup>26, 116</sup>, rezidivieren ein Großteil lokoregional innerhalb von 2 cm von der Kontrastmittel-anreichernden CT-Grenze<sup>159, 242</sup>. Die mittlere Überlebensrate bei Glioblastomen liegt zwischen 6 bis 12 Monaten<sup>65, 231</sup>.

Das Gros der Patienten mit den beschriebenen Tumoren erfährt trotz unterschiedlichster Therapiemöglichkeiten aufgrund des fortgeschrittenen Tumorstadiums nur eine palliative oder symptomatische Behandlung. Um so wichtiger ist es, möglichst früh den Tumor zu diagnostizieren und mit der Behandlung zu beginnen. Somit muss einerseits die Therapie von Tumoren in früheren Stadien radikalisiert werden, um die Rezidivrate zu senken, und andererseits an neuen Therapiemöglichkeiten für fortgeschrittene Tumoren gearbeitet werden. Denn je frühzeitiger und radikaler die Therapie erfolgt, desto größer sind die Heilungschancen.

Jedoch sind Tumoren häufig sehr inhomogen strukturiert und entwickeln aufgrund ihrer chromosomalen und genetischen Instabilität Resistenzmechanismen gegenüber den eingesetzten Therapien. So werden bei Bestrahlung oder Chemotherapie häufig einzelne resistente Tumorzellen selektiert, die unter der Therapie oder nach Therapieende proliferieren und zu Rezidiven führen.

## 1.2 Vielfachresistenz

Biologische Resistenzmechanismen von soliden Tumoren gegenüber zytotoxischen Antitumorsubstanzen können unterteilt werden in die pharmakokinetische und in die zelluläre Resistenz. Zu den zellulären Mechanismen zählen eine verminderte Aktivität des nuklearen Enzyms DNA Topoisomerase II, welche bei der DNA-Replikation die DNA-Stränge spaltet und nach einer Umlagerung wieder zusammenfügt<sup>39, 47, 102</sup>. Defekte des zellulären, zur Apoptose führenden Signaltransduktionsweges können sowohl Folgen der malignen Transformation wie Mutationen von p53<sup>147</sup> oder Bcl-2<sup>38</sup> als auch nach Zytostatika-Exposition erworbene Veränderungen der Zellzyklusmaschinerie<sup>100, 117, 209</sup> oder des Zeramid-Niveaus<sup>144</sup> sein. Im Rahmen von Tumorresistenz werden zusätzlich Entgiftungsmechanismen aktiviert, zu denen einerseits Reparaturpfade wie das DNA *mismatch repair system* (MMR)<sup>183</sup> oder die O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT)<sup>132</sup> und andererseits die Aktivierung des Cytochrom-P450-Oxidase Systems<sup>211</sup> gehören. Neben der verminderten Aufnahme von wasserlöslichen Zytostatika, die über zelluläre Transporter und Endozytose in die Zelle eindringen, ist der vermehrte Auswurf von Chemotherapeutika aus der Zelle eine weitere Art der Vielfachresistenz, die in der Literatur auch als *Multidrug Resistance* oder MDR bezeichnet wird (siehe Abb. 1).



**Abb. 1 Mechanismen der Vielfachresistenz.** Genauere Informationen siehe Text.  
 abh.: abhängig, bcl-2: B-cell lymphoma 2, MDR: *Multidrug-Resistance*, Mech.: Mechanismen,  
 MGMT: O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA Methyltransferase, MRP: *multidrug resistance related protein*, P-Gp.: P-Glykoprotein, Sys.: System.

Im Jahre 1976 wurde ein 170 kDa großes glykosyliertes Membranprotein aus Colchicin-resistenten Chinesischen Hamsteroovarien isoliert, das Proteinen, die für die Medikamentenpermeabilität verantwortlich waren (Englisch: *pump*), gleich und deshalb P-Glykoprotein benannt wurde<sup>111</sup>. Zehn Jahre später wurde das P-Glykoprotein exprimierende MDR1-Gen aus humanen Tumorzellen isoliert<sup>30, 237, 238</sup>. Das humane, phosphorylierte und glykosylierte P-Glykoprotein setzt sich aus 1280 Aminosäuren zusammen und besteht aus 2 homologen Hälften mit 6 hydrophoben Transmembransegmenten und einer intrazellulären ATP-Bindungsstelle. Strukturell bildet es einen Zylinder mit einer wässrigen Kammer, die zur extrazellulären Seite geöffnet und zur zytoplasmatischen Seite geschlossen ist. P-Glykoprotein arbeitet somit als ATP-abhängige Pumpe, die Substrate detektiert und aus der Zelle entfernt. Es gehört zu der Superfamilie der ABC Transporter (ABC = *ATP-binding cassette*), der mehr als vierzig verschiedene Proteine angehören. Die ABC-Transporter werden in normalem Gewebe exprimiert und besitzen protektive Funktionen gegenüber Xenobiotika. Durch Expression an der Blut-Gewebe-Schranke schützen sie das Gehirn, die Hoden und Feten<sup>252</sup>. Sie limitieren die enterale Aufnahme von Stoffen im Gastrointestinaltrakt und fördern die Ausscheidung von Substanzen in der Gallenblase und der Niere. Andererseits sind die ABC-Transporter mit einem MDR-Phänotyp (*multidrug resistance*) assoziiert, der

erstmalig 1970 von Biedler et al. beschrieben wurde und durch die Kreuzresistenz von Tumoren gegenüber Zytostatika charakterisiert ist<sup>18</sup>. Der MDR-Phänotyp kann in 2 Mechanismen unterteilt werden: 1) die klassische, P-Glykoprotein abhängige MDR, die durch die Überproduktion des 170-kDa großen, membranübergreifenden P-Glykoprotein verursacht wird<sup>111, 237</sup>, und 2) die atypische, nicht P-Glykoprotein abhängige MDR, bei der das *Multidrug-Resistance-Related Protein* MRP überexprimiert wird<sup>37</sup>. Beide Transporter teilen eine 15-prozentige Homologie und befördern verschiedene Medikamente aus den Zellkompartimenten<sup>61, 145</sup>. P-Glykoprotein ist überexprimiert in Karzinomen des Kolons<sup>52, 67</sup>, der Nieren<sup>52, 67</sup>, der Nebennieren<sup>52, 67</sup>, der Leber<sup>52, 67</sup>, der Ovarien<sup>7, 103, 210</sup> und der Mammae<sup>112, 222, 234, 240</sup> sowie in Sarkomen<sup>27, 28</sup>. In kleinzelligen Lungenkarzinomen liegt die MRP1-Expression sogar bei über 80 % der Zellen<sup>173, 255</sup> vor. Chirurgisch entfernte Glioblastome exprimieren in hohem Maße MDR1 und kein oder nur wenig MRP<sup>1, 163, 166</sup>. Im Gegensatz dazu weisen die Zellkultur-Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 eine andere Genexpression auf, wobei MDR1 nicht nachweisbar ist und nur U87 MRP exprimiert<sup>166</sup>. Zu den Substraten der Proteine von MDR und MRP gehören unter anderen das interkalierende Antibiotikum Daunorubicin, der Mitose-Hemmstoff Docetaxel und der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A. Seit den frühen Achtzigern wird an Inhibitoren der P-Glykoprotein-Resistenz geforscht, zu denen u.a. der Kalzium-Kanal-Antagonist Verapamil, das Antiarrhythmikum Amiodaron, verschiedene Neuroleptika wie Phenothiazin, Tamoxifen, das Hormon Progesteron und Cyclosporin A gehören. In klinischen Versuchen haben sich diese jedoch als nicht wirksam erwiesen.

MDR- und MRP-Überexpression wird neben Chemotherapeutika, die dem Gen ihren Namen gegeben haben, auch durch anderen genotoxischen Stress wie UV-Bestrahlung<sup>93, 177</sup> und Hyperthermie<sup>219</sup> hervorgerufen. Die Regulation von MDR und MRP ist hochkomplex, jedoch weisen verschiedene Publikationen darauf hin, dass neben p53 und pRb die nukleare Akkumulation des Y-Box bindenden Proteins YB-1 in hohem Maße an der Regulation der Genpromotoren beteiligt ist<sup>9, 131</sup>.

### 1.3 Das Y-Box bindende Protein YB-1

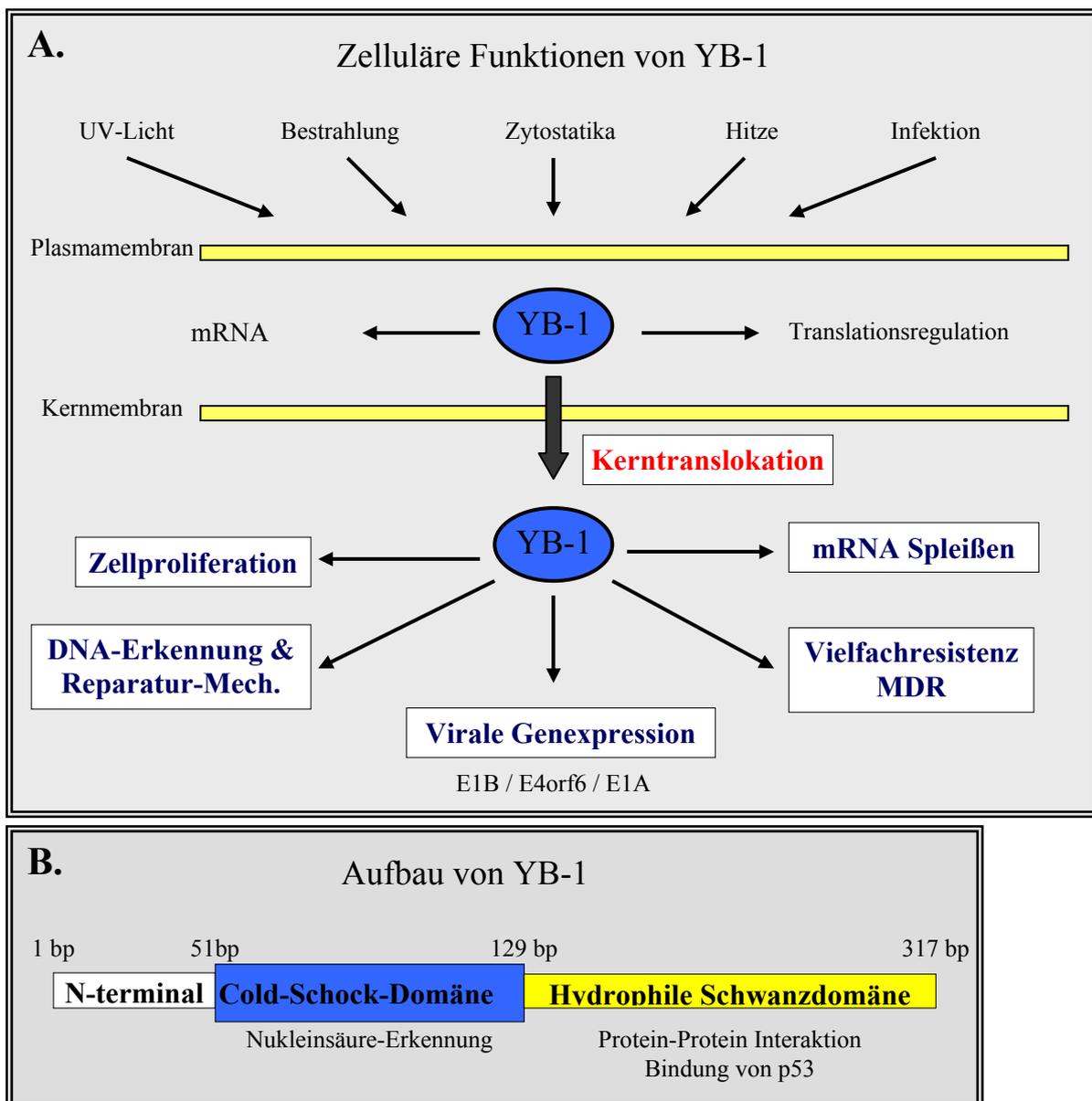
Das 35 kb-große Y-Box bindende Protein YB-1 gehört zur Familie der Y-Box bindenden Proteine, die wiederum Mitglied der CSD-Protein-Superfamilie (CSD = *cold shock domain*) sind<sup>71, 250</sup>. Auch Bakterien besitzen das *Cold Shock Protein*, in denen es als RNA Chaperon fungiert und hilft neu synthetisierte Proteine korrekt zu falten<sup>249</sup>. Das YB-1

Gen enthält 8 Exone und ist auf dem Chromosom 1p34 lokalisiert. Seine mRNA ist ungefähr 1,5 kb lang und kodiert für das 35 kDa große Protein, welches sich sowohl aus einer N-terminalen Domäne, der evolutionär erhaltenen *Cold Shock* Domäne, welche die DNA-bindende Region enthält, als auch aus der C-terminalen Schwanzdomäne, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist<sup>71, 250</sup>, zusammensetzt (Abb. 2 B). YB-1 ist an der Regulation vieler verschiedener zellulärer Funktionen, wie Transkription, Translation, DNA-Reparatur, Medikamentenresistenz und zellulärem Stress beteiligt. YB-1 agiert als Transkriptionsfaktor über Bindung an die invertierte 5'-CCAAT Sequenz<sup>131, 177</sup>, die auch in der Promoterregion des MDR1-Genes enthalten ist<sup>225</sup>. Da seine Aktivität durch UV-Licht und Zytostatika erhöht wird, gilt es als positiver Transkriptionsfaktor zur Hochregulation des MDR1 Genes<sup>74, 176, 215, 236</sup>. Es reguliert aber auch Y-Box-unabhängig die Genexpression durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und bindet an einzelsträngige DNA, die sich vor allem in Regionen mit aktiven Transkriptionspromotoren befindet<sup>247</sup>. Dazu ist es direkt und durch Interaktion mit anderen RNA-bindenden Proteinen an der Regulation der Translation beteiligt<sup>6, 49, 217, 218</sup>. Über Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen fördert YB-1 das Splicing der adenoviralen E1A prä-mRNA und agiert als Chaperon<sup>29, 48</sup>. Des Weiteren kann das Y-Box bindende Protein Enzyme wie eine Thymidinkinase<sup>57, 143</sup> und die DNA-Polymerase  $\alpha$ <sup>182</sup> aktivieren. Es ist weiterhin an der Regulation zellulärer Proliferation beteiligt, und zwar wirkt YB-1 transaktivierend auf c-Myc und p73 und andererseits inhibierend auf p53<sup>178, 239</sup>. Sowohl c-Myc als auch die Tumorsuppressoren-Produkte p53 und p73 sind in die Reaktion auf DNA-schädigende Agenzien involviert<sup>50, 68</sup>. YB-1 selbst agiert direkt als DNA-Reparaturprotein über Interaktion mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)<sup>101</sup>, über YB-1s 3'→5'-Exonukleaseaktivität<sup>104, 153, 154</sup> und über Bindung an Cisplatin-veränderte DNA<sup>36, 59, 101</sup>, wobei Cisplatin ein interkalierendes Zytostatikum ist (Abb. 2 A).

Lokalisiert ist YB-1 hauptsächlich – gebunden an Ankerproteine<sup>126</sup> – im Zytoplasma, wird aber in der S-Phase (der Synthese-Phase) und durch genotoxischen Stress der Zelle wie Zytostatika<sup>137, 176, 253</sup>, Hyperthermie<sup>219</sup> oder UV-Bestrahlung<sup>126, 236</sup> in den Zellkern transloziert. Damit geht einher, dass YB-1 in vielen Tumorzellen hochreguliert und im Kern lokalisiert ist, wo es an der Regulation der MDR- und MRP-Expression beteiligt ist<sup>89</sup>. Des Weiteren haben Untersuchungen an Patientenmaterial gezeigt, dass YB-1 in verschiedenen Tumoren wie Mamma-, Ovarial- und Synovialsarkomen als wichtiger negativ prognostischer Faktor angesehen werden kann<sup>97, 107, 175</sup>.

Neben den beschriebenen Funktionen spielt YB-1 auch eine zentrale Rolle bei der adenoviralen Replikation. Dabei konnte gezeigt werden, dass YB-1 an der Expression der

viralen Polymerase, welche in der viralen E2-Region kodiert wird, beteiligt ist<sup>88</sup>. In einem weiteren experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass Adenoviren effizient in Tumoren mit dem *Multidrug Resistant* Phänotyp replizieren, Zelllyse vermitteln und somit einen Therapieansatz für vielfachresistente Tumoren darstellen<sup>89</sup>. Die vorhandenen Daten lassen stark vermuten, dass das Y-Box bindende Protein somit ein wichtiges Zielmolekül in der onkolytischen Therapie maligner Tumoren mittels Adenoviren sein kann, worauf später näher eingegangen wird.



**Abb. 2 A. Funktionen des Y-Box bindenden Proteins YB-1** (nach Kohno et al., 2003<sup>125</sup>). **B. Aufbau von YB-1** (nach Kloks et al., 2002<sup>124</sup>). Genauere Informationen siehe Text.  
 bp: *base pair(s)*, Mech.: Mechanismen, E1B / E4orf6 / E1A: frühe adenovirale Gene.

## 1.4 Adenoviren

Adenoviren wurden zum ersten Mal im Jahre 1953 aus Rachenpolypen isoliert und sind nach ihrem Isolationsgewebe, das im Englischen mit *adenoids* zu übersetzen ist, benannt worden<sup>198</sup>. Die 80–100 nm großen, humanen Adenoviren bestehen aus einem Zentralkörper (*Core*) und einem Kapsid ohne Membranhülle mit eikosaedrischer Struktur und werden in 6 Gruppen mit insgesamt 51 Serotypen unterteilt. Das Genom besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA mit einer Länge von 36 kb, an deren 5'-Enden ein terminales Protein kovalent gebunden ist. Das Kapsid setzt sich aus den Hexonproteinen, Pentonbasen, Fibern und einer Knob-Domäne zusammen (Abb. 3 A).

Strukturell kann das Genom in frühe Transkriptionseinheiten E1–E4 (*early*), späte Transkriptionseinheiten L1–L5 (*late*) und invertierte Sequenzwiederholungen an den Genomenden, die als Replikationsstartpunkte dienen, eingeteilt werden (Abb. 3 B). Über Interaktion sowohl zwischen dem Fiber Knob seines Kapsids und dem zellulären Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptor (CAR) als auch zwischen den Penton-Basen des Kapsids und zellulären Integrinen wird das Virus mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen, bevor es in den Kern transferiert wird<sup>167</sup>. Die E1-Region kodiert für die *immediate early genes* E1A und E1B, wobei für deren Expression keine anderen von der Zelle neusynthetisierten viralen Faktoren nötig sind. Aus den E1A-Genen, die drei konservierte Regionen CR1–CR3 enthalten, werden 5 verschiedene mRNAs gespleißt, wobei die 12S und 13S mRNAs die häufigsten und wichtigsten sind<sup>11, 23</sup>. Dem 12S Protein fehlt die CR3-Region, die transaktivierend auf die frühen viralen Gene einwirkt<sup>75</sup> und damit zur Replikation benötigt wird<sup>15, 108, 171, 190, 224</sup>, wogegen das 13S Protein die Transkription der viralen *delayed early genes* E2 bis E4 induziert<sup>109</sup>. Nur wenige Publikationen weisen darauf hin, dass 12S transaktivierende Fähigkeiten hat<sup>24, 136, 191, 248</sup>. 12S kann jedoch nur den E2*early*-Promoter aktivieren, aber durch fehlende Aktivierung der anderen Gene keine effiziente Replikation und Lyse vermitteln. E1A dereguliert den Zellzyklus und induziert in ruhenden Zellen die S-Phase und damit die virale DNA-Synthese (Abb. 4). Diese Wechselwirkung, vermittelt durch die CR1- und CR2-Regionen, basiert einerseits auf der Freisetzung von E2F durch Bindung an die Rb-Protein-Familie<sup>138, 244, 258</sup> und deren Phosphorylierung sowie andererseits auf Modulation der Chromatinstruktur durch Bindung an p300<sup>92</sup>, welches eine Histonacetylase-Aktivität aufweist<sup>8</sup>. Die E1B-Gene wirken anti-apoptotisch, wobei E1B55K<sup>204</sup> zusammen mit E4orf6<sup>44</sup> durch Bindung an p53 den p53-vermittelten Zellzyklusarrest inhibiert. Die E2-Genprodukte werden für die Replikation der viralen DNA

benötigt und stehen unter der Kontrolle von 2 Promotoren. Am Infektionsbeginn kontrolliert der *E2<sub>early</sub>*-Promoter über E2F-Bindung die E2-Expression<sup>78, 79, 95, 187</sup>. Alle anderen frühen Gene werden durch E1A-13S transaktiviert, wobei die Aktivierung des E2A Genes wesentlich eher stattfindet als die von E3 und E4, da die Expression von E2 die Synthese von E4orf6 additiv unterstützt<sup>170</sup>. Nach 5 - 6 h übernimmt der *E2<sub>late</sub>*-Promoter, wobei Holm et al. zeigen konnten, dass im Kern akkumuliertes YB-1 an der Aktivierung des *E2<sub>late</sub>*-Promoters beteiligt ist<sup>88</sup>. Die E3-Gene modulieren die Wirtsimmunantwort<sup>13</sup> und können Apoptose induzieren<sup>230</sup>. Die E4-Gene regulieren die Transkription durch Phosphorylierung und Interaktion mit E2F. E4orf6 besitzt im Komplex mit E1B55K eine Shuttlefunktion vom Kern zum Zytoplasma<sup>69, 229</sup>. Des Weiteren liegt der Komplex aus E4orf6 und E1B55K in viralen Einschlusskörpern im Kern vor, welche Ort der viralen Transkription und Replikation sind<sup>180</sup>. Die späten L1-L5-Gene sind fast ausnahmslos Strukturproteine<sup>16</sup>. Bezüglich der adenoviralen Replikation ist noch zu erwähnen, dass sie die Expression der zellulären Topoisomerase I und II fördert, welche beide für eine effiziente adenovirale Replikation benötigt werden<sup>206</sup>.

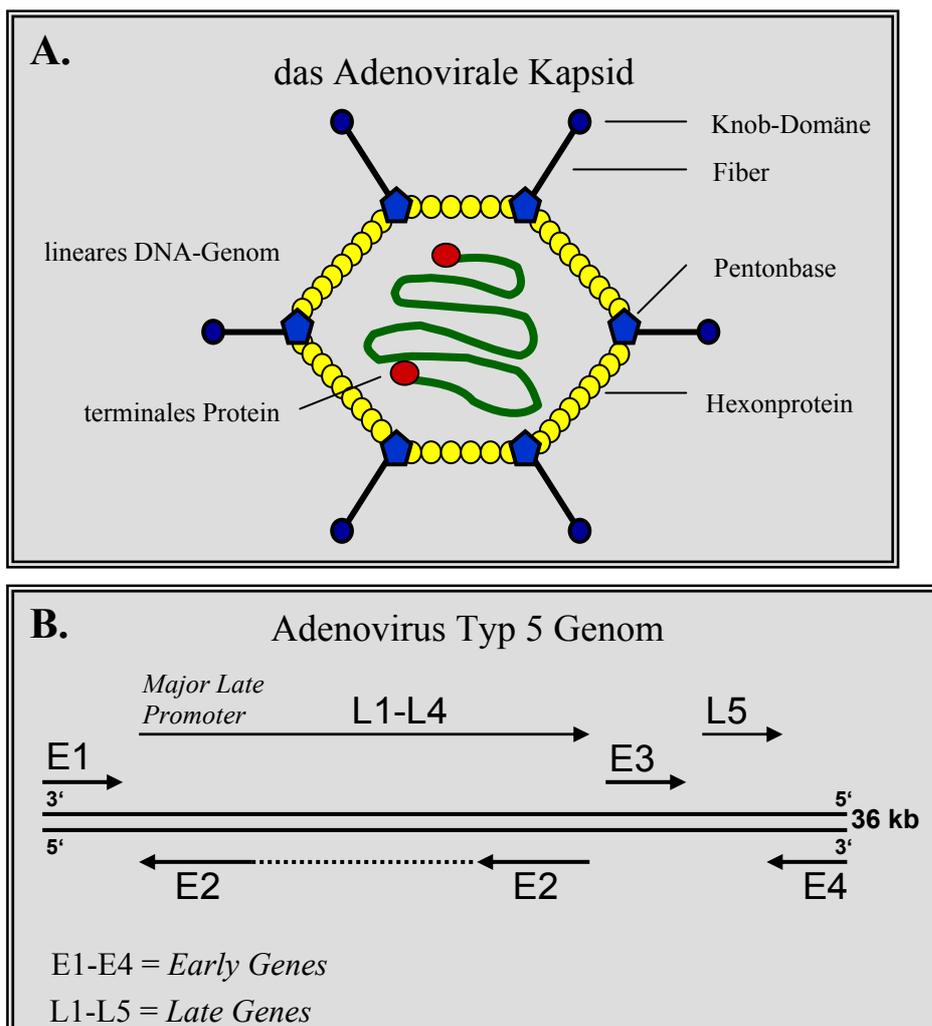
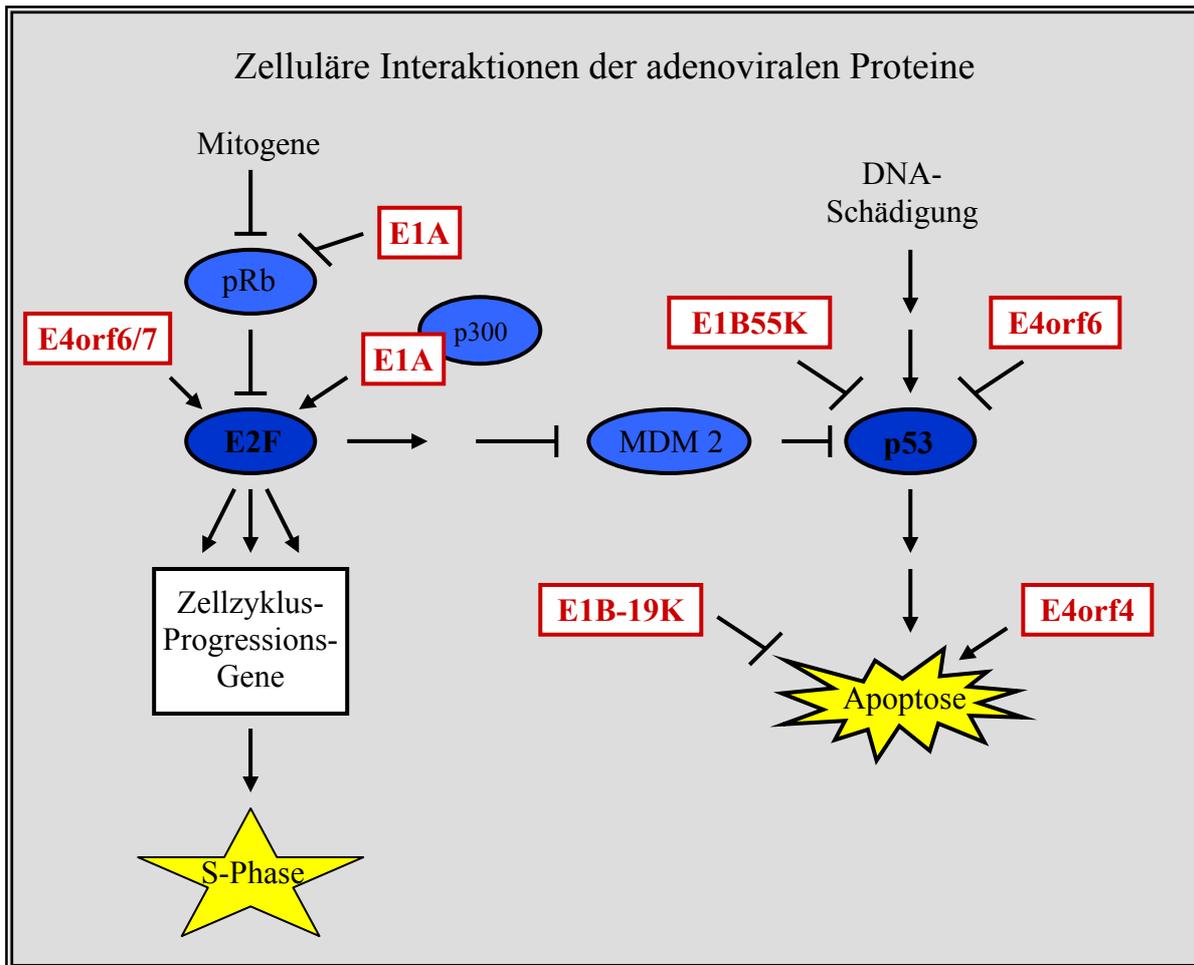


Abb. 3 A. Adenovirus Typ 5 Kapsid-Aufbau. B. Adenovirus Typ 5 Genomstruktur. Genauere Informationen siehe Text. kb: kilo base(s).

Am adenoviralen Genom ist 1962 erstmals die Entstehung von Tumoren durch Viren gezeigt<sup>233</sup> und 1977 die Funktion des *Splicings* entdeckt worden<sup>14, 34</sup>, wofür Roberts und Sharp 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Im Jahre 1987 wurde in Verbindung mit Adenoviren der zelluläre Transkriptionsfaktor E2F identifiziert<sup>128</sup> und ein Jahre später erstmals die Kooperation zwischen einem Onkogen und einem Tumorsuppressorgen<sup>244</sup>.

Seit 1990 werden adenovirale Vektoren als Vehikel in der Genterapie verwendet. Diese ermöglichen den *in vivo* Transfer sowohl in ruhende als auch sich teilende Zellen und besitzen hohe *in vivo* Stabilität. Von diesen für den Menschen nicht-onkogenen Viren lassen sich hohe Titer produzieren, was eine für den klinischen Gebrauch essentielle Voraussetzung ist, und sie infizieren ein breites Spektrum an Zellen. Die Pathogenität des genterapeutisch am häufigsten eingesetzten Adenovirus Typ 5 der Gruppe C beschränkt sich jedoch auf milde Infektionen des oberen Respirationstraktes<sup>91</sup>. Hinzu kommt, dass das adenovirale Genom nicht in das Wirtsgenom integriert wird. Dies ist ein Vorteil bei einer transienten Tumorthherapie, bei der das Virus nach Zerstörung der Tumorzellen nicht mehr benötigt wird. Im Gegensatz dazu sind sich in das Genom integrierende Retroviren zur Heilung von Gendefekten wie bei SCID (*severe combined immune deficiency*), bei denen die Genfunktion ein Leben lang benötigt wird, vorteilhafter. Jedoch wurden auch Adenoviren zur Therapie von Gendefekten verwendet, wobei für den systemischen und wiederholten Transfer korrekter humaner Gene Raum für den Einbau dieser Gene in das adenovirale Genom geschaffen werden musste. In der ersten adenoviralen Vektorgeneration wurden die frühen E1- und E3-Regionen deletiert, wodurch sich eine Einbaukapazität für 7 - 8 kb ergab. Zur Amplifikation dieser replikationsdefizienten Viren mussten Zelllinien geschaffen werden, welche die für die Replikation essentielle E1-Region in ihr Genom integriert haben, wie die HEK293 Zellen. Die zweite Vektorgeneration besaß eine zusätzliche Deletion der E2- oder E4-Gene, welche neben der geschaffenen Einbaukapazität auch einen zusätzlichen Sicherheitsfaktor zur Reduktion der Wirtsreaktion bietet. Die Herstellung von Zelllinien, die durch Integration dieser Gene in ihr Genom die Replikation der Vektoren ermöglichten, stellte sich jedoch als sehr schwierig heraus. Später wurden Helfer-abhängige Viren entwickelt, denen alle viralen Proteine fehlen, und die nur zusammen mit einem E1-deletierten Virus in 293-Zellen amplifiziert werden können.

Ein Problem von Adenoviren ist die Transduktionseffizienz der Zielzellen. Zum Nachweis der Transduktionseffizienz kann ein adenoviraler Vektor kodierend für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP) eingesetzt werden. So kann bei Infektion einer Zelle GFP exprimiert und nachgewiesen werden. Wie der Name verspricht, besitzt das Protein



**Abb. 4 Zelluläre Interaktionen der frühen adenoviralen Proteine** (nach Ben-Israel und Kleinberger, 2002<sup>12</sup>. Genauere Information siehe Text.

Eigenfluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht<sup>185</sup>, und kann unter dem Fluoreszenz-Mikroskop und im Zellsorter nachgewiesen werden.

Neben dem gentherapeutischen Transfer sind Adenoviren auch als onkolytische Viren zur selektiven Zerstörung von Tumorzellen eingesetzt worden.

## 1.5 Onkolytische Viren – dl520 im Speziellen

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts konnte in Krebspatienten, die eine Viruserkrankung erlitten oder geimpft wurden, Tumorregression beobachtet werden<sup>217</sup>. Nach Therapieversuchen mit anderen Viren als onkolytische Agenzien, die aber aufgrund ihres niedrigen Effektivitäts- zu Toxizitäts-Verhältnisses beendet worden waren, wurden im Jahre 1956 kurz nach der Isolation des Adenovirus 30 Patienten mit Zervixkarzinomen mit Adenoviren therapiert<sup>99</sup>. Zehn Jahre später erst formulierte Tatum das grundlegende Konzept einer genetischen Therapie, „Viren effizient zum Wohlergehen der Menschheit“ zu nutzen

und diese „über Regulation von Genaktivitäten ...“ zu erreichen<sup>228</sup>. Die Krebstherapie mittels onkolytischer Viren ist eine Art der Gentherapie und ist definiert als tumorspezifische Replikation und Zellyse von infizierten Tumorzellen mittels eines viralen Agens. Im Jahre 1991 wurde das erste Virus, das selektiv in Tumorzellen replizierte, konstruiert<sup>157</sup> (Abb. 5).

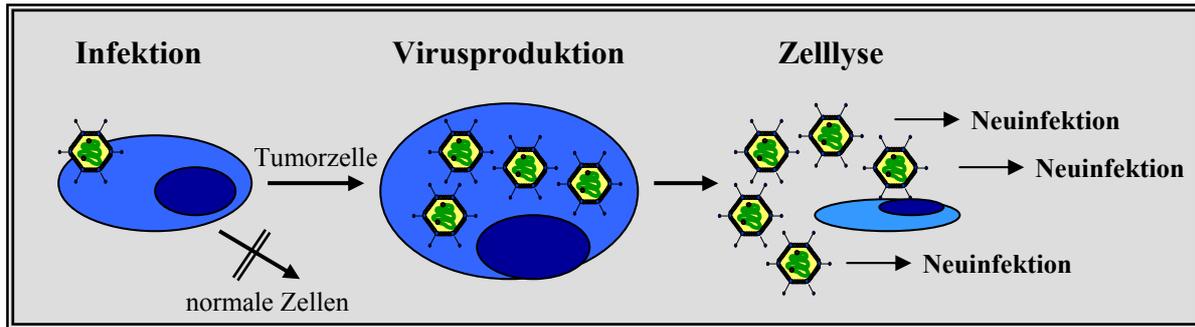
Seitdem wurden 5 generelle Mechanismen der tumorselektiven Onkolyse beschrieben. Dazu zählen 1.) der Gebrauch von Viren mit inhärenter Tumorselektivität wie Newcastle Viren<sup>146</sup> oder Vesikulären Stomatitis-Viren<sup>221</sup>, 2.) die Deletion kompletter viraler Gene essentiell für die Replikation<sup>20, 157, 160</sup> sowie 3.) die Deletion funktionaler Genregionen, die notwendig für effiziente Replikation und/oder Toxizität in normalen Zellen<sup>81, 168, 188</sup>, aber verzichtbar in Tumorzellen sind. Weiterhin wurden 4.) tumor- bzw. gewebe selektive Promotoren entwickelt<sup>77, 162</sup> und 5.) die virale Hülle modifiziert<sup>3, 245</sup>, um die Replikation bzw. die Internalisation auf Tumorzellen zu beschränken.

Für die schon 1953 onkolytisch eingesetzten Adenoviren haben sich 4 Strategien bezogen auf das *Targeting* in der Tumorzelle herauskristallisiert:

- 1.) spezifische Promotoren
- 2.) p53
- 3.) pRb
- 4.) YB-1

Selektivität kann nach der 1. Möglichkeit z.B. durch Steuerung der Aktivierung von adenoviralem E1A über tumorspezifische Promotoren erreicht werden. Weiterhin wurde nach Strategie 2 durch Deletion von E1B55K eine selektive adenovirale Replikation in p53-mutierten Tumorzellen und nach Strategie 3 durch Deletion der CR1 und/oder der CR2-Region in der E1A-Sequenz eine selektive Vermehrung in pRb-defekten Tumorzellen gewährt. Die 4. Strategie beruht auf YB-1 vermittelter Replikation, bei der das in Tumorzellen deregulierte und nuklear akkumulierte YB-1 über die Y-Boxen im *E2late*-Promoter die virale Replikation vermittelt.

In der Entwicklung von tumorspezifischen Promotoren zur Kontrolle des E1A-Genes wurden  $\alpha$ -Fetoprotein- (AFP)<sup>4, 77</sup>, Prostata-spezifisches Antigen- (PSA)<sup>192</sup> und Kallikrein-2-Promotoren<sup>257</sup> verwendet, weil diese Faktoren in bestimmten Tumoren vermehrt produziert werden bzw. spezifisch sind für einen Gewebetyp, in dem sich der Tumor entwickelt hat. Weitere replikationsselektive Viren steuern die E1-Region über E2F-1 Promotoren, die eine Replikation in Tumorzellen mit defektem pRB-Signalweg gewährleisten<sup>106</sup> (Abb. 4).



**Abb. 5 Funktionsweise onkolytischer Adenoviren.** Onkolytische Viren können normale Zellen je nach Mechanismus entweder nicht infizieren oder die Zellen zwar infizieren, in diesen jedoch nicht replizieren und folglich das normale Gewebe nicht zerstören. Im Gegensatz dazu können sie Tumorzellen aufgrund der genetischen Veränderungen infizieren, sich in diesen vermehren und folglich zur Lyse der Tumorzellen mit Freisetzung des Virus führen. Das neu synthetisierte Virus kann dann wiederum andere Tumorzellen infizieren. Genauere Informationen siehe Text.

Das E1B55K deletierte Virus Onyx-015 kann effektiv in p53-defizienten Tumoren replizieren, jedoch nicht in normalem Gewebe. In Letzterem wird p53 nach adenoviraler Infektion hochreguliert und induziert die Apoptose, bevor das Virus replizieren kann<sup>20</sup>. Onyx-015 hat klinische Phase I und II Studien erreicht und wird in multimodalen Therapiekonzepten mit Bestrahlung oder Chemotherapie verabreicht<sup>58, 60, 194, 246</sup>. Durch die Deletion der CR2-E1A- Bindungsdomäne führt das Adenovirus  $\Delta 24$  zur Lyse von pRb-defekten Tumoren, kann aber normale Zellen nicht in die S-Phase treiben und somit nicht replizieren<sup>56, 80</sup>. In einem anderen Onkovirus wurden die Deletionen von Onyx-015 und  $\Delta 24$  kombiniert, um Tumoren mit Mutationen in pRb und p53 zerstören zu können<sup>169</sup>.

Holm et al. haben gezeigt, dass eine E1-unabhängige Replikation in vielfachresistenten Tumorzellen durch das Y-Box bindende Protein YB-1 ermöglicht wird<sup>88</sup>. YB-1 akkumuliert im Zellkern, wo es u.a. an der Expression des *Multidrug Resistant* Phänotyp MDR beteiligt ist, und im Zellkern über Bindung an die Y-Box im adenoviralen E2late-Promoter virale Replikation und folglich Lyse der Tumorzellen vermitteln kann. Das E1A-deletierte Virus Ad312 und das 13S E1A-defiziente Adenovirus dl520 replizieren und lysieren in MDR-phänotypischen Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen und MDR-sensitiven Tumoren, wobei dl520 einen stärkeren onkolytischen Effekt aufweist<sup>89</sup>. Das Adenovirus dl520 kann durch eine Deletion in E1A<sup>75</sup> nur das im Vergleich zum 13S E1A Protein insuffizient transaktivierende E1A-12S Protein herstellen<sup>23, 24, 75, 108, 109, 142, 165, 214</sup>. Somit ist dl520 ein replikationsdefizientes Virus, welchem über im Kern vorliegendes YB-1 eine E1A-unabhängige Replikation ermöglicht wird.

## 1.6 Bestrahlung, Chemotherapie und Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Strahlentherapie stellt zusammen mit der Chirurgie und der Chemotherapie eine der wichtigsten Behandlungsformen maligner Erkrankung dar. Bestrahlung kann alle Moleküle innerhalb der Zelle schädigen. Da jedoch Proteine, Enzyme und RNA-Moleküle mehrfach in der Zelle vorhanden sind, kann dieser Schaden leicht kompensiert werden. Die DNA stellt den strahlenempfindlichkeitsbestimmenden Teil der Zelle dar. Ionisierende Strahlung führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Basenveränderungen oder -verlust, Vernetzung innerhalb der DNA und zwischen DNA und Proteinen sowie zu multiplen Schädigungen, sogenannten *bulky lesions*. Einige Schäden können durch das zelluläre Reparatursystem behoben werden, wie Einzelstrangbrüche und einzelne Basenschäden, andere jedoch sind irreparabel und damit letal für die Zelle. Die Strahlensensibilität ist in der G<sub>2</sub>- und M-Phase des Zellzyklus am höchsten, weshalb schnell proliferierende Gewebe und somit Tumorgewebe besonders strahlensensibel sind. Bei hohen Strahlendosen ist eine Zelle nicht mehr in der Lage den Zellzyklus zu beenden und stirbt den Interphasetod. Bei dem wesentlich häufigeren Reproduktivtod tritt die Zelle jedoch nach der Bestrahlung in die Mitose und verliert dann ihre Reproduktions- und Zellerneuerungsfähigkeit. Die tumorwirksame Gesamtdosis liegt bei den meisten Tumoren um die 60 Gy, diese wird jedoch wegen der Empfindlichkeit des gesunden Gewebes fraktioniert. Hierdurch kann sich das normale Gewebe, vor allem die Stammzellen der Haut und die Kryptenzellen des Darms, erholen, denn die Reparaturmechanismen sind im gesunden Gewebe funktionsfähiger als im Tumorgewebe<sup>189, 205</sup>. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die nukleare Lokalisation des Y-Box bindenden Proteins YB-1 durch zellulären Stress wie Bestrahlung erhöht werden kann und somit vermehrt für die Replikation von onkolytischen Adenoviren zur Verfügung steht<sup>126, 219</sup>.

Antineoplastische Substanzen hemmen unselektiv das Zellwachstum; eine relative Selektivität auf das Tumorgewebe wird erst durch die hohe Teilungsrate der Tumorzellen erreicht. So wird aber auch Normalgewebe mit einem hohem Zellumsatz, z.B. die Schleimhaut des Verdauungstraktes, ebenfalls geschädigt. Zytostatika wirken also verstärkt gegen proliferierende Zellen, so dass sie weniger effektiv wirken, je größer und langsamer ein Tumor wächst. Therapeutisch gebräuchlich sind unterschiedliche chemische Gruppen, die an verschiedenen Punkten mit dem Zellstoffwechsel interferieren<sup>113</sup>.

Die interkalierende Substanz Daunorubicin ist ein Anthrazyklin-Derivat, schiebt sich zwischen 2 Basenpaare der DNA und blockiert damit die Matrizenfunktion und somit die

DNA- und RNA-Synthese. Zusätzlich inhibiert es die Topoisomerase II, welche beide DNA-Stränge spaltet, umlagert und wieder verschließt. Die Wiederverknüpfung wird gehemmt, so dass Strangbrüche zurückbleiben. Eine gefährliche Nebenwirkung von Daunorubicin ist seine Kardiotoxizität, wodurch es Herzrhythmusstörungen bis hin zu Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz verursachen kann<sup>149</sup>.

Irinotecan ist ein Derivat des Alkaloids Camptothecin, das aus den Früchten eines chinesischen Baumes gewonnen wird. Es hemmt die Topoisomerase I, welche einen der beiden DNA-Stränge spaltet und nach einer Umlagerung wieder zusammenfügt. Irinotecan lässt die Spaltung zu, unterbindet aber das Zusammenfügen, so dass Strangbrüche entstehen<sup>150</sup>. Somit induziert dieses S-Phasen-spezifische Zytostatikum ein G<sub>2</sub>-Arrest der Zellen<sup>17, 87, 220, 243</sup>. Es ist bei metastasierenden Dickdarm- und Enddarmkarzinomen indiziert nach erfolgloser Therapie mit Fluoruracil und wird in einer Phase II Studie in Glioblastomen sowie in einer multizentrischen Phase II Studie an Prostatakarzinomen untersucht<sup>55, 62, 127</sup>.

Docetaxel ist ein Inhaltsstoff der Rinde der pazifischen Eibe. Es lagert sich an die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli und hemmt auf diese Weise die Depolymerisation von Mikrotubuli durch Bildung atypischer Mikrotubuli. Daraus resultiert eine Mitose-Hemmung<sup>148</sup>. Dieses phasenspezifische Zytostatikum wird bei metastasierenden Ovarial- und Mammakarzinomen eingesetzt und wird in einer Phase II Studie am Glioblastom untersucht<sup>203</sup>.

Ein hochinteressanter Fund von Bernt et al. hat ergeben, dass sowohl Daunorubicin, als auch ein Topoisomerase I Inhibitor und ein Mitose-Hemmstoff die tumorspezifische Replikation von adenoviralen Vektoren erhöhen<sup>17</sup>. Des Weiteren konnte sowohl nach Inkubation mit Docetaxel als auch mit Irinotecan eine Hochregulation des YB-1 abhängigen MDR Genes nachgewiesen werden<sup>227</sup>.

Als neue Gruppe an Tumormedikamenten stehen neben Chemotherapeutika seit einigen Jahren Histondeacetylase-Inhibitoren, wie Trichostatin A oder FK228, zur Verfügung. Trichostatin A wird erfolgreich in experimentellen Versuchen unter anderem gegen Brust-, Pankreas-, Lungen- oder Kolorektalkarzinome eingesetzt<sup>83, 94, 241</sup>. Über Trichostatin A wurde erstmals als fungistatisches Antibiotikum berichtet. Es blockiert das Tumorwachstum durch einen G<sub>2</sub>-Arrest und induziert Apoptose. Histonacetylierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression, möglicherweise durch Alteration von Chromatinstrukturen. Stark acetylierte Nukleosome sind assoziiert mit transkriptionell aktivem Chromatin. Histonacetylierung wird durch ein Gleichgewicht zwischen Histonacetylasen und Histondeacetylasen reguliert. Trichostatin A inhibiert also die Expression vieler Gene, u.a. die

Telomerase-Aktivität<sup>73</sup>. Es kann jedoch auch transaktivierend wirken, denn durch die Acetylierung von Histon-Proteinen wird ihre positive Ladung neutralisiert und die Nukleosom-Struktur gelockert<sup>90</sup>, und so konnte auch vielfach die Erhöhung der adenoviralen Transgenexpression nachgewiesen werden<sup>41, 66, 123</sup>.

Es hat sich herausgestellt, dass Histondeacetylase-Inhibitoren neben dem zytotoxischen Antitumor-Effekt auch die Expression des Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptors (CAR) auf der zellulären Oberfläche erhöhen. Da Adenoviren über den CA-Rezeptor in humanen Zellen internalisiert werden, bietet die Erhöhung der Expression von CAR eine verbesserte Infektionsfähigkeit durch Adenoviren<sup>41, 66, 123, 133</sup>. Folglich kann das *Targeting* von onkolytischen Adenoviren in der Tumorthherapie verbessert werden, da mehr Virus bei niedrigeren viralen Konzentrationen in die Tumorzelle aufgenommen wird.

Die oben aufgeführten Chemotherapeutika werden in der Therapie von Tumoren häufig mit Bestrahlung kombiniert und vor bzw. nach einer chirurgischen Resektion des Tumorgewebes eingesetzt. Des Weiteren werden sie wie z.B. bei Lymphomen als alleinige Therapie angewendet.

## 1.7 Kombinationstherapie

Chemotherapie und Bestrahlung sind die Hauptstützen in der Therapie fortgeschrittener Tumoren, die nicht mehr in toto reseziert werden können. Ihre Wirkung ist aber durch Tumorresistenz und einen relativ schmalen therapeutischen Index begrenzt; das bedeutet, dass Dosiserhöhungen bzw. Kombinationstherapien, die entwickelt wurden, um diese Resistenz zu überwinden und Tumorzelluntergang zu steigern, durch die Toxizität auf das normale Gewebe begrenzt sind. Onkolytische Adenoviren führen auf anderem Wege zum Zelltod als Chemotherapeutika und Bestrahlung – nämlich durch Lyse – und werden deshalb viel in der Tumorthherapie-Forschung verwendet. Da die onkolytische Therapie in der Lage ist, den therapeutischen Index zu erhöhen, dabei aber tumorselektiv wirkt, stellen Therapiekombinationen aus onkolytischen Viren, Bestrahlung und/oder Chemotherapie eine vielversprechende Zukunftsoption dar.

Einige onkolytische Viren wie Onyx-015, CV706, der einen PSA-spezifischen Promoter enthält, oder das E1A-teildefiziente Adenovirus KD-3, der das *Adenoviral Death Protein* (ADP) exprimiert, sind bereits in Kombination mit Bestrahlung angewendet worden und haben in verstärkter Wachstumsinhibition des Tumors resultiert<sup>31, 60, 194, 232</sup>. Weitere

Studien mit Onyx-015 und  $\Delta 24$  sowie mit Herpesviren zeigen einen erhöhten zytopathischen Effekt nach Bestrahlung, jedoch ohne mechanistische Erklärung<sup>2, 35, 134, 184</sup>.

In einer Phase II Studie wird Onyx-015 in Kombination mit dem interkalierenden Zytostatikum Cisplatin und dem Pyrimidinsynthese-Antagonisten 5-Fluorouracil in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen angewendet, wobei bei  $\frac{2}{3}$  der Patienten Teilremissionen und bei  $\frac{1}{3}$  Totalremissionen erzielt werden konnten<sup>119, 135, 201</sup>. Versuche mit  $\Delta 24$  und Ad312 bestätigen einen synergistischen onkolytischen Effekt in Kombination mit Zytostatika<sup>70, 139, 179</sup>. In einem anderen Ansatz werden Gene von Enzymen, die Zytostatika-Vorstufen in ihre aktivierten Metabolite umwandeln, in Viren eingebaut. Das replikationsdefiziente E1/E3 deletierte Adenovirus Ad-P450 exprimiert das Zytochrom P450 und das Flavoenzym NADPH-Zytochrom-P450-Reduktase, welche die Zytostatika-Vorstufe Cyclophosphamid in ihren aktiven Metaboliten umwandeln<sup>110</sup>. Thymidinkinase-exprimierende Adenoviren, die Gancyclovir zu seinem aktiven Metaboliten phosphorylieren<sup>32, 246</sup>, Cytosindesaminase und Uracil-Phosphoribosyltransferase exprimierende Adenoviren, die 5-Fluorocytosin über 5-Fluorouracil in den zytostatischen Wirkstoff 5-Fluoro-UMP umwandeln, oder beide Gene exprimierende Adenoviren<sup>118, 194-196</sup> verstärken somit den onkolytischen Effekt durch nur intratumoral wirkende Zytostatika. In den oben genannten Versuchen kann keine erhöhte virale Replikation nach Kombination mit Zytostatika beobachtet werden. Bernt et al. zeigen jedoch, dass auch Zytostatika wie 5-Fluorouracil, Camptothecin, Daunorubicin und Taxol die adenovirale Replikation erhöhen und die virale Ausbreitung im Tumorgewebe verbessern<sup>17</sup>.

Bezogen auf die Histondeacetylase-Inhibitoren wie Trichostatin A wurde neben der Erhöhung der viralen Infektionsfähigkeit durch CAR-Hochregulation eine erhöhte adenovirale Transgenexpression festgestellt<sup>25, 72, 254</sup>.

Durch Angriff der Tumorzellen auf verschiedenen zellulären Ebenen wirkt die Kombination aus Bestrahlung, Chemotherapie und onkolytischen Viren sehr effektiv und eröffnet optimierte Therapieresultate. Ein verbesserter Antitumoreffekt ist auch bei der Kombination des Adenovirus dl520 mit Bestrahlung und Chemotherapie denkbar, die durch erhöhte nukleare Akkumulation von YB-1 zu einer verbesserten Y-Box vermittelten adenoviralen Replikation und Zellyse führen müssten.

## 1.8 Zielsetzung

Da bei Hirntumoren aufgrund der niedrigen Überlebenszeit neue Therapieoptionen erforderlich sind, wurden unsere Versuche an Glioblastom-Zelllinien durchgeführt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte 1.) die Infizierbarkeit der Glioblastom-Zellen mittels des Grün Fluoreszierenden Proteins untersucht werden. 2.) sollte die CAR-Expression der Zellen bestimmt werden. 3.) sollte überprüft werden, ob das Adenovirus dl520 in der Lage ist, in Glioblastom-Zellen zu replizieren und diese zu lysieren. 4.) sollte die Kernlokalisierung des Y-Box bindenden Proteins YB-1 und der Einfluss von Bestrahlung und Zytostatika auf die Lokalisation von YB-1 bestimmt werden. 5.) sollte untersucht werden, ob ein trimodales Therapiekonzept aus einer tumorschädigenden Substanz zur nuklearen YB-1 Akkumulation, aus einem Histondeacetylase-Inhibitoren zur Erhöhung der Infektionsfähigkeit zusammen mit dem Adenovirus dl520 die wirksamste Strategie war, um mit dl520 eine effiziente Virotherapie durchzuführen. 6.) sollte der Einfluss von Bestrahlung und Zytostatika wie Irinotecan auf die adenovirale Replikation von dl520 untersucht werden. 7.) sollte überprüft werden, ob der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A über CAR-Hochregulation die Transduktionseffizienz von dl520 erhöht. Als letztes sollte 8.) ein Therapiekonzept aus dl520 und fraktionierter Bestrahlung entwickelt und im Xenograft-Mausmodell angewendet werden, um die Effektivität dieser Kombinationstherapie *in vivo* zu analysieren.

## 2. Methoden

Alle Materialien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Peske sowie Schubert & Weiss bezogen. Bezugsquellen von Chemikalien, Reagenzien und Lösungen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

### 2.1 Zelllinien, Zellkultur und Zellsplitting

Alle Zellen wurden in Brutschränken von Life Sciences International bei 5 % CO<sub>2</sub> in 37 °C warmer, wassergesättigter Luft gehalten.

Die U373-MG-Glioblastom-Zellen wurden freundlicherweise von John Ohlfest von der University of Minneapolis, Minnesota, USA, zur Verfügung gestellt und als Monolayer in RPMI, 10 % FKS, 2 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

U87-MG-Glioblastom-Zellen, T98-G-Glioblastom-Zellen, HeLa-Zervixkarzinom-Zellen, U2OS-Osteosarkom-Zellen und HEK293-Nieren-Zellen wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, bezogen. Alle 5 Zelllinien wurden als Monolayer in D-MEM, 10 % FKS, 2 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

EPG85-257RDB-Magenkarzinom-Zellen wurde im Oktober 1985 aus einem am Krankenhaus Eppendorf in Hamburg exzidierten Adenokarzinom des Magens etabliert und durch Selektion in Gegenwart von Daunorubicin die resistente Variante generiert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dietel zur Verfügung gestellt und sind durch Exposition mit Daunorubicin etabliert worden. Sie wurden in L-15-Medium mit 10 % FKS, 2 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1,1 g/l Natriumcarbonat, 1 g/l Glukose, 6,25 mg/ml Fetuin, 80 IU/l Insulin, 2,5 mg/ml Transferrin, 1 % minimal essentiellen Vitaminen und 20.000 kIU/l Trasylol in Kultur gehalten. Um die P-Glykoprotein Expression und somit die Kernlokalisierung von YB-1 zu gewährleisten, erfolgte alle 4 Wochen eine Inkubation der Zellen mit 100 ng/ml Daunorubicin.

Um für das Zellwachstum die Konfluenz der Zellen unter 100% zu halten, war es notwendig, die Zellen regelmäßig – 2 mal die Woche – durch Aufteilen auf mehrere Kulturflaschen auszudünnen.

Dazu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit PBS gespült und mit 1 ml Trypsin in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen bzw. mit 2 ml bei 150 cm<sup>2</sup>-Flaschen gelöst. Kurz vor dem vollständigen

Ablösen wurden die Zellen in 12 bzw. 23 ml Medium resuspendiert, in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die HEK293-Zellen wurden nach Absaugen des alten Mediums mit 5 ml 1x *Citric Saline* gewaschen. Nach Absaugen der Spülflüssigkeit wurden die Zellen mit 1 ml *Citric Saline* für 3-4 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Kurz vorm Ablösen der Zellen wurden diese mit 12 ml Medium resuspendiert, in Kulturflaschen überführt und im Brutschrank aufbewahrt.

Zur Lagerung der Zellen wurden diese nach Trypsinierung für 3 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 4 °C temperiertem Einfriermedium (10 % FKS, 15 % DMSO) portioniert. Die Portionen sind rasch bei – 80 °C für 24 h eingefroren worden, bevor sie bei – 196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Zur Anzucht wurden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und der Überstand bei 1.200 rpm für 3 min abzentrifugiert und verworfen. Das Pellet wurde in dem jeweiligen Medium aufgenommen und in Gewebekulturflaschen bei 37 °C kultiviert.

## 2.2 Verwendete Viren

Ad5-WT: Es ist das Wildtyp-Virus des Adenovirus Typ 5 der Gruppe C.

dl520: Die Adenovirus-Typ5-Mutante dl520 wurde erstmals im Jahre 1984 von Haley et al. konstruiert, die 11 bp zwischen 1107 bis 1117 bp vom 5'-Ende des Genoms deletierten und somit die Spleißsequenz für das 13S Protein von E1A entfernten<sup>76</sup>.

Ad312: Es ist ein Typ 5 Adenovirus und ihm fehlt die E1A-Region<sup>170</sup>.

Ad-E1minus: Es ist ein Typ 5 Adenovirus, dem die komplette E1-Region fehlt.

Ad-GFP: Es ist ein Typ 5 Adenovirus, dessen E1- und E3-Regionen deletiert wurden. Es enthält das Grün-Fluoreszierende-Protein Gen (GFP) als Transgen unter Kontrolle des CMV-Promoters.

## 2.3 Verwendete Zytostatika

Die Zytostatika Daunorubicin, Docetaxel, Irinotecan und Trichostatin A wurden für diese Versuche verwendet. Genauere Informationen über ihre Eigenschaften befinden sich in der Einleitung 1.6 und über ihre Herkunft unter dem Abschnitt Materialien 8.2 .

## 2.4 Polymerasekettenreaktion

Die 1985 von Kary Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR = *Polymerase Chain Reaction*) ermöglicht eine schnelle *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen<sup>164</sup>. Der DNA-Doppelstrang wird durch Erhöhen der Temperatur auf 90 °C denaturiert. Nach raschem Abkühlen auf etwa 50 °C werden zwei aus 15 bis 25 Basen bestehende Oligonukleotide, auch *Primer* genannt, zugesetzt, die der Sequenz an den 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind. Durch Zusatz einer DNA-Polymerase, die in 5'→3' Richtung katalysiert, werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert, so dass nun 2 Doppelstränge vorhanden sind. Die Menge verdoppelt sich mit jedem Zyklus, so dass 30 Zyklen in einer 2<sup>28</sup>-fachen (270 Millionenfachen) Amplifikation resultieren. Dem PCR-Ansatz wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Bestandteile zu einem Gesamtansatz von 50 µl zugefügt (Abb. 6).

Jeder Schritt eines Zyklus benötigt eine minimale Zeitdauer, wobei zu lange Dauer schädlich für die Polymerase sein kann. Die für die Strangseparation kritische Denaturierung wurde auf 95 °C für 1 min eingestellt. Der folgende *Annealing*-Schritt wurde auf 45 °C für 1 min festgelegt, wobei die verwendeten *Primer* niedrige GC-Basemengen enthielten, die zum vollständigen Anlegen der *Primer* Temperaturen unterhalb 55 °C benötigten. Der folgende 1 min dauernde, auf 72 °C warme Synthese-Schritt ermöglichte eine der optimalen *Taq*-Temperatur (~75 °C) naheliegende Grad Celsius-Einstellung ohne Abfallen der *Primer*. Nach Beendigung der durchgeführten 30 Zyklen am Robo Cycler Gradient 40 von Stratagene ist ein letztes Mal für 5 min bei 72 °C elongiert worden, bevor die Proben bei 6 °C bis zur Analyse aufbewahrt wurden.

100 ng	DNA-Template
0,5 µM	5'-3' Vorwärtsprimer
0,5 µM	3'-5' Rückwärtsprimer
5 µl	10x PCR-Puffer
10 µM	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
6 µl	Glyzerin
3 µl	Kresolrot
3 µl	MgCl <sub>2</sub>
2 U	Taq-Polymerase
µl	H <sub>2</sub> O
<hr/>	
50 µl	

**Abb. 6 Ansatz einer Polymerasekettenreaktion.**

Genauere Informationen siehe Text.

dNTP: Deoxyribonukleotidtriphosphat,

MgCl<sub>2</sub>: Magnesiumchlorid, H<sub>2</sub>O: Wasser.

## 2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Zur analytischen oder preparativen Separierung von DNA in ihre Fragmente werden Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt, wobei Fragmente zwischen 0,5 und 25 Kilobasen aufgetrennt werden können.

- 1) Zur Herstellung eines 1 % Agarosegels wurden 60 ml Elektrophorese-Puffer mit 1 %-Agarose aufgekocht, bis die Agarose geschmolzen war. Für die Reinigung von DNA-Sonden wurde Tris-Azetat-Puffer verwendet, ansonsten Tris-Borat-Puffer, der über eine größere Pufferungskapazität verfügt. Die Agarosekonzentrationen können variiert werden, wobei eine Konzentration von 1 % DNA Fragmente zwischen 0,5 und 10 kb am effektivsten separiert. Die Agaroselösung wurde in die den Gelträger enthaltene Gießform gefüllt, 0,5 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt und ein Gelkamm zur Formung der Geltaschen platziert. EtBr interkaliert zwischen den Nukleinsäurebasen und fluoresziert rot-orange bei Anregung mit UV-Licht (260 - 360 nm). Damit können kleine DNA-Mengen unter 5 ng nachgewiesen werden<sup>213</sup>.
- 2) Der Gelträger wurde in der Elektrophoresekammer Hoefer™ HE 33 von Amersham positioniert und das Gel bedeckend mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 6x-Ladepuffer vermischt und ebenso wie eine DNA Molekulargewichtsleiter in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde auf eine Spannung von 70-80 V eingestellt, wobei zwischen 1 bis 10 V pro Gel-cm berechnet werden sollten. Die an den Enden des Gels bzw. der Kammer angelegte Spannung erzeugt ein elektrisches Feld. Die dem Feld ausgesetzten DNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphate am DNA-Rückgrat zur positiven Anode. Die Größe der DNA bestimmt die Passagerate im Gel und erlaubt damit die Auftrennung von verschieden großen DNA-Fragmenten. Die DNA-Passagerate ist der angelegten Spannung proportional, jedoch wandern große DNA-Moleküle mit steigender Spannung schneller als kleinere. Die Laufweite der DNA-Moleküle im Gel kann mittels dem Ladepuffer beigefügten Farbstoff Bromphenol dargestellt werden, der mit DNA-Molekülen der Größe 0,5 kb wandert.
- 3) Die Agarosegele wurden unter UV-Licht am Gerät von LTF Labortechnik fotografiert, wobei das UV-Licht die mit EtBr markierte DNA zum Fluoreszieren anregt.

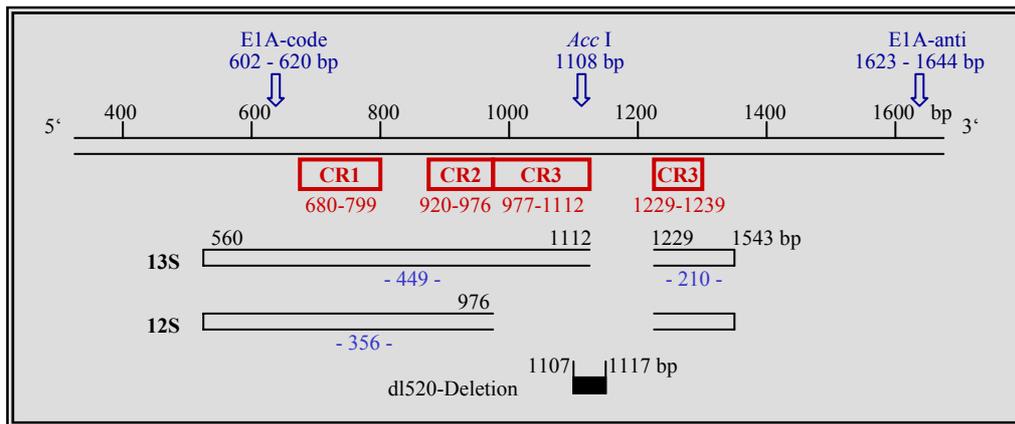
## 2.6 Fällung der DNA

Zur Reinigung und Konzentrierung von DNA kann diese aus ihrer Lösung gefällt werden. Hierzu wird die DNA mit 100 %-Ethanol präzipitiert. Wenn in der DNA-Lösung hohe Kationen-Konzentrationen (0,1 - 0,5 M) vorliegen, induziert Ethanol eine strukturelle Umwandlung in Nukleinsäuremoleküle, welche aggregieren und aus der Lösung präzipitieren. Bei niedrigeren Kationen-Konzentrationen muss die Lösung auf niedrige Temperaturen gekühlt werden. Neben 100 %-Ethanol können auch Ammoniumazetat, das die Lösung gleichzeitig ansäuert, oder Natriumchlorid die DNA fällen.

- 1) Pro 200  $\mu$ l DNA-Lösung wurden 800  $\mu$ l eiskaltes 100 %-Ethanol, 50  $\mu$ l 3 M Ammoniumazetat, pH 5,2, und 3  $\mu$ l Glykogen, das der DNA am Boden des Gefäßes mehr Haftung gewähren soll, in einem 1,5 ml-Eppendorffgefäß vermischt und bei 4 °C für mindestens 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- 2) Der Überstand wurde mit einer 200 ml-Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml raumtemperiertem, 70 %-Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Das Eppendorffgefäß ist einige Male invertiert/geschwenkt worden, bevor es für 5 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert wurde.
- 3) Der Überstand wurde verworfen, wobei vorsichtig abpipettiert werden musste, da das Pellet nach Entfernen der Salze nicht mehr gut an der Gefäßwand haftete.
- 4) Das Pellet wurde getrocknet und die DNA in der entsprechenden Menge TE-Puffer gelöst, in dem es bei – 20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden konnte.

## 2.7 Verdau von dl520 mit Restriktionsenzymen

Das Genom des Typ 5 Adenovirus der Gruppe C unterteilt sich in frühe und späte Gene. Das frühe E1A-Gen ist das erste exprimierte adenovirale Gen, das sich aus drei hoch konservierte Regionen CR1 bis 3 (*highly conserved regions*) zusammensetzt, und exprimiert unter anderen die Translationsprodukte 12S und 13S, die 243 und 289 Aminosäuren entsprechen. Die 13S mRNA enthält im Gegensatz zur 12S mRNA die 145 bp-große CR3-Region. Die Adenovirus-Typ5-Mutante dl520 kann aufgrund einer Deletion die 13S mRNA nicht exprimieren. Es besitzt eine 11 bp-große Deletion, die zwischen 1107 bp und 1117 bp vom 5'-Endes entfernt lokalisiert ist. In dieser Sequenz ist die Spleißregion für die 13S mRNA lokalisiert.



**Abb. 7** Ausbreitung der E1A-Proteine 12S und 13S, die sich aus drei *conserved regions* CR1-3 zusammensetzen, und Darstellung der Deletion von dl520. Bindungssequenz der Primer E1A-code und E1A-anti im adenoviralen Genom, sowie die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *AccI*. Weitere Informationen siehe Text.  
bp: base pair(s), CR: conserved region.

Zum Nachweis von dl520 wurde dieses mit Ad5-WT verglichen. Die untersuchte Sequenz wurde mittels der *Primer* E1-anti und E1-code auf die E1A-Genregion eingeschränkt. Die beiden Proben wurden amplifiziert und mittels einer Restriktionsendonuklease verdaut, welche die DNA zwischen 5'→3' 1107 bp und 1117 bp schneidet, so dass Ad5-WT in 2 Sequenzen und dl520 nicht verdaut werden würde.

Der *Primer* E1-code ist komplementär zu den Basenpaaren 5'→3' 602 bp bis 619 bp und E1-anti zu den Basenpaaren 5'→3' 1625 bp bis 1644 bp. Somit ergab sich eine DNA-Sequenzlänge von 1006 bp – der Differenz 1625 bp minus 619 bp entsprechend – für Ad5-WT als PCR-Produkt und von 996 bp für dl520 wegen der 11 bp-Deletion.

Ad5-WT:	1625 bp – 619 bp	= E1-anti	– E1-code	= 1006 bp
dl520:	1006 bp – 11 bp	= Ad5-WT	– Deletion in dl520	= 995 bp

- 1) Mit den oben aufgeführten *Primern* wurde eine Polymerase-Kettenreaktion von Ad5-WT und 5 von dl520 durchgeführt. Zur Kontrolle, ob die PCRs funktioniert hatten, wurden 5 µl jedes PCR-Produktes mit 1 µl 6x-Ladepuffer und eine 1 kb-Leiter auf ein 1 %-TBE-Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht kontrolliert.
- 2) Um die gesamte DNA der PCR-Produkte für den Verdau verwenden zu können, wurde die DNA gefällt. Die DNA-Pellets wurden in 17 µl RNase-freiem-H<sub>2</sub>O gelöst.
- 3) Für die Restriktion wurde die Restriktionsendonuklease *AccI* verwendet, welche das adenovirale Genom 1108 bp entfernt vom 5'-Ende schneidet. Somit ergaben sich nach dem Verdau 2 Produkte für WT und nur eines für dl520, weil die

Region, in der *AccI* schneidet, nicht vorhanden war. Der Verdauansatz setzte sich aus 17 µl DNA-Fällungsprodukt, 2 µl 10x-Puffer A und 1 U *AccI* (1 µl) zusammen und wurde über Nacht (für mindestens 3 h) bei 37 °C inkubiert.

- 4) Den 20 µl Verdauprodukten von dl520 und Ad5-WT wurden jeweils 4 µl 6x-Loading-Buffer zugegeben und beide Ansätze mit einer 1 kb PEΦ-Gold-DNA-Leiter von Fermentas auf ein 1 %-TBE-Gel + 2,5 µl EtBr aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei 90 V für 90-120 min. Das Ergebnis war unter UV-Licht abzulesen.

## 2.8 Gelelution

Die zu eluierende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß überführt, dessen Leergewicht von 1,0 g vorher bestimmt worden ist. Das Gelfragment wurde im Eppendorffgefäß gewogen und sein Gewicht durch Subtraktion des Leergewichts bestimmt. 3 Volumina des QG-Puffer aus dem QIAquick Gel Extraction Kit wurden zu einem Volumen des Gels pipettiert, dabei entsprächen 100 mg Gel 100 µl Puffer. Der Ansatz wurde bei 50 °C für 10 min inkubiert, wobei der Ansatz alle 2 bis 3 min während der Inkubation geschüttelt wurde. Nach Auflösen des Gelfragments sollte die Suspension einen gelben Farbton angenommen haben. Ein Gelvolumen Isopropanol wurde dem Ansatz hinzugefügt und dieser vermischt. Eine QIAquick Zentrifugensäule wurde in ein 2 ml Sammelgefäß platziert, die Lösung auf die Säule pipettiert und der Ansatz bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Das maximal auf die Säule passende Volumen betrug 800 µl, so dass bei einem größeren Suspensionsansatz mehrmals zentrifugiert werden musste. Der Durchlauf wurde verworfen, 500 µl QG Puffer auf die Säule gegeben, um die Sonde vollständig von der Agarose zu reinigen, und der Ansatz bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchlaufs wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule pipettiert, um die Sonde zu waschen, und der Ansatz bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der Ansatz ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorffgefäß gestellt und 50 µl EB Puffer auf die Säule gegeben, um die Sonde zu eluieren. Der Ansatz wurde nach einer 1 min Inkubationszeit bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Die gewonnene DNA bzw. RNA konnte nun weiterverarbeitet werden.

## 2.9 Sonden-Herstellung

Für die E1A-Sonde wurden 2 Polymerasekettenreaktionen von Ad5-WT als Template mit den *Primern* AdE2F-forward (= E1Acode-601neu) und AdE1ArevB-reverse (= E1Aanti-1620neu) durchgeführt. AdE2F-forward ist komplementär zur Basensequenz 5'-ATG GCC GCC AGT CTT TTG-3', welche zwischen 602 bp und 619 bp vom 5'-Ende des adenoviralen Genoms entfernt liegt. AdE1ArevB-reverse bindet an die Basensequenz 5'-GAT AAT GTT AAC TTG CAT GGC-3', welche zwischen 5'-1623 bp und 5'-1644 bp lokalisiert ist. Hieraus ergab sich eine Sonde der Größe 1042 bp (1644 bp – 602 bp = 1042 bp). Die Annealing-Temperatur der *Primer* lag bei 50 °C.

Die PCR-Produkte wurden mit einer 100 bp PEΦ-Gold-DNA-Leiter auf ein 1 %-TAE-Agarosegel aufgetragen und bei 50 V für 80 min elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde zur Kontrolle ein Bild des Agarosegels angefertigt, bevor die spezifische Bande aus dem Gel geschnitten und in 50 µl TE-Puffer geleluert wurde.

Die Sondenkonzentration wurde in einer Verdünnung von 1:50 am Heraeus-Photometer bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.

Zur Herstellung der E3-Sonde wurden die *Primer* E3-30484 und E3anti-30780-reverse verwendet. E3-30484 ist zur Sequenz 5'-GAA TTA TTA CAG AGC AGC GCC C-3' komplementär, welche im adenoviralen Genom zwischen den Basenpaaren 5'-30484 bp und 5'-30504 bp lokalisiert ist. E3anti-30780-reverse ist komplementär zur Sequenz 5'-TCT TAA TAA GGG TGC AGA GAT C-3', deren Position sich zwischen 5'- 30780 bp und 5'-30801 bp befindet. Hieraus ergab sich eine Fragmentgröße der E3-Sonde von 317 bp (30801 bp – 30484 bp = 317 bp).

Die PCR zur Herstellung der E2*late*-Sonde wurden mit den *Primern* E2A-f und E2A-b angefertigt. Der *Primer* E2A-f besitzt die Sequenz 5'-GTC GGA GAT CAG ATC CGC GT-3', deren komplementäre Bindungssequenz zwischen 5'- 22734 bp und 5'- 22753 bp positioniert ist. Der *Primer* E2A-b mit der Sequenz 5'-AAG CGA AGA CGA CGA GGA CC-3' bindet an die Position 5'- 24216 bp bis 5'-24235 bp. Die Fragmentgröße der E2*late*-Sonde betrug 1501 bp (24235 bp – 22734 bp = 1501 bp).

## 2.10 Virale Infektion (*in vitro*)

Eine 10 cm-Petrischale wurde mit  $1 \times 10^6$  Zellen ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml OptiMEN benetzt. Die erforderliche *moi* des

Virus wurde hinzupipettiert, wobei die Stock-Lösung mit OptiMEN verdünnt wurde. Somit ergab sich beispielhaft die Berechnung:

$$\frac{5 \times 10^{10} \text{ pfu/ml dl520}}{2 \times 10^6 \text{ Zellen/Schale}} = \frac{5 \times 10^7 \text{ pfu/}\mu\text{l dl520}}{2 \times 10^6 \text{ Zellen/Schale}} = \frac{25 \text{ pfu/}\mu\text{l dl520}}{\text{Zelle}}$$

Infektion mit 10 pfu: 1 : 25 Verdünnung → 10  $\mu\text{l}$  dl520

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 1 h inkubiert, wobei sie alle 10 min geschwenkt wurden, um das Benetzen des ganzen Rasens zu gewährleisten. Nach 1 h Inkubation wurde das Virus-OptiMEN-Gemisch abgesaugt und durch 10 ml Medium ersetzt. Zur Isolation von DNA oder RNA sind die Zellen für 2 - 3 d im Brutschrank kultiviert worden, bevor die Nukleinsäure isoliert wurde.

In 6-Napf-Schalen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in jeweils 2 ml Medium und respektive 200  $\mu\text{l}$  OptiMEN verwendet. Bei 12-Napf-Schalen wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Medium ausplattiert und zur Infektion 100  $\mu\text{l}$  OptiMEN eingesetzt.

### **2.11 Untersuchung der Infizierbarkeit von Zellen durch GFP mittels FACS-Analyse und Photographie**

- 1) Von den Zelllinien U87, U373, T98-G, 257RDB und HeLa wurde jeweils eine 6-Schalen-Platte à  $2 \times 10^5$  Zellen pro Schale ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Ad-GFP infiziert. Je eine Kavität wurde mit 5, 10, 50 und 100 pfu Ad-GFP infiziert, wobei 2 Nöpfe als Kontrollen dienten. Nach Infektion wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.
- 2) 48 h später wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 von Zeiss photographiert, bevor Zellen und Überstand isoliert wurden.
- 3) Die Zellen wurden vom Napfboden abgeschabt und die Suspension in ein 3 mm-Röhrchen gegeben. Nach 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 1.300 rpm wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 3 ml PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300  $\mu\text{l}$  4 %-Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert. Die Fluoreszenz-Strahlung der einzelnen Zellen wurde am FACSvantage von Becton Dickinson gemessen, indem die Zellen in eine Reihe geordnet wurden und ein Photometer passierten, das die Fluoreszenz von GFP registrierte.

## **2.12 Wachstumskurve der Zelllinien U87 und U373 mit und ohne Bestrahlung**

- 1) Von den Zelllinien U373 und U87 wurden vier 6-Schalen-Platten à  $5 \times 10^4$  Zellen pro Schale ausplattiert. Nach 24 h wurden je zwei 6-Schalen-Platten mit 4 Gy bestrahlt. Je 2 Platten blieben unbestrahlt und dienten als Kontrollen. 72 h nach Ausplattieren wurde die schon bestrahlten 6-Schalen-Platten ein zweites Mal mit 4 Gy bestrahlt, so dass sich eine Gesamtstrahlendosis von 8 Gy ergab.
- 2) Die Zellzahl aus jeweils 2 Nöpfen jeder Platte wurde 72 h, 120 h und 168 h nach Ausplattieren bestimmt. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zuerst mikroskopisch betrachtet, um festzustellen, ob sich viele Zellen abgelöst hatten. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit jeweils 2 ml PBS gespült. Nach Absaugen des PBS wurden 500  $\mu$ l Trypsin auf jedes Well gegeben und für 2 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablösen vom Schalenboden wurde pro Schale 1 ml D-MEM hinzugefügt, die Zellen gut resuspendiert und jede Suspension in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß überführt. 20  $\mu$ l der Zellsuspension wurden 1:1 mit 20  $\mu$ l Trypanblau vermischt und in einem 1,5 ml-Eppendorffgefäß für 2 - 3 min inkubiert. 10  $\mu$ l wurden auf die Zählkammer aufgetragen und 4 Zählfelder ausgezählt.
- 3) Die Zellzahl ließ sich aus dem Mittelwert der Zählkammerwerte, dividiert durch 2 (aufgrund der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau), multipliziert mit 1,5 (wegen des Zellsuspensions-Gesamtvolumens von 1,5 ml) errechnen. Da je 2 Kavitäten ausgezählt wurden, sind Mittelwerte erstellt worden, die graphisch dargestellt wurden.

## **2.13 Untersuchung der Expression von YB-1 in Glioblastom-Zelllinien mittels Fluoreszenz-Mikroskopie**

Fluoreszenz ist die Lichtemission, die durch Absorption von Photonen entsteht und sofort nach Entfernen der anregenden Lichtquelle stoppt. Bei Verwendung mehrerer Filter im optischen System eines Fluoreszenz-Mikroskops können mehrere fluoreszierende Stoffe dargestellt werden.

- 1) Für die Gewebekulturuntersuchungen wurden die Zelllinien U373 und U87 auf Objektträgern ausplattiert. Hierzu wurde ein steriler Objektträger mit einer sterilen Pinzette in die Mitte einer 10 cm-Petrischale gelegt. Dann wurden pro Zelllinie  $5 \times 10^5$  Zellen ausplattiert, indem die Zellen in 10 ml Medium auf die Petrischale geträufelt wurden. Nach 48 h wurden die Zellen auf den Objektträgern fixiert.

- 2) Zur Fixierung wurde eine – 20 °C kalte 1:1 Azeton-Methanol-Lösung hergestellt. Die Objektträger wurden mit einer sterilen Pinzette in einem Küvetten-Ständer platziert, überdeckt mit Azeton-Methanol-Lösung und für 15 min bei – 20 °C gelagert.
- 3) Zur Entfernung der Fixierungslösung sind die Objektträger dreimal für 5 min in PBS gewaschen worden, bevor sie an der Luft getrocknet wurden.
- 4) Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Zellen für 5 min in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert
- 5) Die Objektträger wurden in die Feuchtkammer platziert und für 18 h bei 5 °C mit Antikörper-Dilutionslösung von DakoCytomation und 1:250 verdünnten polyklonalen Hasen-Anti-YB-1-Antikörper inkubiert. Da die Oberflächenspannung bei diesen Versuchen sehr hoch war, wurden die Objektträger für die Inkubationszeit mit Parafilm bedeckt.
- 6) Um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, sind die Objektträger einmal mit PBS abgespült worden, bevor sie fünfmal für 10 min in einem PBS-Bad gewaschen wurden.
- 7) Nach Waschen wurden die Objektträger für 15 min bei Raumtemperatur mit dem in Phosphat-Puffer 1:200 verdünnten Anti-Hasen-IgG-Fluoreszin F(ab')<sub>2</sub> Fragment inkubiert.
- 8) Die Objektträger waren für 15 min bei Raumtemperatur mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex inkubiert worden, bevor sie mit Tris-Puffer abgespült und dreimal für 15 min in Tris-Puffer gebadet wurden.
- 9) Zur Anfärbung der Antikörper waren die Objektträger für 15 min bei Raumtemperatur mit NovaRed® von Vector Laboratories angefärbt worden, bevor sie mit ddH<sub>2</sub>O abgespült wurden.
- 9) Zur Darstellung der Zellstrukturen wurden die Objektträger für 15 sec in Mayers Haematoxyllin getränkt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nachfolgend mit Eukitt eingebettet (siehe 2.31).
- 10) Die Intensität der YB-1 Expression wurde mittels des Lucia-G/F Digital-Bilddarstellungssystem von Nikon gemessen. Von jedem Objektträger wurden die Mittlere Größe, der Mittlere Grauwert, die Mittlere Sättigung und die Integrale Dichte bestimmt. Als Endergebnis wurde der Mittelwert der gemessenen Werte bestimmt. Des Weiteren wurde die Lokalisation von YB-1 auch subjektiv bewertet und die Immunreaktion nach eine Skala von 0 - 3 eingeteilt (0 = keine Reaktion, 1 = schwache Reaktion, 2 = moderate Intensität, 3 = starke Reaktion). Diese wurde unabhängig von

2 Histologen bewertet. Im Falle von Differenzen wurde die Auswertung mit einem Mikroskop mit 2 Objektiven wiederholt.

#### **2.14 Sulforhodamin-Test zur Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten nach Zytostatika bzw. Trichostatin A Inkubation**

IC<sub>50</sub>-Werte entsprechen dem Überleben von 50 % der Zellen bei einer bestimmten Konzentration an Zytostatika, wobei die IC<sub>50</sub>-Werte von den Zelllinien U87, U373 und 257RDB mit Zytostatika für die weiteren Versuche bestimmt wurden.

- 1) In einem Vorversuch musste herausgefunden werden, welche Zellzahl die validesten Werte bot, wobei die Vorversuche mit Daunorubicin angefertigt wurden. In einer 96-Schalen-Platte wurden für die Zelllinien U87 und U373 jeweils 24 Schalen mit 500, 1000, 2000 und 4000 Zellen pro Schale in 200 µl Medium mittels einer Multipipette ausplattiert. Hierbei wurden die Zellen 6 d nach Ausplattieren mit Sulforhodamin B angefärbt, wie in den weiteren Punkten beschrieben, und am Photometer gemessen. Für die weiteren Versuche wurde eine Zellzahl von 2000 Zellen pro Napf der 96-Napf-Platte verwendet.
- 2) Von den Zelllinien U87, U373 und 257RDB wurden jeweils 96-Schalen-Platten à 2000 Zellen in einem Volumen von 100 µl Medium pro Schale ausplattiert.
- 3) Nach 24 h wurde die jeweilige Zytostatikakonzentration in einem Volumen von 100 µl hinzugefügt, wobei darauf zu achten war, dass die Zytostatikakonzentrationen auf 200 µl berechnet worden sind, da die Zellen in 100 µl Medium ausplattiert worden waren. Die insgesamt benötigte Menge jeder Konzentrationsstufe wurde jeweils vorbereitet und dann mit der Multipipette in die Näpfe pipettiert, um eine gleichmäßigere Mengenverteilung als mit einer einfachen Pipette zu gewährleisten.
- 4) Die Daunorubicin Stocklösung von Sigma hatte eine Konzentration von 1 mg/ml und war in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Daunorubicin-Konzentrationen von 0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1 µg/ml wurden auf den Zelllinien U87 und U373 ausgewertet, wobei für jede Konzentration 8 Schalen einer 96-Schalen-Platte zur Verfügung standen. Die Daunorubicin-Versuche wurden für eine Inkubationszeit von 48 h zweimal durchgeführt. Es ist zu vermerken, dass die Zelllinie 257RDB *in vitro* alle 4 Wochen mit 100 ng/ml Daunorubicin inkubiert wurden, um den MDR-Phänotyp zu erhalten.

- 5) Für die Zytostatika-Einzelwerte von Docetaxel, Irinotecan und Trichostatin A wurden die Zelllinien U87, U373 und 257RDB verwendet und die Versuche mit Inkubationszeiten von 48 h und 72 h jeweils zweimal analysiert (Abb. 8). Die Docetaxel Stocklösung hatte eine Konzentration von 5 mg/ml ddH<sub>2</sub>O, was einer molaren Masse von 6,2 mM entsprach. Die Docetaxel-Konzentrationen von 0 nM/ml, 0,001 nM/ml, 0,01 nM/ml, 0,1 nM/ml, 1 nM/ml, 10 nM/ml und 100 nM/ml wurden auf allen Zelllinien ausgewertet, wobei für jede Konzentration 8 Schalen einer 96-Schalen-Platte zur Verfügung standen.
- 6) Die Irinotecan Stocklösung hatte eine Konzentration von 20 mg/ml ddH<sub>2</sub>O, einer molaren Masse von 57 mM entsprechend, wobei die Irinotecan-Konzentrationen von 0 µM/ml, 0,001 µM/ml, 0,01 µM/ml, 0,1 µM/ml, 1 µM/ml und 10 µM/ml untersucht wurden.
- 7) Die Trichostatin A Stocklösung besaß eine molare Masse von 10 mM, wobei 1 mg Trichostatin A in 330 µl DMSO gelöst wurde. Entsprechend den anderen Zytostatika wurden die Trichostatin A-Konzentrationen von 0 µM/ml, 0,001 µM/ml, 0,01 µM/ml, 0,1 µM/ml, 1 µM/ml und 10 µM/ml untersucht.
- 8) Nach Zugabe der Zytostatika wurden die Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert, bevor das Zytostatika-haltige Medium durch 200 µl frisches Medium ersetzt worden ist.
- 9) Insgesamt 48 h und 72 h nach Inkubationsende wurde das Medium von den Platten abgeschüttet und 200 µl eiskalte 10 %-TCA-Lösung (Trichloressigsäure) in jede Schale pipettiert, um die Zellen am Schalenboden zu fixieren.
- 10) Nach 1 - 2 h Inkubation bei 4 °C wurde jeder Napf fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O gespült, bevor in jede Kavität 100 µl 0,4 %-Sulforhodamin B Lösung pipettiert wurden, um die Zellen anzufärben.
- 11) Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde jede Schale fünfmal mit 1 %-Essigsäure gespült, um die überschüssige Sulforhodamin B Lösung abzuwaschen, und über Nacht getrocknet.
- 12) Zum Lösen des Sulforhodamin B wurden in jede Schale 300 µl 20 mM Tris-Puffer, pH 10, gegeben und für 1 - 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Konzentration jedes Ansatzes wurde am Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter von Wallac bei einer Absorption von 540 nm gemessen.
- 13) Die Messergebnisse der verschiedenen Versuche wurden gemittelt und in einen Graphen übertragen.

## 2.15 Vorbehandlung der Zelllinien und Infektion mit Virus zur späteren DNA-Isolation

14) Aus den IC<sub>50</sub>-Ergebnissen der Zytostatika-Einzelwerte von Docetaxel, Irinotecan und Trichostatin A wurden jeweils Zweierkombinationen erstellt und auf den Zelllinien U87, U373 und 257RDB untersucht (Abb. 8). Pro Kombination und Zelllinie wurden 4 Kavitäten einer 96-Schalen-Platte verwendet. Der Versuchsaufbau blieb aus den vorherigen Versuchen bestehen, wobei wiederum sowohl eine 48 h als auch eine 72 h Inkubationszeit jeweils zweimal untersucht wurde. Die Messergebnisse wurden gemittelt und graphisch dargestellt.

Dauno. (ng)	Doce. (nM)	Irino. (µM)	Tricho. (µM)	Tr(µM) + Do(µM)	Do(nM) + Ir(µM)	Ir(µM) + Tr(µM)
48 h	48 h / 72 h	48 h / 72 h	48 / 72 h	48 h	48 h	48 h
0,001	0,001	0,001	0,001		0,7 + 0,7	
0,01	0,01	0,01	0,01		0,7 + 1,0	
0,1	0,1	0,1	0,1		0,7 + 3,0	
1	1	1	1		0,7 + 7,0	
	10	10	10		0,7 + 10,0	
					1,0 + 0,7	
					1,0 + 1,0	
					1,0 + 3,0	
					1,0 + 7,0	
					1,0 + 10,0	
					3,0 + 0,7	
					3,0 + 1,0	
					3,0 + 3,0	
					3,0 + 7,0	
					3,0 + 10,0	
					7,0 + 1,0	
					7,0 + 3,0	
					7,0 + 7,0	
					7,0 + 10,0	
					10,0 + 1,0	
					10,0 + 3,0	
					10,0 + 7,0	
					10,0 + 10,0	

**Abb. 8 Zytostatikakonzentrationen der IC<sub>50</sub>-Werte.** Weitere Informationen siehe Text.

Angaben sind in ng/ml bzw. in nM/ml oder µM/ml. Dauno.: Daunorubicin, Doce.: Docetaxel, Irino.: Irinotecan, Tricho.: Trichostatin A, Tr. + Do.: Trichostatin A + Docetaxel, Do. + Ir.: Docetaxel + Irinotecan, Ir. + Tr.: Irinotecan + Trichostatin A.

## 2.15 Vorbehandlung der untersuchten Zelllinien und Infektion mit Virus zur späteren DNA-Isolation

### 2.15.1 *In vitro* Zytostatika- bzw. Trichostatin A-Inkubation und Infektion mit dl520

1x10<sup>6</sup> Zellen der Zelllinien U373, U87 und 257RDB wurden in 10 cm-Schalen ausplattiert, um sie nach 24 h mit verschiedenen Zytostatikakonzentrationen in M/ml bzw.

## 2.15 Vorbehandlung der Zelllinien und Infektion mit Virus zur späteren DNA-Isolation

g/ml zu inkubieren. Für jedes Zytostatikum bzw. jede Zytostatikakonzentration wurde jeweils eine Petrischale und somit eine Kontrolle ohne Zytostatikum angesetzt. Die Zellen wurden mit 2 nM/ml Docetaxel bzw. mit 1 oder 2  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan für jeweils 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Trichostatin A wurde für 24 h in den Konzentrationen 0,25  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , 0,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , 0,75  $\mu\text{M}/\text{ml}$  oder 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  eingesetzt und für 5 h in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , 2,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , 7,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  oder 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ . Das dritte eingesetzte Zytostatikum war Daunorubicin, mit dem die Zellen für 6 h in den Konzentrationen 50 ng/ml oder 100 ng/ml inkubiert wurden. Zur Berechnung der adäquaten Konzentration war zu beachten, dass diese pro Milliliter Medium angegeben wurden. Daraus ergab sich folgende Beispielberechnung:

10  $\mu\text{l}$  Trichostatin A (C = 10 mM) + 990  $\mu\text{l}$  D-MEM  $\rightarrow$  C = 100  $\mu\text{M}$

0,5  $\mu\text{M}$  Trichostatin A im Medium:  $x = 0,5 \mu\text{M} * 10000 \mu\text{l} (\text{Medium in 10 cm-Schale}) / 100 \mu\text{M}$   
 $x = 50 \mu\text{l} / 10 \text{ cm-Schale}$

Nach Beendigung der Inkubationszeit mit Zytostatika wurden die Zellen mit 5 - 10 pfu des Adenovirus dl520 infiziert. Sobald nach 2 - 3 d verstärkte Lichtbrechung zu sehen war und sich einzelne Zellen abgelöst hatten, wurden die Zellen isoliert. Als Kontrolle für die Southern Blot Analyse wurde eine Petrischale mit  $1 \times 10^6$  U2OS-Osteosarkom-Zellen ausplattiert, mit 5 pfu Ad5-WT infiziert und nach 48 h isoliert.

Die Zellen wurden vom Petrischalenboden abgeschabt und mit einer 10 ml-Pipette in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 3000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, so dass nur das Zellpellet im Falkonröhrchen zurückblieb. Dieses konnte nun für die DNA-Isolation direkt weiterverarbeitet werden.

### 2.15.2 *In vitro* Bestrahlung und Infektion mit dl520

$1 \times 10^6$  Zellen der Zelllinien U373 und U87 wurden in 10 cm-Schalen ausplattiert, um sie nach 24 h mit 0, 3 oder 6 Gy am Linearbeschleuniger Megatron MX-2 von Siemens zu bestrahlen. Die Zellen wurden für 6 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert, bevor sie mit 5-10 pfu dl520 infiziert wurden. Nach 1 h Inkubation mit dem Virus wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen im Brutschrank kultiviert. Bei beginnender verstärkter Lichtbrechung nach 2 - 3 d wurden die Zellen photographiert und das Zellpellet isoliert, so dass es für Isolation der DNA weiterbehandelt werden konnte.

## 2.16 DNA-Isolation aus *in vitro* Zellen

### 2.16.1 DNA-Extraktion und Deproteinisierung mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Die Isolation von DNA aus Zellen setzt sich aus 2 Schritten zusammen. Die DNA wird freigesetzt durch Verdau der Zellmembranen und der RNA und die folgende Reinigung von Proteinen. Die gebräuchlichste Methode der Deproteinisierung ist die DNA-Extraktion mittels Phenol, welches Proteine denaturiert und unlöslich macht<sup>122</sup>. Bei dieser Methode entsteht eine untere, organische Phenolphase und eine obere, wässrige DNA-haltige Phase. Dazwischen liegen die denaturierten Proteine. Chloroform wird auch zur Protein-Denaturierung verwendet und hat die positive Eigenschaft, dass es, wenn kombiniert mit Phenol, die instabile Grenze zwischen den Phasen stabilisiert und durch Reduzierung des Volumens der klaren Phase den DNA-Gewinn erhöht<sup>181</sup>. Zu Phenol und Chloroform wird dem Protein-Denaturierungsansatz noch Isoamylalkohol hinzugefügt, welches Schäumen der Lösung verhindert und die Auftrennung der beiden Phasen verbessert<sup>155</sup>.

- 1) Jedes Zellpellet wurde in 250 µl Digestionspuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß überführt. Es wurde 10 µl Proteinase K (200 µg) hinzugegeben. Bei sehr großen Pellets wurde das doppelte Volumen verwendet, um den kompletten DNA-Verdau zu gewährleisten. Die Ansätze wurden bei 70 °C für 1 h inkubiert und dabei in regelmäßigen Abständen geschüttelt.
- 2) Der Zelldetritus wurde für 5 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert und die Digestionslösung in ein neues 1,5 ml-Eppendorffgefäß überführt.
- 3) Das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurde unterm Abzug hinzugefügt, weil Phenoldämpfe kanzerogene Wirkung besitzen. Der Ansatz wurde kräftig geschüttelt, so dass eine milchige Lösung entstand, die dann für 5 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer 200 µl Pipette abgetragen und in ein neues 2 ml-Eppendorffgefäß transferiert.
- 4) Die DNA aus der wässrigen Phase ist mittels dem vierfachen Volumen eiskalten 100 %-Ethanol, ¼ des Volumen 3 M Ammoniumazetat, pH 5,2 und 3 µl Glykogen gefällt und das Pellet nochmals in raumtemperiertem 70 %-Ethanol gewaschen worden, bevor es in Tris-Cl Puffer gelöst wurde (2.6).

### 2.16.2 Verwendung des QIAgen DNeasy Tissue Kits

Die Zellpellets sind von den in Petrischalen kultivierten und mit Virus infizierten Zellen isoliert worden. Diese wurden in 200 µl PBS, 200 µl Puffer AL und 20 µl Proteinase K (200 µg) des QIAgen DNeasy Tissue Kit resuspendiert und bei 70 °C für 60 min inkubiert, dabei in regelmäßigen Abständen invertiert. Nach Inkubationsende wurden 200 µl 100 %-Ethanol hinzugegeben und mit dem Ansatz gut vermischt. Aufgrund der langen Kulturzeit waren die Pellets meist sehr zellreich und groß, so dass der doppelte Ansatz der Lösungsmittel und Enzyme verwendet wurde. Die Lösung wurde auf eine QIAgen Säule, die in einem 2 ml-Eppendorffgefäß platziert worden ist, pipettiert und für 1 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wurde zum Waschen erst 500 µl AW1-Puffer auf die Säule pipettiert, und diese bei 4 °C und 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde ebenfalls verworfen und in einem zweiten Waschschrift 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben, welche für 3 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Dann wurde die Säule in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß gestellt und 100 µl Puffer AE, welcher die DNA von der Säule löst, auf die Säule pipettiert. Der Ansatz hatte bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert, bevor er für 1 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Das im 1,5 ml-Eppendorffgefäß befindliche Eluat enthielt die DNA, so dass die Säule verworfen werden konnte.

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der Lösung mit 98 µl ddH<sub>2</sub>O in einer 1:50-Verdünnung vermischt und die Konzentration am Beckman-Photometer bei einer Absorption von 260 nm gemessen.

### 2.16.3 DNA-Isolation aus *in vivo* Gewebe mittels QIAgen DNeasy Tissue Kit

25 mg Tumorgewebe wurden abgewogen, in kleine Stücke zerkleinert und in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß platziert. Es wurden 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K hinzugefügt und der Ansatz für 3 h bei 55 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde für 15 sec geschüttelt, 200 µl AL Puffer hinzugefügt und für 60 min bei 70 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte entsprachen denen für *in vitro* Gewebe unter Punkt 2.16.2.

## 2.17 Southern Blot Analyse

Beim von E. M. Southern 1975 entwickelten Southern Blotting werden DNA Fragmenten aus einem Elektrophorese-Gel auf eine Membran transferiert, wodurch die Fragmente immobilisiert werden und die Membran eine semipermanente Reproduktion des Gelbandenmusters trägt. Darauf folgend können spezifische DNA-Banden mittels komplementärer Sonden in einer Hybridisierungs-Analyse dargestellt werden.

### 2.17.1 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Das *in vitro* DNA-Isolat nach Infektion der Zellen mit Virus setzt sich aus viraler und zellulärer DNA zusammen. Um bestimmte Sequenzen im adenoviralen Genom nachweisen zu können, muss die DNA mittels Restriktionsendonukleasen verdaut werden.

Restriktionsendonukleasen erkennen kurze DNA-Sequenzen und schneiden doppelsträngige DNA innerhalb oder anliegend dieser Sequenzen. Das Enzym *KpnI* generiert 3'-überhängende Enden und schneidet die Sequenz

$$5'G-G-T-A-C\downarrow C3'$$

$$3'C\uparrow C-A-T-G-G5'$$

Im adenoviralen Genom liegen elf Schnittstellen für *KpnI* vor, so dass 10 Fragmente entstehen, von denen eines die Größe von 3646 bp besitzt und die adenovirale E2-Region umfasst. Diese wird nur nach Replikation eines Virus exprimiert und ist somit ein Indikator für die Replikation von dl520 in den untersuchten Zelllinien. Als Positivkontrolle der Southern Blot Analyse wurde das 3646 bp Fragment enthaltene *E. coli* Plasmid pUC18 mitverdaut (siehe 2.26).

- 1) Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 2 µl der DNA-Lösung 1:50 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die Konzentration am Beckman-Photometer bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.
- 2) 2 µg der jeweiligen DNA-Probe wurden mit 2 µl 10x-*KpnI*-Restriktionspuffer + BSA, 1 µl *KpnI* und RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Das Kälberalbumin (BSA) diente als Stabilisator der Endonuklease, und der Puffer hielt den für das Enzym optimalen pH-Wert aufrecht. 1 µl *KpnI* enthält 5 U des Enzyms, wobei 1 U Endonuklease 1 µg DNA innerhalb von 60 min komplett verdauen. Jedoch kann das Enzym bei größerer DNA Präparation mehr Zeit benötigen. Zusätzlich sollte darauf geachtet werden, dass das Volumen der Restriktionsendonuklease weniger als 1/10

des Gesamtvolumens ausmacht, weil sonst das im Puffer enthaltene Glycerol mit der Restriktion interferieren kann.

- 3) Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 4 µl 6x-Ladepuffer gestoppt.

### 2.17.2 Gelelektrophorese der DNA-Proben

Die verdauten DNA-Proben zusammen mit der Plasmid-Positivkontrolle und einer 1 kb PEΦ-Gold-DNA-Leiter von Fermentas wurden auf ein 1 %-TBE-Gel mit EtBr aufgetragen und bei einer Spannung von 50 V für 120 bis 150 min elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert, um die aufgetragenen DNA-Mengen und das Laufverhalten der Proben vergleichen zu können.

### 2.17.3 Southern Blotting

- 1) Um die Darstellung bestimmter DNA-Sequenzen durch Bindung von komplementären Sonden in der Hybridisierungs-Analyse zu ermöglichen, müssen unpaare Basenpaare vorliegen. Um die doppelsträngige DNA aufzutrennen, wurde das Agarosegel für 20 min im 10-fachen Gelvolumen Denaturierungslösung geschwenkt.
- 2) Mit destilliertem Wasser wurde das Gel abgespült und zweimal für 20 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Dieser Schritt senkt den pH-Wert des Gels auf unter 9,0. Bei höherem pH-Wert bindet die transferierte DNA nicht an die Nitrocellulose-Membran. Weniger kritisch ist die Neutralisierung bei Nylonmembranen, sollte aber trotzdem durchgeführt werden.
- 3) Mittels eines abwärts-gerichteten Kapillartransfer-Systems von Schleicher & Schuell wurde die DNA auf die positiv geladenen Nylonmembran Nytran von Schleicher & Schuell transferiert. Diese hat im Gegensatz zum aufwärts-gerichteten Kapillartransfer den Vorteil, dass das Gel durch das Gewicht der daraufliegenden Filterpapiere nicht brechen kann. Ein 3 cm-dicker Stapel saugfähiger Papiertücher, die etwas größer als das Gel waren, wurden mit 4 gleich großen, daraufliegenden Whatman 3MM Filterpapieren in einer Plastikschaale platziert. Darauf folgte ein mit 20x SSC angefeuchtetes Filterpapier und die ebenfalls angefeuchtete Nylonmembran. Obendrauf wurde das Agarosegel positioniert, wobei mögliche Blasen mittels Rollen einer Glaspipette über das Gel entfernt wurden. 3 weitere Whatman Papiere wurden in

20x SSC getränkt, auf das Gel gelegt und dabei nochmals die Blasen entfernt. Den Abschluss bildeten ein längeres Filterpapier und eine Plastikplatte, welche die Verdunstung der Flüssigkeit vermindern sollte. Die Enden des Filterpapiers hingen in einem die Blotting-Pyramide umgebenden Reservoir mit 20x SSC und bildeten eine Brücke für den Flüssigkeitsnachschub. Das System wurde für 2 h belassen.

- 4) Nach Abbau der Blotting-Pyramide wurde die Nylonmembran auf einem trockenen Whatman Papier platziert und im UV-Stratalinker 2400 von Stratagene bei einer Wellenlänge von 254 nm mit UV-Licht bestrahlt. Diese Technik wird auch *UV crosslinking* genannt und führt durch eine kovalente Bindung der einzelsträngigen DNA an die Nylonmembran zu ihrer Fixierung.

#### 2.17.4 Hybridisierungs-Analyse

Diese Methode, welche die Identifizierung spezifischer Sequenzen genomischer DNA ermöglicht, wurde erstmals 1966 von Denhardt vorgeschlagen und 1975 durch die Blotting-Entwicklung von Southern komplettiert<sup>40</sup>. Sie setzt sich aus der Prähybridisierung der Membran, der Herstellung der radioaktiv-markierten Sonde und ihrer Inkubation mit der Membran sowie dem Waschschrift der Membran zusammen.

##### 2.17.4.1 Prähybridisierung

Zum Prähybridisieren wurde die Nylonmembran in einem Hybridisierungsröhrchen mit 4 ml Hybridisierungslösung von Clontech platziert und im Hybridisierungssofen bei 68 °C für 3 h inkubiert. Hierdurch wurden unspezifischen DNA-Bindungsstellen blockiert und somit der Hybridisierungshintergrund reduziert.

##### 2.17.4.2 Radioaktiv-Markierung und Denaturierung der Sonde

Während der Prähybridisierungsphase wurde die zur Detektion der viralen Replikation verwendete *E2late*-DNA-Sonde radioaktiv markiert. Hierzu wurde die Sonde mit dem Klenow Fragment verdaut. Das Klenow Fragment mit einem Molekulargewicht von 76.000 besteht aus 70 % des C-terminalen Endes der *E. coli* DNA Polymerase I und hat damit dessen 5'→3' Exonuklease-Aktivität verloren<sup>105</sup>. Seine 3'→5' Exonuklease-Aktivität erzeugt 5'-überhängende DNA-Enden, an die seine DNA-Polymerase-Aktivität Nukleotide

inkorporiert. Wenn im Verdauansatz  $^{32}\text{P}$ -markierte dNTPs enthalten sind, werden auch diese eingebaut und markieren die Sonde somit radioaktiv.

- 1) 25 ng DNA der *E2late*-Sonde wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 26 µl aufgefüllt und mit 10 µl Random Oligonucleotide Primern aus dem Prime-It II Random Primer Labeling Kit in einem 1,5 ml-Eppendorffgefäß für 2 min bei 96 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation des Ansatzes zum Sammeln wurde er mit 10 µl 5x *Primer* Puffer, 1 µl Klenow Enzym (5 U/µl) sowie 3 µl dCT<sup>32</sup>P vermischt und bei 37 °C für 40 min inkubiert.
- 2) Eine MicroSpin™ G-25-Säule von Amersham wurde vorbereitet, indem die Säule geschüttelt, in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß platziert und bei 2500 rpm für 1 min zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde verworfen, die Säule in ein neues 1,5 ml-Eppendorffgefäß gestellt und der 50 µl-Ansatz mit der radioaktiv-markierten Sonde auf die Säule pipettiert. Die Zentrifugation des Ansatzes über die Säule bei 2500 rpm für 2 min ermöglichte die Reinigung der Sonde von den ungebundenen dNTPs, den *Primern* und dem Enzym.
- 3) Die nun radioaktiv-markierte Sonde war noch in doppelsträngigem Zustand und konnte noch nicht an die Nylonmembran binden. Zur Trennung der DNA-Stränge wurde die DNA denaturiert. Hierzu ist das Eluat für 3 min im Wasserbad bei 100 °C aufgeköcht und für 5 min auf Eis abgekühlt worden, bevor sie zu der Membran in das Hybridisierungsröhrchen hinzugefügt wurde. Der Ansatz inkubierte über Nacht bei 58 °C unter kontinuierlicher Drehung des Röhrchens.

#### 2.17.4.3 Waschschrift und Filmentwicklung

Um ein spezifisches Signal der gesuchten Sequenz zu erhalten, musste der Blot von den ungebundenen Sonden-Molekülen und nur partiell gebundenen Molekülen gereinigt werden. Dies wurde in verschiedenen Waschsritten vollzogen.

- 1) Die die radioaktiv-markierte Sonde enthaltene Hybridisierungslösung wurde entfernt und durch das gleiche Volumen an vorgewärmter 2x SSC + 0,1 % SDS Lösung ersetzt. Diese inkubierte unter ständiger Drehung für 15 min bei 54 °C, wobei dieser Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt wurde.
- 2) Die Waschlösung wurde zweimal durch das gleiche Volumen einer 0,2x SSC + 0,1 % SDS Lösung ersetzt, die jeweils für 15 min bei 54 °C inkubierten. Im ersten Waschvorgang wurde der Blot gröber gereinigt als beim zweiten, denn je

- 3) niedriger die Salzkonzentration (0,2x SSC) einer Lösung, desto stringenter wäscht sie. Es war darauf zu achten, dass der Flüssigabfall radioaktiv kontaminiert war und den Strahlenschutzbestimmungen entsprechend entsorgt werden musste.
- 4) Nun wurde der Blot aus der Hybridisierungsröhrchen entfernt, auf einem etwas größeren Whatman Papier platziert und in Klarsichtfolie eingewickelt. Der Blot wurde nun in eine Filmkassette geklebt und einem Film exponiert. Die Exposition dauerte je nach Intensität der Sondenradioaktivität zwischen 1 h und 12 h. Der Film wurde in einem abgedunkelten Raum aus der Kassette entfernt und im FLA-2000 Reader von Fuji positioniert, über den der Film in den Computer eingescannt wurde.

## 2.18 Northern Blot Analyse

### 2.18.1 Infektion der Zellen mit dl520

Zwei 10 cm-Petrischalen mit jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen von HeLa und 257RDB wurden ausplattiert und 24 h später mit 20 pfu dl520 bzw. Ad5-WT infiziert. Nach 48 h, wenn die Zellen begannen verstärkte Lichtbrechung zu zeigen, wurde die RNA isoliert. Der Zellrasen wurde vom Petrischalenboden abgeschabt und mit einer 10 ml-Pipette in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt. Das Zellpellet wurde für 10 min bei 4 °C und 3000 rpm runterzentrifugiert und der Überstand verworfen.

### 2.18.2 Isolation von RNA aus *in vitro* Zellen

Die meisten RNA-Isolationsmethoden lysieren und denaturieren erst die Zellen, um die komplette Nukleinsäure freizusetzen und zersetzten dann die DNA, um RNA isoliert vorliegen zu haben.

- 1) Jedes Zellpellet wurde in 1 ml Trizol von Life Technologies resuspendiert und in ein 2 ml-Eppendorffgefäß überführt. Der Ansatz inkubierte für 5 min bei Raumtemperatur. Trizol enthält Lysepuffer zur Zersetzung der Zellmembranen und DNase, um die DNA zu denaturieren. Zusätzlich ist Phenol zur Denaturierung der Proteine und Isolation der RNA in der Lösung enthalten.
- 2) Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz für 15 sec geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und

12.000 rpm hatte sich das Gemisch in die organische Phenol-Chloroform-Phase und die wässrige RNA-haltige Phase aufgetrennt.

- 3) Die klare Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorffgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Isopropanol kann ebenso wie Ethanol zur Fällung von Nukleotiden verwendet werden, hat aber den Nachteil, dass es weniger volatil ist und die RNA deshalb länger zum Trocknen benötigt. Die Suspension inkubierte für 10 min bei Raumtemperatur und wurde für 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert. Die RNA präzipitierte und bildete ein Gel-artiges Pellet am Boden des Eppendorffgefäßes.
- 4) Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml 70 %-Ethanol gewaschen. Die Suspension wurde für 5 min bei Raumtemperatur und 7.500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in RNase-freiem Wasser aufgelöst.
- 5) Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 2 µl der RNA-Lösung 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Konzentration am Beckman-Photometer bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.

### 2.18.3 Northern Blotting

Die Entwicklung des Southern Blotting im Jahre 1975 wurde gefolgt von der ähnlichen Methode zur Immobilisierung von im Gel aufgetrennten RNA-Fragmenten<sup>5</sup>. Diese Methode, scherzhaft als Northern Blotting bezeichnet, ist eine Standardmethode zur Identifikation und Größenanalyse von RNA-Transkripten. Der hauptsächliche Unterschied zum Southern Blotting besteht im initialen Gel-Auftrennungsschritt. Einzelsträngige RNA kann Sekundärstrukturen bilden und muss deshalb unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt werden, um eine gute Auftrennung der Transkripte zu gewährleisten.

#### 2.18.3.1 Elektrophorese der RNA in einem Agarose-Formaldehyd-Gel

Da viele Lösungen und Gläser mit RNase kontaminiert sind, musste darauf geachtet werden, dass eine Elektrophoresekammer und ein Gelträger verwendet wurden, die ausschließlich für RNA-Präparationen benutzt wurden.

- 1) Zur Erstellung eines 1 %-Agarosegels wurden 0,65 g Agarose und 61,8 ml 1x MOPS-Puffer zum Schmelzen gebracht, dem Ansatz 3,2 ml 37 %-Formaldehyd zugegeben und die Lösung in den Gelträger mit Taschenkamm gegossen. Aufgrund

der Toxizität von Formaldehyd sollte dieser Schritt unter dem Abzug vollzogen werden. Der Gelträger mit dem festen Gel wurde in der Elektrophoresekammer platziert und mit 1x MOPS-Puffer überdeckt.

- 2) Währenddessen sind jeweils 10 µg RNA auf 20 µl Volumen mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und mit 4 µl 6x-Ladepuffer von Sigma für 10 min bei 67 °C ebenfalls unterm Abzug inkubiert worden, bevor die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt wurden. Der Ladepuffer enthielt teratogenes Formaldehyd sowie EtBr zur Darstellung der RNA.
- 3) Die Proben wurden mit einer 1 kb PEΦ-Gold-DNA-Leiter, die ebenfalls erhitzt worden ist, auf das Gel aufgetragen, welches bei 50 V für 3 h elektrophoretisch aufgetrennt wurde.
- 4) Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert, um das gleichmäßige Laufverhalten und die aufgetragene Menge zu kontrollieren.

### 2.18.3.2 Northern Blotting

- 1) Mittels eines abwärts-gerichteten Kapillartransfer-Systems von Schleicher & Schuell wurden die RNA-Transkripte auf die positiv geladenen Nylonmembran Nytran von Schleicher & Schuell transferiert.
- 2) Zur Vorbereitung wurde das Agarosegel mit deionisiertem Wasser abgespült und für 45 min in 20x SSC getränkt. Die Blotting-Pyramide wurde wie in Abschnitt 2.17.3 beschrieben aufgebaut und das Gel über Nacht *geblottet*.
- 3) Am nächsten Tag wurde die Blotting-Pyramide abgebaut, die Nylonmembran auf einem Whatman Papier platziert und bei einer Wellenlänge von 254 nm im UV-Stratalinker 2400 von Stratagene *gecrosslinkt*. Zur Kontrolle, ob die RNA auf die Membran *geblottet* worden ist, wurde das Agarosegel unter UV-Licht betrachtet. Bei vollständiger Übertragung auf die Membran, waren keine Banden mehr zu sehen, weil das vom UV-Licht angeregte EtBr an die RNA gebunden und nicht im Gel vorhanden war.

### 2.18.3.3 Hybridisierungsanalyse

#### 2.18.3.3.1 Prähybridisierung und Hybridisierung

- 1) Zum Prähybridisieren wurde die Nylonmembran mit der Hybridisierungslösung in ein Hybridisierungsröhrchen platziert und unter kontinuierlicher Drehung bei 58 °C inkubiert.
- 2) Für die Northern Blot Analyse wurden eine E1A- und eine E3-Sonde hergestellt (2.9). Sie waren über das Klenow Fragment mit dCT<sup>32</sup>Ps markiert worden, bevor sie durch Aufkochen denaturiert wurden. Daraufhin waren die Sonden von den nicht-eingebauten Nukleotiden und Enzymen über eine MicroSpin G-25 Säule gereinigt worden, bevor sie der Hybridisierungslösung zugefügt wurden. Die Nylonmembran inkubierte wie bei der Southern Blot Analyse über Nacht bei 58 °C mit der radioaktiv-markierten Sonde (2.17.4.2).

#### 2.18.3.3.2 Waschschritt und Entwicklung

Die Hybridisierungslösung wurde durch vorgewärmte 2x SSC + 0,1 % SDS Lösung ersetzt und der Ansatz inkubierte für 15 min. Nach zweimaliger Durchführung wurde mit vorgewärmter 0,2 SSC + 0,1 % SDS Lösung zweimal für 15 min gewaschen. Die Membran wurde je nach Intensität der Sonde zwischen 1 bis 12 h auf dem Film exponiert und am FLA-2000 Reader von Fuji eingescannt.

## 2.19 Amplifikation von Viren

Die Adenoviren, wie dl520 oder Ad312, wurden in HEK293-Zellen amplifiziert. Die E1A- und E1B-Region des Adenovirus ist in das zelluläre Genom integriert und ermöglicht replikationsdefizienten Adenoviren die Replikation. Zusätzlich sind die Zellen gut infizierbar. Durch die Replikation von Adenoviren werden Zellen lysiert, um das Virus freizusetzen. Im Verlauf der Replikation runden sich die Zellen ab und zeigen verstärkte Lichtbrechung im Licht des Mikroskops. Da das Virus intrazellulär vorliegt, werden die Zellmembranen im Verlauf der Virusamplifikation durch wiederholten Einfrieren und Auftauen zerstört, um das Virus kontrolliert freizusetzen.

- 1) Zur Herstellung des G1-Stocks wurde eine T75-Flasche mit HEK293-Zellen, die zu 70 % konfluent waren, mit 10-20 pfu dl520 infiziert, dessen Konzentration mittels Photometrie bestimmt worden war. Nach 1 h Inkubation wurde das Virus auf den Zellen belassen und nicht wie sonst abgesaugt, sondern 8 ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden isoliert, sobald sie zu 70 - 80 % verstärkte Lichtbrechung (nach 3 - 4 d) gezeigt und sich abgerundet hatten – ein Zeichen für den zytopathischen Effekt. Die noch adhärenen Zellen wurden vom Flaschenboden abgeklopft und die Suspension mit einer 10 ml-Pipette in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt. Um das Virus vollständig aus dem Zellinneren freizusetzen, wurde der Ansatz viermal gefriergetaut, sprich für 20 min auf Trockeneis schockgefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Dieser Vorgang zerstörte die Zellmembranen. Der Zelldetritus wurde für 10 min bei 4 °C und 4.000 rpm in der Heraeus-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml-Falkonröhrchen überführt. Der hergestellte G1-Stock wurde in 1 ml-Portionen aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.
- 2) Zur Herstellung des G2-Stocks wurde eine T150-Flasche HEK293-Zellen mit 1 ml des G1-Stocks infiziert. Wiederum wurde nach Infektion das Virus-OptiMEN-Gemisch nicht abgesaugt und 16 ml Medium auf die Zellen gegeben. Als sich die Zellen zu 70 - 80 % abgekugelt hatten, wurden sie isoliert, indem die restlichen adhärenen Zellen abgeklopft wurden, und die Suspension in ein 50 ml-Falkonröhrchen überführt wurde. Zur Freisetzung des Virus aus den Zellen sind diese viermal gefriergetaut worden, bevor der Zelldetritus runterzentrifugiert wurde. Der das Virus enthaltende Überstand stellte den G2-Stock dar und wurde à 1 ml portioniert und bei – 80 °C gelagert.
- 3) Zur finalen Amplifikation des Virus wurde eine Maxiprep-Isolation des Virus aus HEK293-Zellen durchgeführt. Mit 2 ml des G2-Stocks wurden 10 T150-Flaschen HEK293-Zellen infiziert. Nach Inkubation wurde das Virus wiederum auf den Zellen belassen und jeweils 16 ml Medium zugefügt. Sobald die Hälfte der Zellen nach ca. 2 d verstärkte Lichtbrechung gezeigt und sich abgerundet hatten, doch bevor sich viele abgelöst hatten, wurden die Zellen isoliert. Die adhärenen Zellen wurden vom Flaschenboden abgeklopft und die Suspension zweier Flaschen jeweils in ein 50 ml-Falkonröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 4.000 rpm wurde der Überstand verworfen. Da die Zellen nicht gefriergetaut worden waren, befand sich das Virus noch innerhalb der Zellen. Die Pellets wurden vereint und in insgesamt 8 ml *Viral Preservation Medium* resuspendiert. Nun wurden die Zellen viermal gefriergetaut und der Zelldetritus für 10 min bei 4 °C und 4.000 rpm

- 4) runterzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml-Falkonröhrchen gefüllt und bis zur Virusaufreinigung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Virusreinigung wurde mittels eines Cäsiumchlorid-Gradienten (CsCl) vollzogen.

## 2.20 Virusaufreinigung

Neben reifen adenoviralen Partikeln werden bei Replikation und Herstellung eines Virus auch leere Kapside freigesetzt. Um ausschließlich reife Viruspartikel zu isolieren, muss das Amplifikationsprodukt gereinigt werden. Die unterschiedliche Dichte reifer und leerer adenoviraler Partikel ermöglicht ihre Auftrennung über einen Dichtegradienten. Reife Viruspartikel besitzen eine Dichte von  $1.34\text{ M}$  und sedimentieren somit bei Ultrazentrifugation auf einem Kissen höherer Dichte. Die Ultrazentrifugation wurde mit Cäsiumchlorid-Lösungen der Dichte  $1,33\text{ M}$  und  $1,45\text{ M}$  durchgeführt, wobei das komplette Virus eine Interphase zwischen den beiden Lösungen bildet und somit abgetragen werden kann.

- 1) Der Cäsiumchlorid-Gradient wurde hergestellt, indem  $17\text{ ml } 1,33\text{ M CsCl}$  in 2 SW28-Röhrchen für die Beckman Optima-LE-80K-Ultrazentrifuge pipettiert und diese mit  $9\text{ ml } 1,45\text{ M CsCl}$  vom Röhrchenboden aus unterschichtet wurden, so dass der Gradient entstand. Um Luftblasen zu verhindern, wurden die letzten  $500\text{ }\mu\text{l}$  in der Pipette belassen. Das eine Röhrchen diente der Virusreinigung, das zweite als Ausgleich für die Zentrifuge. Die nach der Amplifikation isolierten  $10\text{ ml}$  Viruslysate wurden vorsichtig oben auf einen der CsCl-Gradienten pipettiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden im Röhrchenständer abgewogen und das Gegengewicht mit *Viral Preservation Medium* angeglichen. Die Röhrchen wurden für  $2\text{ h}$  bei  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $18.000\text{ rpm}$  in der Beckman Optima-LE-80K Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch den CsCl-Gradienten entstanden 2 Banden, wobei die untere das dichtere komplette Virus enthielt. Diese wurde mit einer  $5\text{ ml}$ -Spritze von BD Discardit II und einer  $20\text{G } 1\frac{1}{2}\text{ } 0,9\times 40$  Kanüle von BD Microlance  $5\text{ ml}$  durch die Wand des Zentrifugenröhrchens abgesaugt. Der isolierte Ansatz wäre ausreichend für *in vitro* Versuche.
- 2) Für *in vivo* Versuche musste das Virus ein weiteres Mal über einen CsCl-Gradienten gereinigt werden. Hierfür wurden zur Herstellung des Gradienten in 2 kleinen SW41 Ultrazentrifugenröhrchen  $4\text{ ml } 1,33\text{ M CsCl}$  und  $4\text{ ml } 1,45\text{ M CsCl}$  pipettiert.  $4\text{ ml}$  der durch den ersten Gradienten gewonnenen Virusbande wurden auf den Gradienten

pipettiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden im Ständer abgewogen und das Gegengewicht mit *Viral Preservation Medium* angeglichen. Die Proben wurden über Nacht (< 18 h) bei 20 °C und 25.000 rpm in der Beckman Optima-LE-80K-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die untere Bande wurde mit einer 5 ml-Spritze und einer 20G Nadel abgetragen.

- 3) Zum Dialysieren wurde das Slide-A-Lyzer Dialyse Produkt von Pierce verwendet. Die Slide-A-Lyzer Kassette wurde ohne Berühren der Membran in die Rille einer weißen Slide-A-Lyzer Boje geschoben. Zur Erhöhung der Membranflexibilität und Druckverringering wurde die Kassette für 30 sec in 10 mM Tris-Puffer pH 7,6 - 7,8 getaucht und der Kassettenrahmen zum Trocknen vorsichtig auf einem Papierhandtuch abgeklopft. Die Virussuspension wurde in eine 5 ml-Spritze mit einer sterilen 20G 1½ 0,9x40 Nadel aufgezogen und die Dialysekassette aus der Boje entfernt. Der Dichtungsring an der oberen Ecke der Kammer wurde mit der Nadel penetriert und die Suspension in die Kassette injiziert. Mit der Nadel, die noch in die Kassettenkavität inseriert war, wurde die in der Kassette befindliche Luft abgezogen und die Nadel entfernt. Hierdurch wurden die Membranen aneinander komprimiert, so dass die Virussuspension auf das ganze Fenster verteilt war. Die Kassette wurde in die Rille der Boje geschoben und in 10 mM Tris-Puffer pH 7,6 - 7,8 getaucht. Nach 18 h Dialyse bei Raumtemperatur, wobei nach 2 und 4 h der Puffer gewechselt wurde, wurde die Membran aus der Pufferlösung entnommen und die Boje entfernt. Zum Aufnehmen des Dialysates wurde in eine 5 ml-Spritze mit einer sterilen 20G 1½ 0,9x40 Nadel mindestens die gleiche Menge Luft aufgezogen, die dem Volumen des Virus entsprach, und durch einen ungebrauchten Dichtungsring der Kassettenecke in die Kavität injiziert. Die Kassette wurde so gedreht, dass die Suspension an die Seite der Nadel am Boden der Kammer floss und die Luft oben an der gegenüberliegenden Seite gepresst wurde. Somit konnte das Virus komplett mit der Nadel abgetragen, 50 µl-Portionen aliquotiert und bei – 80 °C gelagert werden.
- 4) Eine Methode zur Bestimmung der Gesamtpartikelzahl ist die photometrische Messung der DNA-Konzentration bei einer Absorption von 260 nm und wurde erstmals von Maizel et al. im Jahre 1968 publiziert<sup>151</sup>. 10 µl des Virus wurden 1:10 mit 1x TE-Puffer, pH 8,0, verdünnt und die Absorption bei 260 nm am Beckman-Photometer bestimmt. Die Viruspartikelzahl pro ml konnte durch Verwendung folgender Formel errechnet werden.

$$\begin{aligned} A_{(260\text{ nm})} &= 1,0 \rightarrow \text{Viruspartikel/ml} = 10^{12} \\ \text{also} & \quad 1 / 10^{12} = [A_{(260\text{ nm})} * 10] / x \\ \text{wobei} & \quad x = \text{Viruspartikel/ml} \end{aligned}$$

10 entsprachen der 1:10 Verdünnungsstufe.

Zur genaueren Bestimmung der Gesamtpartikelzahl wurde ein Plaquetest durchgeführt.

## **2.21 Bestimmung der Gesamtpartikelzahl bzw. des viralen Titers mit Hilfe des Plaquetests**

Prinzipiell werden bei einem Plaquetest Monolayer mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Virus infiziert. Diese werden mit halbfestem Medium wie Agarose überschichtet, so dass nach Lyse einer infizierten Zelle das austretende Virus nur die direkt benachbart liegenden Zellen infizieren kann. Durch die Lyse bildet sich ein Loch (= Plaque) im Zellrasen. Die Plaques werden ausgezählt und aus ihnen kann die Plaque-bildende Einheit bzw. *plaque forming unit* (pfu) errechnet werden.

- 1) Als Monolayer wurden HEK293-Zellen verwendet, weil diese die adenovirale E1-Region zur Verfügung stellen und somit auch replikationsdefiziente Viren auf ihnen replizieren können. Aus einer T150-Flasche mit HEK293-Zellen konnten zehn 6 cm-Petrischalen in je 8 ml DMEM ausplattiert werden. Die Petrischalen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 d kultiviert, bis sie zu 90 % konfluent waren.
- 2) Aus dem CsCl-gereinigten Virus wurde eine Titration bis auf die Verdünnungsstufe 10<sup>-11</sup> mit OptiMEN hergestellt, indem erst 10 µl Viruseluat mit 90 µl OptiMEN und bei jedem weiteren Schritt 60 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe mit 540 µl OptiMEN verdünnt wurden.
- 3) Die 6 cm-Petrischalen wurden mit jeweils 250 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe bedeckt, wobei pro Verdünnungsstufe 2 Petrischalen infiziert wurden. Nach 1 h Inkubation wurde der Zellrasen mit Agarose überlagert.
- 4) Während der Infektionszeit wurde das Agarose-*Overlay* vorbereitet. Eine 1:1 Lösung aus Plaquetest-Medium und 1 %-Agarose wurde hergestellt. Die Agarose wurde geschmolzen und für 30 min bei 44 °C im Wasserbad aufbewahrt. Das Plaquetest-Medium wurde ebenfalls im Wasserbad vorgewärmt und kurz vor Ende der Infektion mit der Agarose vermischt.
- 5) Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig vom Rand der Petrischalen aus mit jeweils 8 ml der Agarose-Lösung überlagert. Es war darauf zu

achten, dass einerseits die Lösung nicht zu warm war, um die Zellen nicht zu schädigen, und dass andererseits wegen Abhärtung der Agarose zügig gearbeitet werden musste. Nach Abhärtung der Agarose wurden die Schalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

- 6) Am 7. und 10. d wurden die Plaques ausgezählt. Die Plaquezahl in *plaque forming units* wurde wie folgt berechnet:

$$\# \text{ Plaques} * 4 / \text{ml} * \text{Verdünnung} = \# \text{ pfu/ml}$$

Da nur 250 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe eingesetzt wurden, wurde die Rechnung mit 4 multipliziert.

### 2.22 Partikelbestimmung von dl520 und Ad5-WT im Vergleich

Mit der Partikelbestimmung konnte die Replikationsfähigkeit bzw. Virusproduktion von dl520 im Vergleich zum adenoviralen Wildtyp Ad5-WT und von dl520 in Kombination mit Bestrahlung untersucht werden.

- 1) Für den Vergleich von dl520 mit Ad5-WT wurden von den Zelllinien U87, U373 und 257RDB jeweils vier 6 cm- Schalen à  $2 \times 10^5$  Zellen ausplattiert.
- 2) Nach 24 h wurden jeweils die Hälfte der Zellplatten aller Zelllinien mit 50 pfu dl520 bzw. mit 50 pfu Ad5-WT infiziert. Nach Infektion wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.
- 3) Nach 2 weiteren Tagen wurden die Zellen vom Petrischalenboden abgeschabt und mit dem Überstand jeweils in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt.
- 4) Um das ganze Virus aus dem Zellinneren freizusetzen, wurde die Zellen viermal gefriergetaut. Der Zelldetritus wurde für 10 min bei 4 °C und 3.000 rpm runterzentrifugiert und der das Virus enthaltende Überstand in ein neues 15 ml-Falkonröhrchen überführt.
- 5) Von den Isolaten wurden Titrationen hergestellt und ein Plaquetest von den Zelllinien U87, U373 und 257RDB mit den Verdünnungsstufen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  durchgeführt.
- 6) Die Versuche wurden jeweils doppelt durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

### **2.23 Partikelbestimmung von dl520 mit und ohne Irinotecan-Inkubation bzw. Bestrahlung**

Mit der Partikelbestimmung konnte die Virusproduktion von dl520 mit und ohne Inkubation mit 2 µM/ml Irinotecan bzw. mit und ohne Bestrahlung analysiert werden.

- 1) Von den Zelllinien U87 und U373 wurden für jeden Versuchsaufbau jeweils vier 6 cm-Schalen à  $2 \times 10^5$  Zellen ausplattiert.
- 2) Nach 24 h wurden je 2 Schalen von U87 und U373 mit 2 µM/ml Irinotecan inkubiert. 24 h später wurden die 8 Zellplatten aller Zelllinien mit 40 pfu dl520 infiziert. Vergleichsweise wurden nach 24 h je 2 Schalen von U87 und U373 mit 6 Gy am Linearbeschleuniger Megatron MX-2 von Siemens bestrahlt und nach 6 h alle 8 Zellplatten (0 und 6 Gy) mit 40 pfu dl520 infiziert. Nach Infektion wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.
- 3) 2 d später wurden die Zellen vom Petrischalenboden abgeschabt und mit dem Überstand jeweils in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt.
- 4) Um das ganze Virus aus dem Zellinneren freizusetzen, wurde die Zellen viermal gefriergetaut. Der Zelldetritus wurde für 10 min bei 4 °C und 3.000 rpm runterzentrifugiert und der das Virus enthaltende Überstand in ein neues 15 ml-Falkonröhrchen überführt.
- 5) Von den Isolaten wurden Titrations hergestellt und ein Plaquetest von den Zelllinien U87 und U373 mit den Verdünnungsstufen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  durchgeführt.
- 6) Die Versuche wurden jeweils doppelt durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

### **2.24 Bestimmung der Viralen Freisetzung von dl520 mit und ohne Bestrahlung**

Die Menge des aus Zellen freigesetzten Virus konnte mit Hilfe des Plaquetestes festgestellt werden.

- 1) Von den Zelllinien U87 und U373 wurden jeweils vier 6 cm-Schalen à  $2 \times 10^5$  Zellen ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 7 pfu dl520 infiziert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.
- 2) 3 d nach Infektion wurde jeweils 2 Schalen mit 6 Gy am Linearbeschleuniger Megatron MX-2 von Siemens bestrahlt.
- 3) Das Medium wurde 2 d später isoliert, indem je 4 ml mit einer 5 ml-Pipette in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt wurden.

- 4) Eine Titration mit den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  wurde für die Erstellung eines Plaquetest auf HEK293-Zellen angefertigt.
- 5) Die Versuche wurden jeweils doppelt durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

## 2.25 Zytopathischer Effekt Test

Eine Virusvermehrung kann zu unterschiedlichen Effekten führen. Es können sich Synzytien oder Einschlusskörperchen bilden, die virale Replikation kann zu Proliferation der Zellen führen, die Vermehrung kann ohne erkennbaren Effekt vonstatten gehen, oder die Zellen können lysiert werden. Adenoviren lysieren die Zelle bei erfolgreicher Replikation. Zur Untersuchung, wie effizient ein Adenovirus in einer bestimmten Zelllinie repliziert, kann deshalb ein Zytopathischer Effekt Test (CPE = *cytopathic effect*) durchgeführt werden.

### 2.25.1 CPE-Test zum Vergleich von in der E1-Region deletierter Viren

Das Adenovirus Typ 5 ist aufgeteilt in frühe und späte Gene, wobei die E1-Region das erste exprimierte Gen und für die weitere Aktivierung der Replikation verantwortlich ist. 3 Viren mit Deletionen innerhalb der E1-Region wurden analysiert: ein E1-deletiertes Virus Ad-E1-, Ad312, dem die E1A-Region fehlt, und dl520, welches das 13S-E1A Protein nicht exprimieren kann.

Es wurden je drei 12-Schalen-Platten à  $3 \times 10^4$  Zellen von U373, U87, HeLa und 257RDB ausplattiert. Nach 24 h wurden von jeder Zelllinie je 2 Näpfe mit 0, 2, 5, 10, 50 und 100 pfu Virus infiziert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 d inkubiert, wobei sie regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert wurden. Je nach Verbrauch des Mediums wurde nach 3 d 0,5 ml Medium hinzugefügt, jedoch kein altes Medium abgesaugt, um keine freigelassenen Viruspartikel abzusaugen und somit das Ergebnis zu verfälschen. Nach 5 - 7 d wurde das alte Medium abgesaugt und jeder Napf zweimal vorsichtig mit 1 ml PBS gespült, um die abgelösten Zellen zu entfernen. Die adhärenen Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt und am Schalenboden fixiert. Danach wurden die Platten im Wasserbad gespült, um das überschüssige Kristallviolett zu entfernen, und getrocknet.

### 2.25.2 CPE-Test von dl520 und Ad5-WT in Glioblastom-Zellen im Vergleich

Die lytische Effizienz von dl520 im Vergleich zum adenoviralen Wildtyp Ad5-WT in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 wurde untersucht. Hierzu wurden je drei 6-Schalen-Platten à  $3 \times 10^4$  Zellen von U373 und U87 ausplattiert. Nach 24 h wurden von jeder Zelllinie ein Napf mit 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 pfu Virus dl520 bzw. Ad5-WT infiziert. Die weiteren Schritte glichen denen in 2.25.1 .

### 2.25.3 CPE-Test mit Bestrahlung

Der zytopathische Effekt mit und ohne Bestrahlung wurde analysiert. Hierzu wurden jeweils drei 12-Napf-Platten à  $3 \times 10^4$  Zellen von U373, U87 und 257RDB ausplattiert. Je eine 12-Napf-Platte diente als Kontrolle, eine wurde nach 24 h mit 4 Gy bestrahlt, und die dritte wurde nach 24 h und nach 48 h mit jeweils 4 Gy bestrahlt. 48 h nach Ausplattieren wurden von jeder Zelllinie je 2 Schalen mit 0, 5, 10, 20 und 30 pfu dl520 infiziert. Die weiteren Schritte glichen denen in 2.25.1, wobei die Zellrasen vor Kristallviolett-Färbung photographiert wurden.

### 2.25.4 CPE-Test mit Zytostatika- und Trichostatin A-Gabe

Neben der Analyse des zytopathischen Effektes von dl520 mit Bestrahlung wurde sie nach Inkubation mit Zytostatika bzw. Histondeacetylase-Inhibitoren durchgeführt.

- 1) Bei einer 24 h Inkubationsdauer mit 2 nM/ml Docetaxel, 2  $\mu$ M/ml Irinotecan und 1  $\mu$ M/ml Trichostatin A wurden pro Konzentration und Zelllinie drei 6-Schalen-Platten à  $2 \times 10^5$  Zellen von U87, U373 und 257RDB ausplattiert sowie 3 Platten pro Zelllinie als Kontrollplatten, die nicht mit Zytostatika bzw. Trichostatin A inkubiert worden sind. 24 h nach Ausplattieren, wurden die Zellen mit der jeweiligen Konzentration bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h wurde das das Zytostatikum bzw. Trichostatin A enthaltene Medium abgesaugt und je 2 Schalen mit 0, 2, 4, 8, 10, 20 und 30 pfu dl520 infiziert. Nach 5 - 7 d wurden die Zellen photographiert, mit PBS gespült und mit Kristallviolett gefärbt (siehe 2.25.1).
- 2) Bei der 5 h Inkubation mit 10 nM/ml Docetaxel, 10  $\mu$ M/ml Irinotecan und 1  $\mu$ M/ml Trichostatin A wurde jeweils eine 12-Napf-Schale à  $3 \times 10^4$  Zellen von U373, U87 und 257RDB sowie je eine Kontrollplatte ohne Zytostatika bzw. Trichostatin A

- 3) ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit der jeweiligen Konzentration inkubiert und 5 h später infiziert. Je 2 Näpfe pro Zelllinie wurden mit 0, 5, 10, 15, 20 oder 30 pfu dl520 infiziert.
- 4) Für die Untersuchungen mit Daunorubicin, von dem jeweils 0, 50 oder 100 ng/ml für 5 h auf den Zellen belassen wurden, wurde für jede Konzentration eine 6-Schalen-Platte à  $1 \times 10^5$  Zellen von U87, U373 und 257RDB ausplattiert. Nach 24 h waren die Zellen für 6 h mit der jeweiligen Konzentration von Daunorubicin im Brutschrank inkubiert worden, bevor je eine Schale mit 0, 2, 5, 10, 20 und 30 pfu dl520 infiziert wurde.

### 2.25.5 Quantifizierung der CPE-Tests

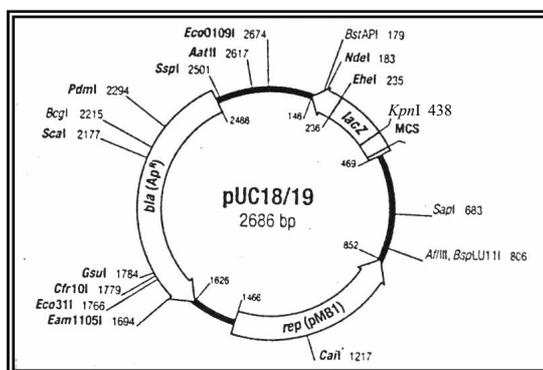
Um die Ergebnisse aus CPE-Tests genauer quantifizieren zu können, besteht die Möglichkeit, die Kristallviolett-Färbung zu lösen. Da die fixierten Zellen mit Kristallviolett angefärbt wurden, war die Farbintensität der Lösung proportional zur Zelldichte in einer Schale. Die Kristallviolett-Färbung jeder Schale wurde in 2 ml 0,1 % SDS in PBS gelöst und bei 37 °C für mindestens 1 h geschwenkt. Die Lösung jeder Schale wurde jeweils à 100 µl in 4 Schalen einer 96-Schalen-Platte überführt und die Farbintensität bei einer Absorption von 590 nm am Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter von Wallac bestimmt. Die Kontrolle eines CPE-Tests wurde dabei jeweils als 100 % festgelegt, so dass daran die Abnahme der Farbintensität bzw. der Zelldichte ermittelt werden konnte.

## 2.26 Sonden-Klonierung von 3646bp in pUC18 und Transformation von DH10B

Für gentechnische Verfahren ist die Vermehrung von spezifischen DNA-Sequenzen in beliebigen Mengen unabdingbar. Die spezifischen DNA-Sequenzen, auch Fremd-DNA genannt, müssen mit einer geeigneten Träger-DNA verknüpft werden, die auch als Vektor bezeichnet wird. Der Einbau von Fremd-DNA in einen Vektor bezeichnet man als Klonierung und die Einschleusung dieses Vektors in eine Empfängerzelle als Transformation. Bei DNA-Größen von einigen tausend Basenpaaren werden Plasmide, die zirkuläre Satelliten-DNA von Bakterien mit Genen für Antibiotika-Resistenz oder Konjugation enthalten, als Vektoren verwendet und Bakterienzellen damit transfiziert. Mit dem gesuchten Plasmid transfizierte Bakterien können z.B. über Platten mit Ampizillin selektioniert werden.

In der Southern Blot Analyse wurde die Replikation des Adenovirus dl520 in Glioblastom-Zellen untersucht, indem die isolierte DNA mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* verdaut und mit einer gegen die E2-Region gerichteten Sonde hybridisiert worden ist. Um ein spezifisches Positivsignal für die Southern Blot Analyse zu haben, sollte die von *KpnI* geschnittene, 3.646 bp-große Sequenz mit der E2-Region in ein Plasmid kloniert werden, welches dann bei der Southern Analyse mitverdaut und hybridisiert werden konnte. Das *E. coli* Plasmid pUC18, der Länge 2686 bp, besitzt eine einzige Enzymschnittstelle für *KpnI*, die den Einbau einer Gensequenz ermöglicht, somit auch des adenoviralen 3.646 bp Fragmentes (Abb. 9).

- 1) Hierzu wurden zu 9 µg des adenoviralen Vektors pAdenoX, dem die E1 und E3-Regionen fehlt, 1 µl *KpnI* und 2 µl *KpnI*-Puffer + BSA pipettiert und der Ansatz über Nacht bei 37 °C verdaut, um das spätere 3646 bp-große *Insert* zu erhalten.
- 2) Zur Eröffnung des Plasmids, in das die Sequenz eingebaut werden sollte, wurden parallel 800 ng des *E. coli* Plasmids pUC18, in 26 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, mit 1 µl Endonuklease *KpnI* und 3 µl *KpnI*-Puffer + BSA vermischt und über Nacht bei 37 °C verdaut, um das Plasmid zu eröffnen.
- 3) Nach Inkubationsende wurde der Ansatz mit dem verdauten Plasmid pUC18 für 10 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Zur Unterbindung einer Religation wurden die Plasmidenden dephosphoryliert. Hierzu wurde der 30 µl-Ansatz mit 1 µl intestinaler Kälber-Alkalischer Phosphatase (CIAP = *calf intestine alkaline phosphatase*) vermischt und bei 37 °C für mindestens 15 min inkubiert. Zur Kontrolle, ob die Plasmidenden nicht religiert hatten, wurde der Ansatz auf einem 1 %-TAE-Agarosegel + 2,5 ml EtBr bei 70 V für 120 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das linearisierte Plasmid wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit geleluert.



**Abb. 9 Aufbau vom Plasmid pUC18 mit seinen Enzymschnittstellen** (nach Fermentas, 2004). Weitere Informationen siehe Text.

- 4) Um die vorher zugefügten Enzyme zu entfernen, wurde das Eluat mit dem verdauten Plasmid mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kit gereinigt. Hierzu wurden die 30 µl Eluat mit 300 µl PN-Puffer vermischt und auf eine in einem 2 ml-Sammelgefäß befindliche QIAquick Säule pipettiert. Diese wurde für 1 min bei Raumtemperatur und 6.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säulenmembran mit 750 µl PE-Puffer bei 1 min Zentrifugation bei 6.000 rpm gewaschen. Die Säule war in ein sauberes 1,5 ml-Eppendorffgefäß platziert und die Plasmid-DNA mit 30 µl EB-Puffer für 1 min inkubiert worden, bevor sie für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde.
- 5) Zum Klonieren des 3646 bp-großen pAdenoX Fragmentes in das Plasmid wurden 3 µl des geöffneten Plasmids pUC18, die ca. 80 ng entsprechen, mit 13 µl pAdenoX-Insert, 2 µl T4-Ligase und 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer vermischt. 13 µl Insert entsprachen ~900 ng, da die Fragmentgröße von 3.646 bp wiederum etwa ein Zehntel des 34.000 bp-großen pAdenoX entsprachen, von dem anfangs 9 µg eingesetzt worden sind. Die Ligase „klebte“ die Enden des Plasmids mit dem Insert zusammen und integrierte so das Insert in das Plasmid. Der Ligationsansatz war über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden, bevor er für 10 min bei 80 °C hitzeinaktiviert wurde.
- 6) Für die Transformation wurden 100 µl DH10B Bakterien, die bei – 80 °C lagerten, aufgetaut. Diese wurden mit 10 µl Ligationsansatz durch Rühren vermischt – nicht durch Auf- und Abpipettieren – und für 30 min auf Eis aufbewahrt. Den Bakterien wurden für 30 - 60 sec bei 42 °C ein Hitzeschock versetzt und der Ansatz wieder für 2 min auf Eis gestellt. 600 µl raumtemperiertes LB-Medium wurden dazugegeben und bei 37 °C für 60 - 90 min im Brutschrank geschüttelt. Unterdessen wurde eine Agarplatte mit 100 µg/ml Ampizillin im Brutschrank vorgewärmt. Der Transformationsansatz wurde mittels Glaskügelchen auf der Agarplatte verteilt. Die Agarplatte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt, um Kolonien wachsen zu lassen. Da das Plasmid pUC18 ein Ampizillin-Resistenz-Gen enthält, konnten nur die das Plasmid enthaltenden Bakterien auf der Agarplatte wachsen und wurden somit selektiert. Nach Inkubation wurden etwa 10 Kolonien *gepickt* und jede in einem 2 ml-Eppendorffgefäß mit 1,2 ml LB-Medium + 1 µl Ampizillin/ml Lösung gelöst. Die Ansätze wurden bei 37 °C für mind. 5 h geschüttelt, um in dem Nährmedium anzuwachsen.  $\frac{3}{4}$  jedes Ansatzes wurden in ein 2 ml-Eppendorffgefäß

überführt, für 8 min bei Raumtemperatur und 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.  $\frac{1}{4}$  der Lösung diente als Stock oder für eine Maxiprepherstellung. Diese waren in 600  $\mu$ l LB-Medium + 1  $\mu$ l Ampizillin/ml Lösung aufgenommen und für 2 - 3 h bei 37 °C kultiviert worden, bevor sie bei - 80 °C gelagert wurden.

- 7) Um die Plasmid-DNA zu fällen, wurden Puffer aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Jedes Pellet der „ $\frac{3}{4}$ -Ansätze“ wurde in 300  $\mu$ l P1-Puffer gelöst. Jeder Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. 300  $\mu$ l P2-Puffer wurden dazugegeben, wiederum zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zuletzt wurden 300  $\mu$ l N3-Neutralisationspuffer hinzugefügt, für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml-Eppendorffgefäß überführt. Das Pellet enthielt die gefällten Proteine und die genomische Bakterien-DNA, der Überstand die Plasmid-DNA. Zum Fällern der Plasmid-DNA wurden dem Überstand 600  $\mu$ l Isopropanol und 3 - 5  $\mu$ l Glykogen hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei - 20 °C gelagert. Am nächsten Morgen wurde dieser für 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Ammoniumazetat wurde nicht wie sonst bei Fällungen benötigt, weil die Lösung schon durch die Puffer einen sauren pH besaß. Um Salze zu entfernen, wurde das Pellet mit 600  $\mu$ l 70 %-Ethanol zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das die Plasmid-DNA enthaltende Pellet in 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst.
- 8) Zur Kontrolle des Sequenzeinbaus in das Plasmid wurde jeder Ansatz mit *KpnI* verdaut. Hierzu wurden 17  $\mu$ l der jeweiligen Plasmid-DNA mit 1  $\mu$ l *KpnI* und 2  $\mu$ l *KpnI*-Puffer + BSA vermischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde das Produkt mit einer 1 kb-Leiter auf einem 1 %-TAE-Agarosegel + EtBr für 90 min bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert. Bei 2 zu sehenden Banden, war das Insert integriert worden, bei nur einer Bande nicht, weil nur das Plasmid-Rückgrat geöffnet worden wäre.
- 9) Die Plasmid-DNA konnte nun immer für die Southern Blot Analyse als Positivkontrolle verwendet und jeweils mit den anderen Proben verdaut werden.

## 2.27 Bestimmung der CAR-Expression mittels FACS-Analyse

Der Coxsackie-Adenovirale-Rezeptor (CAR) vermittelt neben Integrinen die Absorption und Internalisation von Adenoviren durch Interaktion mit dem Fiber-Knob des adenoviralen Kapsids. Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A beeinflusst die CAR-

Expression, wobei sein Einfluss mittels Durchflusszytometrie am Zellsorter untersucht werden kann.

- 1) Von den Zelllinien U87 und U373 wurden jeweils drei 6 cm-Schalen à  $3 \times 10^5$  Zellen ausplattiert und eine davon nach 24 h mit  $1 \mu\text{M/ml}$  Trichostatin A inkubiert.
- 2) Nach weiteren 24 h wurden die Zellen aller Schalen isoliert, indem sie vom Schalenboden abgeschabt wurden, und die Suspension in ein 3 ml-Röhrchen überführt wurde. Nach 5 min Zentrifugation bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1.300 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 3 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert.
- 3) Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet für 20 Min mit  $1 \mu\text{g}$  des monoklonalen Maus-Anti-CAR-Antikörpers, der in  $20 \mu\text{l}$  PBS gelöst war, inkubiert. Nach Inkubation wurde das Pellet erneut mit 3 ml PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Das Pellet wurde runterzentrifugiert und der Überstand verworfen.
- 4) Zur Markierung des Primärantikörpers wurde das Pellet mit  $1 \mu\text{g}$  polyklonalem Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper-FITC, der in  $10 \mu\text{l}$  PBS gelöst war, für 20 min im Dunkeln bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern wurde das Pellet mit PBS gewaschen, runterzentrifugiert und der Überstand verworfen.
- 5) Das Zellpellet wurde in  $300 \mu\text{l}$  4 %-Paraformaldehyd-Lösung gelöst. Der Sekundärantikörper war mit dem Fluoreszenzstoff Isothiozyanat-Isomer 1 (FITC) konjugiert, dessen Fluoreszenz am FACSvantage von Becton Dickinson gemessen wurde.

## **2.28 *In vivo* Xenograft Mausmodell mit subkutanen U87-Glioblastomen**

Zur Untersuchung des onkolytischen Effektes von dl520 in Kombination mit Bestrahlung am Xenograft-Mausmodell wurden 4 Versuchsgruppen aufgestellt:

- a) die Kontrollgruppe, die zweimal – am 2. und 5. d der Therapie – jeweils  $50 \mu\text{l}$  normale Kochsalzlösung intratumoral appliziert bekam;
- b) die Bestrahlungsgruppe, die am 1., 4. und 7. d der Therapie mit jeweils 4 Gy bestrahlt wurde;
- c) die Virusgruppe, die am 2. und 5. Therapietag jeweils  $50 \mu\text{l}$  mit  $5 \times 10^8$  pfu dl520 intratumoral gespritzt bekam;
- d) die Radiovirotherapie Gruppe, die am 1., 4. und 7. d mit jeweils 4 Gy bestrahlt und am 2. und 5. d jeweils  $5 \times 10^8$  pfu dl520 intratumoral appliziert bekam.

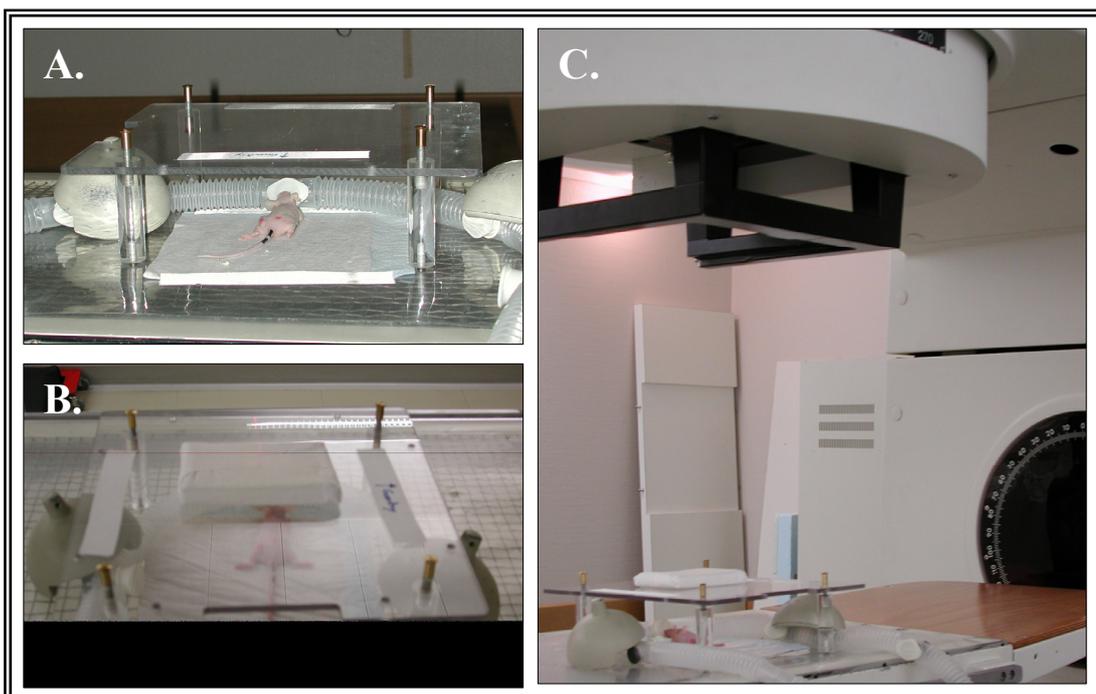
Als Versuchstiere dienten 32 weibliche, 7 Wochen alte Cr1:CD1-nu Mäuse, die von Charles River Laboratories bezogen wurden. Die Mäuse lebten gruppenweise in Makrolon-Typ-IV-Käfigen mit einer Belegdichte von 10 Tieren. Die Tiere wurden auf entkeimtem und entstaubtem Weichholzgranulat sowie Zellstoff, die zweimal pro Woche gewechselt wurden, gehalten und bekamen Alleinfutter-Pellets und Leitungswasser aus Nippeltränken *ad libitum*. Die Tiere wurden gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung in speziellen Tierhaltungsräumen einer konventionellen Tierhaltung bei einer jeweils 12 h andauernden Hell-Dunkel-Phase und einer Lichtintensität zwischen 50 - 100 lux untergebracht. Die Raumtemperatur betrug zwischen 20 - 25 °C und die Luftfeuchtigkeit zwischen 60 - 70 %.

Gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 17.02.1998 wurde das Tierversuchsvorhaben von der Regierung von Oberbayern genehmigt und das Vorhaben gemäß § 12 des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993 bei der Regierung von Oberbayern angemeldet.

- 1) 32 weibliche, 7 Wochen alte Cr1:CD1-nu Mäuse wurden für 2 Wochen in Quarantäne gehalten, bevor ihnen jeweils  $5 \times 10^6$  U87-Zellen subkutan in die linke Hüftregion gespritzt wurden. Hierzu wurden die U87-Zellen für einen Monat in D-MEM Medium ohne Penizillin und Streptomycin kultiviert. Ihre Zellzahl wurde regelmäßig bestimmt, um genug Zellen für die zu spritzenden Tumoren hochzuziehen. Die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und mittels einer 0,3 ml-Insulinspritze injiziert.
- 2) Die Tumoren wurden für 2 Wochen alle 3 - 4 d zweidimensional mit einer Schieblehre gemessen, wobei das Volumen mit der Formel  $\frac{4}{3}\pi * a/2 * (b/2)^2$  bestimmt wurde.
- 3) Als die Tumoren eine Größe von 200 – 300 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, wurden die Mäuse in die 4 Therapiegruppen randomisiert und die Therapie begonnen.
- 4) Die Mäuse wurden am Linearbeschleuniger Megatron MX-2 mit 6 MV von Siemens mit 3 Gy/min bestrahlt. Sie wurden jeweils einer Strahlung von 4 Gy ausgesetzt (Abb. 10). Die Bestrahlung war auf die linke Beckenregion der Mäuse begrenzt und fiel außerhalb des Bestrahlungsgebietes exponentiell ab. Zur Bestrahlung wurden die Mäuse mittels Isofloran an einem mobilen Gerät narkotisiert. Sie wurden unter einen Plexiglasständer gelegt, der einen Bodenabstand von 7,5 cm und einen Mausabstand von ca. 6 cm besaß und dessen Plexiglasscheibe 0,5 cm dick war. Auf den Plexiglasständer wurde ein 5 x 10 cm-großes Schaumstoffkissen mit einer Dicke von 1,5 cm platziert, das den Aufbaueffekt der Strahlung abfangen sollte, so dass ein Dosisseffekt von 100 % bis in 5 mm der Mausoberfläche eindrang (Abb. 10). Nach

dem Ausleitung der Narkose bekamen die Tiere 10 ml Ringer-Lösung mit 5 %-Glukose gespritzt.

- 5) Virus und normale Kochsalzlösung wurden den Tieren unter der Abzugshaube appliziert. Die  $5 \times 10^8$  pfu dl520 wurden auf 50  $\mu$ l Volumen mit PBS aufgefüllt und in 100  $\mu$ l-Insulin-Spritzen aufgezogen. Respektive wurden 50  $\mu$ l Kochsalzlösung in 100  $\mu$ l-Insulin-Spritzen aufgezogen. Die Volumina wurden fächerartig intratumoral appliziert.
- 6) Die Tumoren wurden zweimal die Woche für insgesamt 22 d zweidimensional mit der Schieblehre gemessen, die Volumina errechnet und statistisch erfasst.
- 7) Falls die Mäuse ab einer bestimmten Tumorgroße litten, wurden die Tiere vorzeitig geopfert. Die restlichen Tiere wurden am 22. d nach der Therapie geopfert. Die Tiere wurden mit einer Überdosis Ketamin (Ketanest®) euthanasiert. Die Tiere wurden obduziert und die Tumoren sowie Teile der Leber entnommen. Bei der Obduktion wurden die Tiere nach makroskopisch sichtbaren intrakranialen und intraabdominalen Metastasen untersucht.
- 8) Die entnommenen Gewebe wurden in 4 %-Formaldehyd eingelegt, um histologische Schnitte anfertigen zu können. Ein Teil der Tumoren wurde auf Trockeneis eingefroren und bei  $-80$  °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Dieses Tumorgewebe wurde auf virale Replikation untersucht. Die DNA wurde isoliert und eine Southern Blot Analyse durchgeführt.



**Abb. 10 Aufbau der Bestrahlung im Xenograft Mausmodell. A** Maus am Narkosegerät. **B** Schaumgummikissen zur Bündelung der Strahlen. **C** Zyklotron. Weitere Informationen siehe Text.

### **2.29 *In vivo* Xenograft-Mausmodell mit subkutanen U373-Glioblastomen**

- 1) Als Versuchstiere dienten 35 vier Wochen alte Cr1:CD1-nu Mäuse von Charles River Laboratories. Diese wurden für 2 Wochen in Quarantäne gehalten, bevor ihnen jeweils  $1 \times 10^7$  U373-Zellen subkutan in die linke Hüftregion gespritzt wurden. Hierzu wurden die U373-Zellen für einen Monat in RPMI-Medium ohne Penizillin und Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und mittels einer 0,3 ml-Insulinspritze injiziert.
- 2) Ab einer Tumorgröße von 100 mm<sup>3</sup> wurden die Mäuse in eine der 4 Therapiegruppen randomisiert und die Therapie begonnen. Leider wuchsen die Tumoren nur sehr langsam und verschwanden sogar bei vielen der Mäuse. Aufgrund dieser Tatsache konnten nur einige Mäuse exemplarisch in eine der Gruppen aufgeteilt und therapiert werden.
- 3) Die Kontrolltiere bekamen am 1. und 4. d jeweils 50  $\mu$ l PBS gespritzt, die nur mit Virus therapierten Tiere bekamen an den gleichen Tagen jeweils  $3 \times 10^8$  pfu dl520 in einem Volumen von 50  $\mu$ l intratumoral injiziert. Die Bestrahlungstiere wurden am 1. und 4. d mit jeweils 2 Gy bestrahlt und bekamen 1 h nach der Bestrahlung entweder PBS oder dl520 intratumoral injiziert. Somit wurden den Virustieren eine Gesamtdosis von  $9 \times 10^8$  pfu dl520 injiziert. Die mit einer Kombinationstherapie behandelten Tiere wurden am 1. und 4. d zuerst mit 2 Gy bestrahlt, und 1 h später wurde dl520 intratumoral injiziert.
- 4) Das Tumorwachstum wurde zweimal wöchentlich für insgesamt 50 d verfolgt, bevor die Tiere geopfert wurden. Falls die Mäuse ab einer bestimmten Größe unter dem Tumor litten, wurden sie vorzeitig geopfert. Die Tiere wurden obduziert und nach makroskopisch sichtbaren intrakranialen und intraabdominalen Metastasen untersucht.

### 2.30 Statistische Auswertung der Xenograft-Mausmodelle

Von den Einzelwerten der Tumorgrößen wurden Mittelwerte  $\bar{x}$  und Standardabweichung  $s$  berechnet.

$$\bar{x} = \frac{\text{Summe aller } \chi\text{-Werte}}{\text{Anzahl aller } \chi\text{-Werte}} = \frac{\sum \chi_i}{N}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\chi_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen des U87-Xenograft-Mausmodells bestand, wurde das Signifikanzniveau  $p$  bestimmt. Aufgrund der geringen Fallzahl mit dem quantitativen Merkmal der Tumorgröße wurden nichtparametrische Tests verwendet, bei denen von einer beliebigen Verteilung ausgegangen wird. Zum Vergleich aller 4 Gruppen miteinander wurde der asymptotische  $p$ -Wert im Kruskal-Wallis-Test und zum Vergleich von jeweils 2 Gruppen miteinander der exakte  $p$ -Wert im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bestimmt. Die Fallzahlen des U373-Xenograft-Modells waren zu niedrig um signifikante Ergebnisse zu bieten; deshalb wurden keine Signifikanzniveaus bestimmt. Der Versuch war als *Proof of Principle* anzusehen.

### 2.31 Histologie

- 1) Um die Morphologie der Tumoren zu erhalten, wurden die entnommenen U87-Tumoren in 4 %-Paraformaldehyd-Lösung bei 4 °C über Nacht getränkt und damit fixiert.
- 2) Die Tumoren wurden in Schnapphalterungen platziert. Um sie in Paraffin einzubetten und dadurch schneiden zu können, mussten die Tumoren erst dehydriert werden. Hierzu wurden Wasserlösungen mit aufsteigenden Alkohol-Konzentrationen getränkt, so dass das Wasser nach und nach durch Alkohol ersetzt wurde. Sie waren dreimal für jeweils 20 Min in 50 %-Ethanol inkubiert worden, bevor sie dreimal für jeweils 20 min in 70 %-Ethanol getränkt wurden. Die Tumoren wurden in ein 95 %-Ethanol-Bad überführt und zweimal für 20 Min in frischer Lösung getränkt. Dann waren sie zweimal für 20 Min in 100 %-Ethanol inkubiert worden, bevor sie dreimal für jeweils

10 min in Xylol-Lösung getränkt wurden. Aufgrund der Toxizität von Xylol wurden diese Schritte unterm Abzug durchgeführt.

- 3) Die in den Schnapphalterungen befindlichen Tumoren konnten nun in Paraffin eingebettet werden, indem sie mit 60 °C warmen Paraffin überdeckt wurden.
- 4) Nach Abhärtung des Paraffins konnten die Tumoren in 7 µm-breite Schnitte geschnitten und auf Objektträgern platziert werden.
- 5) Um sie Anzufärben mussten die Schnitte erst entparaffinisiert und rehydriert werden. Hierzu wurden die Schnitte in umgekehrter Reihenfolge, wie in Abschnitt 2 beschrieben, in Alkohollösungen inkubiert. Die im letzten Schritt in ddH<sub>2</sub>O badenden Schnitte wurden zur Anfärbung mit Haematoxillin-Eosin erst für 30 - 45 sec in ein Bad mit Haematoxillin getaucht und kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wurden sie für 30 sec in ein Bad mit Eosin getaucht, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und eingedeckt.

## 2.32 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie kann mittels Antikörpern ein bestimmtes Molekül im Gewebe nachgewiesen werden. Bei der indirekten Methode bindet ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Im nächsten Schritt gibt man den Sekundärantikörper, der spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist, hinzu. Der Primärantikörper ist entweder mit einer Fluoreszenz konjugiert oder wird in einem weiteren Schritt dargestellt. Die indirekte Methode besitzt gegenüber der direkten, bei welcher der Primärantikörper an einen Farbstoff konjugiert ist, eine höhere Sensitivität.

Bei der ABC-Methode (*avidin biotin complex*) ist der Sekundärantikörper ein Brückenantikörper, an den das wasserlösliche Vitamin Biotin gekoppelt ist. Dieser Antikörper wird dann mit dem Hühnereiweiß Avidin, das 4 Bindungsstellen für Biotin besitzt, inkubiert. Heutzutage wird das noch spezifischere Streptavidin, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen wird, verwendet. An das Streptavidin ist wiederum Alkalische Phosphatase gebunden, die aus Kälberdarm gewonnen und mittels eines an ihn gebundenen roten Farbstoff-Komplex sichtbar gemacht wird.

- 1) Die Tumoren wurden in 3 - 4 µm-breite Scheiben geschnitten und auf Objektträgern positioniert.
- 2) Um eine Immunhistochemie durchführen zu können, mussten die Schnitte entparaffinisiert und rehydriert sein. Paraffin blockiert die Bindungsstellen des Gewebes und somit auch die Bindungsstellen für Antikörper. Hierzu wurden die

Präparate für mindestens 20 Min in Xylol getränkt, welches das Paraffin aus dem Gewebe herauslöst. Dann wurden sie in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert, in umgekehrter Reihenfolge wie in Abschnitt 2.31 beschrieben. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für 10 Min in ddH<sub>2</sub>O und dann zweimal für 10 min in Tris-Puffer, pH 7,4, gespült.

- 3) Die Schnitte wurden mit einem Fettstift von Dako eingekreist, damit die Inkubationsflüssigkeiten nicht verliefen.
- 4) Da während der Fixierung mit Formalin Aldehydvernetzungen entstehen, welche die Bindung von Antikörpern verhindern, und sich dadurch auch die dreidimensionale Struktur von Proteinen verändern kann, werden diese für den Antikörper nicht mehr erkennbar (Antigenmaskierung). Neben Demaskierungen mit Enzymen wie Trypsin hebt Erhitzung der Schnitte in einer kalziumpräzipitierenden Lösung die Proteinvernetzung auf. Die Schnitte wurden in einer Plastikkuvette platziert, die bis zum oberen Rand mit Citrat-Puffer, pH 6,0, aufgefüllt wurde. Die Kuvette wurde in der Mitte der Mikrowelle platziert und dreimal für 5 min bei 600 - 800 Watt gekocht. Danach konnten die Schnitte langsam abkühlen, und der Citrat-Puffer wurde durch 1:10 verdünntem Tris-Puffer ersetzt.
- 5) Die Schnitte wurden dreimal für 15 min in 1:10 verdünntem Tris-Puffer gewaschen.
- 6) Um zu Verhindern, dass der Primärantikörper unspezifisch an elektrostatische Ladungen anderer Proteine bindete, wurden die Schnitte zur Absättigung der elektrostatischen Ladungen mit Normalserum inkubiert. Eingesetzt wird das Serum der Tierspezies, in welcher der Sekundärantikörper produziert wurde. Die Schnitte wurde für 20 min in einem 3 %-Mausserum-Wasserbad inkubiert.
- 7) Die Schnitte wurden horizontal in einer Feuchtkammer platziert, damit die Inkubationsflüssigkeiten nicht verdunsteten. Auf jeden Schnitt wurde 3 Tropfen des mit PBS 1:300 verdünnten polyklonalen Kanninchen-Anti-Adenovirus-Antikörpers gegeben und in der Feuchtkammer für 2 h inkubiert. Nach Inkubation wurden die Schnitte jeweils mit 1:10 verdünntem Tris-Puffer abgespült und dann dreimal für 15 min in 1:10 verdünntem Tris-Puffer Bad gewaschen.
- 8) Die Schnitte wurden in der Feuchtkammer platziert und für 45 min jeweils mit 400 µl des mit Tris-Puffer 1:400 verdünnten monoklonalen Maus-Anti-Kanninchen-Antikörpers inkubiert. Die Schnitte wurden jeweils mit 1:10 verdünntem Tris-Puffer abgespült und dreimal für 15 min in 1:10 verdünntem Tris-Puffer Bad gewaschen.

- 9) Die Schnitte wurden wieder in die Feuchtkammer gelegt. Sie wurden für 20 min mit jeweils 3 Tropfen Streptavidin, das an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet, benetzt. Sie wurden mit 1:10 verdünntem Tris-Puffer abgespült und dreimal für 15 min in 1:10 verdünntem Tris-Puffer gebadet.
- 10) Die an das Streptavidin gebundene Alkalische Phosphatase sollte nun mit einem Farbstoff dargestellt werden. Hierzu wurde ein Ansatz aus Produkten des Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I angefertigt. 5 ml Substratpuffer wurden mit 2 Tropfen Lösung I, 2 Tropfen Lösung II und 3 Tropfen Lösung III vermischt. Zusätzlich wurden 5 Tropfen Levamisol von Dako hinzugefügt, um die endogene Alkalische Phosphatase zu blockieren und somit unspezifische Farbreaktion zu verhindern. Die Schnitte wurden in der Feuchtkammer positioniert und mit dem Ansatz benetzt. Sie sind für 30 min im Dunkeln inkubiert worden, bevor sie für 2 - 3 min mit ddH<sub>2</sub>O gespült wurden. Der gebundene Farbstoff war rot-pink.
- 11) Um das Gewebe darzustellen, wurde die Schnitte zwischen 30 - 45 sec in Haematoxillin getaucht, bis die Blaufärbung intensiv genug war. Sie wurden für 2 min in Leitungswasser gespült. Um die Schnitte einzubetten, mussten sie wieder dehydriert werden. Hierzu wurden sie jeweils für 3 min in ein 70 %-, ein 80 %- und ein 90 %-Ethanolbad getaucht. Dann waren sie zweimal für jeweils 10 min in 100 %-Ethanol-Bäder überführt worden, bevor sie sechsmal für 10 min in Xylol gebadet wurden. Die Schnitte wurden mit Eukitt von Kindler eingedeckt. Diese Schritte wurden aufgrund der Toxizität von Xylol unterm Abzug durchgeführt.
- 12) Die Ergebnisse konnten mikroskopisch beurteilt werden. Zur Kontrolle, ob die Bindung der Antikörper und des Farbstoffes spezifisch war, mussten verschiedene Kontrollschritte durchgeführt werden. Jeweils ein Schnitt musste ohne Primärantikörper, ohne Sekundärantikörper, ohne beide Antikörper und ohne Farbstoff durchgeführt werden und mit den Schnitten, bei denen alle Antikörper-Inkubationen durchgeführt wurden, verglichen werden.

### 3. Ergebnisse

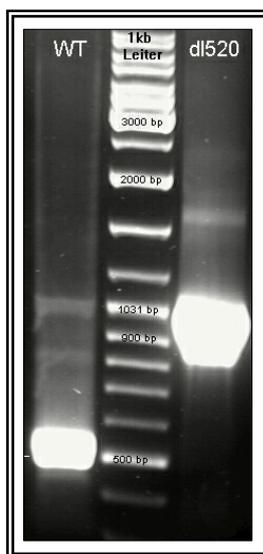
#### 3.1 Nachweis der 11-bp Deletion von dl520 und Ausschluss einer Wildtyp-Kontamination

In der vorliegenden Arbeit sollte das Adenovirus dl520 hinsichtlich effizienter Replikation im Glioblastom-Modell und einer Verstärkung der Replikation in Kombination mit Bestrahlung oder Zytostatika untersucht werden. Hierzu musste zuerst die im Genom von dl520 vorhandene Deletion der E1A-Region nachgewiesen und eine Kontamination mit Wildtyp-Adenovirus ausgeschlossen werden.

Das Typ 5 Adenovirus dl520 hat eine 11 bp-große Deletion, die in der *conserved region* CR3 von 1107 bis 1117 bp des adenoviralen Genoms reicht. Hiermit wird die 13S Spleißfunktion entfernt, die 1112 Nukleotide vom 5'-Genomende lokalisiert ist. Somit kann dl520 nur das 243 Aminosäuren große E1A-12S Protein exprimieren, nicht aber das 289 Aminosäuren große 13S-E1A Protein. Um die Reinheit von dl520 zu belegen, wurden nach PCR-Amplifikation der E1A-Region von dl520 und Ad5-WT beide Ansätze mit der Restriktionsendonuklease *AccI*, die das Genom an der Nukleotidposition 1108 bp eröffnet, verdaut und auf einem Agarosegel elektrophoretisch analysiert. Wie auf dem UV-Bild in Abbildung 11 zu sehen, wurde das 1006 bp-große E1A PCR-Produkt von Ad5-WT in 2 Genomsequenzen der Größe 489 bp und 517 bp verdaut.

Ad5-WT: 619 bp bis 1008 bp = 489 bp

1008 bp bis 1625 bp = 517 bp



**Abb. 11 Beweis der Deletion von dl520.** Durch seine 11 bp-große Deletion verliert das Adenovirus dl520 seine Spleißstelle für das E1A-13S Protein und kann nur noch die 12S mRNA exprimieren. dl520 und Ad5-WT wurden mittels PCR amplifiziert und von dem Enzym *AccI* verdaut. Dessen Schnittstelle liegt in der Deletionssequenz von dl520, so dass es im Gegensatz zu Ad-WT nicht verdaut wurde. Weitere Informationen siehe Text.

bp: *base pair(s)*, kb: *kilo base(s)*, WT: Adenovirus-Wildtyp.

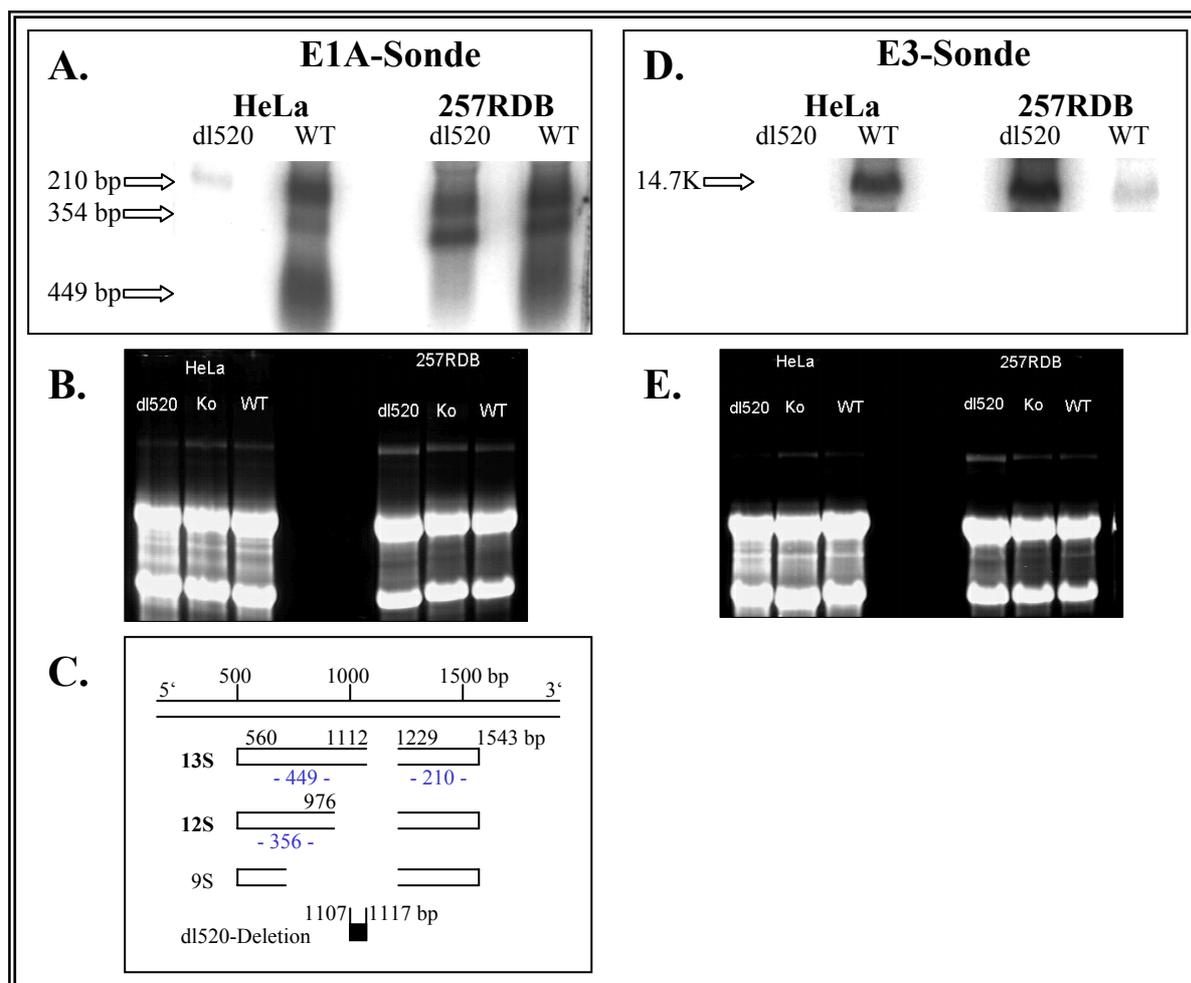
Das 995 bp-große E1A PCR-Produkt von dl520, das aufgrund seiner 11 bp-Deletion in der CR3-Region nicht verdaut wurde, zeigte ein einziges Signal um die 1000 bp sowie kein Signal von verdauten Produkten um die 500 bp an. Beim Wildtyp war ebenfalls nur eine Bande um die 500 bp zu sehen, da die beiden Fragmente aufgrund der fast identischen Größe so dicht nebeneinander lagen. Die Schmierspür beim Wildtyp entstand durch die große aufgetragene DNA-Menge bei zu schneller Laufgeschwindigkeit. Das Ergebnis bestätigt, dass keine messbare Wildtyp-Kontamination von dl520 vorlag.

Nach Beleg der Deletion von dl520, welches damit die 13S-E1A mRNA nicht exprimieren konnte, sollte die Transkription des replikationsdefizienten Adenovirus dl520 in vielfachresistenten Tumorzellen mit MDR-sensiblen verglichen werden.

### **3.2 Hohe Transkriptionsrate von dl520 in vielfachresistenten Tumorzellen, stark verringerte in MDR-sensiblen Zellen**

Bevor die Replikation von dl520 am Glioblastom-Modell untersucht wurde, sollte belegt werden, dass das replikationsdefiziente Adenovirus dl520 in vielfachresistenten Tumorzellen replizieren und alle viralen Proteine erzeugen konnte, zu Gleichem in Zytostatika-sensiblen, MDR-negativen Zellen aber unfähig war. Hierzu wurden die den *Multidrug Resistant* Phänotyp exprimierenden 257RDB-Magenkarzinom-Zellen und die MDR-sensiblen HeLa-Zervixkarzinomzellen auf die Expression der viralen Transkriptionsprodukte E1A und E3 untersucht. E1A gehört zu den *immediate early genes* und schaltet die Transkription der weiteren frühen Gene E2 bis E4 ein. Hierzu wurden die Zellen mit jeweils 20 pfu von dl520 bzw. Ad5-WT infiziert, ihre RNA nach 3 d isoliert und mit der <sup>32</sup>P-markierten Sonde für E1A und E3 hybridisiert.

Abbildung 12 C stellt die E1A-Transkriptionseinheiten dar, wobei beide Transkriptionsprodukte eine 210 bp-Sequenz am 3'-Ende enthalten. Zusätzlich werden für das 13S Transkript eine durch die *Primer*-Lokalisation verkürzte 449 bp-Sequenz und für die 12S mRNA eine ebenfalls durch die *Primer* verkürzte 354 bp Einheit gespleißt. Abbildung 12 A verdeutlicht, dass Ad5-WT sowohl die 12S als auch die 13S mRNA in beiden Zelllinien transkribieren konnte. dl520 hingegen produzierte nur 12S mRNA, weshalb das obere Signal, welches der 449 bp Sequenz entspricht, nicht zu sehen war. E1A-Transkription von dl520 war vergleichbar mit Wildtyplevel in 257RDB-Zellen, jedoch nur sehr schwach ausgeprägt in HeLa-Zellen. Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass HeLa-Zellen schlechter zu infizieren sind. Ad5-WT transkribiert sowohl in 257RDB als auch in HeLa-Zellen die 14,7K



**Abb. 12 Northern Blot Analyse von der E1A (A) und der E3 (D) mRNA in MDR-positiven 257RDB-Zellen und MDR-sensiblen HeLa-Zellen.** 257RDB- und HeLa-Zellen wurden auf virale E1A- und E3-mRNA von dem Adenovirus dl520 bzw. Wildtyp-Adenovirus untersucht. E1A wurde nach Infektion mit dl520 stark in MDR-positiven 257RDB-Zellen und schwach in MDR-sensiblen HeLa-Zellen exprimiert. dl520 konnte in MDR-sensiblen HeLa-Zellen die anderen frühen Gene, wie E3, nicht aktivieren, im Gegensatz zu MDR-positiven 257RDB-Zellen. **B** und **E** zeigen die zugeordneten Agarosegele und **C** stellt die Genomsequenz der E1A-Spleißprodukte dar. Weitere Informationen siehe Text. bp: base pair(s), WT: Wildtyp-Adenovirus.

mRNA, die TNF- $\alpha$ -vermittelte Apoptose inhibiert und für welche die E3-Sonde spezifisch ist (Abb. 12 D). Im Gegensatz dazu wurde die 14,7K E3 Sequenz von dl520 nur in den *Multidrug Resistant* 257RDB-Zellen transkribiert, jedoch nicht in HeLa-Zellen, die MDR-negativ phänotypisiert sind. Das UV-Agarosegel-Bild in Abbildung 12 B verdeutlichte, dass auf von den HeLa-Zellen gleiche RNA-Mengen aufgetragen worden sind, so dass der „Verlust“ des E3 Signals in HeLa-Zellen durch technische Fehler ausgeschlossen werden konnte. Bei den 257RDB-Zellen war die Expression von 14,7K niedriger nach Infektion mit Wildtyp als nach dl520-Infektion. Wie im Agarosegel-Bild in Abbildung 12 E zu sehen, wurde von der Wildtyp-Probe weniger RNA aufgetragen, wodurch ein vermindertes Signal erklärbar wurde. Die in Spalte 2 und 7 des Agarosegels aufgetragenen nicht infizierten

Kontrollen beider Zelllinien ließen im Northern Blot keine Signale erkennen, durch welche die Spezifität der Sonden verdeutlicht wurde.

dl520 replizierte effizient in MDR-Zellen, in denen YB-1 nuklear lokalisiert ist, was durch Expression der E1A- und E3-mRNA verdeutlicht wurde, jedoch nicht in HeLa-Zellen mit alleiniger zytoplasmatischer YB-1-Lokalisation.

Nachdem die Transkriptionsfähigkeit von dl520 in vielfachresistenten und Zytostatika-sensiblen Tumorzellen untersucht worden ist, war die Transduktionseffizienz von dl520 in den zu untersuchenden Glioblastom-Zellen von Interesse.

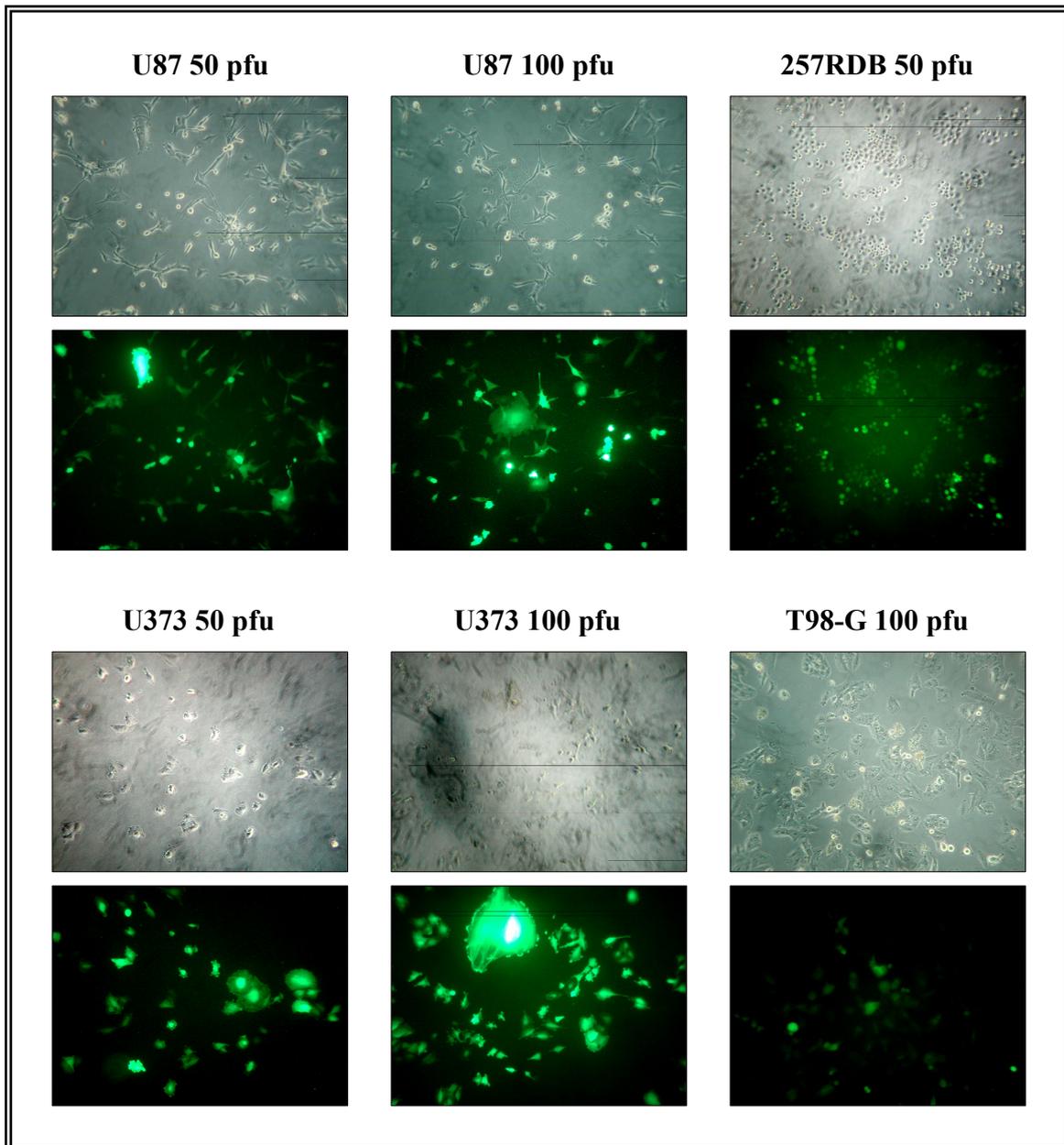
### **3.3 Qualitativ und quantitativ nachgewiesene Transduktionseffizienz in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373**

#### **3.3.1 Effektive Infektionsfähigkeit von Ad-GFP in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, aber nicht in T98-G**

Eine ausreichende Infektionsfähigkeit der Zellen, die über CAR vermittelt wird, ist eine Grundvoraussetzung, um onkolytische Adenoviren therapeutisch einsetzen zu können. Deshalb wurde die Transduktionsfähigkeit der Glioblastom-Zelllinien mit Hilfe des Adenovirus Ad-GFP qualitativ untersucht. Die infizierten Zellen weisen in UV-Licht durch das exprimierte Grün-Fluoreszierende-Protein eine Eigenfluoreszenz der Zelle auf und können so photographisch dargestellt werden.

Abbildung 13 lässt nach Infektion mit 50 pfu Ad-GFP starke Eigenfluoreszenz in der Mehrzahl der 257RDB, U87 und U373 Zellen erkennen. Oben sind jeweils die Bilder der Zellplatten und unten sind die zugehörigen Fluoreszenzbilder zu sehen, wobei zu erkennen ist, dass die Zellen einzeln ohne Kontakt zu Nachbarzellen verteilt waren. Die Glioblastom-Zellen T98-G waren jedoch selbst bei 100 pfu Ad-GFP schlecht infizierbar und wiesen nur geringe Eigenfluoreszenz auf.

Um die qualitativ festgehaltenen Ergebnisse zu untermauern, wurde die Transduktionseffizienz von Ad-GFP in den Glioblastom-Zellen zusätzlich mittels FACS-Analyse quantitativ untersucht.



**Abb. 13 Transduktionseffizienz von Ad-GFP in U87-, U373- und 257RDB-Zellen.** Zu sehen sind Photographien der Glioblastom-Zellen U87, U373 und T98-G und der Magenkarzinom-Zellen 257RDB 48 h nach Infektion mit verschiedenen moi des Adenovirus Ad-GFP. Die oberen Bilder stellen jeweils die Zellschicht bei Weißlicht und die unteren nach Anregung mit UV-Licht dar. Die Glioblastom-Zellen U87 und U373 sowie die Kontrollzellen 257RDB wiesen gute Infektionsfähigkeit auf, im Gegensatz zu den Glioblastom-Zellen T98-G. Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.

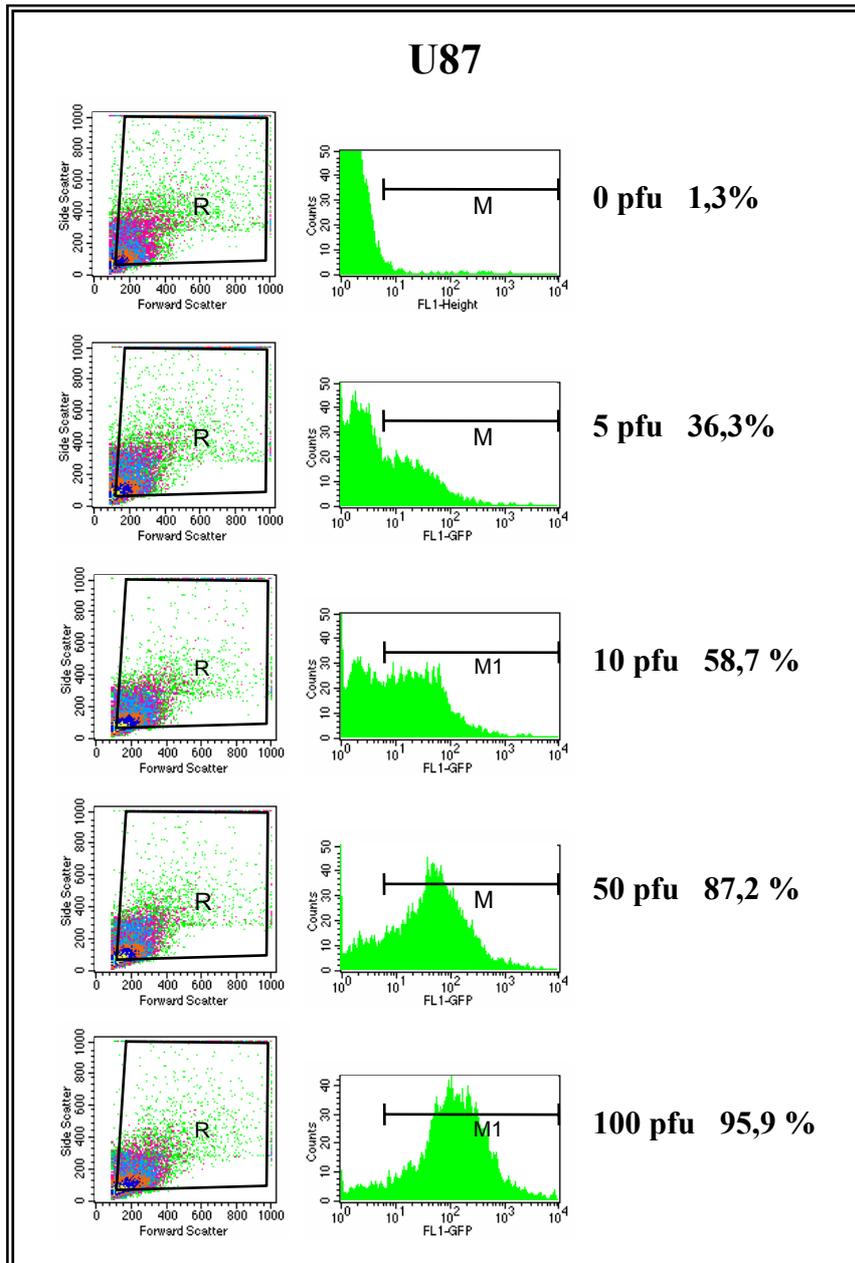
### 3.3.2 Adenovirale Transduktionseffizienz in den Glioblastom-Zellen U87 und U373, jedoch nicht in T98-G

Um die Transduktionseffizienz von Adenoviren in den Glioblastom-Zelllinien U87, U373, T98-G und in der Magenkarzinom-Zelllinie 257RDB quantitativ nachzuweisen, wurden die Zellen jeweils mit 0, 5, 10, 50 oder 100 pfu Ad-GFP infiziert und ihre GFP-Fluoreszenz nach 48 h am Zellsorter (FACS = *fluorescence activated cell sorting*) gemessen (Abb. 14). Nach Infektion mit 5 pfu Ad-GFP wurden 28 % der 257RDB-Zellen erreicht, mit 10 pfu schon 41 % und mit 50 pfu erweiterte sich die Infektion auf 78 % der Zellen aus (Abb. 18). In U87-Zellen infizierten 5 pfu Ad-GFP 31 %, 10 pfu 45 %, 50 pfu schon 80 % und 100 pfu 88 % der Zellen (Abb. 15). Von den U373-Gliom-Zellen wurden mit 5 pfu Ad-GFP 39 %, mit 10 pfu 52 %, mit 50 pfu 68 % und mit 100 pfu 81 % der Zellen erreicht (Abb. 16). Im Gegensatz zu diesen 3 Zelllinien, bei denen schon mit 5 pfu circa 30 % der Zellen erreicht wurden, konnten mit 100 pfu Ad-GFP nur 36 % der T98-G-Zellen infiziert werden (Abb. 17).

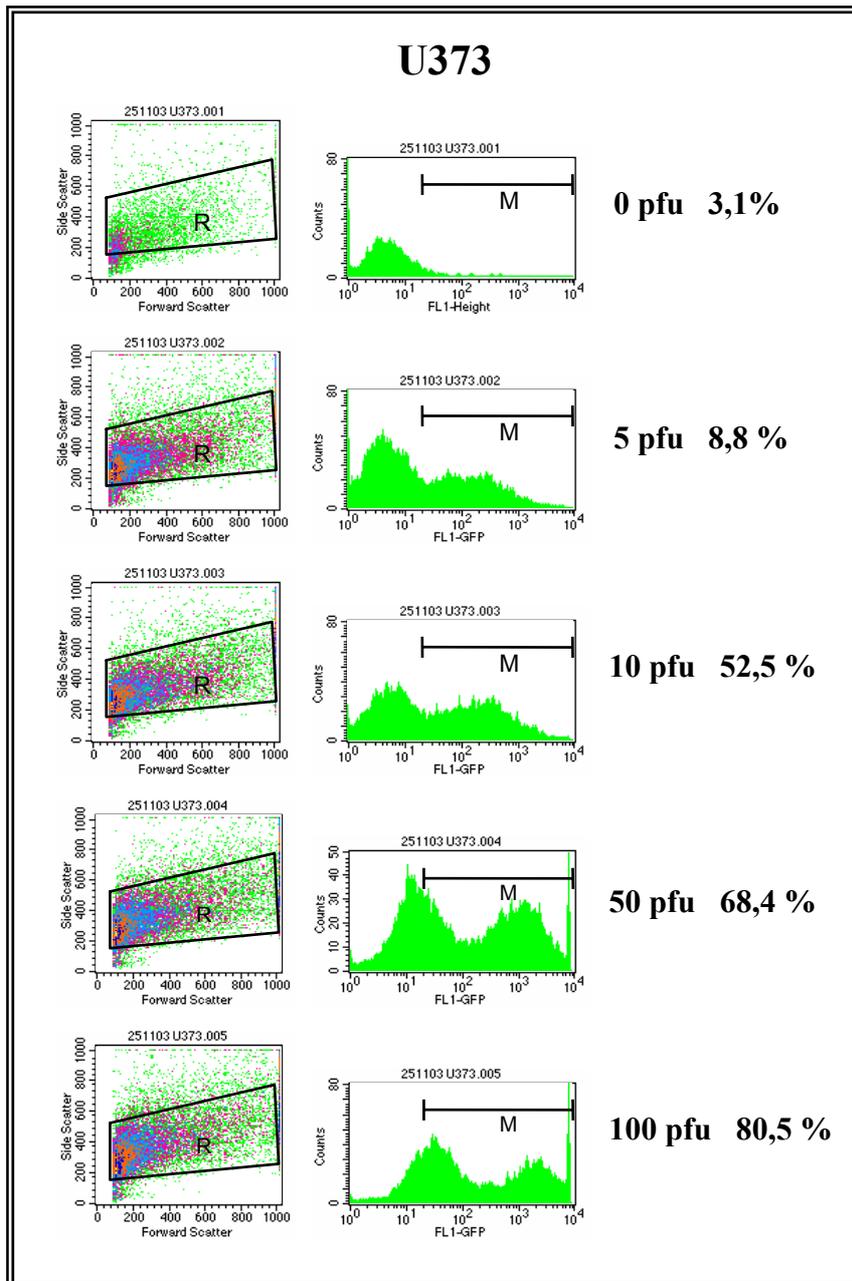
Aufgrund der schlechten Transduktionseffizienz der T98-G-Zellen wurden die weiteren Versuche nur noch an den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass dl520 in vielfachresistenten 257RDB-Zellen replizieren kann, in denen YB-1 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist. dl520 kann jedoch nicht in den YB-1 Kern-negativen HeLa-Zellen replizieren. Deshalb sollte als nächstes die YB-1 Lokalisation für das Glioblastom-Modell anhand der U373-Zellen bestimmt werden.

<b>GFP-Expression</b>				
	<b>U87</b>	<b>U373</b>	<b>T98-G</b>	<b>257RDB</b>
0 pfu	1,3%	3,1%	0,0%	2,5%
5 pfu	36,3%	8,8%	4,2%	28,0%
10 pfu	58,7%	52,5%	10,6%	41,0%
50 pfu	87,2%	68,4%	16,6%	78,1%
100 pfu	95,9%	80,5%	36,4%	79,9%

**Abb. 14 Effektive adenovirale Transduktion der U87, U373 und 257RDB Zellen, aber nicht der T98-G Zellen.** Die Zellen wurden mit verschiedenen moi des Adenovirus Ad-GFP infiziert, 48 h nach Infektion isoliert und die Intensität des Grün-Fluoreszierenden-Proteins am Zellsorter mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) bestimmt. Die Expression von GFP durch die einzelnen Zellen wurde prozentual zur Gesamtzahl der jeweiligen Zellen bestimmt. Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.

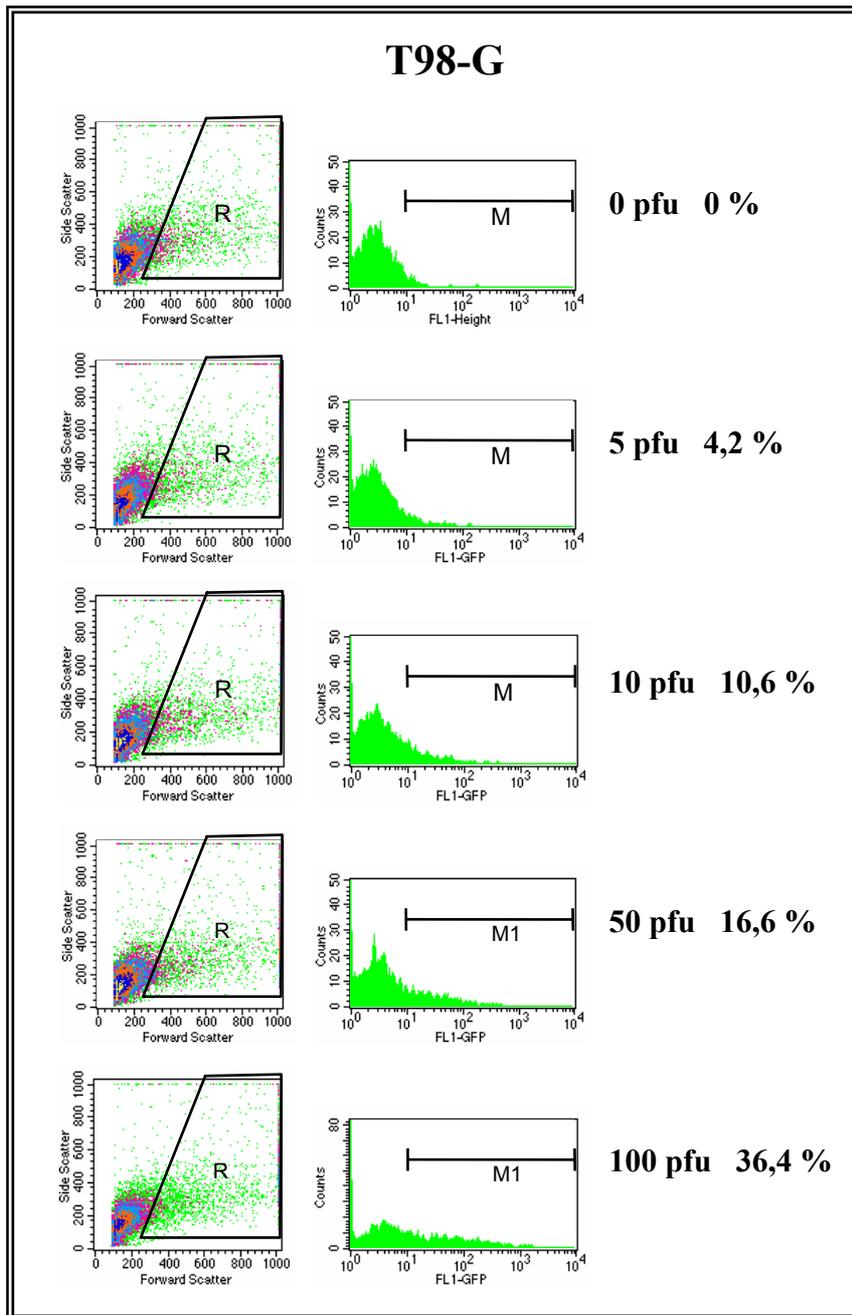


**Abb. 15 Effektive Infektionsfähigkeit der U87-Zellen in der FACS-Analyse.** Die U87-Zellen wurden mit verschiedenen moi des Adenovirus Ad-GFP infiziert, 48 h nach Infektion isoliert und die Intensität des Grün-Fluoreszierenden-Proteins am Zellsorter mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) bestimmt. Sie zeigten gute Transduktionsfähigkeit nach Einsatz von 10 pfu Ad-GFP. Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.

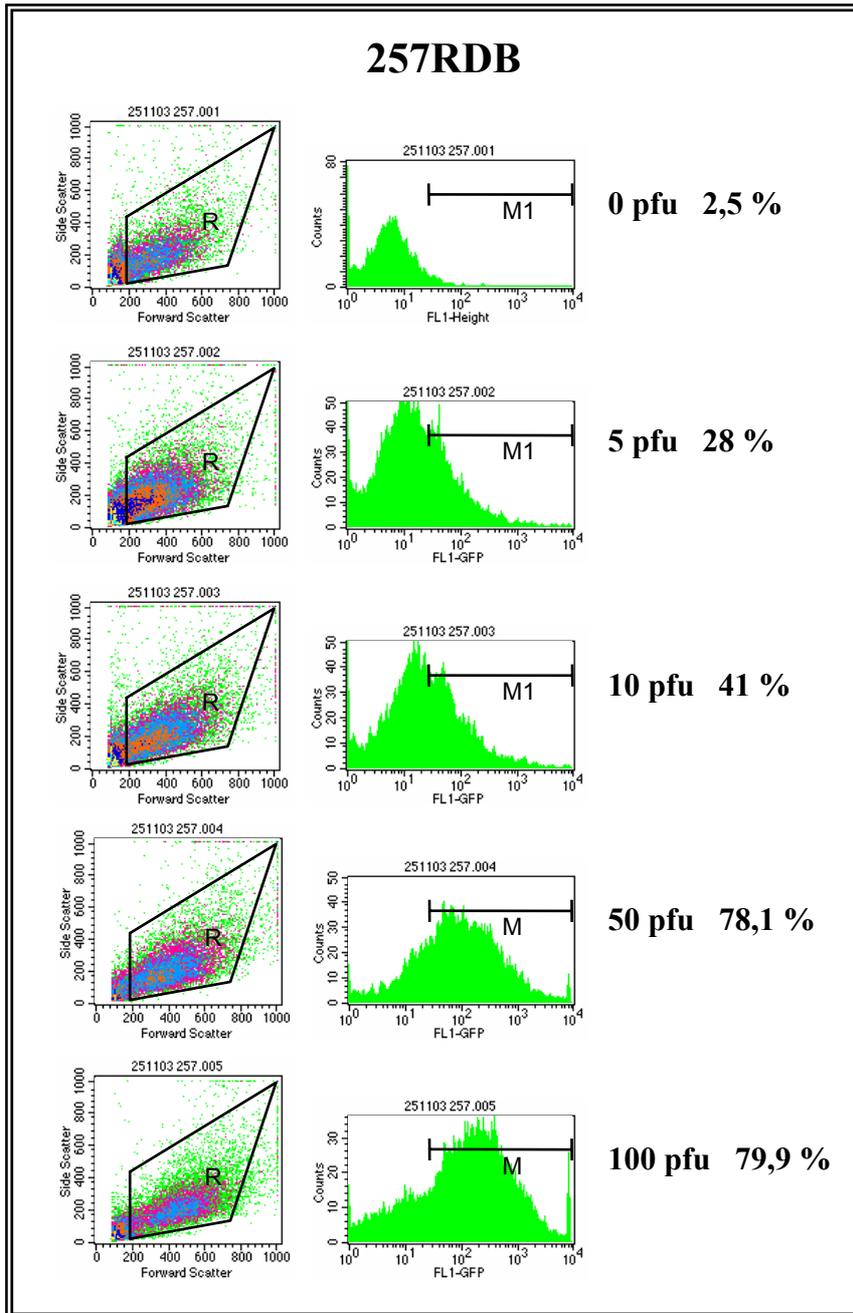


**Abb. 16 Effektive Transduktionsfähigkeit der U373-Glioblastom-Zellen in der FACS-Analyse.** Die U373-Zellen wurden mit verschiedenen moi des Adenovirus Ad-GFP infiziert, 48 h nach Infektion isoliert und die Intensität des Grün-Fluoreszierenden-Proteins am Zellsorter mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) bestimmt. Sie zeigten gute Transduktionsfähigkeit nach Einsatz von 10 pfu Ad-GFP. Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.



**Abb. 17 Schlechte Infektionsfähigkeit der T98-G-Glioblastom-Zellen in der FACS-Analyse.** Die T98-G-Zellen wurden mit verschiedenen MOI des Adenovirus Ad-GFP infiziert, 48 h nach Infektion isoliert und die Intensität des Grün-Fluoreszierenden-Proteins am Zellsortier mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) bestimmt. Sie demonstrierten selbst bei Infektion mit 100 pfu Ad-GFP eine nur sehr geringe Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins. Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.



**Abb. 18 Effektive Transduktionsfähigkeit der 257RDB-Zellen in der FACS-Analyse.** Die MDR-positiven 257RDB-Zellen wurden mit verschiedenen moi des Adenovirus Ad-GFP infiziert, 48 h nach Infektion isoliert und die Intensität des Grün-Fluoreszierenden-Proteins am Zellsorter mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) bestimmt. Sie zeigten gute Transduktionsfähigkeit. Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.

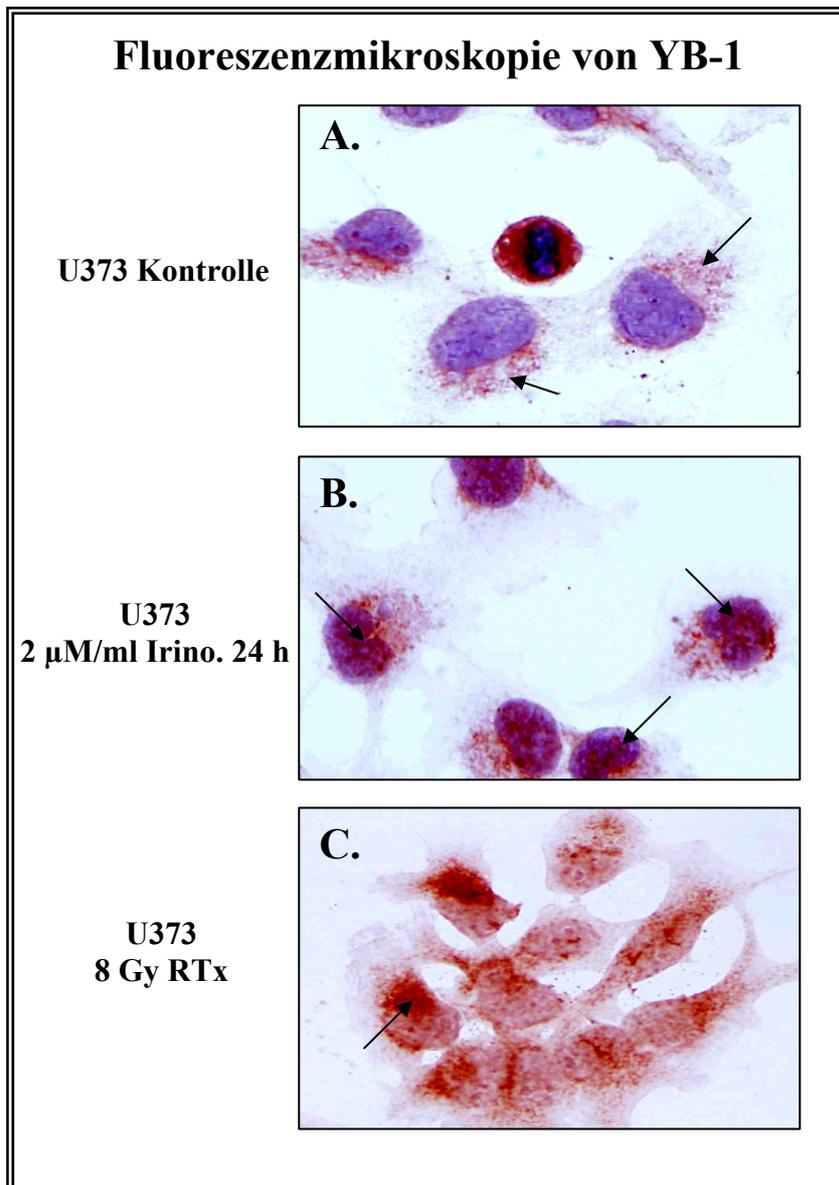
### **3.4 YB-1 Lokalisation im Kern der Glioblastom-Zellen nach Bestrahlung und Irinotecan-Inkubation**

Das Y-Box bindende Protein YB-1 liegt in adultem, normalen Gewebe in praktisch nicht nachweisbaren Mengen vor, ist jedoch in vielen Tumorzellen überexprimiert. Da gezeigt werden konnte, dass nuklear akkumuliertes YB-1 in vielfachresistenten Tumorzellen die Vermehrung von replikationsdefizienten Adenoviren vermitteln kann, war die Lokalisation von YB-1 in den Glioblastom-Zelllinien von großer Bedeutung. Seine Lokalisation wurde mittels einer Immunfluoreszenz-Analyse vor und nach Bestrahlung sowie Inkubation mit Irinotecan ermittelt.

In den Kontrollen der U373-Zellen lag eine mäßig verteilte Zytoplasmafärbung, dagegen aber eine schwächere Anfärbung des Kernes vor (Abb. 19 A). Nach Bestrahlung mit 8 Gy wurde die nukleare Lokalisation von YB-1 in den U373-Zellen stark gesteigert (Abb. 19 B). Nach Inkubation mit 2  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan für 24 h konnte die Kernlokalisation von YB-1 gesteigert werden (Abb. 19 C). Nach Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A für 24 h konnte kein Unterschied zur Kontrollzelllinie gesehen werden (nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu den Gliomzellen zeigten die vielfachresistenten 257RDB-Zellen dagegen, in denen YB-1 hauptsächlich im Zellkern vorliegt, weder nach Bestrahlung noch nach Inkubation mit Irinotecan eine signifikante Steigerung der nuklearen Lokalisation von YB-1 (nicht dargestellt).

Als nächstes sollte anhand der Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, sowie der MDR-positiven 257RDB- und der MDR-sensiblen HeLa-Zelllinien gezeigt werden, ob und wie effektiv dl520 diese Zellen lysieren konnte.



**Abb. 19 Steigerung der Kernlokalisation von YB-1 nach Bestrahlung und Irinotecan-Inkubation in den U373-Zellen.** Die unbehandelten U373-Zellen wurden 60 h nach Ausplattieren auf einem Objektträger fixiert und mittels Immunfluoreszenz-Analyse gegen YB-1 untersucht. Die Kontrollzellen zeigten eine mäßige Zytoplasmafärbung und eine moderate Kernfärbung von YB-1. Nach Bestrahlung mit 8 Gy und nach Inkubation mit 2 µM/ml Irinotecan für 24 h stieg die nukleare Lokalisation von YB-1. Sie konnte nach Inkubation mit Trichostatin A nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), Irino.: Irinotecan Gy: Gray, RTx: Bestrahlung.

### 3.5 Effektive Zelllyse der Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch dl520

In dieser CPE-Analyse (*cytopathic effect*) sollte geprüft werden, ob das E1A-13S defiziente Adenovirus dl520 die Glioblastom-Zellen lysieren konnte und in welchem Zusammenhang der Effekt von dl520 zu der Lokalisation von YB-1 stand. Zur Untersuchung der E1-Region wurden das E1A- und E1B-deletierte Adenovirus AdE1- und das E1A-deletierte Adenovirus Ad312 als Kontrollviren verwendet.

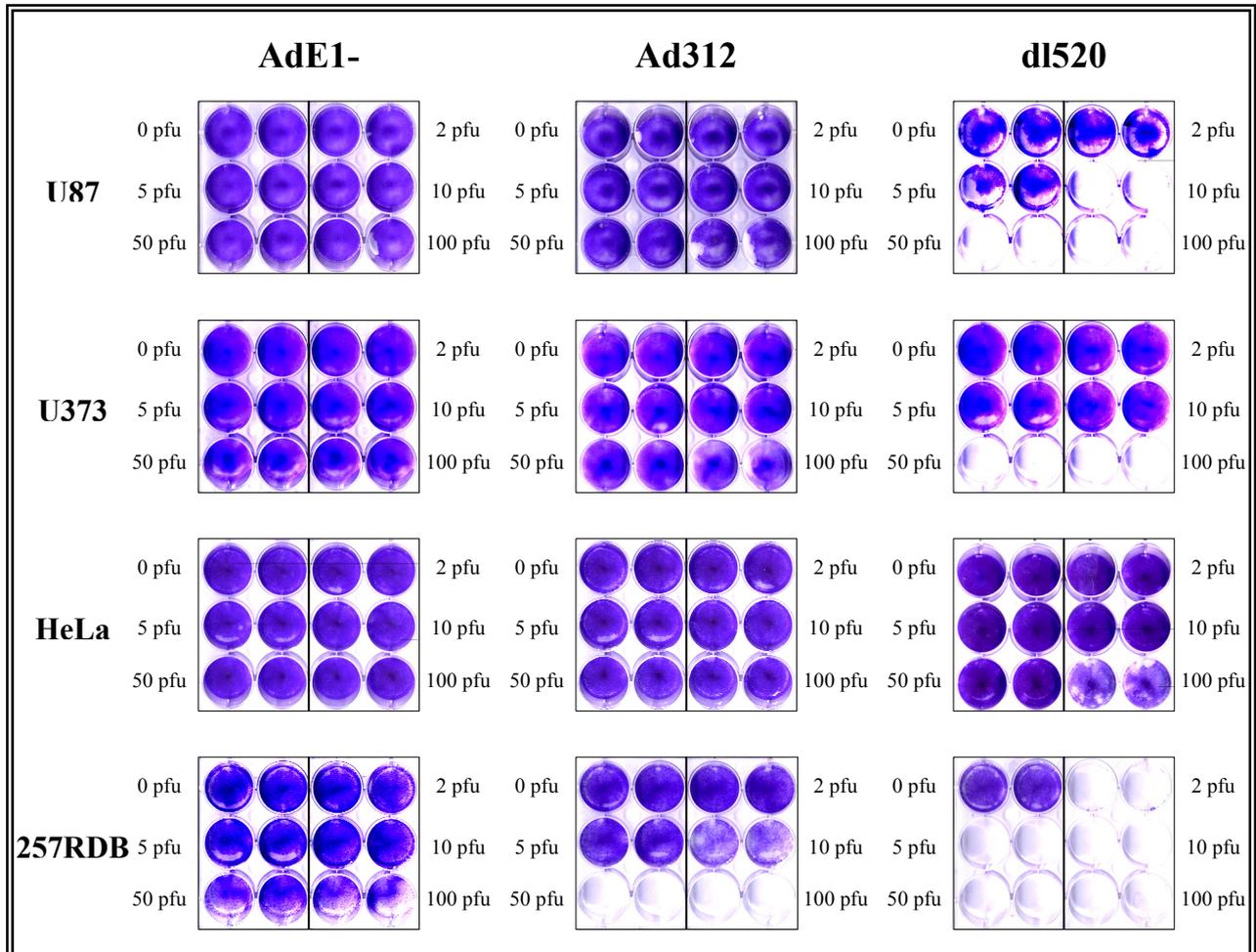
In Abbildung 20 ist zu sehen, dass bei dem maximal eingesetzten Titer von 100 pfu AdE1- keine der 4 Zelllinien 257RDB, HeLa, U87 oder U373 lysieren konnte. Ad312 dagegen konnte bei 100 pfu zwar weder HeLa-, U87- noch U373-Zellen lytisch zerstören, das E1A-deletierte Adenovirus Ad312 erzeugte aber bei 50 pfu Lyse in 257RDB-Zellen. In HeLa-Zellen konnten 100 pfu dl520 keine Lyse auslösen, jedoch lysierte dieses 13S-defiziente Virus bei 50 pfu die U373-Zellen und bei 10 pfu U87-Zellen. Die 257RDB-Zellen wurden von 50 pfu Ad312 und bereits von 2 pfu dl520 lysiert (Abb. 20).

Zur genaueren Quantifizierung des zytopathischen Effektes wurde das Kristallviolett mittels einer 0,1 % SDS in PBS Lösung gelöst, die Lichtabsorption gemessen und der prozentuale Abfall der Absorption bestimmt. Somit konnte die Abnahme der Zelldichte, die proportional zur Farbintensität der Lösung war, quantifiziert werden. Nach Infektion mit 100 pfu AdE1- sank die Farbintensität der Lösung der 257RDB-Zellen auf 60 % im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Abb. 21), so dass selbst E1-deletierte Adenoviren vielfachresistente Zellen mit ausschließlich nuklear lokalisiertem YB-1 schwach lysierten. Bei den anderen 3 Zelllinien waren keine Farbintensitätsabnahmen feststellbar.

Nach Infektion mit Ad312 sank die Farbintensität der U87-Zellen bei 50 pfu und 100 pfu um 20 %, bei den U373 erst bei 100 pfu. Bei den 257RDB-Zellen sank die Intensität nach Infektion mit 10 pfu auf 44 % und mit 50 pfu auf 3 %. Bei den HeLa-Zellen war noch kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

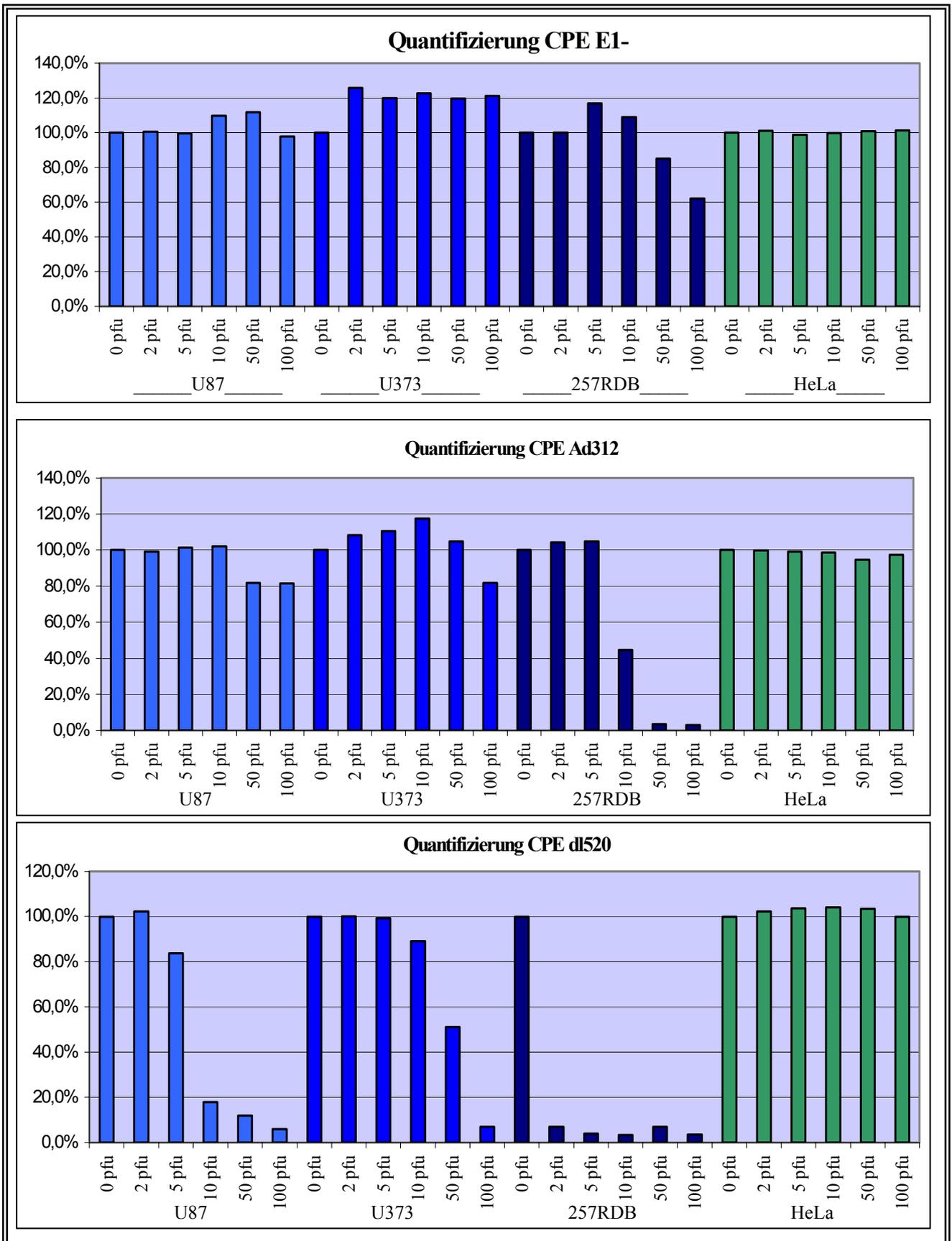
Nach Infektion mit 10 pfu dl520 ergab sich bei der Intensitätsmessung der U87-Zellen ein Abfall von 90 % (Abb. 21), obwohl die Zellen auf dem CPE-Schalenboden alle abgelöst waren (Abb. 20). Dies lag wahrscheinlich an einem Fehler im Versuchsaufbau durch verbleibendes Kristallviolett an den Rändern der Schalen. Ein ähnlicher Effekt war mit 2 pfu bei den 257RDB-Zellen zu sehen. Bei den U373-Zellen betrug die Intensität noch 51 %, obwohl alle Zellen lysiert waren, so dass hier ein technischer Fehler aufgetreten sein musste (Abb. 21). HeLa-Zellen zeigten auch nach Infektion mit dl520 keine Abnahme der Farbintensität.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass dl520 die Glioblastom-Zellen effektiv lysierte, sollte in diesen Zellen die Lysefähigkeit von dl520 auch in Kombination mit Bestrahlung und Chemotherapeutika qualitativ analysiert werden.



**Abb. 20 dl520 lysierte effektiv die Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, in denen YB-1 teilweise im Kern vorlag.** Die Zelllinien U87, U373, HeLa und 257RDB wurden mit dem E1-deletierten Adenovirus AdE1-, mit dem E1A-deletierten Ad312 und mit dem zur Expression des E1A-13S unfähigen Adenovirus dl520 infiziert und die auf dem Schalenboden verbleibenden Zellen nach 5 d mit Kristallviolett angefärbt. dl520 lysierte die Zellen am effektivsten, wobei die MDR-positiven 257RDB-Zellen, in denen YB-1 hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, die stärkste Lyse aufwiesen, gefolgt von den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, in denen eine nukleare Teillokalisierung von YB-1 vorlag. Die MDR-sensiblen HeLa-Zellen wurden nicht lysiert. Weitere Informationen siehe Text.

d: Tag(e), pfu: plaque forming unit(s).



**Abb. 21 dl520 lysierte effektiv die Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, in denen YB-1 teilweise im Kern vorliegt.** Die Zelllinien U87, U373, HeLa und 257RDB wurden mit dem E1-deletierten Adenovirus AdE1-, mit dem E1A-deletierten Ad312 und mit dem zur Expression des E1A-13S unfähigen Adenovirus dl520 infiziert und die auf dem Schalenboden verbleibenden Zellen nach 5 d mit Kristallviolett angefärbt. Zur Quantifizierung der CPE-Tests (*cytopathic effect*) wurde das Kristallviolett mittels einer 0,1 % SDS in PBS-Lösung gelöst und die Absorption bei 590 nm bestimmt. Je niedriger der Prozentsatz desto effektiver war die adenovirale Lyse. Weitere Informationen siehe Text. d: Tag(e), pfu: *plaque forming unit(s)*.

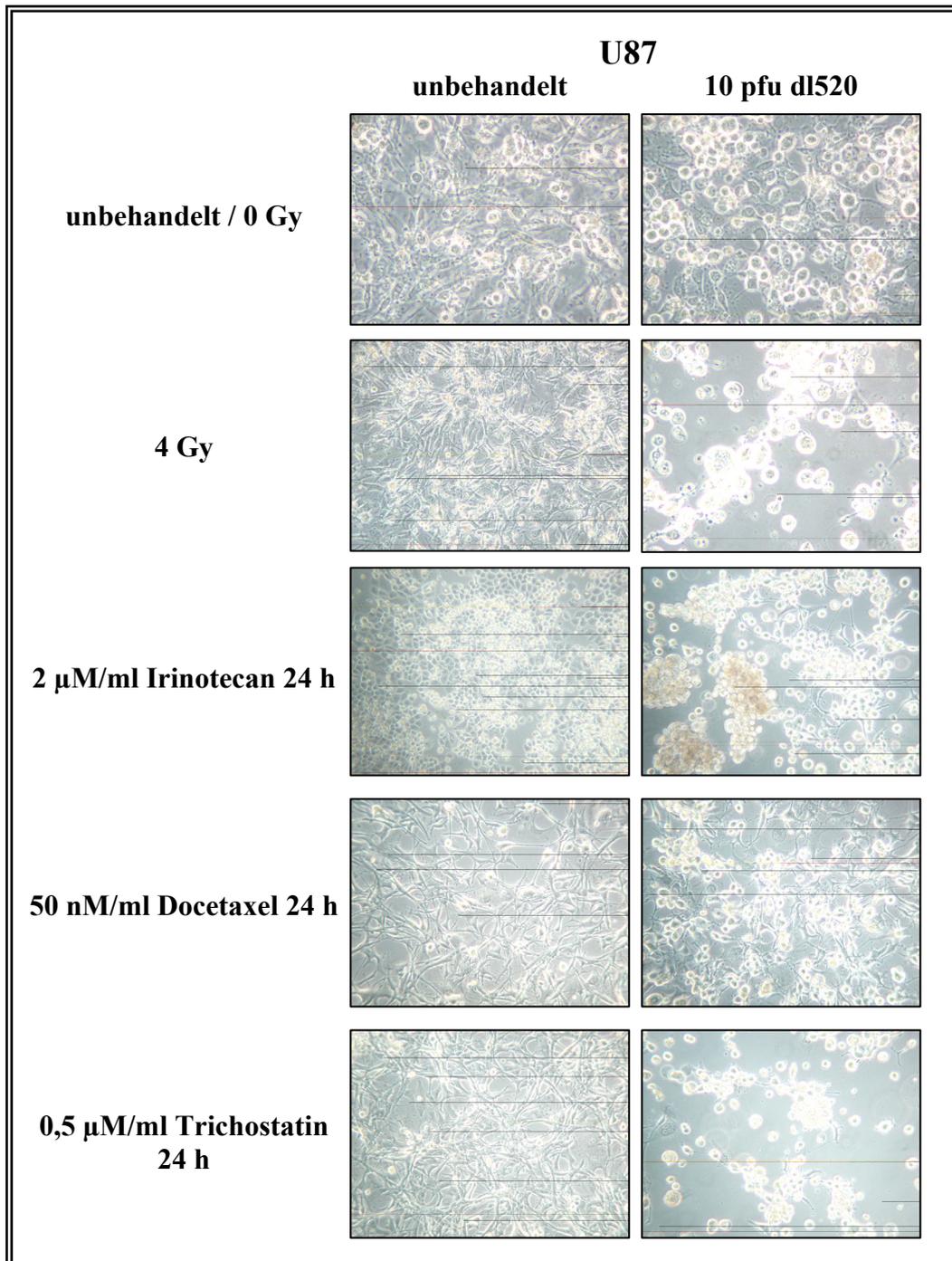
### **3.6 Erhöhung der Glioblastom-Zelllyse von dl520 durch niedrig-dosierte Bestrahlung, Chemotherapie und Trichostatin A-Behandlung**

Nachdem im CPE-Test mit den E1-deletierten Adenoviren ein zytopathischer Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen gezeigt werden konnte, sollte die Zelllyse der Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch dl520 in Kombination mit Bestrahlung bzw. Chemotherapeutika qualitativ mittels Photographie untersucht werden.

Sowohl die mit 4 Gy bestrahlten, die für 24 h mit 2 µM/ml Irinotecan, mit 2 nM/ml Docetaxel als auch mit 0,5 µM/ml Trichostatin A inkubierten U87- und U373-Zellen bildeten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen unveränderte, konfluente Zellrasen (Abb. 22, 23). Nach Infektion mit 10 pfu dl520 zeigten beide unbehandelten Glioblastom-Zelllinien einen 95 % konfluenten Zellrasen mit vereinzelt Zellen, die verstärkte Lichtbrechung aufwiesen – einem Indikator für virale Replikation.

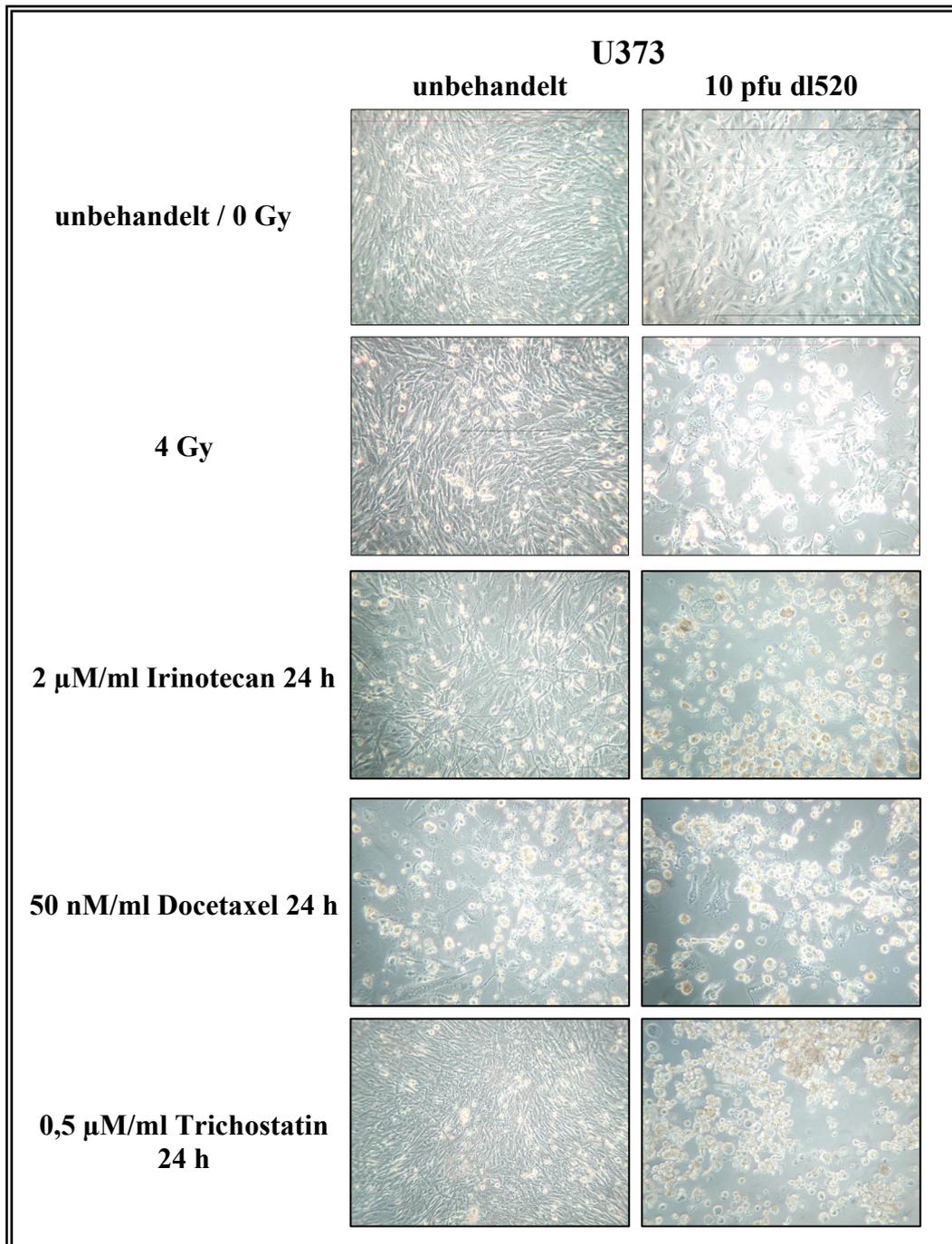
Im Vergleich dazu wiesen die mit 10 pfu infizierten und mit 4 Gy bestrahlten U87-Zellen einen verstärkten zytopathischen Effekt auf, der sich in einem fast aufgehobenen Zellrasen äußerte, welcher fast nur noch aus abgerundeten Zellen mit verstärkter Lichtbrechung bestand. Des Weiteren sind in dem Photo abgelöste, schwimmende Zellen mit verstärkter Lichtbrechung zu sehen (Abb. 22). Die mit 10 pfu infizierten und bestrahlten U373-Zellen zeigten ein vergleichbares Bild mit einem 5 - 10 % konfluent verbleibenden Zellrasen (Abb. 23).

Nachdem die Zelllyse der Glioblastom-Zellen nach Infektion mit dl520 in Kombination mit Chemotherapeutika und Bestrahlung qualitativ genauer analysiert worden ist, sollte die Transkriptionsfähigkeit von dl520 im Vergleich zum Wildtyp-Adenovirus genauer untersucht werden.



**Abb. 22 Verstärkung der Zelllyse von dl520 durch Bestrahlung, Irinotecan, Docetaxel und Trichostatin A in der Glioblastom-Zelllinie U87.** Die mit 10 pfu Adenovirus dl520 infizierten U87-Zellen zeigten verstärkte Zelllyse nach Kombination mit 4 Gy Bestrahlung und nach Inkubation mit 2 µM/ml Irinotecan, 2 nM/ml Docetaxel oder 0,5 µM/ml Trichostatin für 24 h. Die Zelllyse äußerte sich in lichtem Zellrasen und verstärkter Lichtbrechung mit Ablösung der Zellen vom Plattenboden und wurde photographisch festgehalten. Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.



**Abb. 23 Verstärkung der Zellyse von dl520 durch Bestrahlung, Irinotecan, Docetaxel und Trichostatin A in der Glioblastom-Zelllinie U373.** Die mit 10 pfu Adenovirus dl520 infizierten U373-Zellen zeigten verstärkte Zellyse nach Kombination mit 4 Gy Bestrahlung und nach Inkubation mit 2 µM/ml Irinotecan, 2 nM/ml Docetaxel oder 0,5 µM/ml Trichostatin für 24 h. Die Zellyse äußerte sich in lichtem Zellrasen und verstärkter Lichtbrechung mit Ablösung der Zellen vom Plattenboden und wurde photographisch festgehalten. Weitere Informationen siehe Text.

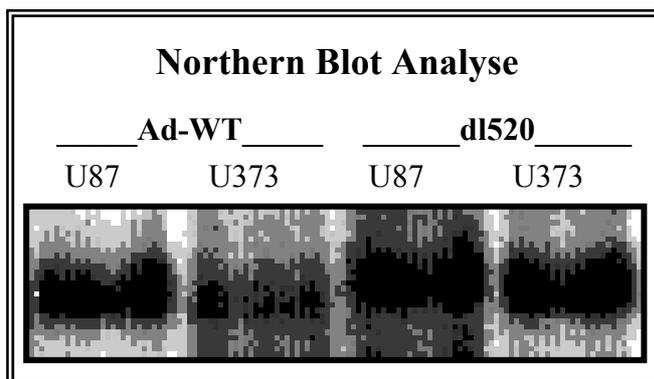
h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.

### 3.7 Vergleichbare Expression der adenoviralen *Early Genes* in den Glioblastom-Zelllinien nach Infektion mit dl520 und Ad5-WT

Um nachzuweisen, dass die Transkription – als Indikator einer abgelaufenen Replikation – von dl520 mit der vom Wildtyp-Adenovirus in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 vergleichbar war, wurde eine Northern Blot Analyse gegen E1B55K mit jeweils 50 pfu dl520 bzw. Ad5-WT durchgeführt. E1B55K und E4orf6 sind eingebunden in den YB-1 Transport vom Zytoplasma in den Kern und beide sind entscheidende Faktoren für die adenovirale Replikation und Partikelformation.

Wie in Abbildung 24 zu sehen, war die Transkription von E1B55K nach Infektion mit dl520 sowohl in den U87- als auch in den U373-Zellen genauso hoch wie nach Wildtyp-Infektion. Die gleichmäßige RNA-Menge wurde mittels EtBr-Färbung kontrolliert (nicht gezeigt).

Als nächstes sollte die Virusproduktion von dl520 mit der vom Wildtyp-Adenovirus in den Glioblastom-Zellen verglichen werden.



**Abb. 24 Vergleichbare Expression des adenoviralen E1B55K nach Infektion mit dem Adenovirus dl520 und Ad5-WT in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373.** Die mit 50 pfu dl520 bzw. Ad5-WT infizierten Glioblastom-Zellen wurden nach 48 h isoliert und eine Northern Blot Analyse mit einer Sonde gegen E1B55K durchgeführt. Beide Zelllinien zeigten eine vergleichbare Expression von E1B55K nach Infektion mit dl520 und Wildtyp. Die gleichmäßige RNA-Menge wurde mittels Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert. Weitere Informationen siehe Text.

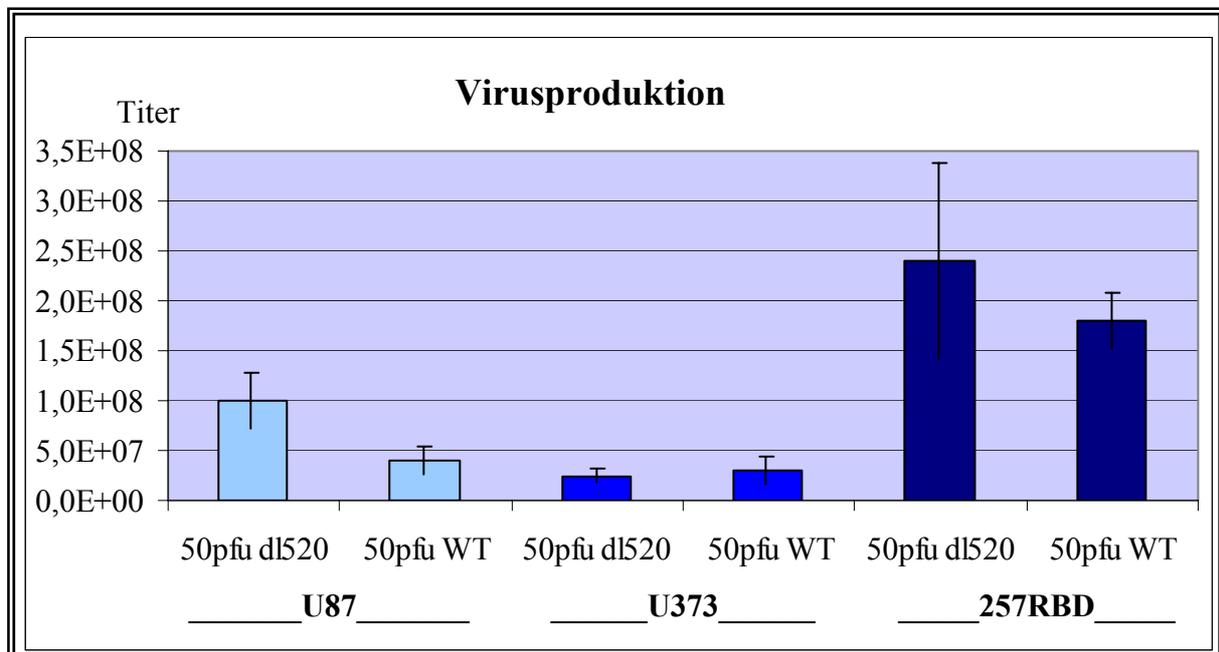
Ad-WT/Ad5-WT: Wildtyp-Adenovirus, h: Stunde(n).

### 3.8 Vergleichbare Virusproduktion von dl520 und Ad5-WT in U373, höhere Partikelbildung von dl520 in U87 und vielfachresistenten Tumorzellen

Nachdem effiziente Zelllyse von dl520 in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, in denen YB-1 zum Teil im Kern vorhanden war, und eine vergleichbare Transkription nach Infektion mit dl520 und Ad5-WT nachgewiesen werden konnte, sollte die Virusproduktion von dl520 mit der vom Wildtyp-Adenovirus verglichen werden. Hierzu wurden die Zellen mit 50 pfu des jeweiligen Virus infiziert und ein Plaque-Assay auf 293-Zellen angefertigt.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, lag in den U87-Zellen der Virusertrag von dl520 mit  $1 \times 10^8$  pfu 2,5-Mal höher als der von Ad5-WT mit  $4 \times 10^7$  pfu. In den U373-Zellen war die Virusproduktion mit  $2,5 \times 10^7$  pfu durch dl520 gegenüber  $3 \times 10^7$  pfu durch Ad5-WT fast gleich. In den 257RDB-Zellen, in denen eine hohe nukleare YB-1 Lokalisation vorliegt, war der Virusertrag nach Infektion mit dl520 mit  $4 \times 10^7$  pfu höher als nach Wildtyp-Infektion mit  $1,8 \times 10^8$  pfu. Somit ergab sich eine vergleichbare Virusproduktion von dl520 und Wildtyp-Adenovirus in den U373-Zellen und eine höhere in den U87- und den 257RDB-Zellen.

Nach der Partikelbildung sollte der zytopathische Effekt von dl520 im Vergleich zu Ad5-WT in den Glioblastom-Zellen untersucht werden.



**Abb. 25 Vergleichbare Virusproduktion von dl520 und Ad5-WT in den U373-Zellen, höhere Partikelbildung von dl520 in den U373- und 257RDB-Zellen.** Die Zelllinien U87, U373 und 257RDB sind mit 50 pfu dl520 bzw. Ad5-WT infiziert worden. Nach 72 h wurde ein Plaque-Test auf 293-Zellen von den Zellen und ihrem Überstand angefertigt. Die Virusproduktion von dl520 und Ad5-WT war in U373-Zellen fast gleich, in U87- und 257RDB-Zellen sogar höher nach Infektion mit dl520. Die Untersuchung wurde zweimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die schmalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Weitere Informationen siehe Text.

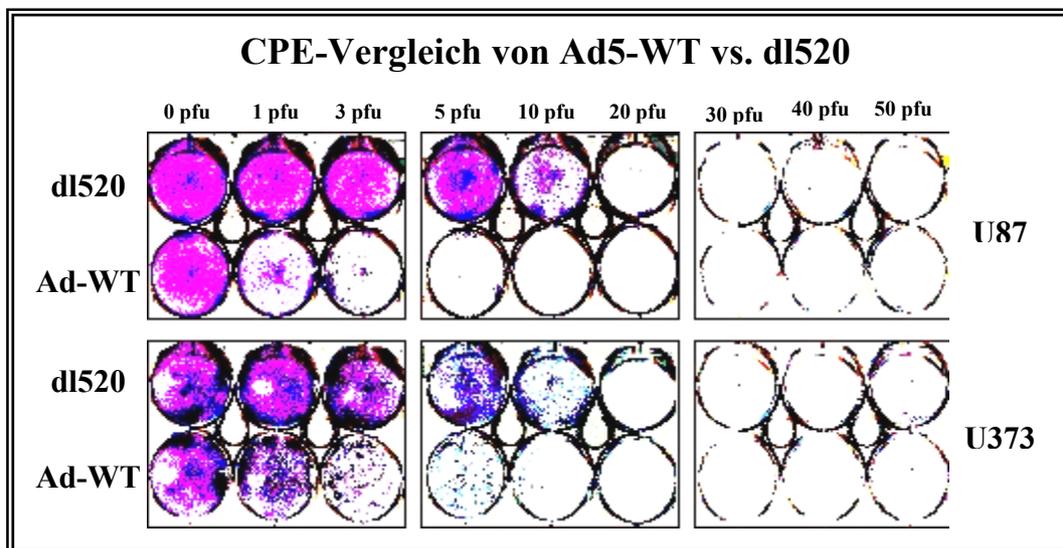
h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*, WT: Wildtyp-Adenovirus.

### 3.9 Effektive Lyse der Glioblastom-Zellen durch dl520, jedoch etwas schwächer als Zellyse durch Ad5-WT

Es konnte gezeigt werden, dass dl520 in den verwendeten Glioblastom-Zelllinien zum Teil einen höheren Virusertrag als Wildtyp-Adenovirus erzeugte. Beim Vergleich von dl520 mit Ad5-WT war jedoch auch der zytopathische Effekt von dl520 von Bedeutung. Deshalb wurde ein CPE-Test in Gegenüberstellung der beiden Viren durchgeführt.

Abbildung 26 zeigt die Kristallviolett-Färbung nach Infektion mit aufsteigenden Viruskonzentrationen von dl520 und Ad5-WT in Gegenüberstellung auf den Zelllinien U87 und U373. dl520 wies auf den U87-Zellen einen zytopathischen Effekt von 100 % bei 20 pfu und von 50 % bei 10 pfu auf. Im Gegensatz dazu lysierte Ad5-WT die Zellen bei 3 pfu zu 100 %. U373-Zellen wurden von 20 pfu dl520 zu 100 % und von 10 pfu dl520 zu 50 % lysiert. Wildtyp zeigte auf den U373-Zellen seinen zytopathischen Effekt bei 10 pfu zu 100 % und bei 5 pfu zu 50 %. Somit konnte dargestellt werden, dass dl520 – neben vielfachresistenten 257RDB-Zellen – Glioblastom-Zellen mit Teillokalisierung von YB-1 im Kern lysierte.

Als nächstes sollte die Verstärkung des onkolytischen Effektes von dl520 in den Glioblastom-Zellen in Kombination mit Bestrahlung untersucht werden.



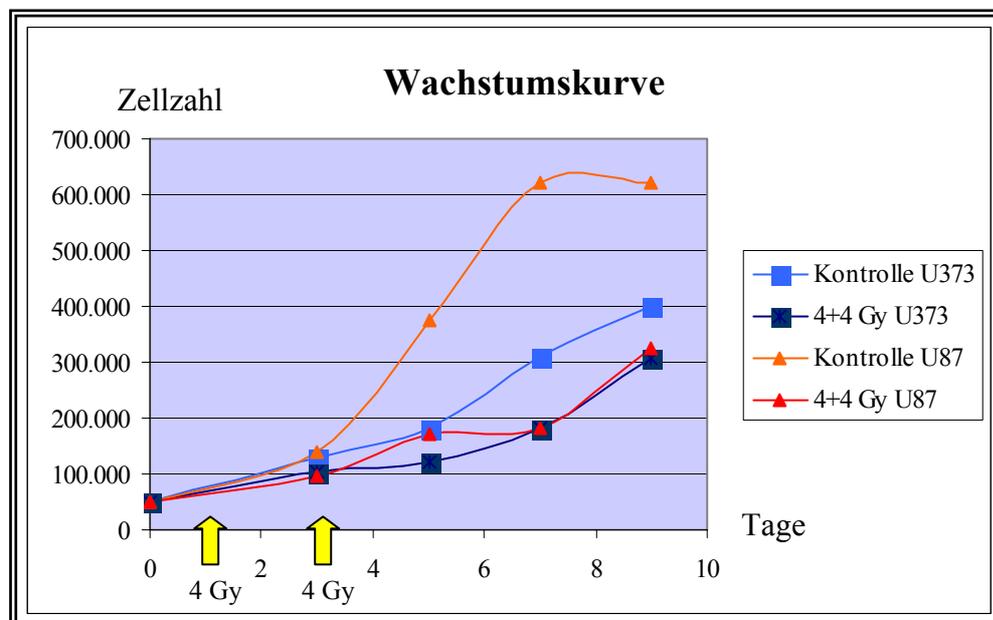
**Abb. 26 Höhere Zellyse der Glioblastom-Zellen nach Infektion mit Ad5-WT als mit dl520.** Die U87- und U373-Zellen wurden mit aufsteigenden moi des Adenovirus dl520 bzw. Wildtyp-Adenovirus infiziert. 5 d nach Infektion wurden die nicht lysierten Zellen mit Kristallviolett gefärbt und fixiert. dl520 erzielte eine effektive Lyse in den Glioblastom-Zellen U87 und U373, welche etwas schwächer als die Lyse durch Wildtyp-Adenovirus ausfiel. Weitere Informationen siehe Text.

Ad5-WT: Wildtyp-Adenovirus, CPE: *cytopathic effect*, d: Tag(e), pfu: *plaque forming unit(s)*, vs: *versus*.

### 3.10 Verbesserter onkolytischer Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch Bestrahlung

#### 3.10.1 Moderate Wachstumsinhibition der U87- und U373-Zellen durch Bestrahlung

Zuerst sollte die Strahlensensibilität der Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 analysiert werden, indem deren Zellzahl alle 2 d durch mitteln der Zellzahl aus je 2 Nöpfen einer 12-Napf-Platte bestimmt wurde. Die Zellen wurden entweder zweimal (am 1. und 3. d) mit 4 Gy oder nicht bestrahlt. Wie Abbildung 27 verdeutlicht, wiesen die unbestrahlten U87-Zellen einen S-förmigen Wachstumsverlauf auf und vermehrten sich von Tag 3 bis 7 mit der Frequenz von 100.000 Zellen pro Tag ( $\Delta=100.000/d$ ). Am siebten Tag erreichte Ihr Wachstum ein Plateau, weil sie aufgrund kompletter Zellkonfluenz des Schalenbodens nicht weiter expandieren konnten. Die mit insgesamt 8 Gy bestrahlte Vergleichsgruppe erfuhr eine mittlere Wachstumsinhibition. 4 d nach der zweiten Bestrahlungssequenz erreichte die Wachstumsinhibition ihr Maximum von 67 % und in diesem Zeitraum waren die Zellen nur mit einer Frequenz von 25.000 Zellen pro Tag gewachsen ( $\Delta=25.000/d$ ). Ab dem siebten Zähltag nahm ihr Wachstum mit der Frequenz von 50.000 Zellen pro Tag zu ( $\Delta=50.000/d$ ). Die U373-Zellen dagegen zeigten nur eine moderate



**Abb. 27 Moderate Wachstumsinhibition der U87-Zellen und mittlere Inhibition der U373-Zellen durch Bestrahlung mit 4+4 Gy.** Die U87- und U373-Zellen wurden in 12-Schalenplatten ausplattiert, an Tag 1 und 3 mit jeweils mit 4 Gy bzw. die Kontrollen nicht bestrahlt. Beide Zelllinien zeigten sich moderat strahlensensibel nach Bestrahlung mit 8 Gy. Weitere Informationen siehe Text.

Gy: Gray

Strahlensensibilität, wobei das Wachstum der bestrahlten Gruppe mit einer Latenz von 3 d nach der zweiten Bestrahlungssequenz mit der gleichen Frequenz von circa 33.000 Zellen pro Tag wuchs ( $\Delta=33.000/d$ ).

Nach Bestimmung der Wachstumsinhibition der Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung alleine, sollte der zytopathische Effekt von dl520 in Kombination mit Bestrahlung untersucht werden.

#### **3.10.2 Erhöhter zytopathischer Effekt von dl520 durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zellen**

In Abschnitt 3.5 wurde eruiert, dass dl520 in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 effizient replizierte und diese lysierte. In der folgenden Untersuchung sollte gezeigt werden, ob dieser zytopathische Effekt von dl520 durch die Kombination mit Bestrahlung verstärkt werden konnte. Hierzu wurden die ausplattierten Zellen entweder nicht, einen Tag nach Ausplattieren mit 4 Gy oder zweimal an Tag 1 und 3 mit 4 Gy bestrahlt, bevor sie 6 h später mit aufsteigenden Titern von dl520 infiziert wurden.

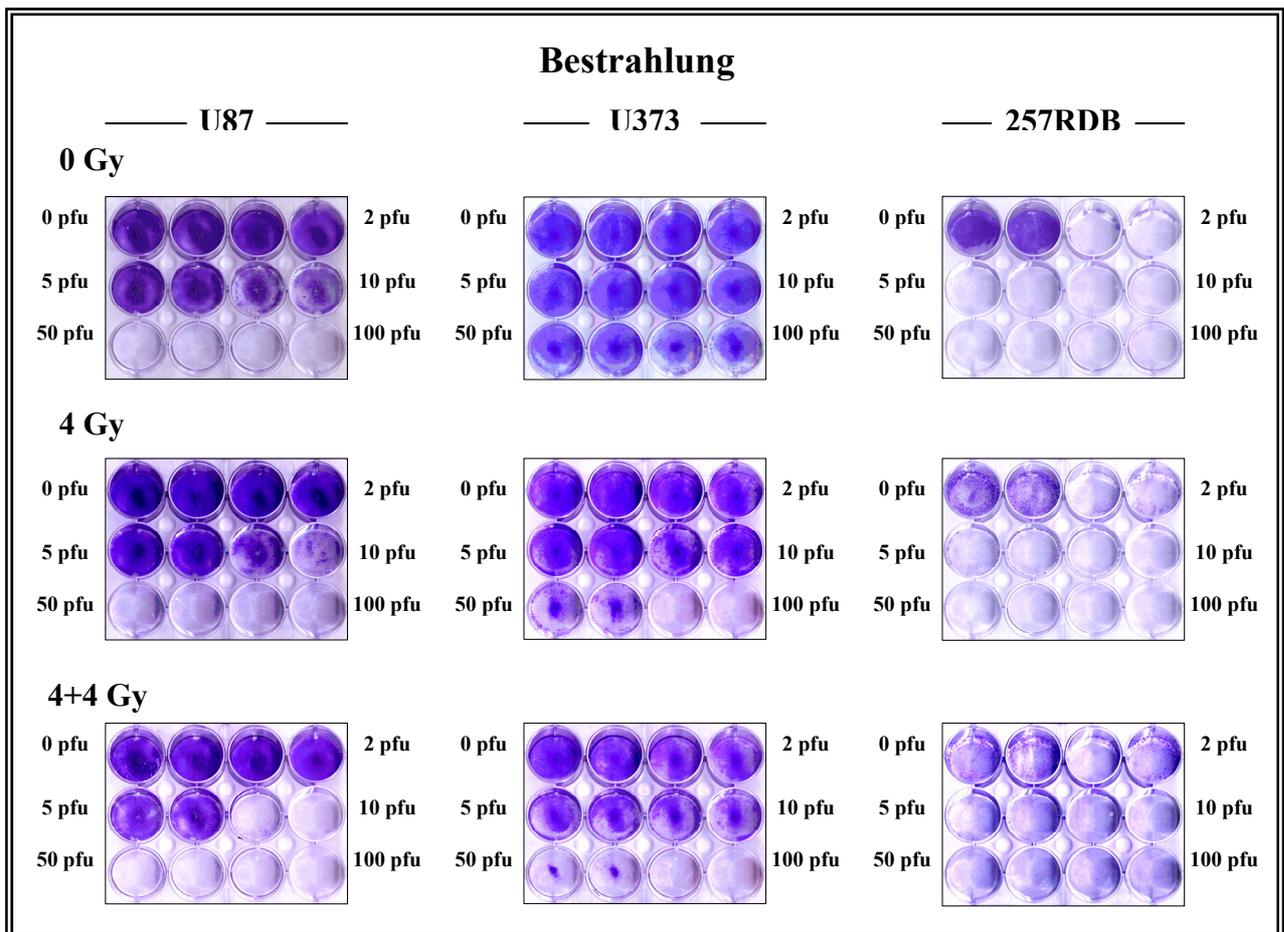
Nach Infektion mit 10 pfu dl520 hatten sich alle U87-Zellen abgerundet und vom Zellboden gelöst (Abb. 28). Nach Bestrahlung mit 4 Gy reagierten 30 - 40 % der U87-Zellen nach Infektion mit 5 pfu dl520 mit einem zytopathischen Effekt, und nach Bestrahlung mit 8 Gy lysierten 5 pfu dl520 den ganzen Zellrasen. Die nicht infizierten Kontrollen wuchsen trotz Bestrahlung mit 8 Gy zu einem konfluenten Zellrasen.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, konnte in den U373-Zellen ohne Bestrahlung nach Infektion mit 20 pfu dl520 noch keine Zelllyse festgestellt werden. Nach Bestrahlung mit 4 Gy wurde der Zellrasen von 20 pfu dl520 komplett lysiert und selbst 10 pfu dl520 erzielten 50 % Lyse in U373-Zellen. Viele Zellen waren abgerundet, zeigten verstärkte Lichtbrechung und hatten sich vom Zellboden gelöst. Die Abrundung und verstärkte Lichtbrechung waren Zeichen des Zelltodes. Die mit 8 Gy bestrahlten Zellen waren bis auf die Schalenmitte, in der die Zellen überkonfluent gewachsen waren und das Virus die Zellen in der Zeit nicht erreichen konnte, nach Infektion mit 5 pfu dl520 komplett lysiert worden. Die nicht infizierten Kontrollen wurden von der Bestrahlung nicht beeinflusst und ergaben einen dichten Zellrasen.

Nach Infektion mit 1 pfu dl520 gingen die vielfachresistenten 257RDB-Zellen bereits ohne Bestrahlung komplett in Lyse. Die Lysefähigkeit von dl520 wurde durch Bestrahlung nicht mehr gesteigert. 257RDB-Magenkarzinom-Zellen stellten sich jedoch als

strahlensensibel heraus, so dass die nicht infizierte Kontrolle nach Bestrahlung mit 8 Gy auf wenige Zellen ausgedünnt wurde, die in Abbildung 28 nicht mehr zu sehen waren.

Nachdem eine verbesserte Zellyse von dl520 in Kombination mit Bestrahlung festgestellt wurde, sollte eruiert werden, inwieweit Bestrahlung die virale Replikation von dl520 beeinflusste.



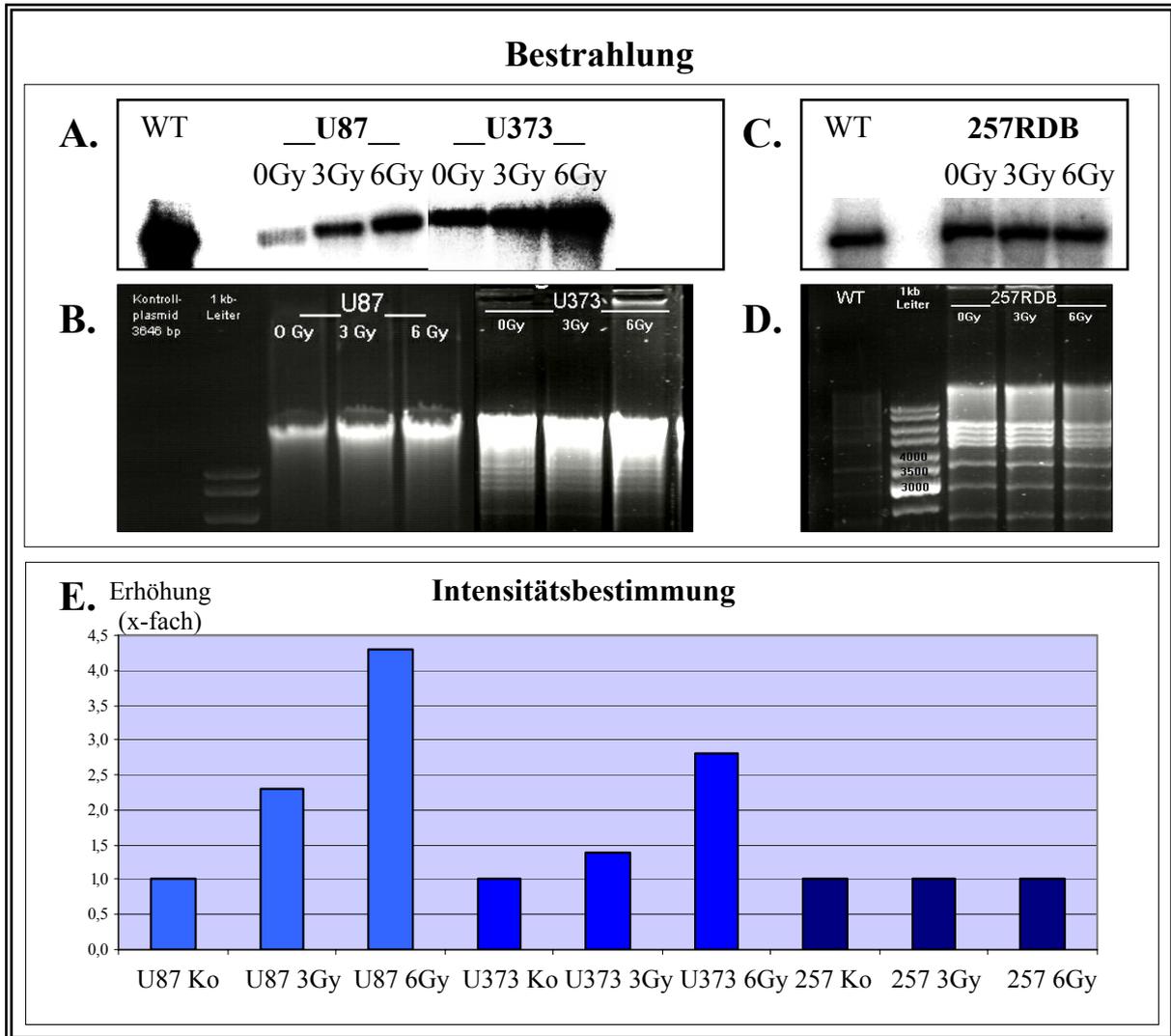
**Abb. 28 Verbesserter zytopathischer Effekt von dl520 nach Bestrahlung in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373.** Die U87-, U373- und 257RDB-Zelllinien wurden mit 0, 4 oder 4+4 Gy bestrahlt, bevor sie mit verschiedenen moi des Adenovirus dl520 infiziert wurden. 5 d nach Infektion wurden die nicht lysierten Zellen mit Kristallviolett gefärbt und fixiert. Durch Bestrahlung wurde der onkolytische Effekt von dl520 in den Zelllinien U87 und U373 erhöht. Weitere Informationen siehe Text.  
d: Tag(e), Gy: Gray, pfu: *plaque forming unit(s)*.

### 3.10.3 Erhöhte Replikation von dl520 durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zellen

Zur Untersuchung der Replikation von dl520 in Kombination mit Bestrahlung wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Die Zellen sind 1 h vor Infektion mit dl520 mit 0, 3 oder 6 Gy bestrahlt worden. Mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* wurde aus der isolierten DNA ein 3646 bp-großes Fragment verdaut, welches die virale E2-Region enthielt. Die E2-Region des Adenovirus transkribiert für die virale DNA-Polymerase, wird mit den anderen frühen Genen eingeschaltet und ist somit ein Indikator für erfolgte Replikation.

Abbildung 29 B zeigt das Agarosegel der Glioblastom-Zelllinien. Die oberen im Gel erscheinenden DNA-Signale verdeutlichten, dass sowohl von den U87- als auch von den U373-Zellproben die gleiche DNA-Menge aufgetragen wurde. Unterhalb der intensiven oberen Signale erschienen schwache Signale in den Bahnen der U373-Zelllinie, welche den viralen, von *KpnI* geschnittenen DNA-Fragmenten entsprachen. Die Southern Blot Analyse in Abbildung 29 A belegte eine Verstärkung der E2-Signale nach Bestrahlung mit 3 und 6 Gy. Die Signalintensität in den Agarosegelen und den Southern Blots wurde bestimmt und, falls zu viel oder zu wenig DNA auf die Gele aufgetragen worden war, wurden die Southern Blot Signale in faktorielle Ergebnisse umgerechnet. Bei den U87-Zellen ergab sich eine 2,3-fache Verstärkung des E2-Signales nach Bestrahlung mit 3 Gy und eine 4,3-fache Verstärkung nach Bestrahlung mit 6 Gy. In den U373-Zellen zeigte sich ein 1,4-fach stärkeres Signal mit 3 Gy Bestrahlung und ein 2,8-fach verstärktes Signal mit 6 Gy Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 29 E). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich eine Southern Blot Analyse von 257RDB-Zellen angefertigt. Von den 3 Proben – 0, 3 und 6 Gy – wurde die gleiche DNA-Menge aufgetragen und die geschnittenen, viralen DNA-Fragmente waren in allen 3 Proben zu erkennen (Abb. 29 D). Weder mit 3 noch mit 6 Gy Bestrahlung konnte das *E2late*-Signal und damit die Replikation verstärkt werden (Abb. 29 C, E).

Nachdem erfolgreich nachgewiesen werden konnte, dass die Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung erhöht wurde, sollte die Virusproduktion von dl520 in Kombination mit Bestrahlung analysiert werden.



**Abb. 29 Verstärkung der Replikation von dl520 durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zelllinien.** U87-, U373- und 257RDB-Zellen wurden mit 0, 3 oder 6 Gy bestrahlt, bevor sie 6 h später mit 5 pfu dl520 infiziert wurden. Die Hybridisierung mit der E2late-Sonde zeigte eine Erhöhung der Replikation durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 (A) jedoch nicht in den MDR-positiven 257RDB-Zellen (C). Abb. B und D zeigen die zugehörigen Agarosegele. Abb. E stellt die Intensitätserhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle dar. Die Signalintensität der Kontrollzellen wurde jeweils gleich 1 festgelegt und die Signalverstärkung im Vergleich zur Kontrolle x-fach bestimmt. Weitere Informationen siehe Text.  
Gy: Gray, h: Stunde(n), kb: kilo base(s), Ko.: Kontrolle, bp: base pair(s), WT: Wildtyp.

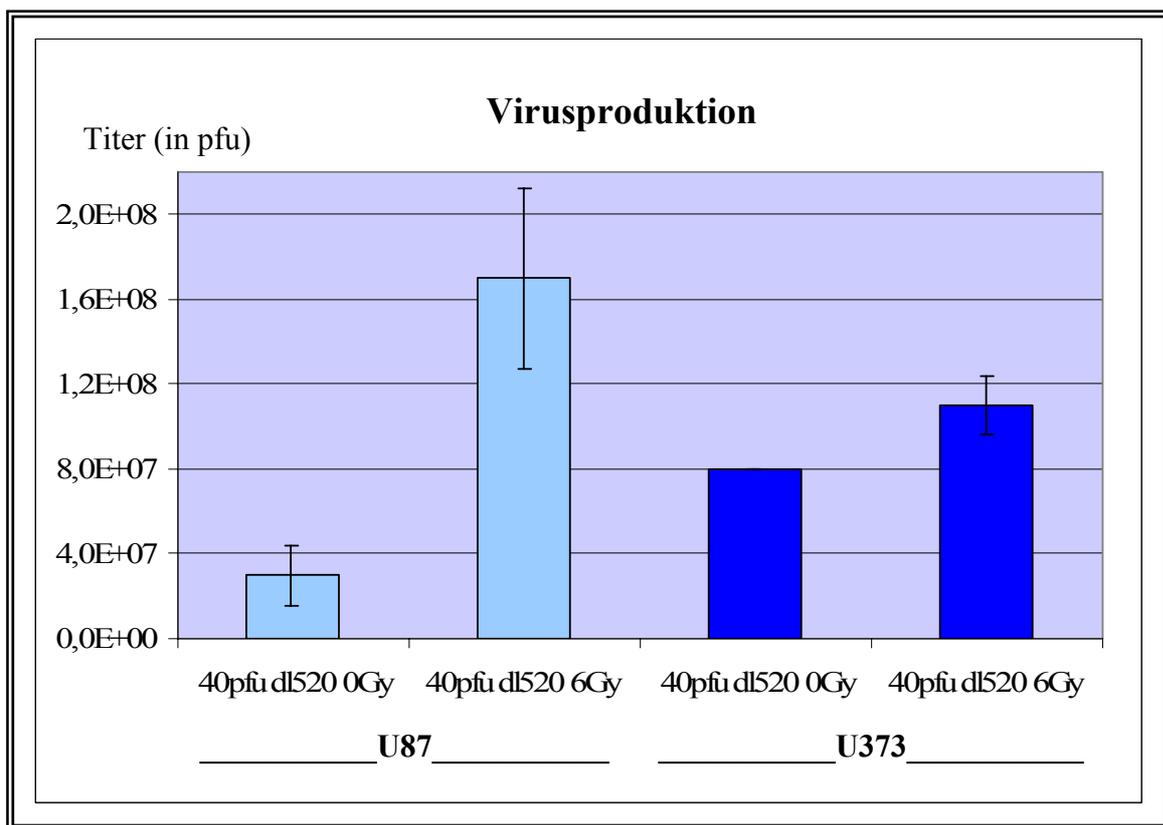
### 3.10.4 Erhöhung der Virusproduktion von dl520 nach Bestrahlung in den Glioblastom-Zellen

Nach Beobachtung der Erhöhung des zytopathischen Effektes durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zelllinien war als nächstes die Verstärkung der Replikation durch Bestrahlung untersucht worden. Weiterhin war zu analysieren, ob Bestrahlung die Virusproduktion von dl520 in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 erhöht. Hierzu wurden die Zellen erst mit 0 oder 6 Gy bestrahlt, mit 40 pfu dl520 infiziert und 72 h später

von der Medium-Zellsuspension ein Plaquetest auf 293-Zellen angefertigt. Selbst E1-deletierte Adenoviren können in 293-Zellen replizieren, weil E1A und E1B in deren Genom integriert ist.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, erbrachte dl520 in den U87-Zellen ohne Bestrahlung nach Infektion mit 40 pfu einen Virusertrag von  $3 \times 10^7$  pfu. Nach Bestrahlung mit 6 Gy konnte dieser Ertrag fast 6-fach auf  $1,7 \times 10^8$  pfu erhöht werden. In den U373-Zellen betrug der Virusertrag von 40 pfu dl520 ohne Bestrahlung mit  $8 \times 10^7$  pfu etwas mehr als in den U87-Zellen. Er konnte durch Bestrahlung mit 6 Gy um  $\frac{1}{3}$  auf  $1,1 \times 10^8$  erhöht werden. Somit wurde die virale Partikelbildung von dl520 in beiden Glioblastom-Zelllinien durch Bestrahlung erhöht.

Als nächstes sollte neben der Verbesserung der Virusproduktion untersucht werden, ob Bestrahlung auch die virale Freisetzung von dl520 aus den Glioblastom-Zellen erhöhte.



**Abb. 30 Erhöhung der Virusproduktion von dl520 durch Bestrahlung.** Die Zelllinien U87 und U373 sind mit 0 oder 6 Gy bestrahlt worden, bevor sie mit 40 pfu dl520 infiziert wurden. Nach 72 h wurde ein Plaquetest auf 293-Zellen von den Zellen und ihrem Überstand angefertigt. Die Virusproduktion wurde in beiden Glioblastom-Zelllinien durch Bestrahlung erhöht. Die Untersuchung wurde zweimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die schmalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Weitere Informationen siehe Text.

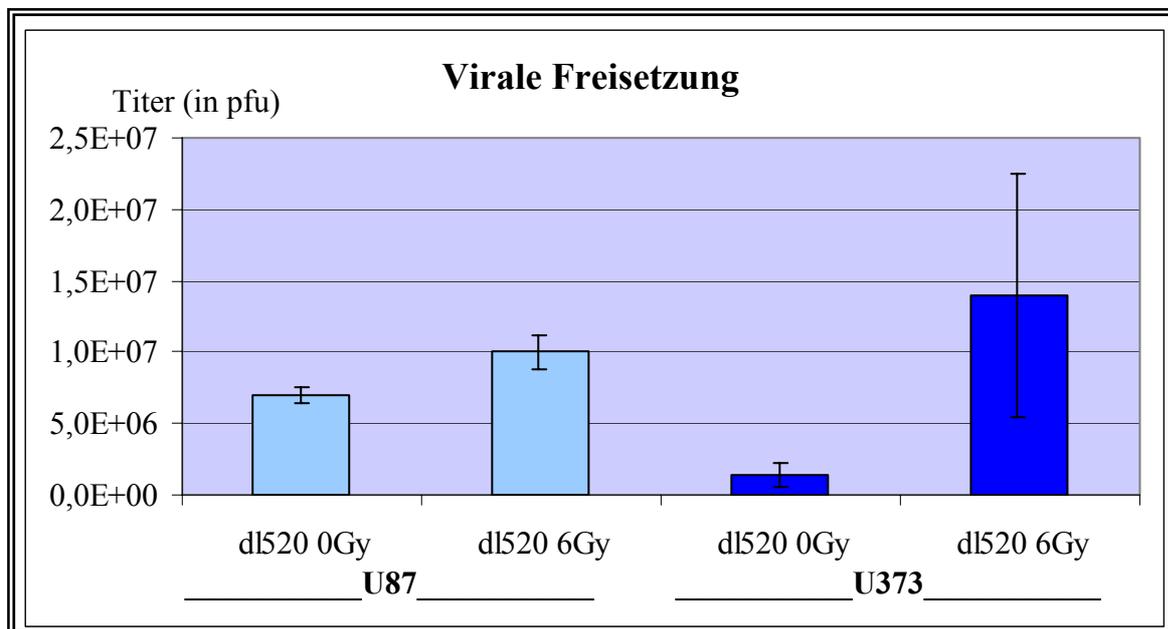
d: Tag(e), h: Stunde(n), Gy: Gray, pfu: plaque forming unit(s).

### 3.10.5 Erhöhung der viralen Freisetzung von dl520 aus den Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung

Nachdem eine Erhöhung der Gesamtvirusproduktion in den Glioblastom-Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte analysiert werden, ob auch die virale Freisetzung aus der Zelle durch Bestrahlung erhöht wird. Hierzu wurden U87- und U373-Zellen 3 d nach dl520 Infektion mit 0 oder 6 Gy bestrahlt und von dem Mediumüberstand ein Plaquetest auf 293-Zellen durchgeführt.

Die virale Freisetzung von dl520 konnte sowohl aus U87- als auch aus U373-Zellen erhöht werden (Abb. 31). In den U87-Zellen setzte dl520 ohne Bestrahlung  $7 \times 10^6$  pfu frei, nach Bestrahlung mit 6 Gy erhöhte sich die freigesetzte Virusmenge um  $\frac{1}{3}$  auf  $1 \times 10^7$  pfu. In U373-Zellen steigerte sich die virale Freisetzung sogar von  $1,4 \times 10^6$  pfu 10-fach auf  $1,4 \times 10^7$  pfu.

Nach Untersuchung der Eigenschaften von dl520 in Kombination mit Bestrahlung *in vitro*, sollte das Therapiemodell des onkolytischen Adenovirus dl520 in Kombination mit Bestrahlung *in vivo* umgesetzt und untersucht werden.



**Abb. 31 Erhöhung der Virusfreisetzung von dl520 aus den Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung.** Die U87- und U373-Zellen wurden mit 5 pfu des Adenovirus dl520 infiziert und 3 d nach Infektion mit 0 bzw. 6 Gy bestrahlt. Von dem nach insgesamt 5 d isolierten Überstand wurde ein Plaquetest auf 293-Zellen angefertigt. Die virale Freisetzung von dl520 wurde in beiden Zelllinien durch Bestrahlung mit 6 Gy erhöht. Die Untersuchung wurde zweimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die schmalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Weitere Informationen siehe Text.  
d: Tag(e), Gy: Gray, h: Stunde(n), pfu: plaque forming unit(s).

### 3.10.6 Hemmung des Wachstums von subkutanen U87-Tumoren im *in vivo* Xenograft-Modell der Maus durch dl520

*In vitro* konnte die Verstärkung der Replikation von dl520, des viralen Ertrages und der viralen Freisetzung, nach Bestrahlung am Glioblastom-Modell nachgewiesen werden. Nun wurde aus den Erkenntnissen ein Therapiekonzept entwickelt, in dem am 1., 4. und 7. d U87-Tumoren mit jeweils 4 Gy bestrahlt und am 2. und 5. d jeweils  $5 \times 10^8$  pfu dl520 intratumoral appliziert wurden. Hierzu wurden weiblichen nu/nu Nacktmäusen  $5 \times 10^6$  U87-Zellen in die linke Flanke injiziert und die angewachsenen Tumoren bei einer Größe von 150 - 200 mm<sup>3</sup> therapiert. Die Versuchsgruppen wurden entweder mit kombinierter Radiovirotherapie („RTx + Virus“) behandelt, wie oben beschrieben, erhielten nur dl520 („Virus“) an Tag 2 und 5, wurden nur bestrahlt („RTx alleine“) an Tag 1, 4, und 7 oder blieben untherapiert („Kontrolle“). Die untherapierte Kontroll- und die Bestrahlungsgruppe bekamen parallel zur viralen Applikation, das gleiche Volumen Kochsalzlösung (PBS) intratumoral injiziert.

Die Tumoren wuchsen extrem schnell an, so dass die Therapieschemata schon nach 2 Wochen begonnen wurden. Die Tumoren sind nicht in allen Tieren angewachsen oder sind in Einzelfällen zu langsam gewachsen, so dass von den insgesamt 40 Mäusen die Gruppen „RTx alleine“ und „RTx + Virus“ jeweils 9 Tiere enthielten. Die mit „Virus alleine“ behandelte Gruppe bestand aus 8 und die Kontrollgruppe aus 7 Tieren. Zusätzlich war eine Maus von Anfang an anorektisch und anämisch, so dass dieser kein Tumor inokuliert wurde.

Die Tumorgrößen unterlagen in allen 4 Therapiegruppen einer starken Schwankungsbreite. Somit ergab sich auch an allen Messtagen in allen Tumorgruppen eine sehr breite Standardabweichung (Abb. 32). Wie in der Graphik in Abb. 33 B und in der Tabelle in Abb. 33 C dargestellt, lag ein signifikanter Unterschied der 3 therapierten Gruppen zur Kontrollgruppe vor, jedoch nur ein minimaler Unterschied zwischen den Gruppen Bestrahlung alleine, Virus alleine und der Kombination aus Bestrahlung + Virus. Am 22. d war das Wachstum der mit der Kombination therapierten Gruppe um 6 % stärker inhibiert worden als in den Gruppen mit Virus oder mit Bestrahlung alleine (Abb. 32, 33 B). Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde das Wachstum durch die Kombinationstherapie um 55,2 % inhibiert, durch Bestrahlung alleine um 48,1 % und durch Virus alleine um 48,9 % (Abb. 32, 33 B).

Die Berechnung des Kruskal-Wallis-Tests, einem nichtparametrischen Test für mehr als 2 Gruppen bei quantitativen Merkmalen, ergab einen p-Wert  $\leq 0,05$  zwischen Tag 3 bis 13

und somit einen signifikanten Unterschied an diesen Tagen bei Betrachtung aller Gruppen (Abb. 33 C). Der signifikante Unterschied ergab sich jedoch aus der Größendifferenz der Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen. Denn der Vergleich der Einzelgruppen miteinander durch Bestimmung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ) zwischen den Gruppen mit „Virus alleine“, mit „Bestrahlung alleine“ und mit „Virus + Bestrahlung“ (Abb. 33 C).

Der fehlende signifikante Unterschied zwischen der Kombinationstherapie und der Therapie mit „Virus alleine“ resultierte möglicherweise aus einem Tumor in der Virusgruppe, der eine Totalremission gezeigt hatte. Zusätzlich könnte ein weiterer Grund für den fehlenden signifikanten Unterschied zwischen der Kombinationstherapie und der mit „Bestrahlung alleine“ therapierten Gruppe daran liegen, dass die nur mit Bestrahlung therapierten Tumoren wesentlich stärker im Wachstum inhibiert wurden, als es nach den Vorversuchen und den Ergebnissen aus der Literatur zu erwarten gewesen wäre. Des Weiteren hätte möglicherweise ein kürzerer Abstand zwischen Bestrahlung und Virusinjektion – 1 h anstatt 1 d vorher – gewählt werden sollen. Koike et al. konnten nämlich nachweisen, dass kurz nach Bestrahlung die nukleare Erhöhung des Y-Box bindenden Proteins am größten ist<sup>126</sup>.

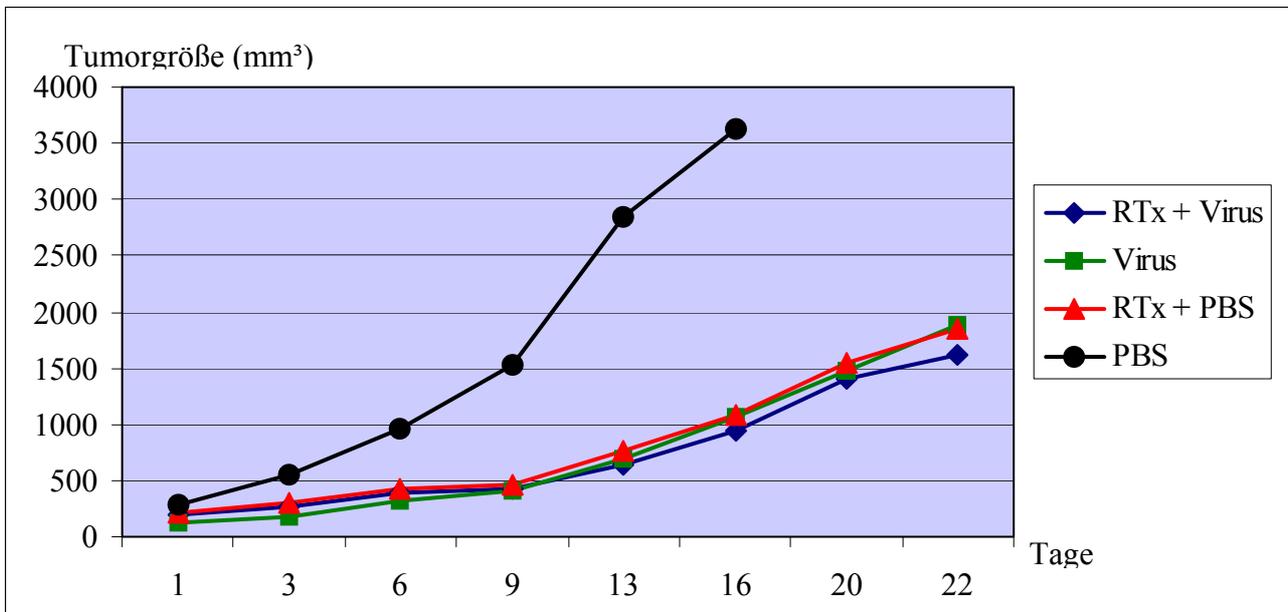
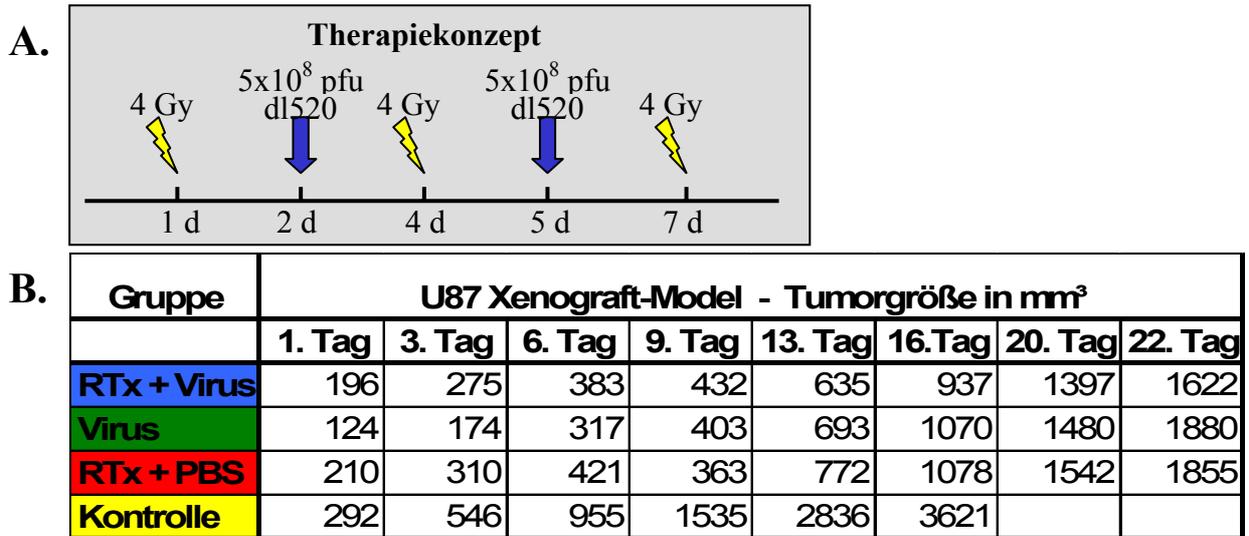
Nichtsdestotrotz konnte in diesem Tierversuch ein onkolytischer Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen U87 *in vivo* im Vergleich zur den unbehandelten Tumoren nachgewiesen werden. Um die Kombinationstherapie aus dl520 und Bestrahlung im Glioblastom-Modell näher zu untersuchen, sollte als nächstes ein weiteres Xenograft-Modell mit den U373-Zellen durchgeführt werden.

<b>Xenograft-Modell mit subkutanen U87-Tumoren</b>				
<b>Gruppe</b>	<b>Mittelwerte in mm<sup>3</sup></b>	<b>Standard- abweichung s</b>	<b>Relation zum Therapiebeginn</b>	<b>Wachstumsinhibition im Vergl. zur Kontrolle</b>
<b>Bestrahlung + dl520 (RTx + Virus)</b>				
1d	196	48	1,0	
3d	275	87	1,4	49,7%
6d	383	143	2,0	59,9%
9d	432	140	2,2	71,8%
13d	635	225	3,2	77,6%
16d	937	514	4,8	74,1%
20d	1397	710	7,1	61,4%
22d	1622	734	8,3	55,2%
<b>dl520 (Virus)</b>				
1d	124	18	1,0	
3d	174	64	1,4	68,1%
6d	317	265	2,6	66,8%
9d	403	296	3,3	73,8%
13d	693	540	5,6	75,5%
16d	1070	677	8,7	70,5%
20d	1480	829	12,0	59,1%
22d	1880	1206	15,2	48,1%
<b>Bestrahlung (RTx + PBS)</b>				
1d	201	58	1,0	
3d	294	185	1,5	46,2%
6d	395	352	2,0	58,6%
9d	439	347	2,2	71,4%
13d	736	657	3,7	74,0%
16d	1047	896	5,2	71,1%
20d	1555	876	7,7	57,1%
22d	1851	1046	9,2	48,9%
<b>Kontrolle (PBS)</b>				
1d	292	116	1,0	
3d	546	263	1,9	
6d	955	424	3,3	
9d	1535	677	5,3	
13d	2836	1237	9,7	
16d	3621		12,4	
20d				
22d				

Abb. 32 Wachstumsinhibition der subkutanen U87-Tumoren im *in vivo* Xenograft-Modell durch dl520, Bestrahlung und die Kombination aus dl520 und Bestrahlung. Die 4 Therapiegruppen des U87-Tiermodells – Kontrolle (PBS), 12 Gy Bestrahlung (RTx + PBS),  $1 \times 10^9$  pfu dl520 (Virus) und 12 Gy Bestrahlung plus  $1 \times 10^9$  pfu dl520 (RTx+Virus) – wurden von Tag 1 bis 22 (1 d – 22 d) verfolgt und die Einzelgrößenwerte der subkutanen U87-Tumoren gemessen. Von den 8 - 9 Einzelwerten jeder Gruppe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (s), die Größenrelation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle der Therapiegruppe und die prozentuale Wachstumsinhibition in Prozent jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Tages errechnet und tabellarisch dargestellt. Weitere Informationen siehe Text.

d: Tag(e), pfu: plaque forming unit(s), Vergl.: Vergleich.

### Xenograft-Modell mit dl520 in subkutanen U87-Tumoren



**C. Test**

Test	Gruppen	p-Werte	Tage							
			1d	3d	6d	9d	13d	16d	20d	22d
Kruskal-Wallis-Test		Asymp. Sig. (2-tailed)	0,186	0,039	0,005	0,004	0,003	0,117	0,938	0,959
Mann-Whitney-Test	1 mit 2	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,210	0,042	0,003	0,002	0,001	0,200		
	1 mit 3	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,000	0,001	0,002	0,001	0,006	0,222		
	1 mit 4	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,142	0,031	0,003	0,000	0,000	0,200		
	2 mit 3	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,001	0,036	0,673	0,963	0,743	0,673	0,837	0,797
	2 mit 4	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,931	0,666	0,436	0,387	0,730	0,863	0,863	0,918
	3 mit 4	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,001	0,021	0,236	0,606	0,888	0,673	0,758	0,876

**Abb. 33** Wachstumsinhibition der subkutanen *in vivo* U87-Tumoren durch dl520, Bestrahlung und die Kombination aus dl520 und Bestrahlung, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 genannten Therapien untereinander. A zeigt das im U87-Xenograft-Modell angewandte Therapiekonzept. B stellt die Mittelwerte der Tumorgößen in mm<sup>3</sup> tabellarisch und graphisch dar. C enthält die p-Werte der Kruskal-Wallis-Tests und des Mann-Whitney-Tests. Die grau markierten p-Werte waren statistisch signifikant. Der Unterschied der Wachstumsinhibition der mit dem Adenovirus dl520 alleine, mit Bestrahlung alleine und der Kombination aus RTx + dl520 therapierten Tumoren war im Vergleich zu den nicht therapierten Kontrolltumoren signifikant, jedoch nicht untereinander. Weitere Informationen siehe Text. d: Tag(e), Gy: Gray, pfu: plaque forming unit(s), RTx: Bestrahlung, PBS: Kontrollgruppe.

### **3.10.7 *Proof of Principle* der verbesserten Wachstumsinhibition durch die Kombination aus dl520 mit Bestrahlung im *in vivo* Xenograft-Modell mit U373-Tumoren**

Das in Abschnitt 3.10.6 beschriebene Therapiekonzept wurde im Xenograft-Modell der Maus mit subkutanen U373-Tumoren wiederholt. Das Bestrahlungsregime wurde verändert, indem die Einzelbestrahlungsdosis auf 2 Gy gesenkt wurde, so dass diesen Tumoren eine Gesamtdosis von 6 Gy zugeführt worden ist. Um ein effizienteres Ergebnis erzielen zu können, wurde der zeitliche Abstand zwischen Bestrahlung und nachfolgender Virusapplikation auf 1 h reduziert, weil die Erhöhung von YB-1 durch die Bestrahlung kurz nach der Bestrahlung am größten ist<sup>126</sup>. Somit wurden die Tumoren an Tag 1, 3 und 5 der Therapie mit 2 Gy bestrahlt und jeweils 1 h nach der Bestrahlung  $3 \times 10^8$  pfu dl520 bzw. Kochsalzlösung intratumoral appliziert (Abb. 35 A).

Leider waren von den 32 Mäusen, denen U373-Tumorzellen subkutan appliziert worden sind, nicht alle Tumoren angewachsen, so dass in die einzelnen Therapiegruppen nur zwischen 2 bis 5 Tiere aufgenommen werden konnten. Eine Übersicht der Mittelwerte der Tumorgrößen von jeder Gruppe und der Standardabweichung ist in Abbildung 34 zu sehen. In der Kontrollgruppe waren die Tumoren zum Teil sehr schnell gewachsen, so dass die Tiere geopfert werden mussten.

Die Tumorgrößen der einzelnen Tiere unterlagen in allen Therapiegruppen mit Ausnahme der Kombinationstherapie-Gruppe einer sehr breiten Schwankungsbreite. Somit ergab sich auch an allen Messtagen in diesen 3 Tumorgruppen eine große Standardabweichung. In der Bestrahlungsgruppe lag es daran, dass eines der beiden Tiere aufgrund einer Anämie sehr früh geopfert werden musste und in der Virusgruppe gab es einen *Non Responder*-Tumor, der überhaupt nicht auf die Therapie angesprochen hatte. Die nur bestrahlten Tumoren hatten im Vergleich zur Kontrolle ein stark inhibiertes Wachstum, jedoch eine wesentlich schlechtere Wachstumsinhibition als die mit Virus behandelten Tiere, wenn man den *Non Responder*-Tumor außer Betracht lässt. Das jedoch bei weitem beste Ansprechen zeigte die mit Kombinationstherapie behandelte Gruppe, wobei einer der 3 Tumoren fast ganz in Remission gegangen war. Die Mittelwerte der Tumorgrößen wurde in Abbildung 35 B tabellarisch und graphisch dargestellt und verdeutlichen die Inhibition des Tumorwachstums durch die Radiovirotherapie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde das Wachstum der bestrahlten Tumoren am 50. d um 46 % inhibiert und am 25. d um maximal 64 % inhibiert. Die mit Virus behandelten Tiere wurden durch das eine *Non Responder*-Tier im Vergleich zur Kontrolle am 50. d nur um 26 % inhibiert und am 18. d um maximal 60 %

reduziert. Am besten jedoch wurde das Wachstum in der mit Radiovirotherapie behandelten Gruppe inhibiert, wobei dieses am 50. d um 86 % und am 29. d um maximal 94 % gehemmt wurde. Durch die geringe Anzahl der Tiere konnte keine statistisch signifikante Aussage über die Effizienz der Kombinationstherapie geschlossen werden. Jedoch ist das Xenograft-Mausmodell der U373-Tumoren als *Proof of Principle* einer Kombinationstherapie aus dem onkolytischen Adenovirus dl520 und Bestrahlung zu sehen, welches in weiteren Tierversuchen bestätigt werden muss.

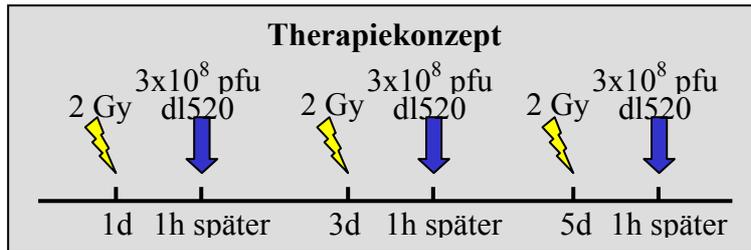
Als nächstes sollte das Tumorgewebe aus dem Xenograft-Modell auf virale DNA untersucht werden.

Xenograft-Modell mit dl520 in subkutanen U373-Tumoren								
Gruppe	Mittelwerte in mm <sup>3</sup>	Standardabweichung (s)	Relation zum Therapiebeginn	Wachstumsinhibition im Vergl. zur Kontrolle	Mittelwerte in mm <sup>3</sup>	Standardabweichung (s)	Relation zum Therapiebeginn	Wachstumsinhibition im Vergl. zur Kontrolle
<b>Bestrahlung (RTx)</b>								
1d	122	40	1,00		122	40	1,00	
4d	230	70	1,88	16%	230	70	1,88	16%
8d	377	34	3,09	-12%	377	34	3,09	-12%
11d	418	6	3,43	35%	418	6	3,43	35%
15d	408	110	3,34	50%	408	110	3,34	50%
18d	500	30	4,10	62%	500	30	4,10	62%
22d	619	132	5,07	60%	619	132	5,07	60%
25d	594	82	4,87	64%	594	82	4,87	64%
29d	710	217	5,82	59%	710	217	5,82	59%
32d	919	105	7,53	52%	919	105	7,53	52%
36d	1252	151	10,26	37%	1252	151	10,26	37%
39d	1348	15	11,05	45%	1348	15	11,05	45%
43d	1426	96	11,69	44%	1426	96	11,69	44%
46d	1645	405	13,48	36%	1645	405	13,48	36%
50d	1910	781	8,32	46%	1910	781	8,32	46%
<b>Kontrolle (PBS)</b>								
1d	127	38	1,00		127	38	1,00	
4d	273	187	2,14		273	187	2,14	
8d	336	303	2,64		336	303	2,64	
11d	642	692	5,05		642	692	5,05	
15d	807	785	6,34		807	785	6,34	
18d	1326	1488	10,42		1326	1488	10,42	
22d	1531	1355	12,03		1531	1355	12,03	
25d	1630	1289	12,81		1630	1289	12,81	
29d	1712	1231	13,45		1712	1231	13,45	
32d	1933	1125	15,19		1933	1125	15,19	
36d	1992	1130	15,66		1992	1130	15,66	
39d	2431	1013	19,10		2431	1013	19,10	
43d	2545	1065	20,00		2545	1065	20,00	
46d	2582	1008	20,29		2582	1008	20,29	
50d	3550		27,90		3550		27,90	
<b>Bestrahlung + Virus (RTx + dl520)</b>								
1d	55	5	1,00		55	5	1,00	
4d	79	4	1,43	71%	79	4	1,43	71%
8d	105	31	1,90	69%	105	31	1,90	69%
11d	79	47	1,42	88%	79	47	1,42	88%
15d	95	29	1,72	88%	95	29	1,72	88%
18d	93	43	1,68	93%	93	43	1,68	93%
22d	151	63	2,73	90%	151	63	2,73	90%
25d	113	52	2,04	93%	113	52	2,04	93%
29d	110	52	1,99	94%	110	52	1,99	94%
32d	207	106	3,75	89%	207	106	3,75	89%
36d	224	165	4,05	89%	224	165	4,05	89%
39d	316	282	5,72	87%	316	282	5,72	87%
43d	383	326	6,92	85%	383	326	6,92	85%
46d	404	356	7,30	84%	404	356	7,30	84%
50d	492	491	6,23	86%	492	491	6,23	86%
<b>Virus (dl520)</b>								
1d	128	44	1,00		128	44	1,00	
4d	144	55	1,13	47%	144	55	1,13	47%
8d	284	235	2,22	15%	284	235	2,22	15%
11d	339	343	2,64	47%	339	343	2,64	47%
15d	455	597	3,55	44%	455	597	3,55	44%
18d	503	670	3,92	62%	503	670	3,92	62%
22d	652	841	5,08	57%	652	841	5,08	57%
25d	932	1233	7,27	43%	932	1233	7,27	43%
29d	1026	1221	8,00	40%	1026	1221	8,00	40%
32d	1236	1322	9,64	36%	1236	1322	9,64	36%
36d	2254	1114	17,58	-13%	2254	1114	17,58	-13%
39d	2279	1079	17,78	6%	2279	1079	17,78	6%
43d	2615	604	20,40	-3%	2615	604	20,40	-3%
46d	2615	604	20,40	-1%	2615	604	20,40	-1%
50d	2615	604	18,11	26%	2615	604	18,11	26%

Abb. 34 stärkste Wachstumsinhibition der subkutanen U373-Tumoren im *in vivo* Xenograft-Mausmodell durch die Kombinationstherapie aus dl520 mit Bestrahlung. Die 4 Therapiegruppen des U373-Tiermodells – Kontrolle (PBS), 6 Gy Bestrahlung (RTx + PBS),  $9 \times 10^8$  pfu dl520 (Virus) und 6 Gy Bestrahlung plus  $9 \times 10^8$  pfu dl520 (RTx+Virus) – wurden von Tag 1 bis 50 (1d–50d) verfolgt und die Einzelgrößenwerte der subkutanen U373-Tumoren gemessen. Die Mittelwerte (MW), die Standardabweichung (s), die Größenrelation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle der Therapiegruppe und die prozentuale Wachstumsinhibition in Prozent jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Tages wurde tabellarisch dargestellt. Weitere Informationen siehe Text. d: Tag(e), RTx: Bestrahlung, Vergl.: Vergleich.

### Xenograft-Modell mit dl520 in subkutanen U373-Tumoren

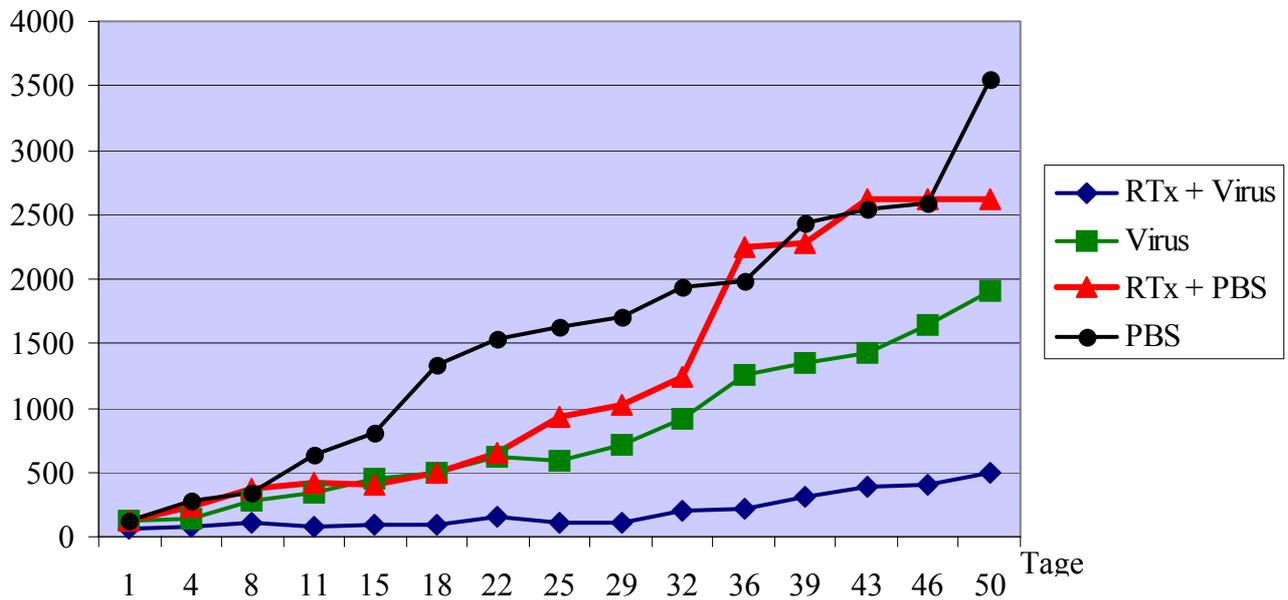
A.



B.

Gruppe	U373-Tumorgröße in mm <sup>3</sup> (Mittelwerte)							
	1. Tag	4. Tag	8. Tag	11. Tag	15. Tag	18. Tag	22. Tag	25. Tag
RTx + Virus	55	79	105	79	95	93	151	113
Virus	128	144	284	339	455	503	619	594
RTx + PBS	122	230	377	418	408	500	652	932
Kontrolle	127	273	336	642	807	1326	1531	1630
	29. Tag	32. Tag	36. Tag	39. Tag	43. Tag	46. Tag	50. Tag	
RTx + Virus	110	207	224	316	383	404	492	
Virus	710	919	1252	1348	1426	1645	1910	
RTx + PBS	1026	1236	2254	2279	2615	2615	2615	
Kontrolle	1712	1933	1992	2431	2545	2582	3550	

Tumorgröße (mm<sup>3</sup>)



**Abb. 35 Proof of Principle** der verbesserten Wachstumsinhibition von dl520 in Kombination mit Bestrahlung in subkutanen U373-Tumoren. A zeigt das im U373-Xenograft-Modell angewandte Therapiekonzept. B stellt die Mittelwerte der Tumorgößen in mm<sup>3</sup> tabellarisch und graphisch dar. Das Wachstum der U373-Tumoren wurde durch die Kombination aus dem Adenovirus dl520 und Bestrahlung am stärksten inhibiert im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltumoren, gefolgt von dl520 alleine und Bestrahlung alleine. Aufgrund der niedrigen Tierzahlen war kein Signifikanzniveau der unterschiedlichen Wachstumsinhibition bestimmt worden und das Modell als *Proof of Principle* anzusehen. Weitere Informationen siehe Text.

d: Tag(e), Gy: Gray, pfu: plaque forming unit(s), RTx: Bestrahlung, PBS: Kontrollgruppe.

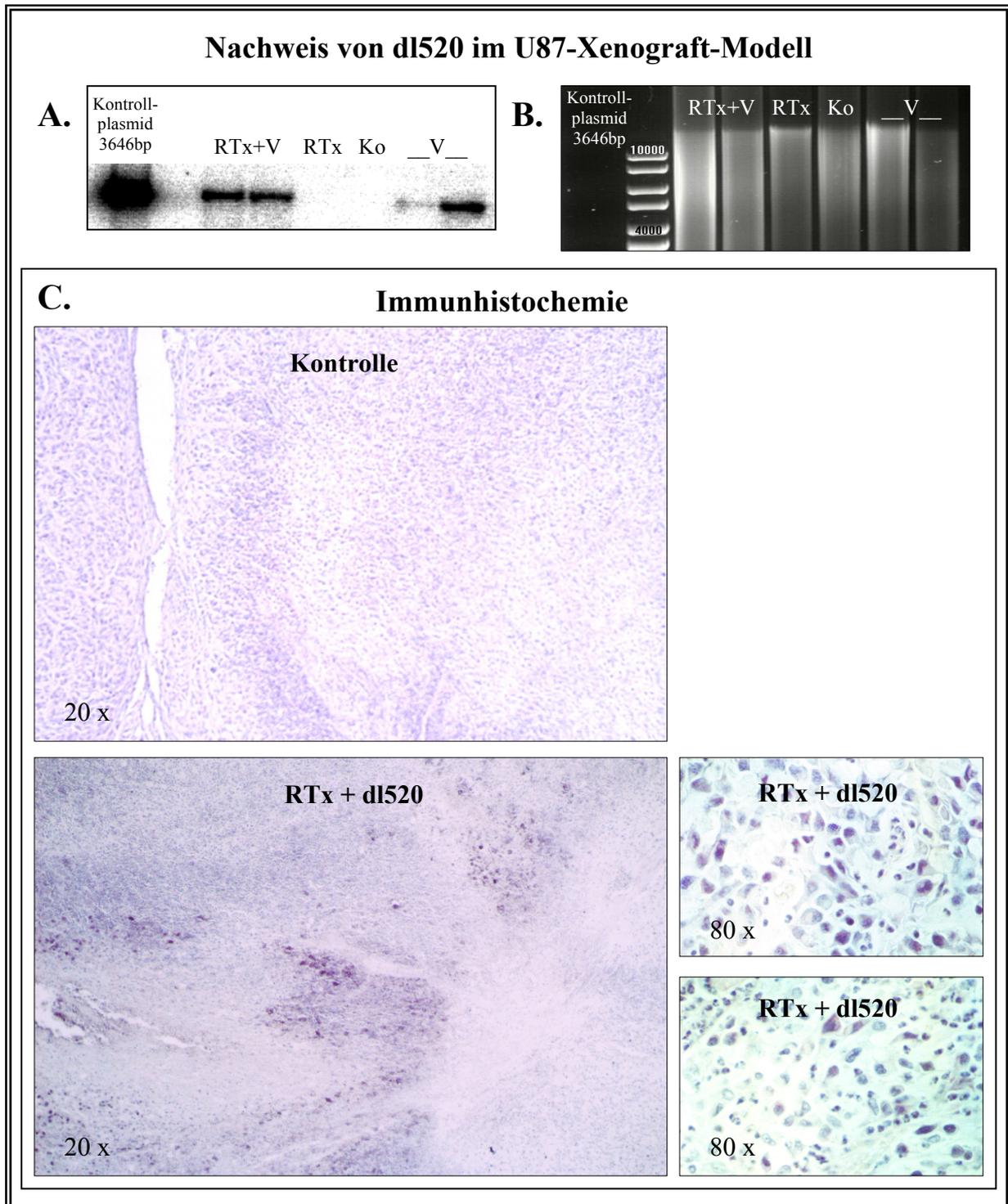
### **3.10.8 Nachweis von adenoviraler DNA in allen mit Virus behandelten U87-Tumoren, jedoch nicht in den nur bestrahlten und den Kontrolltumoren**

Um zu prüfen, ob 3 Wochen nach intratumoraler Injektion noch das Adenovirus dl520 im U87-Tumorgewebe vorhanden war, wurde eine qualitative Southern Blot Analyse durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* verdaut und das E2A-Signal in der Hybridisierung untersucht. Auf dem Agarosegel in Abbildung 36 B ist zu erkennen, dass in allen Bahnen von allen Tumortypen DNA aufgetragen wurde. Sowohl in den mit Radiovirotherapie als auch in den mit Virus alleine behandelten Tumoren konnte Virus nachgewiesen werden (Abb. 36 A). In der bestrahlten und der Kontroll-Gruppe konnte kein E2A-Signal und damit kein Virus nachgewiesen werden. Da im Agarosegel keine klar abgrenzbaren DNA-Signale der zellulären DNA zu erkennen waren, konnte keine quantitative Aussage über die vorhandene DNA getroffen werden. Die beiden untersuchten, mit Virus behandelten Tumoren exprimierten unterschiedlich intensive Signale (Bahn 7 und 8), wobei eines der beiden Signale (Bahn 8) der Intensität der mit der Kombinationstherapie behandelten Tumoren (Bahn 3 und 4) entsprach.

Nachdem die virale DNA mittels Southern Blot Analyse nachgewiesen wurde, sollte das Virus zusätzlich mittels Immunhistochemie untersucht werden.

### **3.10.9 Nachweis des adenoviralen Hexonproteins in den mit Virus behandelten U87-Tumoren, jedoch nicht in den bestrahlten und den Kontrolltumoren**

In der Southern Blot Analyse konnte die Replikation von dl520 im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurden eine Immunhistochemie der Tumoren durchgeführt. Die Tumoren sind 3 Wochen nach Virusapplikation entfernt, mit Formalin fixiert und weiterbehandelt worden. Der verwendete primäre Antikörper richtete sich gegen das Hexonprotein der adenoviralen Oberfläche, welches die Seitenflächen des Kapsids bildet. Das Hexonprotein wurde mittels des Avidin-Biotin-Komplexes, auch ABC-Methode genannt, der durch rote Alkalische Phosphatase angefärbt wurde, dargestellt. Abbildung 36 C zeigt den Schnitt eines Kontrolltumors, in dem keine Adenoviren nachzuweisen war. Im rechten unteren Bild von Abbildung 36 C dagegen ist ein mit Radiovirotherapie behandelte Tumorschnitt zu sehen, in dem viele pinkfarbene Komplexe, um eine Nekrosezone angeordnet, zu erkennen sind. Bei genauerer Betrachtung des unteren Bildes in Abbildung 36 C stellten sich pink-rot gefärbte Zellkerne und teilweise gefärbtes



**Abb. 36 Nachweis des Adenovirus dl520 in den mit Virus behandelten U87-Tumoren, jedoch nicht in den bestrahlten und den Kontrolltumoren.** A stellt den Southern Blot dar. Nach Opfung der Mäuse 32 d nach Therapiebeginn wurde DNA aus dem Gewebe der U87-Tumoren isoliert. Nach Hybridisierung mit der E2late-Sonde konnte in den mit Virus und mit Virus + Bestrahlung therapierten Tumoren DNA des Adenovirus dl520 nachgewiesen werden, jedoch nicht in den bestrahlten und Kontrolltumoren. Abb. B. zeigt das Agarosegel der Southern Blot Analyse. C Von den U87-Tumoren wurde eine Immunhistochemie angefertigt mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Fiber des Adenovirus Typ 5. Die Schnitte sind jeweils in 20- bzw. 80-facher Vergrößerung dargestellt. In den Kontrolltumoren konnte kein Virus nachgewiesen werden und auch keine unspezifische Bindung des Antikörpers. Dagegen konnte am Rande der zentralen tumoralen Nekrosezone dl520 in Schnitten von den mit Virus + Bestrahlung therapierten Tumoren gefunden werden. Weitere Informationen siehe Text.

bp: base pair(s), Ko: Kontrolle, RTx: Bestrahlung, RTx+V: Kombination aus Bestrahlung und dl520, V: Virus.

Zytoplasma dar. Somit war das Adenovirus dl520 selbst 3 Wochen post Virusinokkulation intrazellulär nachzuweisen. Quantitativ war zwischen den mit dl520 alleine und mit Radiovirotherapie behandelten Tumoren kein Unterschied zu beobachten, weshalb nur eines der Ergebnisse gezeigt wurde.

Nachdem das Adenovirus dl520 sowohl mittels Southern Blot Analyse als auch mittels Immunhistochemie nachgewiesen worden waren, sollten die U87-Tumoren makroskopisch und mikroskopisch untersucht werden.

### **3.10.10 Makroskopisch sichtbare Verkleinerung der U87-Tumoren nach Therapie mit dl520 alleine, mit RTx und mit der Kombination aus dl520 + RTx**

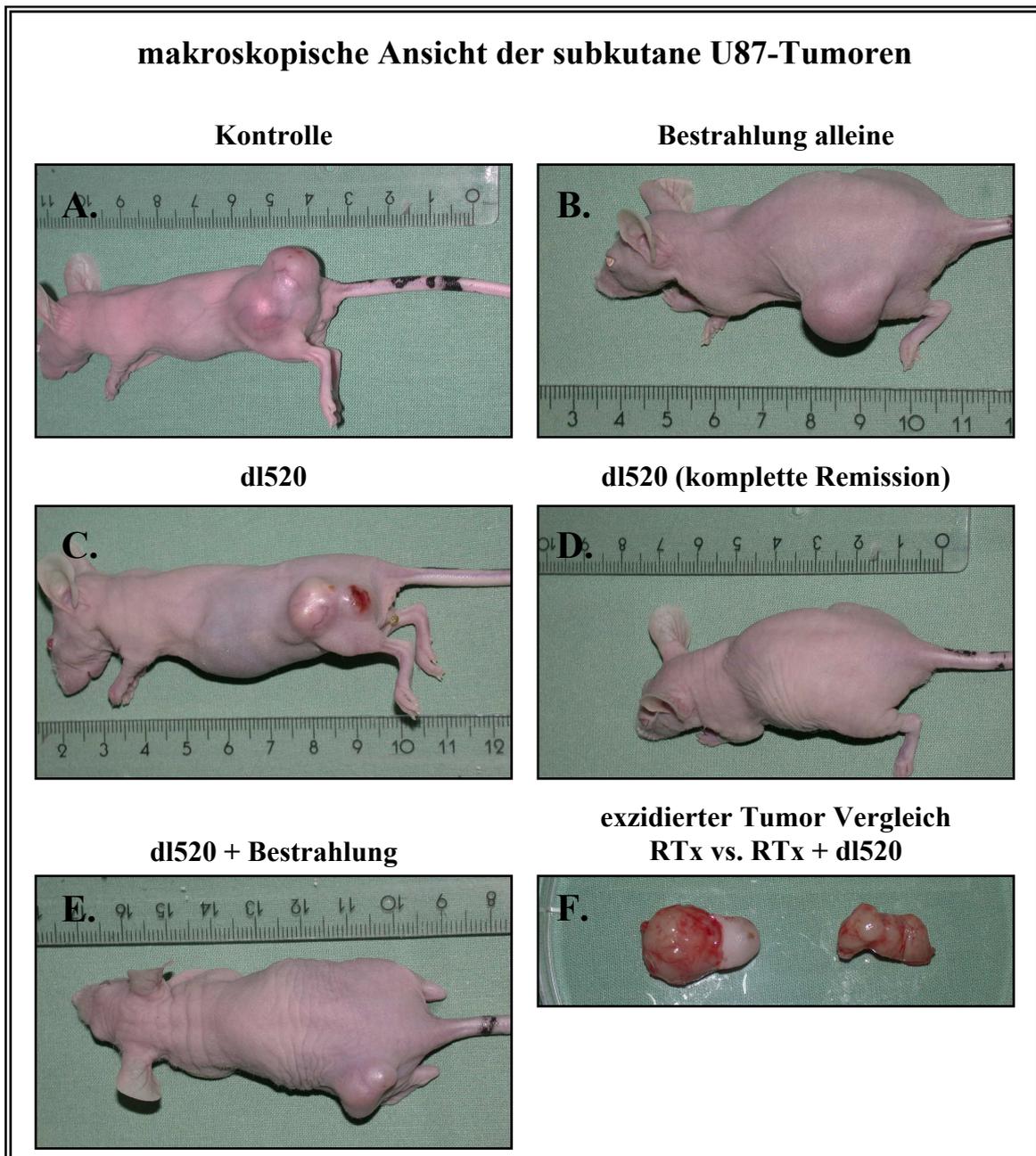
Bevor die U87-Tumoren enthaltenden Mäuse obduziert und auf makroskopisch sichtbare Tumoren untersucht wurden, sind die Tumoren photographiert worden. Wie in Abbildung 37 zu erkennen, waren die dargestellten U87-Tumoren der mit Bestrahlung alleine (RTx) (B), mit dl520 alleine (C, D) und mit der Kombinationstherapie (dl520 + RTx) behandelten Tiere (E) signifikant kleiner als der des Kontrolltieres (A). Zusätzlich wurde die mit Virus alleine behandelte Maus dargestellt, deren Tumor nach Therapie komplett in Remission gegangen war (Abb. 37 D). Des Weiteren sind 2 exzidierte U87-Tumoren zu sehen, wobei der mit Bestrahlung alleine therapierte Tumor makroskopisch kleiner als der mit der Kombinationstherapie behandelte Tumor war (Abb. 37 F).

Als nächstes wurden von den exzidierten U87-Tumoren histologische Schnitte in Haematoxillin-Eosin Färbung angefertigt und diese analysiert.

### **3.10.11 Inhomogene Struktur der mit dl520 behandelten U87-Tumoren im Gegensatz zur homogenen Struktur der bestrahlten und Kontrolltumoren**

Nach makroskopischer Betrachtung der U87-Tumoren wurden die Tumoren und die Lebern der Mäuse entfernt, in Formalin fixiert und 10 µm-dicke Schnitte angefertigt, welche mit Haematoxillin und Eosin gefärbt wurden.

In der histologischen Untersuchung besaßen die Kontrolltumoren eine sehr homogene Struktur aus fischzugartigen, entdifferenzierten Glioblastom-Zellen (Abb. 38 A). Abwehrreaktionen des unspezifischen Abwehrsystems aus Makrophagen und Granulozyten waren hier nicht vorherrschend. Abbildung 38 B zeigt einen bestrahlten Tumor mit homogenem Aufbau der Glioblastom-Zellen, der fibrotisch durchsetzt war. Das fibrotische



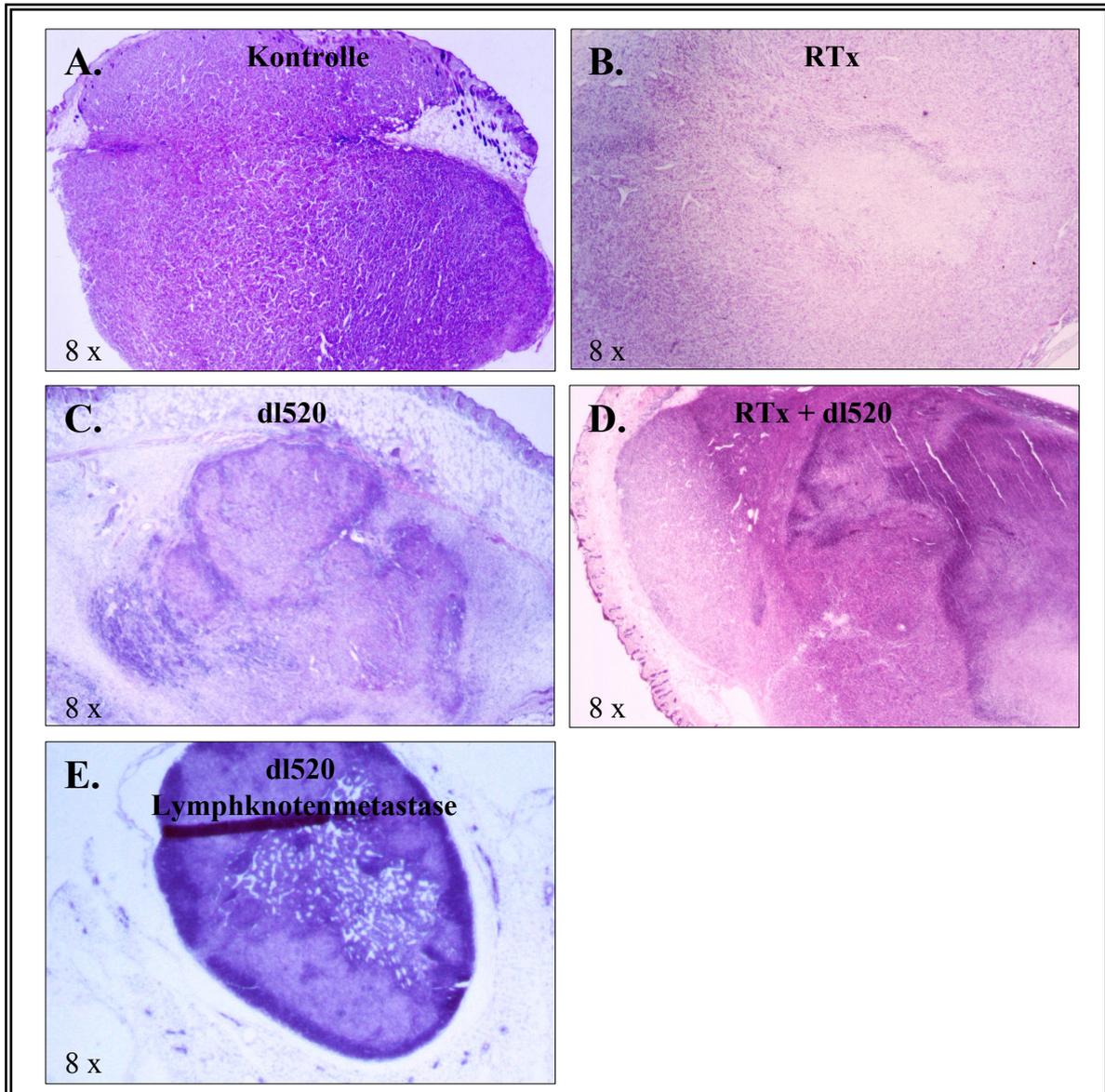
**Abb. 37** Signifikanter Größenunterschied des U87-Kontrolltumors im Vergleich zu den mit Bestrahlung alleine, dl520 alleine und mit dl520 + Bestrahlung behandelten Tumoren. Am Tag 22 nach der Opferung wurden die subkutanen U87-Tumoren des Xenograft-Mausmodells photographiert, wobei neben jeder Maus eine cm-Skala zu sehen ist. Makroskopisch war eine signifikant kleinere TumorgroÙe der mit Bestrahlung alleine (B), mit dem Adenovirus dl520 alleine (C, D) und mit der Kombination behandelten Tiere (E) im Vergleich zum nicht behandelten Kontrolltier (A) zu sehen. Ein mit dl520 alleine therapiertes Tier zeigte eine komplette Tumorregression (D). AuÙerdem sind 2 exzidierte Tumoren zu sehen, welche – links dargestellt – nur bestrahlt (RTx) und – rechts dargestellt – mit der Kombinationstherapie (RTx + dl520) behandelt wurden (F). Weitere Informationen siehe Text.  
RTx: Bestrahlung.

Bindegewebe verlieh dem Tumor eine rosafarbene Tönung in der HE-Färbung. Sowohl die mit Radiovirotherapie (Abb. 38 D) als auch die mit Virus alleine behandelten Tumoren (Abb. 38 C) wiesen eine sehr inhomogene Tumorstruktur auf. Hier herrschte ein Gleichgewicht aus Nekrose, Apoptose und Abwehrreaktion vor, das den so genannten

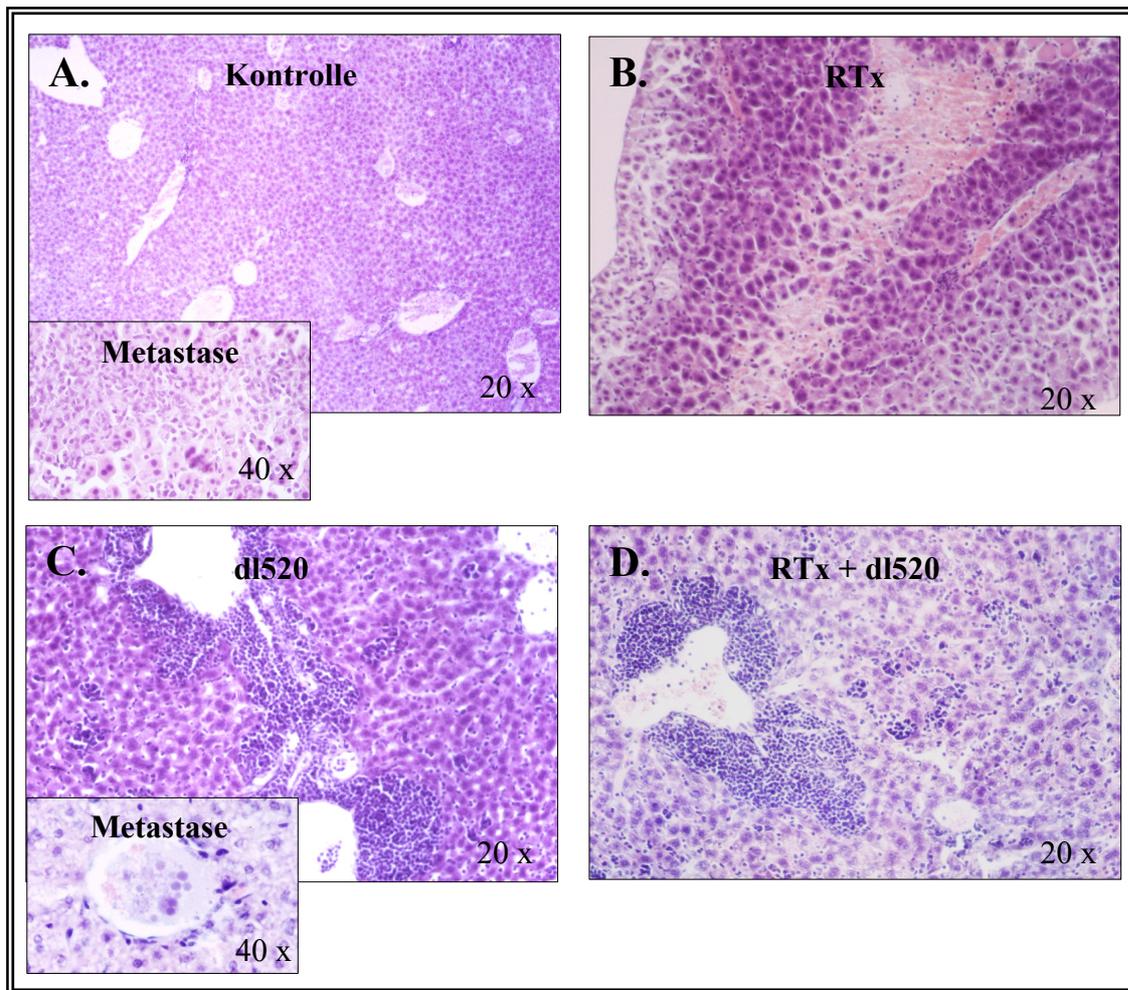
„Mottenfraß“ ergab. Der Mottenfraß war durch die intratumorale wellenartige Struktur zu erkennen. An diesen Wellen trafen Nekrose, Apoptose, und die unspezifische Abwehrreaktion aus Makrophagen und Granulozyten aufeinander. Zusätzlich lag im Vergleich zu den ohne Virus behandelten Tumoren eine erhöhte Vaskularisation vor. Histologisch stellte sich jedoch kein Unterschied heraus, wenn die Tumoren mit Radiovirotherapie und die mit viraler Therapie verglichen wurden. Abbildung 38 E stellt einen Lymphknoten der Beckenregion dar. Peripher waren Lymphfollikel zu erkennen und zentral eine Metastase aus fischzugartigen Glioblastom-Zellen. Dieser Lymphknoten wurde aus einer mit Virus alleine behandelten Maus entfernt, bei der sich als einziges Tier eine komplette Tumorremission eingestellt hatte (Abb. 37 D).

Neben den Tumoren wurden HE-Schnitte der Lebern angefertigt, wobei die Kontrolltiere eine unauffällige, gleichmäßige Leberstruktur aufwiesen. Bei den mit insgesamt 12 Gy bestrahlten Tieren jedoch zeigten sich, wie in Abbildung 39 B dargestellt, starke Hämorrhagien und Nekrosen. Diese wurden wahrscheinlich durch die Streustrahlung verursacht, da die Mäuse aus technischen Gründen außerhalb des Tumorgebietes nicht durch Bleischürzen geschützt werden konnten. In den Lebern der mit Virus behandelten Tiere, sowohl mit als auch ohne Bestrahlung, dominierte eine perivaskuläre Abwehrreaktion, wobei diese unter Kombinationstherapie noch verstärkt wurde (Abb. 39 C, D). Dagegen war in der Kontroll- und in der bestrahlten Gruppe keine Abwehrreaktion zu erkennen. Sowohl in einer Leber einer mit Virus behandelten Maus als auch einer Kontrollmaus wurde eine Metastase aus Glioblastom-Zellen gefunden (Abbildung 39 A, C). Zusammenfassend zeigte sich in den Tumoren eine inhomogene Struktur in allen mit Virus behandelten Tumoren im Gegensatz zu einer homogenen Struktur der nur bestrahlten und Kontrolltumoren. Des Weiteren erzeugte das Virus in den Lebern eine perivaskuläre Abwehrreaktion und die Streustrahlung hepatische Nekrosen und Hämorrhagien.

Nachdem der onkolytische Effekt von dl520 in Kombination mit Bestrahlung *in vitro* und *in vivo* am Glioblastom-Modell analysiert worden war, sollte der onkolytische Effekt von dl520 in Kombination mit Zytostatika und dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A ebenfalls untersucht werden.



**Abb. 38 Inhomogene Struktur der mit dl520 behandelten U87-Tumoren im Gegensatz zur homogenen Struktur der bestrahlten und Kontrolltumoren.** Abb. A - D zeigen 8-fach vergrößerte Übersichtsaufnahmen der HE-Schnitte aus den entfernten U87-Tumoren. Die mit dem Adenovirus dl520 alleine und die mit der Kombination aus dl520 + Bestrahlung behandelten Tumoren wiesen eine inhomogene Struktur auf. Die mit Bestrahlung alleine und nicht behandelten Kontrolltumoren besaßen dagegen eine homogene Struktur. In Abb. E ist ein in der ursprünglichen Tumorlokalisation benachbarter Lymphknoten mit einer Metastase zu sehen, wobei der Tumor selbst sich komplett zurückentwickelt hatte. Weitere Informationen siehe Text.  
RTx: Bestrahlung.



**Abb. 39** Perivaskuläre Abwehrreaktion in der Leber der mit Virus behandelten Mäuse, hepatische Nekrosen der mit Bestrahlung behandelten Mäuse des U87-Xenograft-Modells. In Abb. A - D sind Ausschnitte aus den Lebern der mit den 4 verschiedenen Therapiemodalitäten behandelten Mäuse in 20- bzw. 40-facher Vergrößerung zu sehen. Die Lebern der mit Bestrahlung alleine behandelten Tiere wiesen Hämorrhagien und Nekrosen auf (C). Die Lebern der mit dem Adenovirus dl520 alleine oder mit dl520 + Bestrahlung behandelten Tiere wiesen Abwehrreaktionen um die Gefäße auf (B, D). In einer mit Virus behandelten und einer Kontrollleber waren sogar jeweils eine Metastase zu finden (B). Weitere Informationen siehe Text.  
RTx: Bestrahlung.

### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisierung durch Zytostatika – Erhöhung der CAR-Expression durch Histondeacetylase-Inhibitoren

#### 3.11.1 Höchste Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber der Einzelgabe von Trichostatin A und der Kombination aus Trichostatin A + Irinotecan in der Untersuchung der IC<sub>50</sub>-Werte

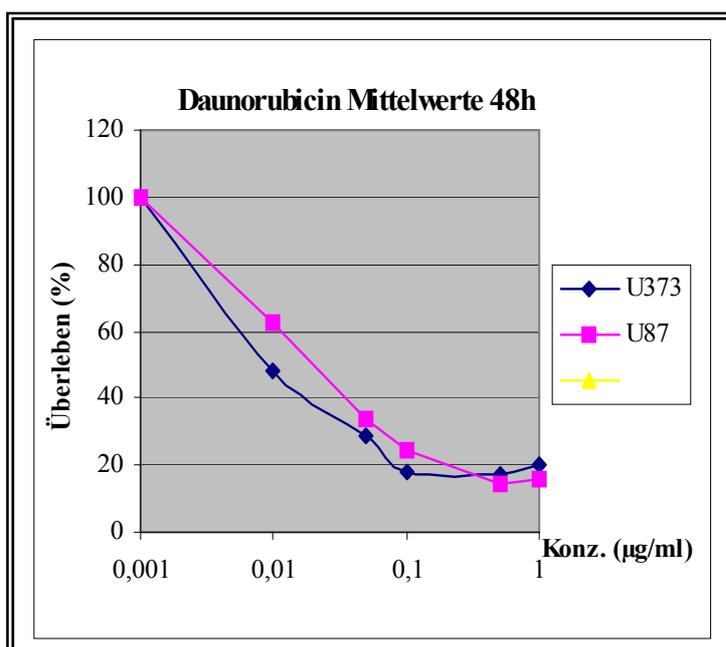
Es konnte gezeigt werden, dass der onkolytische Effekt von dl520 durch die Kombination mit Bestrahlung erhöht wurde, und dies konnte mit der Erhöhung der Kernlokalisierung von YB-1 durch Bestrahlung in Zusammenhang gebracht werden. Da

### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Bestrahlung auf die Zelle genotoxischen Stress ausübt, blieb die Frage offen, ob die Replikation und der zytopathische Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen auch durch Stress mit Zytostatika erhöht werden konnte. Hierfür sollten Daunorubicin, Docetaxel, Irinotecan sowie Trichostatin A verwendet werden, wobei letzteres hauptsächlich auf die Erhöhung der CAR-Expression ausgerichtet war. Um diese Zytostatika in den Glioblastom-Zelllinien einsetzen zu können, musste zunächst die Sensibilität der U87- und U373-Zellen in Verbindung mit den antineoplastischen Substanzen bestimmt werden. Hierzu wurde die Zellen für 48 oder 72 h mit verschiedenen Zytostatikakonzentrationen inkubiert und der  $IC_{50}$ -Wert ( $IC = induced\ cytotoxicity$ ) mittels Elisa untersucht.

#### 3.11.1.1 Hohe Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Daunorubicin

Nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml Daunorubicin überlebten 63 % der U87-Zellen, bei 50 ng/ml nur noch 34 %. Die U373-Zellen reagierten etwas sensibler und 48 % der Zellen überlebten eine 48 h Inkubation mit 10 ng/ml Daunorubicin. Nach Inkubation mit 50 ng/ml überlebten nur noch 29 % (Abb. 40). Den 257RDB wurde in der Zellkultur in regelmäßigen Abständen Daunorubicin zum L-15-Medium hinzugefügt, um den *Multidrug Resistant* Phänotyp zu erhalten. Sie sind folglich resistent gegen die eingesetzten Daunorubicin Konzentrationen. Schlussfolgernd lag der 48h- $IC_{50}$ -Wert der U87-Zellen bei 20 ng/ml und der U373-Zellen bei 10 ng/ml Daunorubicin. Als nächstes mussten die  $IC_{50}$ -Werte für Irinotecan untersucht werden.



**Abb. 40 Niedrige Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Daunorubicin.** Die Glioblastom-Zellen U87 und U373 wurden für 48 h mit dem Zytostatikum Daunorubicin (Konzentration in µg/ml) inkubiert und danach die überlebenden Zellen mit Sulforhodamin B angefärbt. Der  $IC_{50}$ -Wert der U87-Zellen lag bei 20 ng/ml und der U373-Zellen bei 10 ng/ml nach 48 h Inkubation. Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), Konz.: Konzentration.

### **3.11.1.2 Relative Resistenz der Glioblastom-Zellen gegenüber 48 und 72 h Inkubation mit Irinotecan**

Nach Analyse der IC<sub>50</sub>-Werte für Daunorubicin sollte die Sensibilität der Glioblastom-Zellen für den Topoisomerase-Hemmstoff Irinotecan bestimmt werden. Alle 3 untersuchten Zelllinien waren relativ resistent gegenüber einer 48 h Inkubation mit Irinotecan. Erst mit 10 µM/ml des Zytostatikums konnte ein Absterben von 47 % der U87-Zellen erreicht werden. Bei den U373-Zellen überlebten 37 % eine Inkubation mit 10 µM/ml Irinotecan. Mit der maximal eingesetzten Konzentration von 10 µM/ml Irinotecan ließen sich nach 48 h Inkubation keine der 257RDB-Zellen abtöten. Somit lag der 48h-IC<sub>50</sub>-Wert der U87-Zellen etwas oberhalb von 10 µM/ml, der Wert der U373 und der 257RDB-Zellen konnte selbst mit 10 µM/ml nicht erreicht werden (Abb. 41).

Nach 72 h Inkubation überlebten mit 1 µM/ml Irinotecan 48 % der U87-Zellen. In den 48 h Inkubationsversuchen reagierten die U373-Zellen schon resistenter als die U87-Zellen. Eine Inkubation mit 1 µM/ml überlebten noch 82 % der U373-Zellen, erst 10 µM/ml konnten die Zellzahl auf 24 % reduzieren. Die 257RDB-Zellen reagierten sehr resistent und 80 % der Zellen überlebten eine 72 h Inkubation mit 100 µM/ml. Somit ergaben sich 72h-IC<sub>50</sub>-Werte der U87-Zellen von 10 µM/ml und der U373-Zellen von 10 µM/ml (Abb. 41).

Als nächstes mussten die IC<sub>50</sub>-Werte für den Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A bestimmt werden.

### **3.11.1.3 Hohe Sensibilität der Glioblastom-Zellen und der 257RDB-Zellen gegenüber Trichostatin A-Inkubation**

Bei der folgenden Untersuchung der IC<sub>50</sub>-Werte für den Histondeacetylase-Inhibitor reagierten alle untersuchten Zelllinien sensibel auf Trichostatin A. Eine 48 h Inkubation mit 100 nM/ml Trichostatin A überlebten zwar noch 86 % der U87-Zellen, aber bei 1 µM/ml Trichostatin A senkte sich die Überlebensrate auf 39 %. Die U373-Zellen waren weniger sensibel gegen Trichostatin A als U87 und eine 48 h dauernde Inkubation mit 1 µM/ml Trichostatin A überlebten 73 % und mit 10 µM/ml noch 38 % der U373-Zellen. Im Gegensatz zu Irinotecan und Daunorubicin waren die 257RDB-Zellen sensibel gegenüber Trichostatin A. Nach Inkubation mit 100 nM/ml überlebten zwar noch 62 % aber mit 1 µM/ml Trichostatin A nur noch 22 % der 257RDB-Zellen. Aus den Ergebnissen resultierten ein

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

48h-IC<sub>50</sub>-Wert der U87-Zellen von 550 nM/ml, der U373-Zellen von 4,5 µM/ml und der 257RDB-Zellen von 200 nM/ml Trichostatin A (Abb. 41).

Bei der Inkubationszeit von 72 h überlebten von den U87-Zellen bei 100 nM/ml 72 % der Zellen und bei Inkubation mit 1 µM/ml nur noch 29 % der Zellen, so viele wie bei einer 48 h Inkubation mit 10 µM/ml Trichostatin A. Die Sensibilität der U373-Zellen veränderte sich gegenüber einer 48 h Inkubationszeit nicht. Bei einer Konzentration von 1 µM/ml überlebten 78 % und bei 10 µM/ml 42 % der U373-Zellen. Auch die Sensibilität der 257RDB-Zellen unterschied sich nach 72 h Inkubation nicht von der 48 h. 1 µM/ml Trichostatin A für 72 h überlebten 20 % der RDB-Zellen. Es ergaben sich somit 72h-IC<sub>50</sub>-Werte von 300 nM/ml für U87, 6 µM/ml für U373 und 150 nM/ml Trichostatin A für 257RDB-Zellen (Abb. 41).

Als nächstes musste die Sensibilität der Glioblastom-Zellen U87 und U373 gegenüber dem Mitose-Hemmstoff Docetaxel getestet werden.

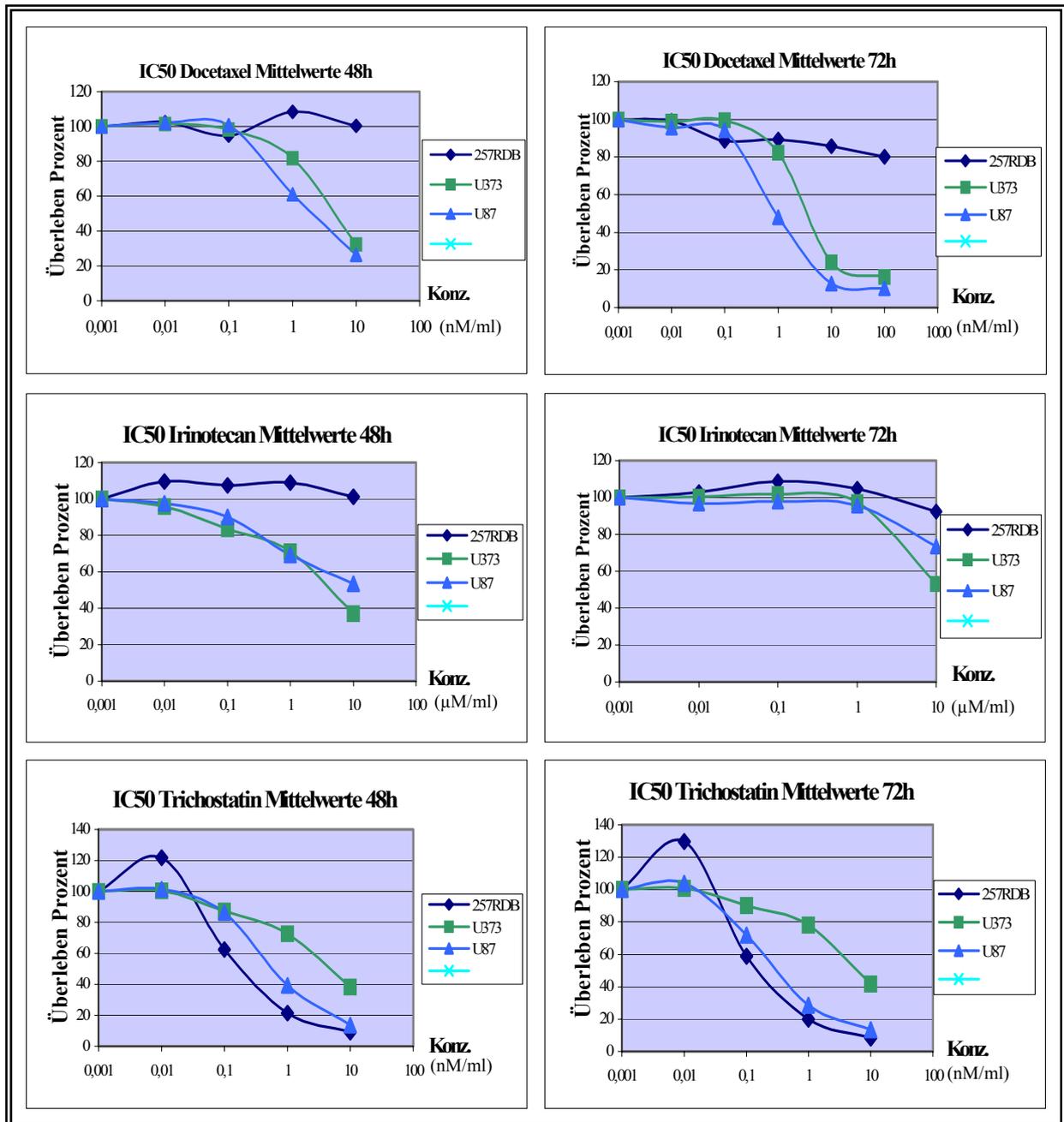
#### **3.11.1.4 Normale Sensibilität der U87- und moderate Sensibilität der U373-Zellen gegenüber Docetaxel**

Nach Untersuchung eines interkalierenden Zytostatikums, eines Topoisomerase-Hemmstoffes und eines Histondeacetylase-Inhibitors sollte die Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber dem Mitose-Hemmstoff Docetaxel untersucht werden. 48 h Inkubationszeiten mit 1 nM/ml Docetaxel überlebten 61 % und mit 10 nM/ml noch 26 % der U87-Zellen. Die U373-Zellen waren etwas weniger sensibel und eine Inkubation mit 1 nM/ml Docetaxel für 48 h überlebten 82 % und mit 10 nM/ml noch 32 % der U373-Zellen. Im Vergleich dazu waren die 257RDB-Zellen resistenter und eine 48 h Inkubation mit 100 nM/ml Docetaxel überlebten 83 % dieser Zellen. Aus den Ergebnissen resultierten 48h-IC<sub>50</sub>-Werte für U87 von 2nM/ml und für U373 von 4,5 nM/ml (Abb. 41).

Wenn man die Inkubationszeit auf 72 h erhöhte, lagen die Überlebensraten der U87-Zellen mit 1 nM/ml Docetaxel bei 48 % und mit 10 nM/ml bei 13 %. Nur minimale Unterschiede ergaben sich bei den U373-Zellen, von denen nach 72 h Inkubation mit 1 nM/ml Docetaxel 82 % und nach 10 nM/ml noch 24 % der Zellen überlebten. Vergleichbar zur Inkubation für 48 h überlebten 80 % der 257RDB-Zellen eine 72 h Inkubation mit 100 nM/ml Docetaxel. Die 72h-IC<sub>50</sub>-Werte sanken verglichen mit den 48h-IC<sub>50</sub>-Werten auf Konzentrationen von 0,9 nM/ml für U87 und 3,5 nM/ml Docetaxel für U373-Zellen (Abb. 41).

### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisierung und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Als letztes sollte die Sensibilität der U87- und U373-Zellen noch gegenüber einer Kombination aus jeweils 2 der Zytostatika analysiert werden.



**Abb. 41** Normale bis hohe Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber den Zytostatika Trichostatin A und Docetaxel, relative Resistenz gegenüber Irinotecan. Die Zellen U87, U373 und 257RDB wurden für 48 oder 72 h mit den verschiedenen Zytostatika inkubiert und danach die überlebenden Zellen mit Sulforhodamin B fixiert. Der IC<sub>50</sub>-Wert der U87-Zellen betrug von Docetaxel 2 nM/ml nach 48 h und 0,9 nM/ml nach 72 h, von Irinotecan 10 μM/ml nach 48 h und 72 h und von Trichostatin A 550 nM/ml nach 48 h und 300 nM/ml nach 72 h. Bei den U373-Zellen lag der IC<sub>50</sub>-Wert von Docetaxel bei 4,5 nM/ml nach 48 h und 3,5 nM/ml nach 72 h, von Irinotecan bei 4 μM/ml nach 48 h und 10 nM/ml nach 72 h und von Trichostatin A bei 4,5 μM/ml nach 48 h und 6 μM/ml nach 72 h. Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), Konz.: Konzentration, M: Molar.

### **3.11.1.5 Höchste Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber der Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A in der Untersuchung der IC<sub>50</sub>-Werte**

In der Therapie neoplastischer Erkrankungen werden bei Einsatz von Chemotherapeutika meist Kombinationen aus mehreren Zytostatika eingesetzt. Die Dosierungen sind in der Klinik während der Induktionstherapie sehr hoch, jedoch während der folgenden Erhaltungstherapie wesentlich niedriger. Deshalb wurden unterschiedliche Zweierkombinationen der oben aufgeführten Zytostatika untersucht, um herauszufinden, welche Überlebensraten der U87-, U373- und 257RDB-Zellen bei welchen Zytostatikakombinationen und in welchen Konzentrationen resultierten.

#### **3.11.1.5.1 Mittlere Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Docetaxel + Irinotecan**

In Abbildung 43 ist zu sehen, dass die Überlebensrate der U87-Zellen mit den angewandten Konzentrationen, die für 48 h belassen wurden, maximal auf 35 % gesenkt werden konnte. Das beste Verhältnis von der Überlebensrate zur Konzentration bestand bei Inkubation mit 3 µM/ml Docetaxel + 0,7 µM/ml Irinotecan, welche 52 % der U87-Zellen überlebten.

Ähnlich verhielt es sich mit den U373-Zellen, wobei ab einer Teilkonzentration von 1 nM/ml Docetaxel die Überlebensrate auf ca. 40 % gesenkt wurde. Der beste Toxizitäts-Konzentrationsindex bestand bei einer Konzentration von 3 nM/ml Docetaxel + 0,7 µM/ml Irinotecan mit einer Überlebensrate der U373-Zellen von 45 % (Abb. 43).

Die 257RDB-Zellen, die sich auch bei Einzelkonzentrationen von Docetaxel oder Irinotecan resistent verhielten, konnten durch die Kombination nicht sensibilisiert werden (Abb. 42).

Nach Untersuchung der Sensibilität gegenüber Docetaxel + Irinotecan wurde die Kombination aus Trichostatin A + Docetaxel analysiert.

#### **3.11.1.5.2 Mittlere Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Trichostatin A + Docetaxel**

Ab einer Einzelkonzentration von 0,7 µM/ml Trichostatin A konnte die Überlebensrate der U87-Zellen auf 40 % gesenkt werden. Diese konnte nur maximal auf 26 %

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

gemindert werden, bei den Maximalkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Docetaxel. Der beste Toxizitäts-Konzentrationsindex lag bei 0,7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 3 nM/ml Docetaxel mit einer Überlebensrate von 40 % der U87-Zellen. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei der Konzentration von 0,7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 0,7 nM/ml Docetaxel (Abb. 43).

Bei den U373-Zellen konnte die Überlebensrate maximal auf 21 % gesenkt werden, dies aber nur mit den höchsten Konzentrationen beider Zytostatika. Der effektivste Index bestand bei den Konzentrationen von 0,7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 0,7 nM/ml Docetaxel, bei denen 41 % der U373-Zellen überlebten. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert betrug 0,7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 3 nM/ml Docetaxel (Abb. 43).

Die 257RDB-Zellen reagierten sehr sensibel auf Einzelkonzentrationen von Trichostatin A. Somit konnte die niedrigste Konzentration von 0,7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 0,7 nM/ml Docetaxel die Zellzahl schon auf 28 % reduzieren (Abb. 42).

Zuletzt musste die Überlebensrate der Glioblastom-Zellen gegenüber Inkubation mit der Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A untersucht werden.

#### **3.11.1.5.3 Höchste Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Irinotecan + Trichostatin A**

Nach der Sensibilitätsuntersuchung der Glioblastom-Zellen mit der Kombination aus Trichostatin A + Docetaxel sollte Trichostatin A zusätzlich mit Irinotecan kombiniert werden. Bei dieser Kombination wurde die Überlebensrate der U87-Zellen, die maximal auf 20 % gesenkt werden konnte, jeweils am stärksten bei den höchsten Trichostatin A-Konzentrationen gesenkt. Der effektivste Toxizitäts-Konzentrationsindex bestand mit einer Überlebensrate von 37 % bei den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan + 3  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei den Konzentrationen 0,7  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A + 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan (Abb. 43).

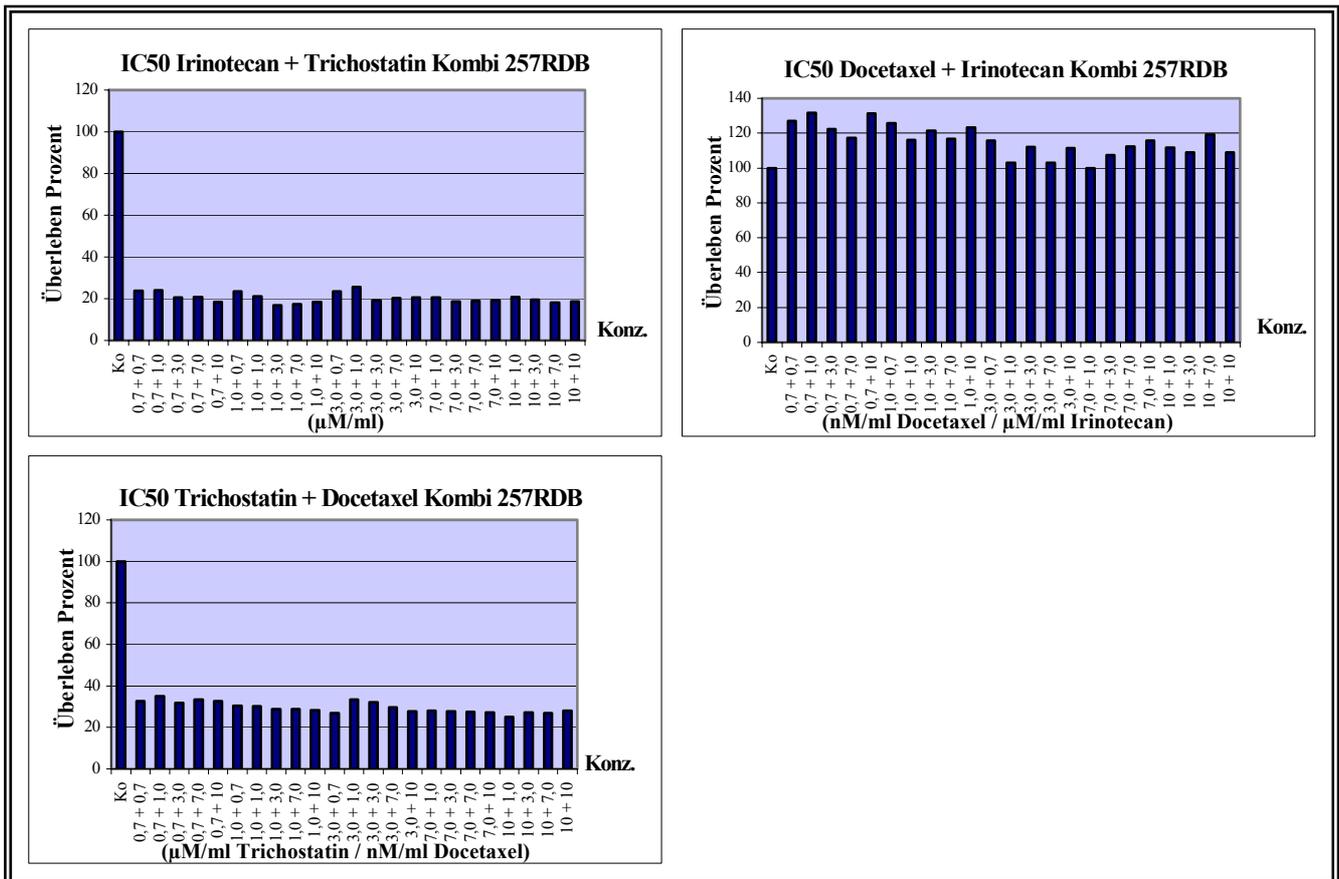
Wie bei den U87-Zellen konnte die Überlebensrate der U373-Zellen am niedrigsten mit den höchsten Trichostatin A-Konzentrationen gesenkt werden. Maximal wurde eine Überlebensrate von 24 % erreicht, wobei die Konzentrationen 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan + 3  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A den optimalen Toxizitäts-Konzentrationsindex ergaben, bei dem 54 % der Zellen überlebten und diese Konzentration auch dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert entsprachen (Abb. 43).

Die 257RDB-Zellen reagierten auf Einzelkonzentrationen von Irinotecan und Trichostatin A sehr empfindlich und erreichten schon bei der niedrigsten Konzentration von

### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisierung und der CAR-Expression durch Chemotherapie

0,7  $\mu\text{M/ml}$  Irinotecan + 0,7  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A eine sehr niedrige Überlebensrate von 23 % (Abb. 42).

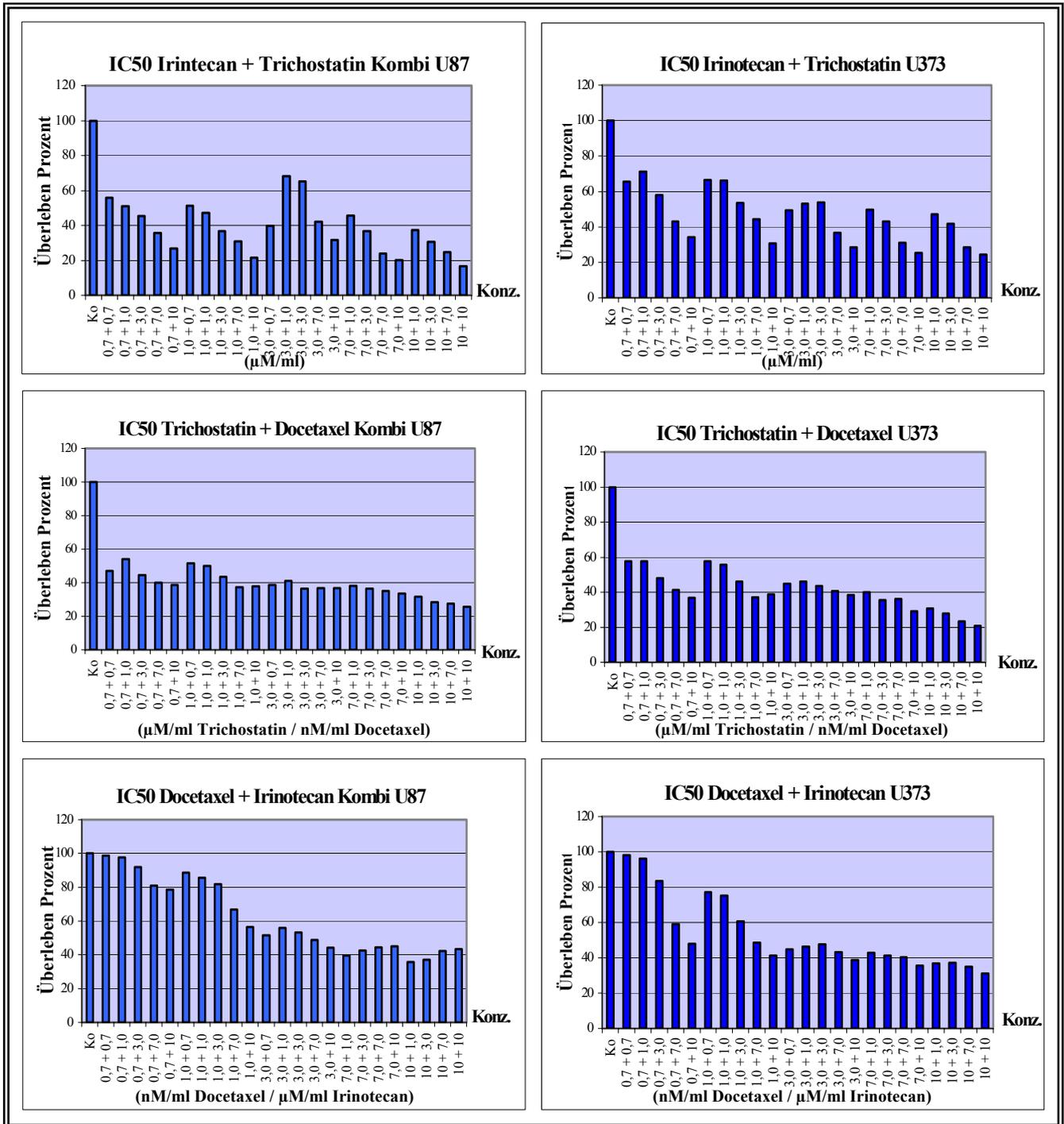
Nachdem die Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber der Inkubation mit den einzelnen Zytostatika und den Kombinationen aus 2 Chemotherapeutika bestimmt worden war, konnte als nächstes der zytopathische Effekt von dl520 in Kombination mit den Zytostatika untersucht werden.



**Abb. 42 Hohe Sensibilität der 257RDB-Zellen gegenüber Trichostatin A + Irinotecan bzw. + Docetaxel.** Die 257RDB-Zellen wurden mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen für 48 h inkubiert – dabei wurden Trichostatin A und Irinotecan in  $\mu\text{M/ml}$  und Docetaxel in  $\text{nM/ml}$  angegeben. Nach Inkubation wurden die überlebenden Zellen mit Sulforhodamin B fixiert. Für die 257RDB-Zellen lagen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte von Irinotecan + Trichostatin A und von Trichostatin A + Docetaxel unterhalb der geringsten eingesetzten Konzentrationen mit 0,7  $\mu\text{M/ml}$  Irinotecan + 0,7  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A bzw. 0,7  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A + 0,7  $\text{nM/ml}$  Docetaxel vor. Bei der Kombination Docetaxel + Irinotecan zeigten die Zellen bei den eingesetzten Konzentrationen keine Sensibilität.

Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), Kombi.: Kombination, Konz.: Konzentration, M: Molar.



**Abb. 43** Höchste Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Trichostatin A + Irinotecan, mittlere Sensibilität gegenüber den Kombinationen Trichostatin A + Docetaxel und Docetaxel + Irinotecan. Die Glioblastom-Zellen U87 und U373 wurden mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen für 48 h inkubiert – wobei Trichostatin A und Irinotecan in  $\mu\text{M}/\text{ml}$  und Docetaxel in  $\text{nM}/\text{ml}$  angegeben sind – bevor die überlebenden Zellen mit Sulforhodamin B fixiert wurden. Für die U87-Zellen stellten sich  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $0,7 \mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan +  $1 \mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A, von  $0,7 \mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A +  $0,7 \text{nM}/\text{ml}$  Docetaxel und von  $3 \text{nM}/\text{ml}$  Docetaxel +  $0,7 \mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan für eine 48 h Inkubation heraus. Für die U373-Zellen ergaben sich  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $3 \mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan +  $0,7 \mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A, von  $0,7 \mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A +  $3 \text{nM}/\text{ml}$  Docetaxel und von  $3 \text{nM}/\text{ml}$  Docetaxel +  $0,7 \mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan für eine 48 h Inkubation.

Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), Kombi.: Kombination, Konz.: Konzentration, M: Molar.

### **3.11.2 Verstärkung des zytopathischen Effektes von dl520 durch Zytostatika**

Der zytopathische Effekt von dl520 konnte durch Bestrahlung, welche zu einer Erhöhung der Kernlokalisation von YB-1 führt, verstärkt werden. Da Chemotherapeutika auch zu einer Akkumulation von YB-1 im Kern führen können, sollte der zytopathische Effekt von dl520 nun in Kombination mit den Zytostatika Docetaxel, Irinotecan und Daunorubicin nach 24 h und 5 h Inkubationszeit durchgeführt werden. Ebenfalls sollte eine Verstärkung des zytopathischen Effektes von dl520 durch den Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A untersucht werden, welcher zu einer Erhöhung der CAR-Expression und somit zu einer Verbesserung der viralen Infektionsfähigkeit führen sollte.

Dabei wurden Konzentrationen eingesetzt, die weit unterhalb der IC<sub>50</sub>-Werte lagen. Da die Glioblastom-Zelllinien auf die Zytostatika-Kombination Irinotecan + Trichostatin A am sensibelsten reagiert hatten, wurde diese Kombination für die weiteren Versuche angewandt, ebenfalls in Konzentrationen unterhalb der IC<sub>50</sub>-Werte.

#### **3.11.2.1 Stärkste Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 in U87-Zellen durch nicht toxische Konzentrationen der Kombination Irinotecan + Trichostatin A nach 24 h Inkubation**

Zuerst wurde die U87-Glioblastom-Zellen auf einen verstärkten zytopathischen Effekt von dl520 durch Zytostatika untersucht. In der Kontrollreihe wurden die U87-Zellen von 30 pfu dl520 komplett lysiert. Bei 20 pfu dl520 zeigten 50 % der Zellen verstärkte Lichtbrechung und der Zellrasen war nur noch zu 50 % konfluent (Abb. 44). Die restlichen Zellen waren in Lyse gegangen und hatten sich damit abgelöst. Der CPE-Test wurde ebenfalls quantitativ analysiert, indem die Kristallviolett-Färbung gelöst wurde. Die Analyse ergab nach Infektion mit 20 pfu eine 60 % Farbintensität im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Abb. 44). Nach Inkubation mit 1 µM/ml Irinotecan für 24 h konnten 20 pfu dl520 den kompletten Zellrasen lysieren (Abb. 45). Die Lysefähigkeit von dl520 konnte nach Inkubation mit 0,5 µM/ml Trichostatin A weiter gesteigert werden, worunter 10 pfu dl520 den Zellrasen komplett lysierten und bei 8 pfu dl520 die U87-Zellen nur noch zu 60 % konfluent waren, und davon 40 % der Zellen verstärkte Lichtbrechung zeigten (Abb. 45). Diesbezüglich ergab die quantitative Bestimmung der Farbintensität der Kristallviolett-Lösung eine Abnahme der Farbintensität auf 36 % bei 8 pfu dl520 im Vergleich zur nicht infizierten, mit Trichostatin A inkubierten Kontrolle von U87 (Abb. 45). Bei Inkubation mit der Kombination

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

von 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan + 0,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A wurde die Lyse bei 8 pfu dl520 komplettiert (Abb. 44, 45).

Nachdem in den U87-Zellen die stärkste Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 durch die Kombination aus 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan + 0,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A nachgewiesen werden konnte, sollten die Zelllyse ebenfalls in den U373-Zellen untersucht werden.

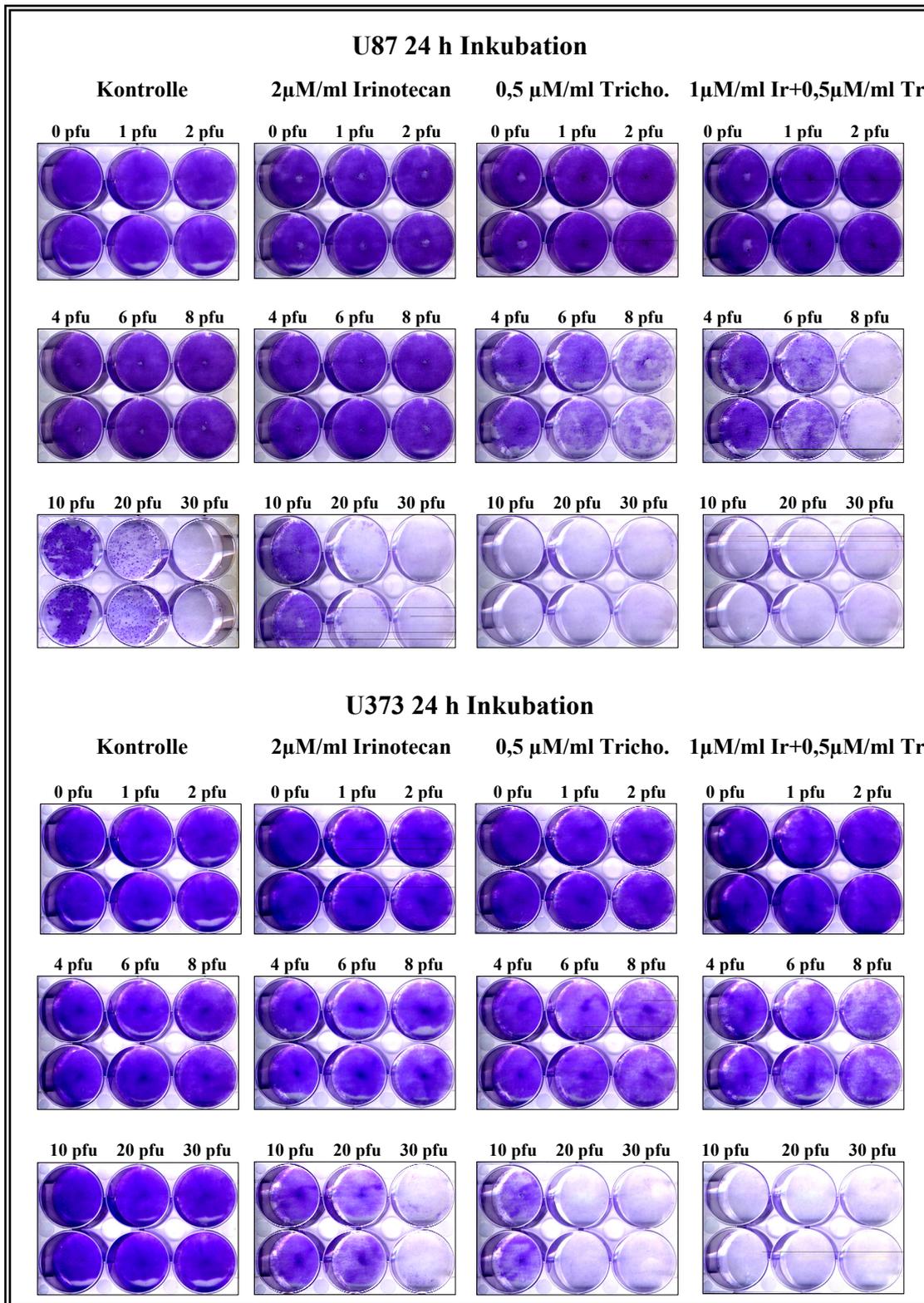
#### **3.11.2.2 Stärkste Erhöhung des U373-Zelllyse von dl520 durch nicht toxische Konzentrationen der Kombination Irinotecan + Trichostatin A nach 24 h Inkubation**

In der Kontrollreihe von U373 konnten die höchsten, experimentell untersuchten 30 pfu von dl520 keine Lyse im CPE-Test erzielen (Abb. 44 unten). Die Farbintensität zeigte jedoch eine Abnahme auf 70 % im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Abb. 45). Nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Irinotecan für 24 h wurden mit 30 pfu dl520 der Zellrasen auf 13 % reduziert (Abb. 44, 45). Auch bei niedrigeren pfu-Zahlen konnte in den U373-Zellen zwar keine signifikante Lyse nachgewiesen werden, aber das Wachstum wurde im Vergleich zur Kontrolle um 20 - 40 % gehemmt. Mit 0,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A für 24 h konnte die lytische Aktivität von dl520 auf 20 pfu gesteigert werden. Bei Infektion mit 10 pfu sank die Farbintensität immerhin auf 51 % (Abb. 44, 45). Bei der Kombination von Irinotecan + Trichostatin A lysierten bereits 10 pfu dl520 den gesamten Zellrasen und bei 8 pfu sank die Farbintensität auf 68 % (Abb. 44, 45).

Als Positivkontrolle sollten neben den Glioblastom-Zellen, in denen YB-1 zum Teil im Zellkern lokalisiert war, die vielfachresistenten 257RDB-Zellen in Kombination mit Zytostatika analysiert werden.

#### **3.11.2.3 Keine Erhöhung der 257RDB-Zelllyse von dl520 durch Zytostatika nach 24 h Inkubation**

Bei den MDR-positiven 257RDB-Zellen, in denen YB-1 hauptsächlich im Kern vorliegt, konnte in diesem Versuch kein Unterschied des zytopathischen Effektes von dl520 zwischen der Kontrolle ohne Zytostatika und den mit den 3 verschiedenen Zytostatika inkubierten Gruppen festgestellt werden. Schon die Kontrolle wurde von 2 pfu dl520 komplett lysiert, somit auch von den mit Zytostatika inkubierten 257RDB-Zellen (Abb. 46).

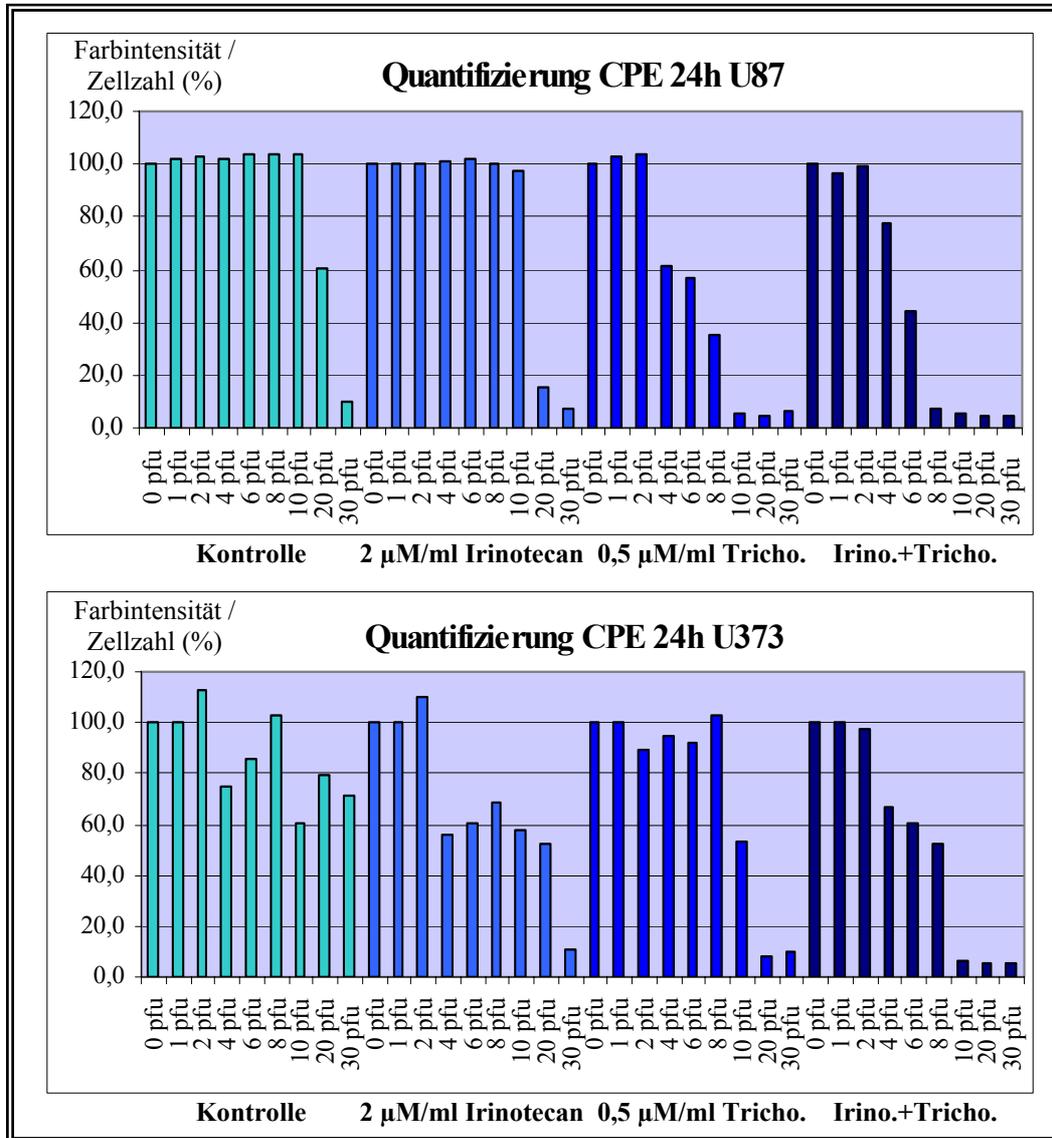


**Abb. 44 Stärkste Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 in den Glioblastom-Zellen nach Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A für 24 h.** Nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen für 24 h wurden die U87- und U373-Zellen mit dl520 infiziert und die Kristallviolett-Färbung 5 d nach Infektion angefertigt. Der onkolytische Effekt von dl520 wurde in den Glioblastom-Zellen durch Zytostatika verstärkt, jedoch nicht in den MDR-positiven 257RDB-Zellen (siehe Abb. 45). Die stärkste Erhöhung konnte in beiden Zelllinien mit der Kombination aus 1 µM/ml Irinotecan + 0,5 µM/ml Trichostatin A erzielt werden, gefolgt von 0,5 µM/ml Trichostatin A alleine und dann 2 µM/ml Irinotecan alleine. Weitere Informationen siehe Text.

d: Tag(e), Ir+Tr: Irinotecan + Trichostatin A, h: Stunde(n), M: Molar, pfu: *plaque forming unit(s)*, Tricho: Trichostatin A.

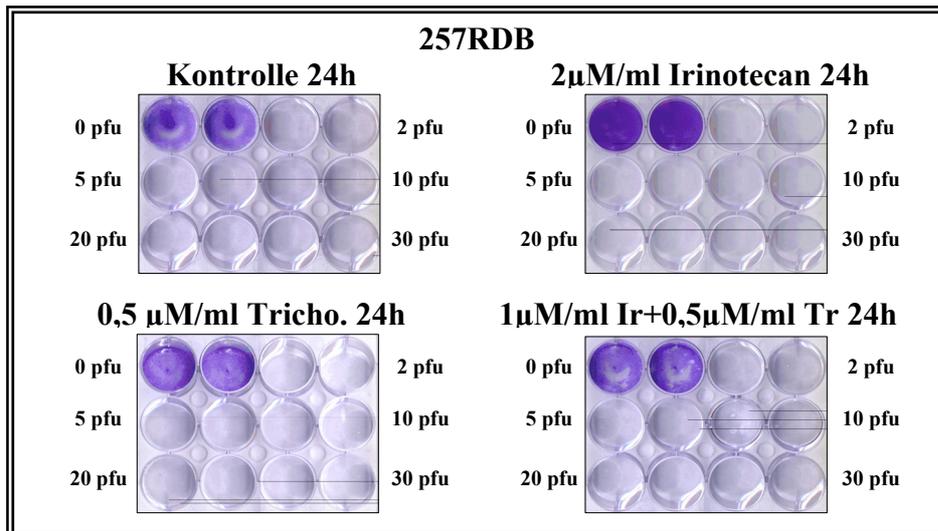
### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der zytopathische Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen durch Zytostatika verstärkt wurde, jedoch nicht in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen, sollte als nächstes der zytopathische Effekt von dl520 mit anderen Inkubationszeiten untersucht werden.



**Abb. 45 Stärkste Erhöhung der Zelllyse der Glioblastom-Zellen durch dl520 mittels der Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A.** Zur Quantifizierung des CPE-Tests mit 24 h Zytostatika-Inkubation wurde die Kristallviolett-Färbung mittels einer 0,1 % SDS in PBS-Lösung gelöst und die Farbintensität bei einer Absorption von 590 nm bestimmt. Auf der Y-Achse wurde die zur Konfluenz des Zellrasens proportionale Farbintensität dargestellt, wobei die Kontrollzellen (ohne Zytostatika) jeweils 100 % gleichgesetzt wurden. Weitere Informationen siehe Text.

CPE: *cytopathic effect*, h: Stunde(n), Irino.+Tricho.: Irinotecan + Trichostatin A, Tricho.: Trichostatin A, M : Molar, pfu: *plaque forming unit(s)*.



**Abb. 46 Keine Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen durch Zytostatika.** Nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen für 24 h wurden die Zellen mit dem Adenovirus dl520 infiziert und die Kristallviolett-Färbung 5 d nach Infektion angefertigt. Der onkolytische Effekt von dl520 wurde in den MDR-positiven 257RDB-Zellen nicht durch Zytostatika verstärkt im Gegensatz zu den Glioblastom-Zellen (siehe Abb. 44). Weitere Informationen siehe Text.

d: Tag(e), h: Stunde(n), Ir+Tr: Irinotecan + Trichostatin, M: Molar, pfu: *plaque forming unit(s)*, Tricho: Trichostatin A.

#### 3.11.2.4 Keine signifikante Verstärkung des zytopathischen Effektes durch Zytostatika nach 5 h Inkubation auf der Zelllinie U87

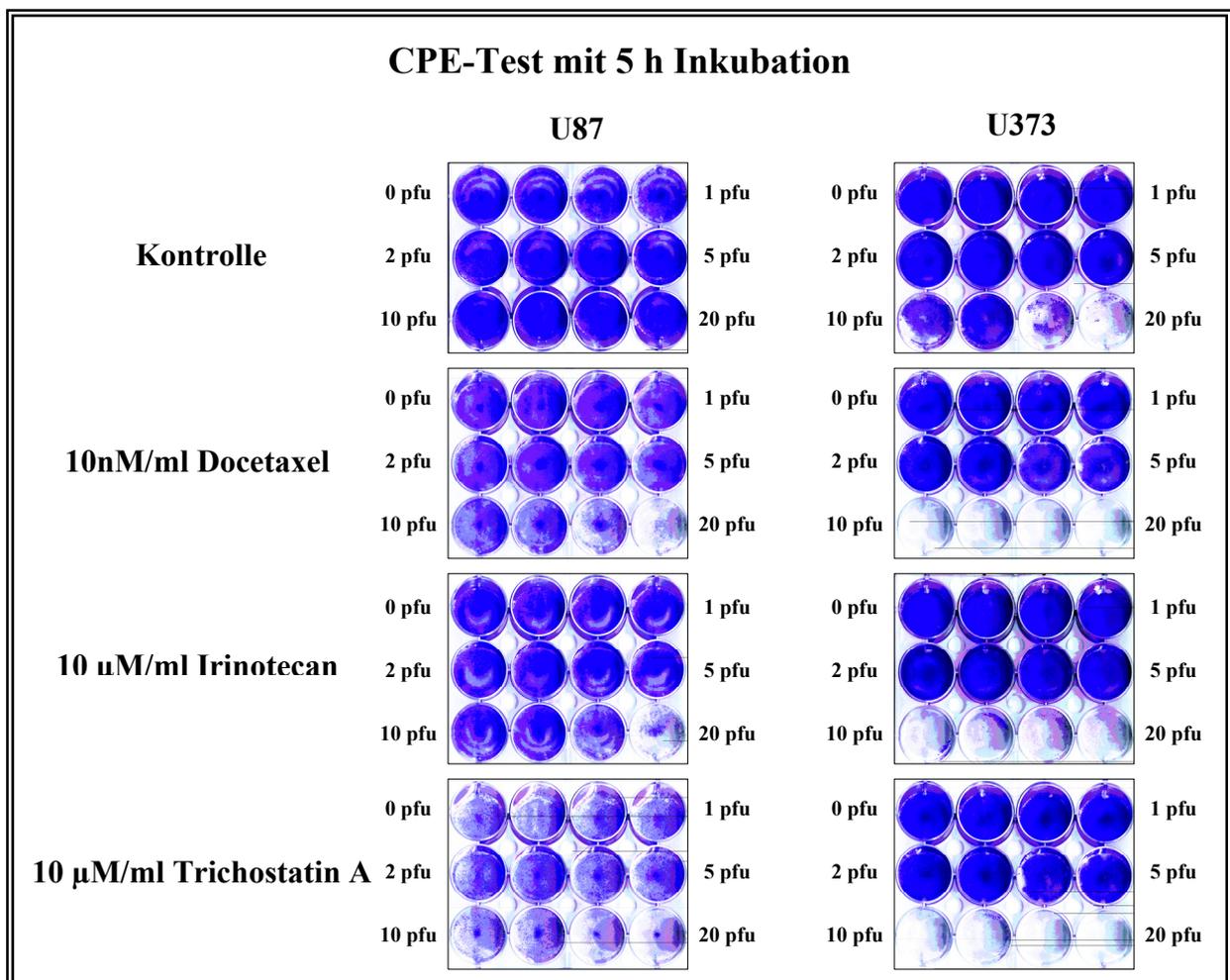
Der zytopathische Effekt von dl520 mit Zytostatika auf den Glioblastom-Zellen sollte mit kürzeren Inkubationszeiten und dabei höheren Zytostatika-Konzentrationen weiter untersucht werden. Im Vergleich zur Kontrollreihe mit 24 h Inkubation, bei der 20 pfu dl520 die Zellen auf 70 % reduzierten, lysierten 20 pfu dl520 die U87-Zellen noch nicht sichtbar. Einige Zellen zeigten verstärkte Lichtbrechung, so dass davon auszugehen war, dass 30 pfu die Zellen komplett lysiert hätten. Nach Inkubation mit 10 nM/ml Docetaxel und mit 10 µM/ml Irinotecan für 5 h lysierten 20 pfu ca. 40 % der Zellen, so dass der Zellrasen ausgedünnt war. Inkubation mit 10 µM/ml Trichostatin A für 5 h führten insgesamt – auch bei den nicht infizierten Zellen – zur Ausdünnung des Zellrasens im Vergleich zur nicht Zytostatika behandelten Kontrolle. Der zytopathische Effekt von dl520 wurde somit nach 5 h Inkubation durch Trichostatin A nicht und durch Docetaxel und Irinotecan auch nur marginal verstärkt (Abb. 47).

Als nächstes sollte der CPE-Test mit 5 h Zytostatika-Inkubation auf den U373-Zellen untersucht werden.

### 3.11.2.5 Schwache vergleichbare Verstärkung der Zelllyse von dl520 durch die drei Zytostatika nach 5 h Inkubation auf der Zelllinie U373

Bei CPE-Analyse der 5 h Chemotherapeutika-Inkubation lysierten 20 pfu dl520 60 % der Kontrolle der U373-Zellen. Nach 5 h Inkubation mit 10 nM/ml Docetaxel, 10 µM/ml Irinotecan und 10 µM/ml Trichostatin A lysierten 10 pfu dl520 alle Zellen. Der zytopathische Effekt konnte somit schwach in den U373-Zellen durch die drei Zytostatika erhöht werden (Abb. 47).

Nachdem gezeigt worden war, dass die Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 nach 5 h Zytostatika-Inkubation wesentlich schwächer ausfiel als nach 24 h Inkubation, sollte zuletzt die Zelllyse von dl520 in Kombination mit Daunorubicin bestimmt werden.



**Abb. 47** Nach 5 h Inkubation keine Verstärkung der Zelllyse durch dl520 in den U87 Zellen, schwache Verstärkung in den U373-Zellen. Nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen für 5 h wurden die Zellen mit dem Adenovirus dl520 infiziert und die Kristallviolett-Färbung 5 d nach Infektion angefertigt. Der onkolytische Effekt von dl520 wurde in den U87-Zellen nicht signifikant durch Docetaxel, Irinotecan oder Trichostatin A erhöht, dagegen in den U373-Zellen durch die drei Zytostatika schwach verstärkt. Weitere Informationen siehe Text.

CPE: *cytopathic effect*, d: Tag(e), h: Stunde(n), M : Molar, pfu: *plaque forming unit(s)*, Trichostatin: Trichostatin A.

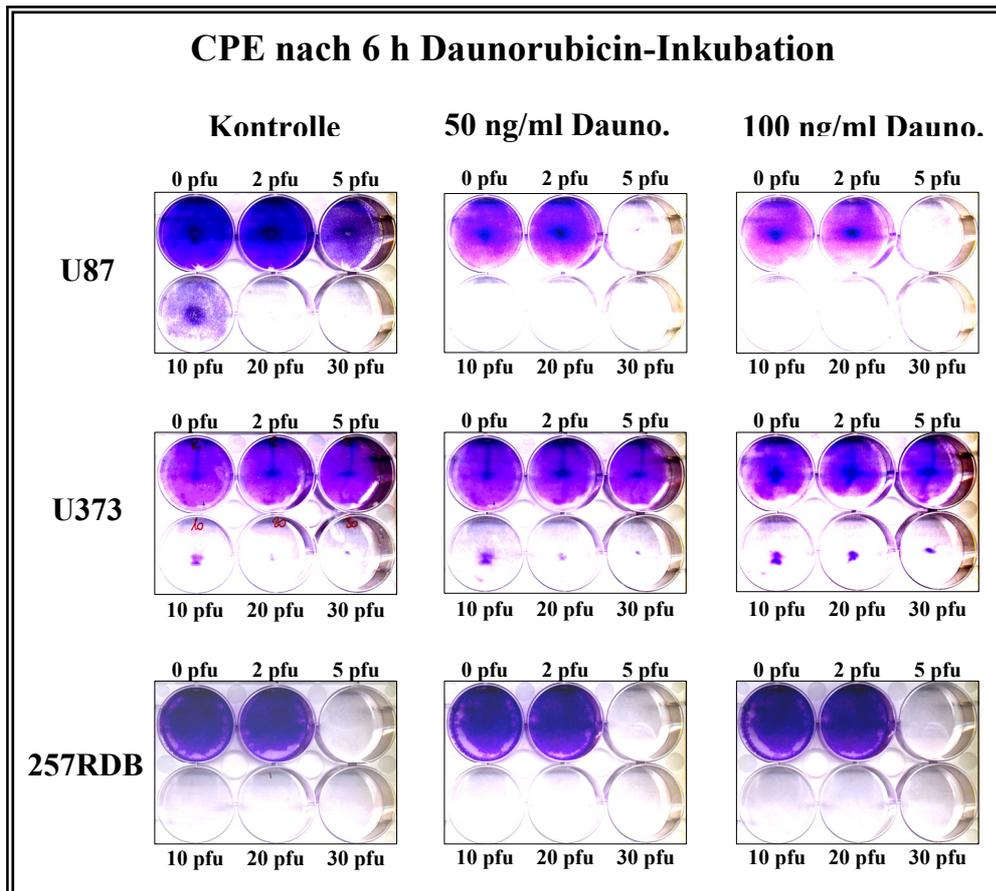
### **3.11.2.6 Verstärkung des zytopathischen Effektes von dl520 in den U87-Zellen durch Daunorubicin, keine Erhöhung in den U373-Zellen**

Der zytopathische Effekt von dl520 sollte ebenfalls in Kombination mit dem interkalierenden Zytostatikum Daunorubicin untersucht werden. Abbildung 48 zeigt, dass in der U87-Kontrollreihe, die Zellen durch 20 pfu dl520 komplett in Lyse gingen, und mit 10 pfu dl520 der Zellrasen nur noch zu 50 % Konfluenz zeigte. Schon nach Inkubation mit 50 ng/ml Daunorubicin stieg der zytopathische Effekt von dl520, und 5 pfu lysierten den kompletten Zellrasen der U87-Zellen. Nach 6 h Inkubation mit 100 ng/ml Daunorubicin konnte der zytopathische Effekt nicht weiter gesteigert werden.

Im Gegensatz dazu konnte der zytopathische Effekt von dl520 in den U373-Zellen unter Daunorubicin-Inkubation gar nicht gesteigert werden. In der Kontrollreihe sowie nach Inkubation mit 50 bzw. 100 ng/ml Daunorubicin wurden die U373-Zellen alle zu 90 % von 10 pfu dl520 lysiert. Das Plattenzentrum bildete die Ausnahme, in dem die Zellen aufgrund eines Fehlers beim Ausplattieren überkonfluent gewachsen waren, und das Virus die Zellen nicht erreichen konnte.

Gleiches galt für die Inkubation von Daunorubicin auf den 257RDB-Zellen. Die Lysefähigkeit von dl520 konnte in diesen nicht gesteigert werden. Sowohl die Kontrolle, als auch die mit 50 und mit 100 ng/ml Daunorubicin inkubierten Zellen wurden von der gleichen moi von 5 pfu dl520 komplett lysiert (Abb. 48).

Nachdem die Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch verschiedene Zytostatika im CPE-Test nachgewiesen werden konnte, sollte in der Southern Blot Analyse untersucht werden, ob dieser Effekt mit einer erhöhten viralen DNA-Produktion in Zusammenhang stand.



**Abb. 48 Verstärkte Zellyse von dl50 durch Daunorubicin in den U87-Zellen, jedoch nicht in den U373-Zellen.** Nach Inkubation mit 0, 50 bzw. 100 ng/ml Daunorubicin für 6 h wurden die Zellen mit dem Adenovirus dl520 infiziert und die Kristallviolett-Färbung 5 d nach Infektion angefertigt. Der onkolytische Effekt von dl520 wurde in U87-Zellen verstärkt, jedoch nicht in den U373- oder den MDR-positiven 257RDB-Zellen. Weitere Informationen siehe Text.

CPE: *cytopathic effect*, d: Tag(e), Dauno.: Daunorubicin, h: Stunde(n), pfu: *plaque forming unit(s)*.

### 3.11.3 Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen mittels Zytostatika – keine Erhöhung in den MDR-positiven 257RDBs

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung hatten gezeigt, dass YB-1 durch Bestrahlung und das Zytostatikum Irinotecan in den Kern transloziert wurde. Unsere Hypothese besagte, dass nuklear lokalisiertes YB-1 die adenovirale Replikation verbessert. Die YB-1 Kernlokalisierung konnte in den bisher durchgeführten Untersuchungen an den Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung erhöht werden. Anstatt der Bestrahlung sollte nun durch Zytostatika ein genotoxischer Stress auf die Zellen ausgeübt werden und damit zu einer Erhöhung der YB-1 Kernlokalisierung führen. Des Weiteren sollte der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A untersucht werden, welcher über eine Erhöhung der Transduktionseffizienz zu einer verbesserten adenoviralen Replikation führen sollte.

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Für die Southern Blot Analyse wurden die Zellen für bestimmte Zeiträume mit dem jeweiligen Zytostatikum inkubiert, mit 10 pfu des Adenovirus dl520 infiziert, bevor 72 h später ihre DNA isoliert wurde. Die eingesetzten Konzentrationen sollten in den Zellen nur Stress auslösen, diese jedoch nicht abtöten, so dass Konzentrationen unterhalb der IC<sub>50</sub>-Werte eingesetzt wurden.

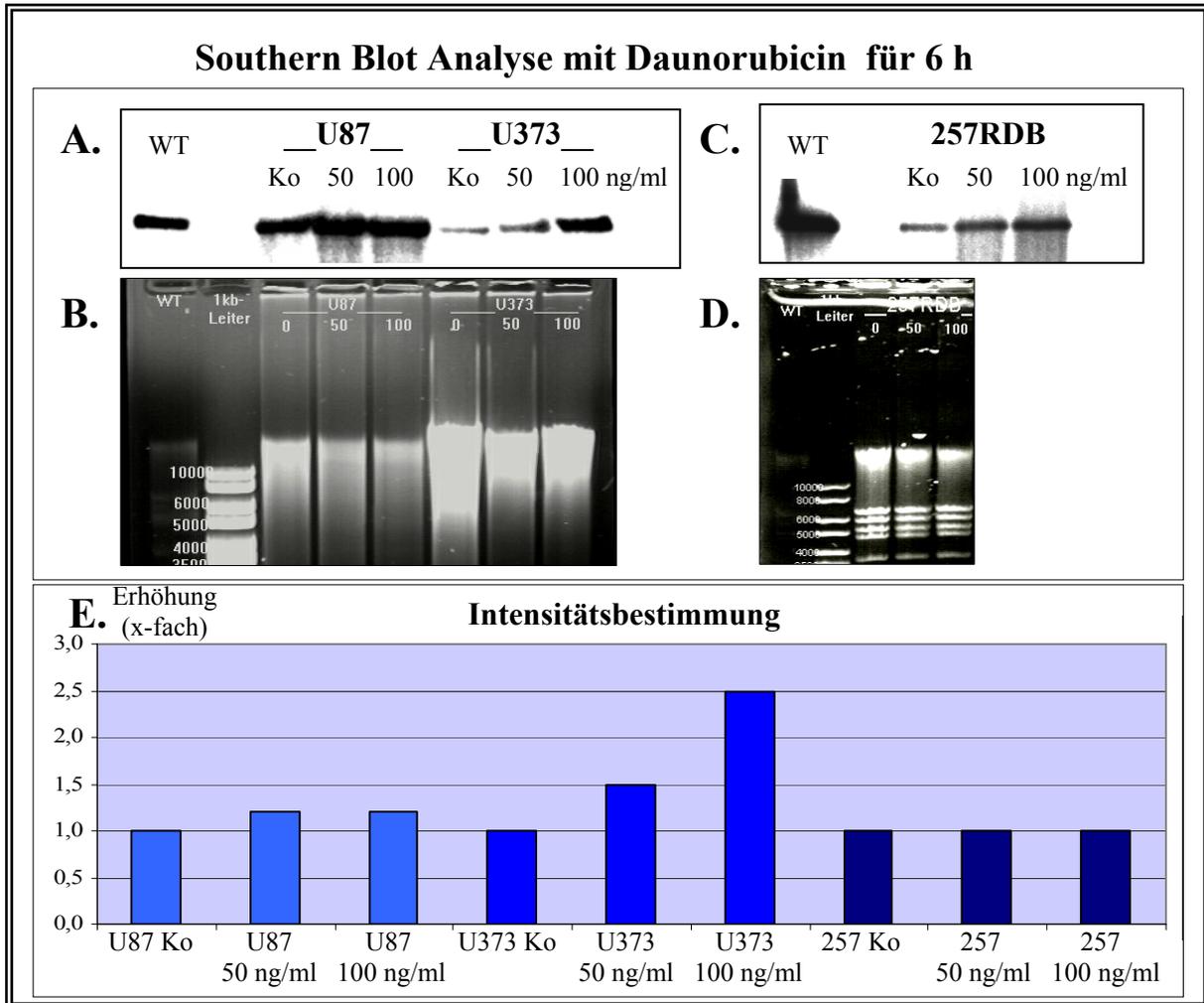
#### **3.11.3.1 Signifikante Erhöhung der viralen Replikation durch Daunorubicin in den U373-Zellen, marginale Erhöhung in den U87-Zellen**

Die unterhalb der IC<sub>50</sub>-Werte gelegenen Konzentrationen von 50 bzw. 100 ng/ml Daunorubicin verblieben für 6 h auf den U87-, U373- und 257RDB-Zellen. Wie in Abbildung 49 B dargestellt, wurden bei den U87-Proben die gleichen DNA-Mengen aufgetragen. Die Kontrolle der U373-Zelllinie enthielt wesentlich mehr DNA als die mit Zytostatika inkubierten Proben. Um die Steigerung des E2<sub>late</sub>-Signales genauer bestimmen zu können, wurde die Dichte der DNA-Signale in den Agarosegelen und die der Southern Blot Signale bestimmt, verrechnet und die Steigerung des E2<sub>late</sub>-Signals graphisch in Abb. 49 E dargestellt. Das E2A-Signal der U87-Zellen wurde sowohl durch 50 als auch durch 100 ng/ml Daunorubicin nur um 20 % (1,2-fach) gesteigert (Abb. 49 E). Betrachtete man die U373-Zelllinie in der Southern Blot Analyse, ergab sich nach Einbeziehung der erhöhten Agarosegel-Werte eine 1,5-fache Steigerung bei einer Inkubation mit 50 ng/ml und eine 2,5-fache Steigerung nach Inkubation mit 100 ng/ml Daunorubicin.

In Abbildung 49 D liegt das Agarosegel der 257RDB-Zelllinie vor, in welchem zu erkennen ist, dass von der Kontroll-Probe etwas mehr DNA als von den Zytostatika-Proben aufgetragen worden war. Zwar stiegen die Southern Blot Signale in Abbildung 49 C nach Inkubation mit Zytostatika, jedoch ergab sich keine Steigerung bei beiden mit Daunorubicin inkubierten Proben nach Herausrechnung der vermehrt aufgetragenen DNA (Abb. 49 E).

Somit konnte die DNA-Replikation von dl520 durch Daunorubicin in den U373-Zellen signifikant und in den U87-Zellen marginal gesteigert werden. In den 257RDB-Zellen dagegen wurde die Replikation nicht gesteigert.

Als nächstes sollte die DNA-Replikation von dl520 in Kombination mit dem Mitose-Hemmstoff Docetaxel durchgeführt werden.



**Abb. 49 Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 durch Daunorubicin in den Glioblastom-Zellen, jedoch nicht in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen.** U87-, U373- und 257RDB-Zellen wurden für 6 h mit 0, 50 bzw. 100 ng/ml Daunorubicin inkubiert und dann mit 10 pfu Adenovirus dl520 infiziert. Die virale Replikation wurde in den Glioblastom-Zelllinien durch Daunorubicin erhöht (A), in den MDR-positiven 257RDB-Zellen nicht (C). Abb. B und D zeigen die zugehörigen Agarosegele. Abb. E stellt die Intensitätserhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle dar. Weitere Informationen siehe Text.  
bp: base pair(s), h: Stunde(n), kb: kilo base(s), Ko.: Kontrolle.

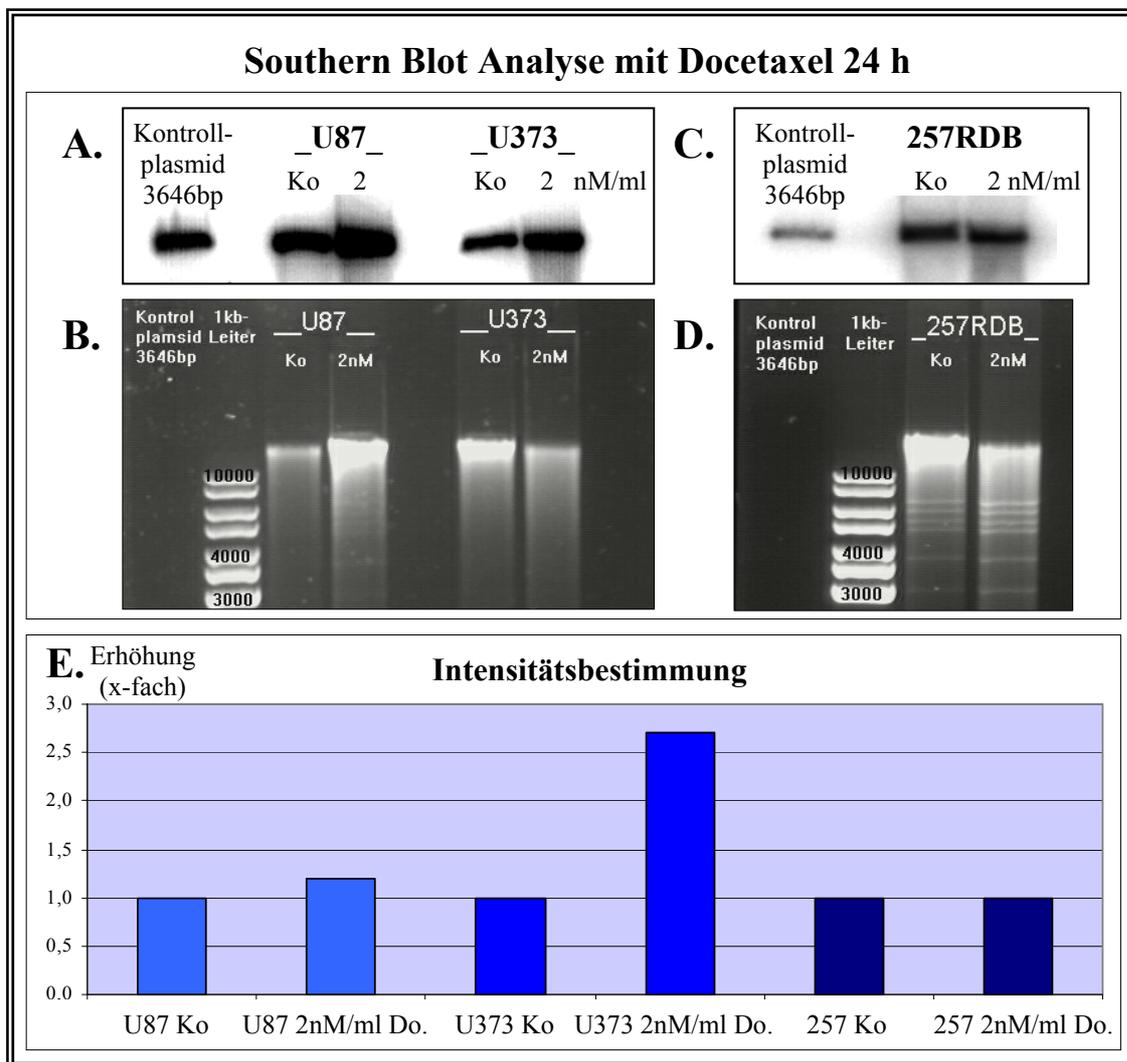
### 3.11.3.2 Signifikante Erhöhung der viralen Replikation durch Docetaxel in den U373-Zellen, marginale Erhöhung in den U87-Zellen

Bei der Untersuchung der Southern Blot Analyse mit Docetaxel wurden für alle Zelllinien die gleiche Konzentration von 2 nM/ml Docetaxel für 24 h eingesetzt. Im Agarosegel in Abbildung 50 B ist zu sehen, dass von der mit Zytostatika inkubierten U87-Probe mehr DNA als von der Kontroll-Probe aufgetragen worden war. Ebenso befand sich mehr DNA auf dem Gel bei der U373-Kontrolle als bei der U373-Probe mit Zytostatika. Bei Betrachtung der E2A-Signale im Southern Blot zeigte sich in beiden Zelllinien ein stärkeres Signal nach Zugabe von Docetaxel (Abb. 50 A). Da von der U87 Kontroll-Probe mehr DNA

### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

aufgetragen worden war, ergab die Umrechnung der Dichtebestimmung nur einer Steigerung um 20 % (1,2-fach) (Abb. 50 E). Bei der U373-Zelllinie gestattete die geringere DNA-Menge in der Zytostatika-Probe die Annahme, dass das Signal noch stärker hätte ausfallen können. Die Dichtebestimmungen und -umrechnungen ergaben eine Steigerung des E2late-Signals in den U373-Zellen nach Inkubation mit 2 nM/ml Docetaxel um 270 % (2,7-fach).

Die Zytostatika-Probe der 257RDB-Zellen enthielt eine geringere DNA-Menge als die Kontroll-Probe (Abb. 50 D). Die Southern Blot Analyse ergab somit eine gleich intensive Expression des E2A-Signales der 257RDB-Zellen mit und ohne Docetaxel (Abb. 50 C). Diese Werte wurden durch die Dichtebestimmung bestätigt (Abb. 50 E).



**Abb. 50 Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 durch Docetaxel in den Glioblastom-Zellen.** U87-, U373- und 257RDB-Zellen wurden für 24 h mit 0 bzw. 2 nM/ml Docetaxel inkubiert und dann mit 10 pfu Adenovirus dl520 infiziert. Die virale Replikation wurde in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch Docetaxel erhöht (A, E), in den MDR-positiven 257RDB-Zellen nicht (C, E). Abb. B und D zeigen die zugehörigen Agarosegele. Abb. E stellt die Intensitätserhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle dar. Weitere Informationen siehe Text.

bp: base pair(s), Do.: Docetaxel, h: Stunde(n), kb: kilo base(s), Ko.: Kontrolle, M: Molar.

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Somit konnte die DNA-Replikation von dl520 durch Daunorubicin in den U373-Zellen signifikant und in den U87-Zellen marginal gesteigert werden.

Als nächstes wurde die DNA-Replikation nach Inkubation mit dem Topoisomerase-Hemmstoff Irinotecan untersucht.

#### **3.11.3.3 Starke Erhöhung der viralen Replikation in den Glioblastom-Zellen durch Inkubation mit Irinotecan in nicht toxischen Konzentrationen**

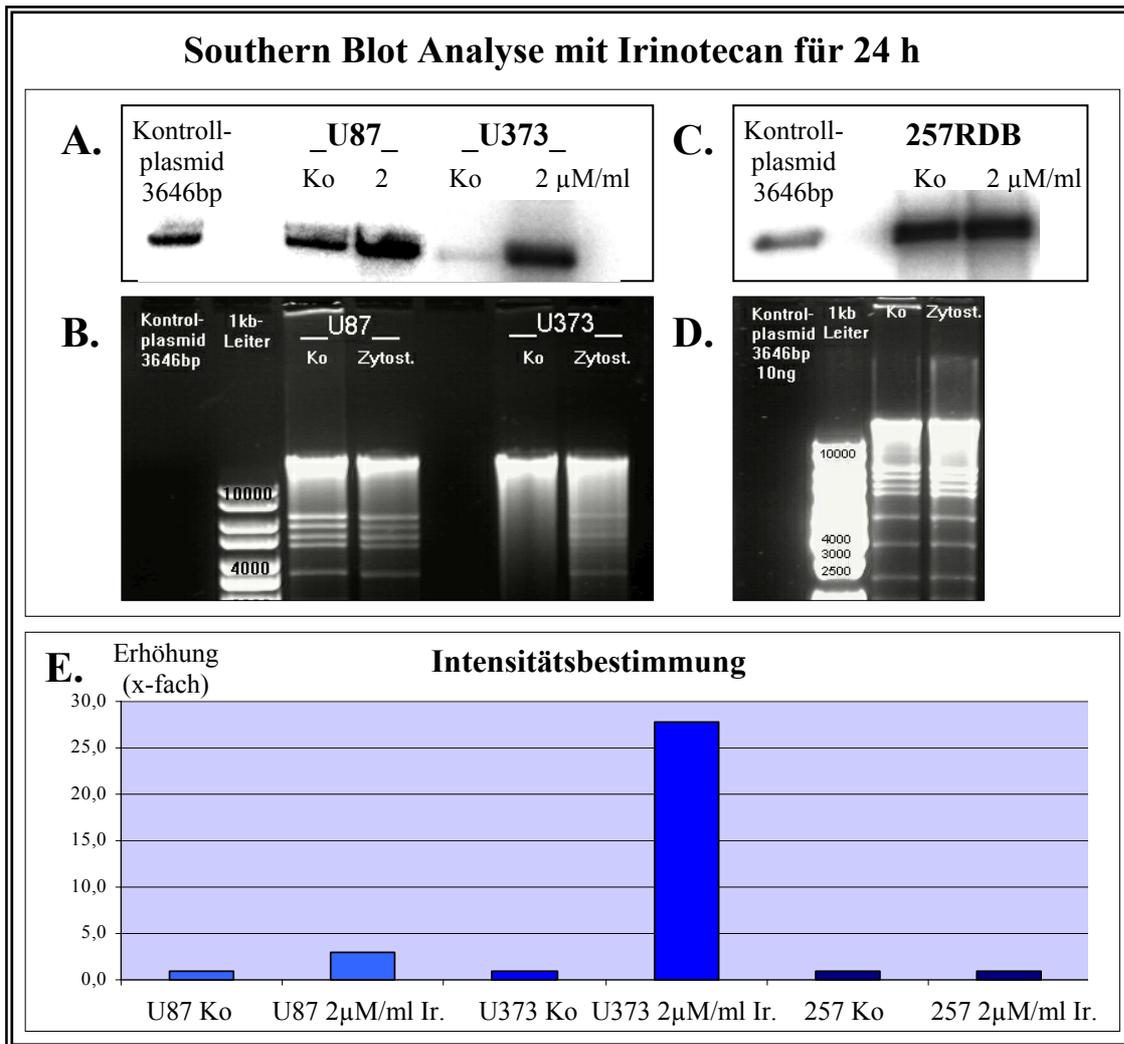
Bei der folgenden durchgeführten Southern Blot Analyse lag die eingesetzte Irinotecan-Konzentration von 2  $\mu\text{M}/\text{ml}$  (24 h) weit unterhalb der  $\text{IC}_{50}$ -Werte von U87 und U373. Das Agarosegel in Abbildung 51 B belegt gleich aufgetragene DNA-Mengen der U373-Proben und eine minimal geringere DNA-Menge der U87 Zytostatika-Probe im Vergleich zur Kontrolle. Nach Hybridisierung stellte sich eine Verstärkung des E2A-Signals in beiden Glioblastom-Zelllinien heraus, jedoch besonders dominant in den U373-Zellen nach Inkubation mit 2  $\mu\text{M}$  Irinotecan für 24 h (Abb. 51 A). Die Dichtebestimmung ergab eine im Vergleich zur Kontrolle in den U87-Zellen 2,9-fach und in den U373-Zellen 27,8-fach gesteigerte Replikation (Abb. 51 E).

Von den 257RDB-Proben waren ohne und mit Inkubation von 2  $\mu\text{M}$  Irinotecan im Agarosegel gleiche DNA-Mengen aufgetragen worden (Abb. 51 D). Bei Betrachtung der Southern Blot Analyse in Abbildung 51 C und der Dichtebestimmung in Abbildung 51 E war keine Verstärkung des E2A-Signales nachweisbar.

Die Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen konnte im Vergleich zu den anderen Einzelgaben der Zytostatika selbst mit einer nicht toxischen Konzentration weit unterhalb des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes stark gesteigert werden. Als nächstes sollte die virale Replikation mit Inkubation des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A untersucht werden.

#### **3.11.3.4 Starke konsekutive Replikationssteigerung von dl520 durch Inkubation mit aufsteigenden Trichostatinkonzentrationen in den Glioblastom-Zellen**

In der Southern Blot Analyse mit Trichostatin A wurden die Versuche für die Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 intensiviert und mit verschiedenen Zytostatikakonzentrationen und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Bei der Inkubationszeit von 24 h wurden 0, 0,25, 0,5 und 0,75  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A und von 5 h die höheren Konzentrationen von 1, 2,5, 5, 7,5 und 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin eingesetzt.



**Abb. 51 Signifikante Erhöhung der Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen durch Irinotecan-Inkubation.** U87-, U373- und 257RDB-Zellen wurden für 24 h mit 0 bzw. 2  $\mu\text{M/ml}$  Irinotecan inkubiert und dann mit 10 pfu Adenovirus dl520 infiziert. Die virale Replikation wurde in den U87- und U373-Zellen durch Irinotecan stark erhöht (A, E). Die Replikation wurde in den MDR-positiven 257RDB-Zellen jedoch nicht verstärkt (C, E). Abb. B und D zeigen die zugehörigen Agarosegele. Abb. E stellt die Intensitätserhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle dar. Weitere Informationen siehe Text.

bp: base pair(s), h: Stunde(n), Ir.: Irinotecan, kb: kilo base(s), Ko.: Kontrolle, M: Molar.

Das Agarosegel der U87-Zelllinie bei der 24 h Inkubationszeit in Abbildung 52 B lässt erkennen, dass von der Kontroll-Probe etwas weniger DNA aufgetragen worden war.

Das E2A-Signal wurde im Vergleich zur Kontrolle schon bei einer Trichostatin A-Konzentration von 0,25  $\mu\text{M/ml}$  erhöht. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration stieg die Expression des E2A-Signals nicht an (Abb. 52 A). Die Intensitätsmessung und Einberechnung der aufgetragenen DNA-Mengen ergaben eine 4,1-fache Erhöhung bei 0,25  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A, jedoch nur eine 3,6-fache bei 0,5  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A und 3,1-fache bei 0,75  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A (Abb. 53 A). Im Agarosegel bei 5 h Inkubationszeit sind die gleichen DNA-Mengen der U87-Proben aufgetragen worden (Abb. 52 D). Aus der

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Southern Blot Analyse und der Intensitätsbestimmung wird ersichtlich, dass die *E2late*-Expression ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  um 20 % erhöht wurde. Bei Steigerung der Konzentration intensiverte sich die Expression des *E2late*-Signals mit 2,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  1,7-fach, mit 7,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  1,8-fach und mit 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$  2,4-fach im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 52 C, 53 B).

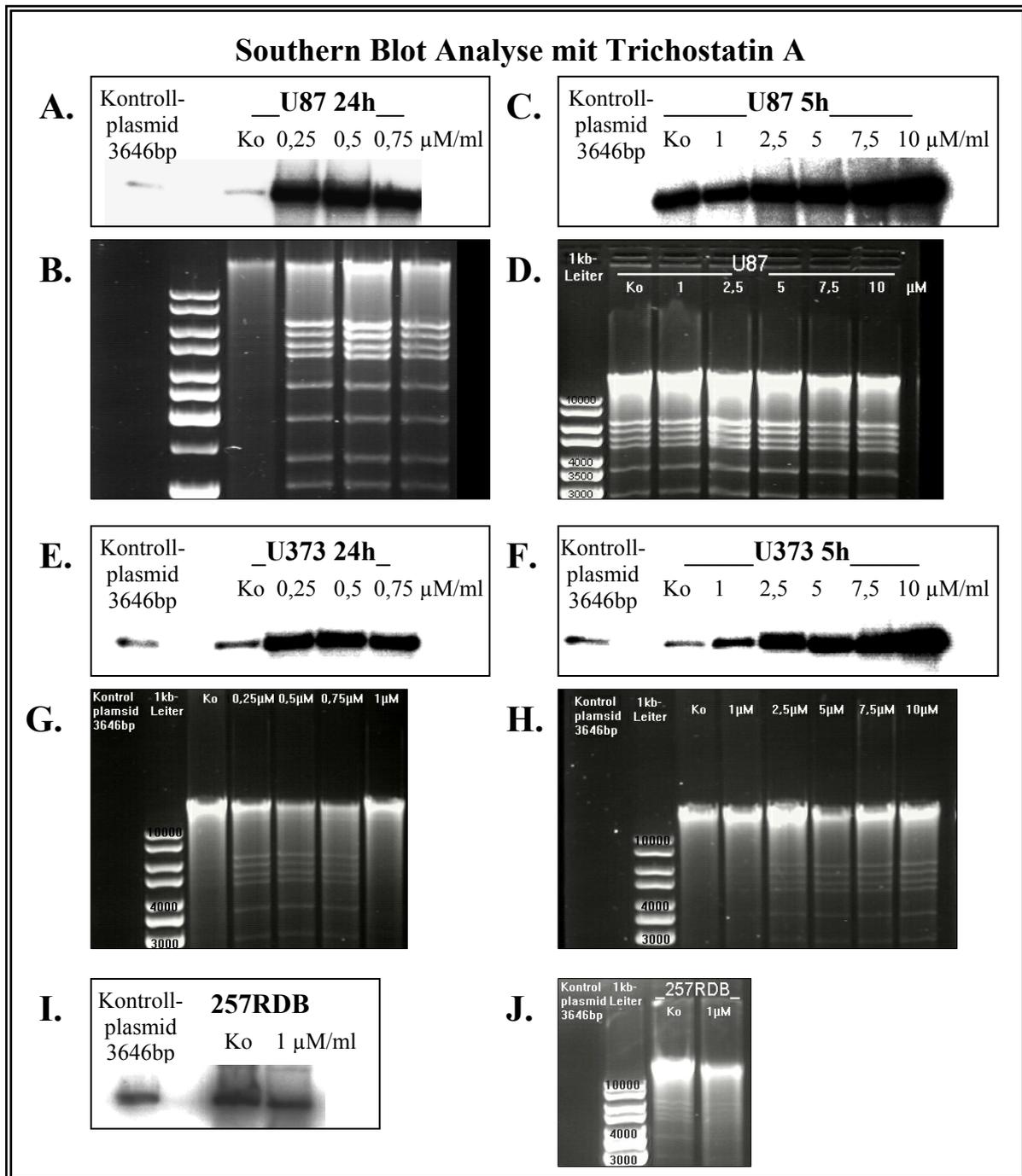
Für die U373-Zellen wurden die gleichen Versuche durchgeführt. Bei Inkubation mit 0, 0,25, 0,5 und 0,75  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A für 24 h war von der Kontrolle, wie im Agarosegel in Abbildung 52 G zu sehen, eine höhere DNA-Menge aufgetragen worden. Von der 0,25  $\mu\text{M}/\text{ml}$ -Probe war weniger DNA als von der Kontroll-Probe aber minimal mehr als von den anderen beiden Zytostatikakonzentrationen auf dem Gel vorhanden. Trotz der erhöhten DNA-Menge in der U373-Kontrolle ergab die Southern Blot Analyse in Abbildung 52 E eine Erhöhung des *E2late*-Signal ab einer Konzentration von 0,25  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A. In der Intensitätsbestimmung in Abbildung 53 A stellte sich eine 4,9-fache Erhöhung nach Inkubation mit 0,25  $\mu\text{M}/\text{ml}$ , eine 6-fache Erhöhung mit 0,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  und eine 5,6-fache Erhöhung nach Inkubation mit 0,75  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A für 24 h im Vergleich zur Kontrolle heraus. Das Agarosegel der U373-Proben nach 5 h Trichostatin A-Inkubation zeigt, dass bis auf die 5  $\mu\text{M}/\text{ml}$ -Probe, die eine geringere DNA-Menge enthielt, gleiche DNA-Mengen aufgetragen wurden (Abb. 52 H). Die Expression des *E2late*-Signals der für 5 h inkubierten U373-Proben wurde mit aufsteigender Trichostatin A-Konzentration erhöht (Abb. 52 F). Die Intensitätsbestimmung bestätigte, dass im Vergleich zur Kontrolle das Southern Blot Signal mit 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  1,9-fach, mit 2,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  4,7-fach, mit 5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  6-fach, mit 7,5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  6,9-fach und mit 10  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A für 5 h 13,2-fach gesteigert wurde (Abb. 53 B).

Für die 257RDB-Zellen wurden nur Untersuchungen mit 24 h Inkubation und 1  $\mu\text{M}/\text{ml}$  Trichostatin A durchgeführt. Im Agarosegel in Abbildung 52 J zeigt sich, dass von den mit Zytostatika inkubierten Proben weniger DNA aufgetragen worden war. Dies ging einher mit dem stärkeren Southern Blot Signal der Kontrolle in Abbildung 52 I. Die Intensitätsbestimmung der Southern Blot Signale unter Einbeziehung der aufgetragenen DNA-Mengen ergab gleich starke Signale und somit keine Steigerung der Replikation nach Trichostatin A-Inkubation (Abb. 53 A).

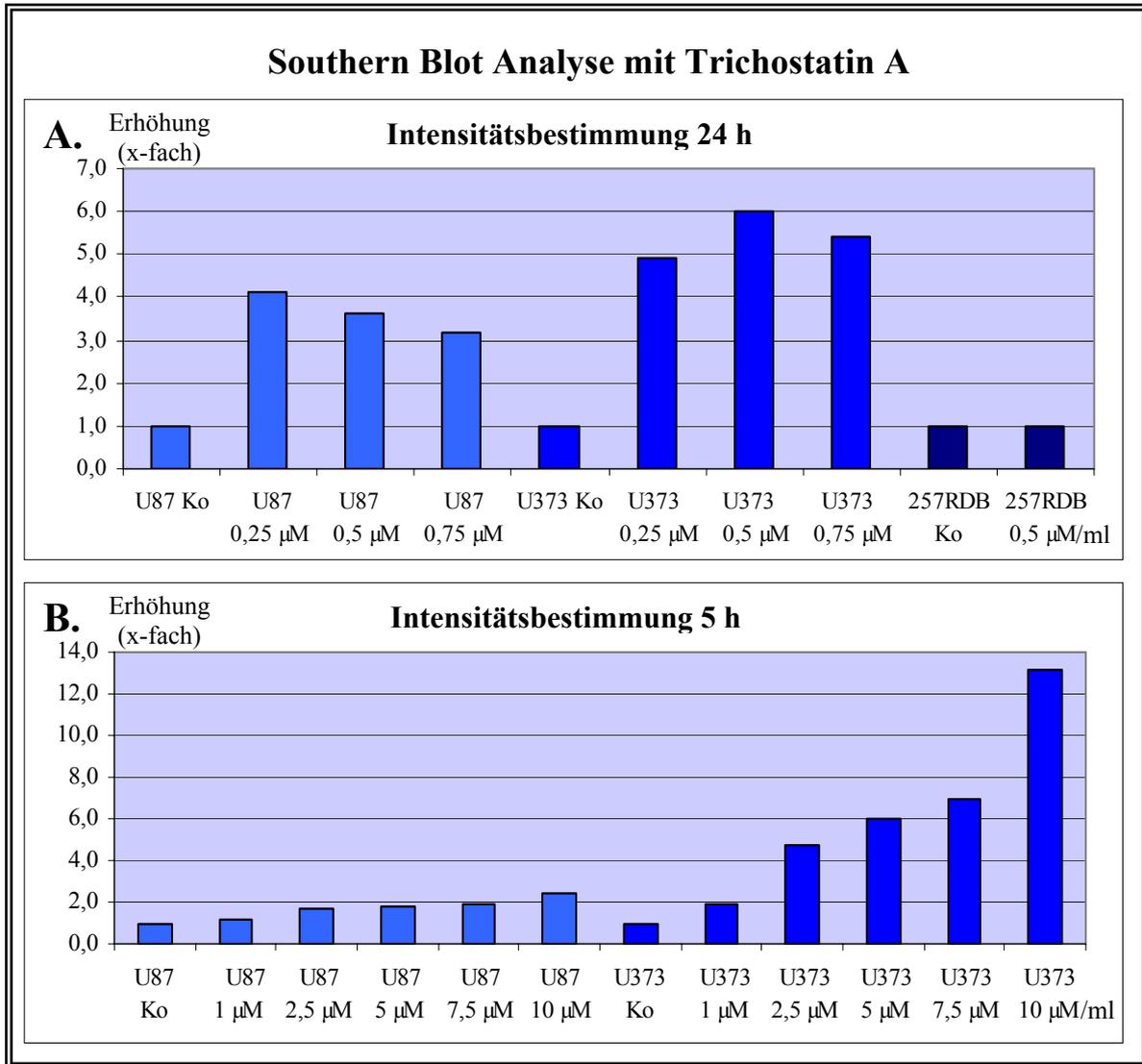
Somit konnte eine 5 h und eine 24 h Inkubation mit aufsteigenden Trichostatin A-Konzentrationen die Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen signifikant steigern, jedoch nicht in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen. Anhand einer letzten Southern Blot

\_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisierung und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Analyse sollte die Replikation von dl520 in Kombination mit Irinotecan + Trichostatin A untersucht werden.



**Abb. 52** Starke konsekutive Steigerung der Replikation von dl520 durch Inkubation mit aufsteigenden Trichostatin A-Konzentrationen für 24 und 5 h in den Glioblastom-Zellen. U87-, U373- und 257RDB-Zellen sind 24 h bzw. 5 h mit verschiedenen Trichostatin-Konzentrationen inkubiert worden, bevor sie mit 10 pfu des Adenovirus dl520 infiziert wurden. Die Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 wurden bei beiden Inkubationszeiten erhöht (A, C, E, F), jedoch nicht in den MDR-positiven 257RDB-Zellen (I). Letzteres wurde durch die Intensitätsbestimmung in Abb. 52 bestimmt. Abb. B, D, G, H und J zeigen die zugehörigen Agarosegele. Weitere Informationen siehe Text.  
bp: base pair(s), h: Stunde(n), kb: kilo base(s), Ko.: Kontrolle, M: Molar.



**Abb. 53** Starke konsekutive Steigerung der Replikation von dl520 durch Inkubation mit aufsteigenden Trichostatin A-Konzentrationen für 24 und 5 h in den U87- und U373-Zellen. Die Intensität der E2A-Signale in den Zelllinien U87, U373 und 257RDB wurde immer im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die gleich 1 gesetzt wurde, bestimmt. Die virale Replikation des Adenovirus dl520 wurde mit steigenden Trichostatin A-Konzentrationen in µM/ml konsekutiv erhöht, jedoch nicht in den 257RDB-Zellen. Das stärkere E2A-Signal in den 257RDB-Zellen nach Inkubation mit Trichostatin A ergab sich aus der erhöht aufgetragenen DNA-Menge (siehe Abb. 51). Weitere Informationen siehe Text.  
h: Stunde(n), Ko.: Kontrolle, M: Molar.

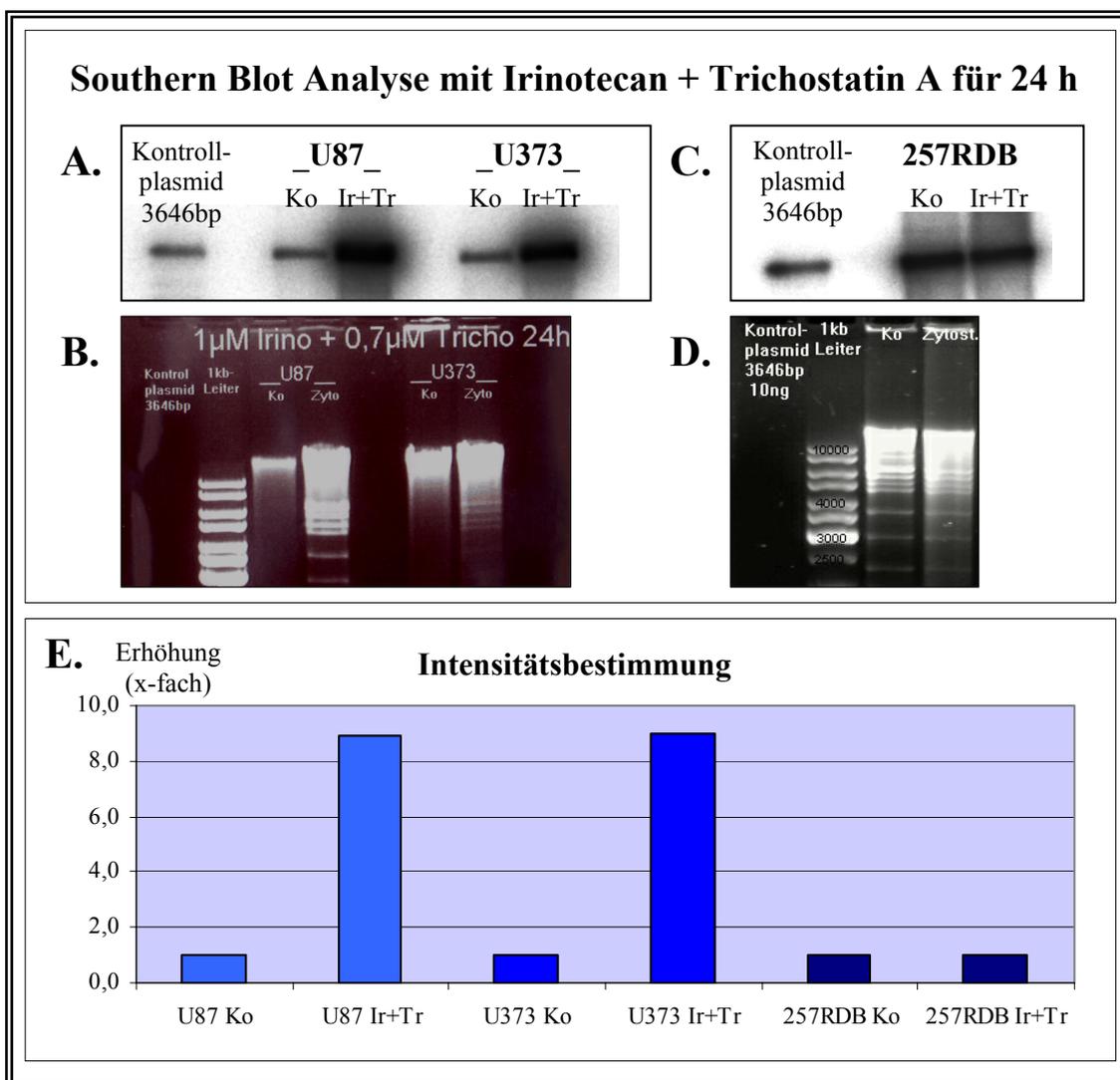
### 3.11.3.5 Stärkste Steigerung der Replikation von dl520 in beiden Glioblastom-Zellen durch Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A

Auf die Zytostatika-Kombination Irinotecan + Trichostatin A hatten die Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 am stärksten im IC<sub>50</sub>-Test reagiert und zeigten den höchsten Zelltod. Die Konzentrationen 1 µM/ml Irinotecan + 0,7 µM/ml Trichostatin A wurden für die Southern Blot Analyse verwendet. Das Agarosegel in Abbildung 54 B zeigt, dass von der Zytostatika-Probe der U87-Zelllinie mehr DNA aufgetragen worden ist. Bei den U373-Proben

### 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation und der CAR-Expression durch Chemotherapie

waren die DNA-Mengen gleich. In der Southern Blot Analyse konnte die Expression des E2late-Signales in beiden Zelllinien stark gesteigert werden. Aus der Intensitätsbestimmung ergab sich eine 8,9-fache Erhöhung in der U87-Zelllinie und eine 9-fache Erhöhung in der U373-Zelllinie nach Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A für 24 h.

Die 257RDB-Zelllinie dagegen zeigte kein verstärktes E2A-Signal nach Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A. Im Agarosegel in Abbildung 54 D ist zu erkennen, dass gleiche DNA-Mengen aufgetragen wurden. Die Southern Blot Analyse ergab gleich starke E2late-Signale (Abb. 54 C). Dies wurde durch die Intensitätsbestimmung bestätigt (Abb. 54 E).



**Abb. 54** Signifikante Steigerung der viralen Replikation den Glioblastom-Zellen durch Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A. U87-, U373- und 257RDB-Zellen wurden für 24 h mit 2 μM/ml Irinotecan + 0,5 μM/ml Trichostatin A inkubiert und dann mit 10 pfu Adenovirus dl520 infiziert. Die Replikation wurde in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 durch die Kombination erhöht (A, E), in den MDR-positiven 257RDB-Zellen nicht (C, E). Abb. B und D zeigen die zugehörigen Agarosegele. Abb. E stellt die Intensitätserhöhung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle dar. Weitere Informationen siehe Text.

bp: base pair(s), h: Stunde(n), Ir+Tr: Irinotecan + Trichostatin A, kb: kilo base(s), Ko.: Kontrolle, M: Molar.

### \_\_ 3.11 Erhöhung der YB-1 Kernlokalisierung und der CAR-Expression durch Chemotherapie

Somit konnte die virale Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen durch Inkubation mit der Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A signifikant gesteigert werden, jedoch nicht in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen, in denen YB-1 hauptsächlich nuklear lokalisiert ist.

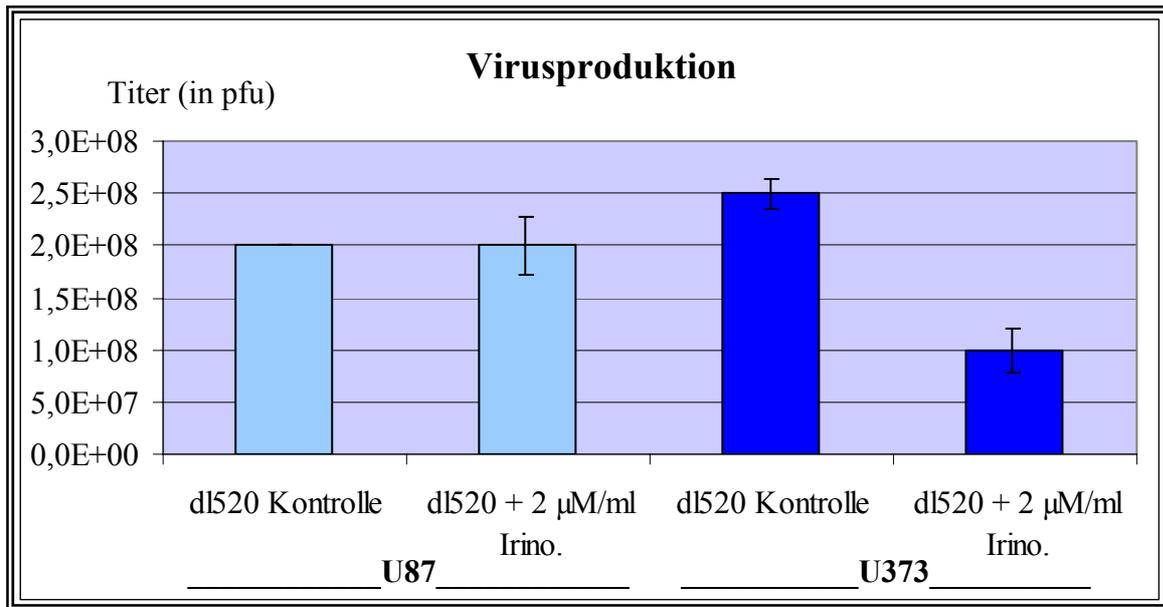
Nachdem eine Steigerung der Replikation von dl520 mittels Kombination mit allen untersuchten Zytostatika und dem Histondeacetylase-Inhibitor gezeigt werden konnte, sollte als nächstes die Virusproduktion von dl520 vor und nach Inkubation mit dem Topoisomerase-Hemmstoff Irinotecan untersucht werden.

#### **3.11.4 Kein bzw. nur ein gering inhibitorischer Effekt von Irinotecan auf die Virusproduktion von dl520**

Nach Beobachtung der Erhöhung des zytopathischen Effektes und der viralen Replikation durch Inkubation mit dem Topoisomerase-Hemmstoff Irinotecan war weiterhin zu analysieren, ob die Inkubation mit Irinotecan die Virusproduktion von dl520 in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 beeinflusste. Dies war vor allem von Interesse, da berichtet worden war, dass adenovirale Replikation die Expression der Topoisomerase I und II fördert, welche beide für eine effiziente adenovirale Replikation benötigt werden. Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit 2 µM/ml Irinotecan inkubiert, mit 50 pfu dl520 infiziert und 72 h später von der Medium-Zellsuspension ein Plaquetest auf 293-Zellen durchgeführt.

Wie in Abbildung 55 dargestellt sank die Virusproduktion von dl520 in den U87-Zellen nach Inkubation mit Irinotecan nicht. Somit ergab sich bei den U87-Zellen mit und ohne Irinotecan einen Virusertrag von  $2 \times 10^8$  pfu. In den U373-Zellen sank die Virusproduktion nach Inkubation mit Irinotecan von  $2,5 \times 10^8$  auf  $1 \times 10^8$  pfu. Somit hatte die Inkubation mit Irinotecan keinen bzw. nur einen gering inhibitorischen Effekt auf die Partikelbildung bzw. Virusproduktion von dl520.

Als nächstes sollte der Einfluss des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A auf die Expression des Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptors der Glioblastom-Zellen untersucht werden.



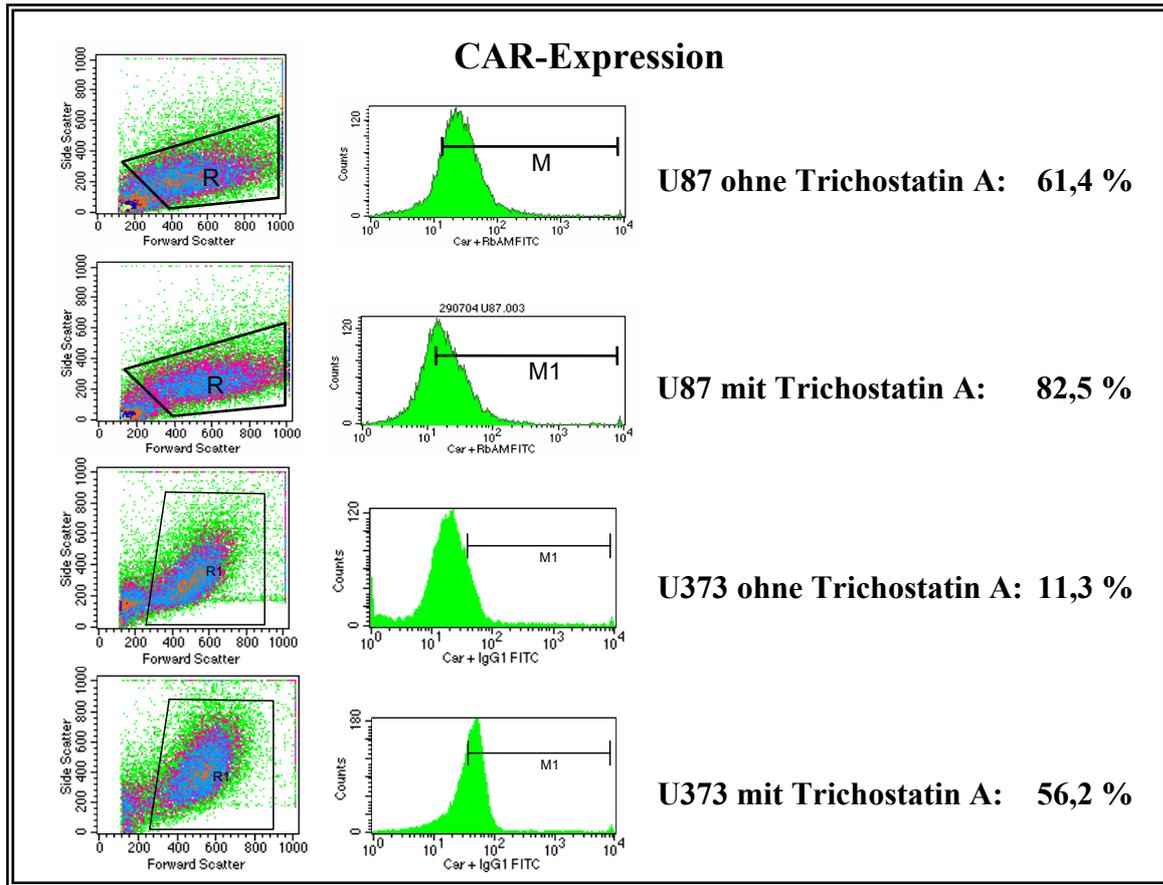
**Abb. 55 Kein bzw. ein nur gering inhibitorischer Effekt von Irinotecan auf die Virusproduktion von dl520.** Die Zelllinien U87 und U373 sind für 24 h mit 2 µM/ml Irinotecan inkubiert und dann mit 50 pfu Adenovirus dl520 infiziert worden. Nach 72 h wurde ein Plaquetest auf 293-Zellen von den Zellen und ihrem Überstand angefertigt. Die Virusproduktion von dl520 war gleichbleibend in den U87-Zellen und leicht verringert in den U373-Zellen nach Inkubation mit Irinotecan. Die Untersuchung wurde zweimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die schmalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Weitere Informationen siehe Text.

h: Stunde(n), Irino.: Irinotecan, M: Molar, pfu: *plaque forming unit(s)*.

### 3.11.5 Erhöhung der CAR Expression in den Glioblastom-Zellen durch Trichostatin A

Die Adsorption und Internalisierung eines Adenovirus vollzieht sich über eine Interaktion sowohl zwischen den Penton-Basen seines Kapsids und zellulären Integrinen als auch zwischen dem Fiber Knob des Kapsids und dem Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptor (CAR). Die Expression von CAR auf der Oberfläche der Glioblastom-Zelllinien U87 und U373 wurde am Zellsorter (FACS = *fluorescence activated cell sorting*) untersucht, und es wurde analysiert, ob die CAR-Expression nach Inkubation mit Trichostatin A anstieg.

Hierzu wurden die Zellen mit 0 bzw. 1 µM/ml Trichostatin A für 24 h inkubiert, nach weiteren 48 h isoliert und mit einem Antikörper, der gegen den Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptor gerichtet ist, inkubiert. Dessen Fluoreszenz wurde dann am FACS bestimmt. Wie in Abbildung 56 gezeigt, stieg die CAR-Expression in den U87-Zellen von 61,4 % der unbehandelten auf 82,5 % der mit Trichostatin A inkubierten Zellen und in den U373-Zellen von 11,3 % ohne auf 56,2 % mit Trichostatin A-Inkubation. Somit konnte der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A die CAR-Expression der Glioblastom-Zellen erfolgreich steigern.



**Abb. 56 Erhöhung der CAR-Expression auf den Glioblastom-Zellen durch Trichostatin A-Inkubation.** Die Glioblastom-Zellen U87 und U373 wurden für 24 h mit 0 bzw. 0,5  $\mu\text{M/ml}$  Trichostatin A inkubiert und 2 Tage nach Inkubation ihre CAR-Expression am Zellsorter bestimmt. Beide Zellen exprimierten mehr Coxsackie-Adenovirale-Rezeptoren nach Inkubation mit Trichostatin A. Weitere Informationen siehe Text.

CAR: Coxsackie-Adenoviraler-Rezeptor, h: Stunde(n).

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das ansonsten replikationsdefiziente Adenovirus dl520 einen zytopathischen Effekt und effiziente Replikation in Glioblastom-Zellen auslöste, in denen das Y-Box bindende Protein YB-1 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma akkumuliert war. Des Weiteren konnten Bestrahlung und Chemotherapie die YB-1 Kernlokalisation in den Glioblastom-Zellen erhöhen und damit zu einer Verbesserung der viralen Replikation und Zelllyse von dl520 führen. Drittens wurde eine verbesserte Transduktionsfähigkeit von dl520 nach Inkubation mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A durch Erhöhung der CAR-Expression beobachtet. Als Konsequenz konnte viertens gezeigt werden, dass ein trimodales Therapiekonzept aus einer tumorschädigenden Substanz zur nuklearen YB-1 Akkumulation, einem Histondeacetylase-Inhibitoren zur Erhöhung der Infektionsfähigkeit zusammen mit dem Adenovirus dl520 die wirksamste Strategie war, um mit dl520 eine effiziente Virotherapie durchzuführen. Somit zeigte die Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A die stärkste Zelllyse und die größte Erhöhung der Replikation von dl520. Als letztes führte die Kombination aus dl520 mit Bestrahlung in einem *Proof of Principle in vivo* Mausmodell zu verstärkter Wachstumsinhibition der Glioblastome im Vergleich zur nicht behandelten Kontroll- und mit Virus alleine behandelten Gruppe.

### 4.1 YB-1 abhängige Replikation des Adenovirus dl520 in vielfachresistenten Tumoren

Das Adenovirus dl520 kann aufgrund einer 11 bp-großen Deletion das transaktivierende E1A-13S Protein nicht exprimieren, sondern nur das E1A-12S Protein. Die transaktivierende Wirkung von 12S wird in der Literatur kontrovers diskutiert, wobei meist berichtet wird, dass die *conserved region 3* (CR3), die nur im 13S enthalten ist, zur Transaktivierung der frühen adenoviralen Genpromotoren und damit zur adenoviralen Replikation benötigt wird<sup>15, 108, 171, 190, 224</sup>. 12S kann zwar durch Freisetzung des zellulären E2F aus dem pRb-Komplex den E2*early*-Promoter aktivieren, aber durch fehlende Aktivierung der anderen Gene keine effiziente Replikation und Lyse vermitteln<sup>24, 136, 191, 248</sup>.

Erst durch Holm et al. konnte ein Zusammenhang zwischen der Kernlokalisation von YB-1 und adenoviraler Replikation über den E2*late*-Promoter hergestellt werden<sup>89</sup>. Sie

#### 4.1 YB-1 abhängige Replikation des Adenovirus dl520 in vielfachresistenten Tumoren

konnten zeigen, dass das Adenovirus dl520 in vielfachresistenten 257RDB-Zellen, in denen YB-1 hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, replizieren und Lyse *in vitro* und *in vivo* auslösen kann<sup>89</sup>. dl520 konnte jedoch MDR-sensible HeLa-Zellen, in denen YB-1 im Zytoplasma lokalisiert ist, nicht lysieren. In dieser frühen Arbeit von Holm et al. wurde die Transaktivierung der frühen Gene, zu denen E3 gehört, nicht untersucht. Wir konnten nun belegen, dass dl520 in vielfachresistenten 257RDB-Zellen E1A-12S und E3 wie Wildtyp-Adenovirus transaktivierte, wobei eine Wildtyp-Kontamination von dl520 ausgeschlossen wurde. Im Gegensatz dazu exprimierte dl520 in HeLa-Zellen E1A-12S mRNA nur sehr schwach und E3 mRNA gar nicht, weil das 12S Protein ohne die *conserved region 3* in YB-1 Kern-negativen Zellen die frühen Gene wie E3 und E4 nicht transaktivieren kann. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass dl520 in vielfachresistenten Zellen über sein 12S Protein mit Hilfe des nuklear akkumulierten YB-1 den *E2late*-Promoter und darüber auch den E3-Promoter aktivieren kann. Ob die Bindung von E1A-12S an Rb und an p300 von Bedeutung ist, muss noch untersucht werden<sup>92, 138, 244, 258</sup>.

Der Einfluss der E1-Region auf die adenovirale Replikation bzw. seinen zytopathischen Effekt wurde genauer untersucht. Die Versuche wurden an Glioblastom-Zellen aufgrund der immer noch infausten Prognose von Hirntumoren trotz der Fortschritte in therapeutischen Konzepten durchgeführt.

Im CPE-Test dienten das E1-deletierte Adenovirus AdE1- sowie das E1A-deletierte Adenovirus Ad312 als Kontrollviren (Abb. 20). 100 pfu AdE1- verringerten die Zelldichte der vielfachresistenten 257RDB-Zellen um 40 %, wobei in unveröffentlichten Daten von Holm et al. Lyse von 257RDB-Zellen durch 100 bis 200 pfu AdE1- nachgewiesen werden konnten. Bei so hohen Titern können Adenoviren ihre Gene schwach unspezifisch aktivieren.

Das E1A-deletierte Ad312 besaß im Vergleich zu AdE1- die E1B mRNA und lysierte bei hohen pfu-Zahlen die vielfachresistenten 257RDBs effizienter als AdE1-. Somit war ein replikationsfördernder Effekt durch E1B zu vermuten. Holm et al. haben festgestellt, dass E1B55K an der Translokation des Transkriptionsfaktors YB-1 aus dem Zytoplasma in virale Einschlusskörper im Kern beteiligt ist, wo YB-1 die Replikation vermittelt<sup>88</sup>. Virale Einschlusskörper sind Ort der viralen Transkription und Replikation; E1B55K und E4orf6 liegen in ihnen vor<sup>180</sup>.

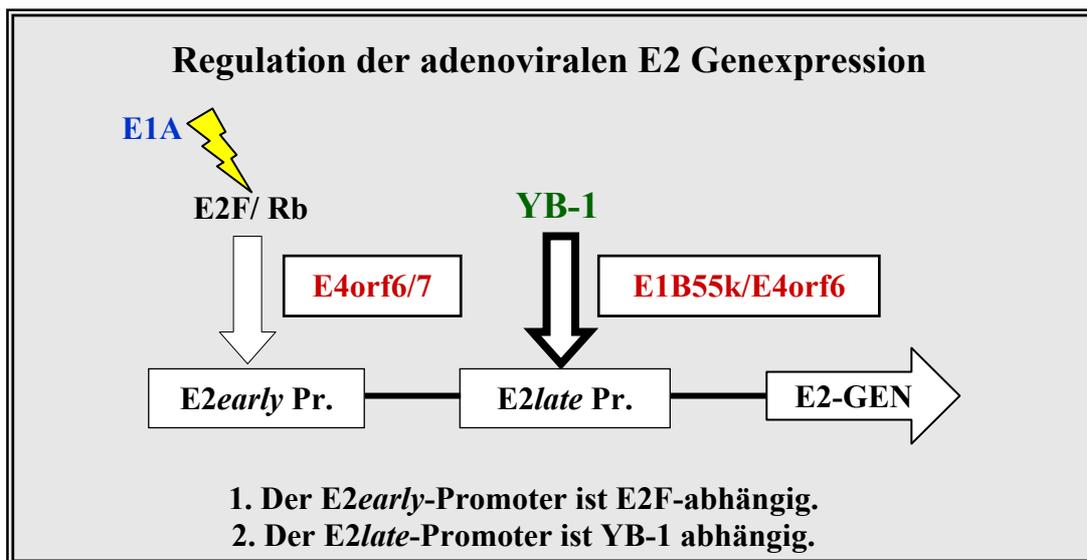
dl520, welches im Vergleich zu Ad312 zusätzlich die E1A-12S mRNA besitzt, lysierte sowohl die vielfachresistenten 257RDB- als auch die Glioblastom-Zellen effizienter als Ad312. Ob dl520 durch das schwach transaktivierende E1A-12S besser als Ad312 wirkte,

#### 4.1 YB-1 abhängige Replikation des Adenovirus dl520 in vielfachresistenten Tumoren

welches kein funktionelles E1A-Protein aufweist<sup>24, 108, 165</sup>, muss noch genauer untersucht werden.

Holm et al. konnten nachweisen, dass nuklear akkumuliertes YB-1 E1-unabhängige Replikation vermitteln kann, und dass YB-1 in HeLa-Zellen zytoplasmatisch und in vielfachresistenten 257RDB-Zellen durch konstante Zytostatika-Exposition hauptsächlich im Kern vorliegt<sup>89</sup>. In den aufgeführten Ergebnissen lysierte dl520 neben den vielfachresistenten 257RDB-Zellen die Glioblastom-Zellen U87 und U373 erfolgreich. In den Glioblastom-Zellen konnten wir eine Teilakkumulation von YB-1 im Kern nachweisen (Abb. 19). Eine adenovirale Abhängigkeit von YB-1 war somit stark anzunehmen, da dl520 um so besser replizierte, je mehr YB-1 primär im Kern lokalisiert war (257RDB > U87/U373 > HeLa).

Aus den Ergebnissen wurde das Y-Box bindende Protein als ein entscheidender Faktor für die virale Replikation bestätigt, und das Anwendungsspektrum von dl520 konnte von vielfachresistenten (MDR-positiven) Tumorzellen auf Tumorzellen, in denen YB-1 nuklear teilakkumuliert ist, erweitert werden (Abb. 57).



**Abb. 57 Zwei Aktivierungswege der adenoviralen Replikation.** 1) Die für die virale Replikation essentiellen E2-Genprodukte werden durch Bindung des durch CR1/2 von E1A freigesetzten E2F in Konjugation mit E4orf6/7 an den E2early-Promoter aktiviert und exprimiert. Alle anderen frühen Gene werden durch die im E1A-13S Protein enthaltene CR3-Region transaktiviert, wobei die Aktivierung von E2 wesentlich später stattfindet als die von E3 und E4, weil Expression von E2 die Synthese von E4orf6/7 additiv unterstützt. Im weiteren Verlauf der Replikation erfolgt ein Wechsel zum E2late-Promoter. 2) Nach Transport von YB-1 durch einen Komplex aus E1B55K und E4orf6 aus dem Zytoplasma oder Kern in die im Nukleus befindlichen viralen Einschlusskörper bindet YB-1 an die invertierte 5'-CCAAT-Sequenz innerhalb des E2late-Promoters und aktiviert die Replikation. Graphik nach Mantwill et al.<sup>152</sup>.

Weitere Informationen siehe Text.

Pr.: Promoter.

#### 4.2 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Bestrahlung

Die primäre Behandlungstechnik von Hirntumoren umfasst neben der chirurgischen Resektion die Strahlentherapie. Bisherige klinische Studien ließen einen synergistischen Effekt von onkolytischen Adenoviren mit Bestrahlung vermuten. In unseren Versuchen konnte effiziente Lyse der Glioblastom-Zellen durch dl520 nachgewiesen werden, vermittelt durch nuklear lokalisiertes YB-1. Das Y-Box bindende Protein ist in zelluläre Reparaturmechanismen involviert, und die Translokation von YB-1 vom Zytoplasma in den Zellkern wird durch UV-Licht und Zytostatika induziert<sup>74, 176, 215, 236</sup>. Aufgrund dieser Reaktion von YB-1 auf zellulären Stress wurde die Effizienz von dl520 in Kombination mit Bestrahlung untersucht, wobei die Hypothese zugrundegelegt wurde, dass die Bestrahlung über eine Erhöhung der YB-1 Kernlokalisation zu einer Verbesserung der onkolytischen Aktivität von dl520 führt.

Die Glioblastom-Zellen U87 und U373 wiesen eine mittlere bzw. moderate Strahlensensibilität auf, welche von Schmidberger et al. bestätigt wird<sup>208</sup>. Nach Bestrahlung mit 4 bzw. 4+4 Gy wurde der zytopathische Effekt von dl520 in beiden Glioblastom-Zellen verstärkt (Abb. 28). Eine Erhöhung der Zelllyse der vielfachresistenten 257RDB-Zellen konnte dagegen nicht festgestellt werden, jedoch waren sie sehr strahlensensibel, so dass das Wachstum der Kontrollzellen nach Bestrahlung mit 8 Gy inhibiert wurde. Die Vermutung, dass Bestrahlung über erhöhte YB-1 Kernlokalisation zu einer Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 geführt hat, wurde durch die Immunhistochemie bestärkt, in der Bestrahlung der U373-Zellen zu einer Akkumulation von YB-1 im Kern geführt hatte (Abb. 19). Diese Hypothese wird des Weiteren dadurch bestätigt, dass die vielfachresistenten 257RDB-Zellen, in denen der Großteil von YB-1 bereits ohne Bestrahlung im Kern vorliegt, keine Verstärkung der viralen Zelllyse durch Bestrahlung aufwiesen.

In der Literatur wurde die Verstärkung des zytopathischen Effektes durch Bestrahlung in verschiedenen onkolytischen Viren nachgewiesen, jedoch blieb die Ursache zum Teil ohne mechanistische Erklärung<sup>134, 184</sup> und zum Teil umstritten. Es wurde einerseits beschrieben, dass Bestrahlung ein vorteilhaftes Umfeld für virale Replikation schafft<sup>33</sup>. Jedoch gibt es Studien mit onkolytischen Viren bei denen Bestrahlung sowohl zu einer Erhöhung<sup>2, 35</sup>, keiner Veränderung<sup>194, 232</sup> als auch zu einer Erniedrigung<sup>60</sup> der viralen Replikation geführt hat. Nach Kombinationstherapie mit CV706 wurde der zytopathische Effekt des Virus und die Größe der Zellen vor der viralen Freisetzung (*burst size*) erhöht, was auf eine erhöhte virale

## 4.2 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Bestrahlung

Replikation hinweist<sup>31</sup>. Zusätzlich wurde von einer verbesserten Kinetik berichtet, bei der Bestrahlung eine frühere Zelllyse und damit eine frühere virale Freisetzung erlaubt<sup>134</sup>. Als eine weitere Begründung für den beobachteten synergistischen Effekt einer Radiovirotherapie wird die Strahlensensibilisierung der Zellen durch das E1A Protein genannt. E1A kann p53-abhängig und unabhängig von diesem Tumorsuppressorgen die Zellen strahlensensibilisieren<sup>156, 200-202</sup>. Letzteres könnte sich, vermittelt durch die CR1/2-Regionen, durch Runterregulation des 26S Proteosoms ergeben, welches NF-κB-Inhibitoren inhibiert und somit einen anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor aktiviert<sup>212, 235</sup>. Andererseits wird E1A sehr früh in der Infektion exprimiert, so dass eine früher einsetzende Zelllyse vor Beendigung der kompletten Virusherstellung die Virusproduktion senken würde.

Aufgrund der unterschiedlichen publizierten Ergebnisse wurde die Replikation, die Virusproduktion und die virale Freisetzung von dl520 in Kombination mit Bestrahlung analysiert (Abb. 29-31). Die Replikation von dl520 konnte durch Bestrahlung mit 4 und 4+4 Gy in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 erhöht werden. Im Gegensatz dazu wurde in den YB-1 Kern-positiven 257RDB-Zellen keine Verstärkung der Replikation beobachtet. Sowohl die Virusproduktion als auch die virale Freisetzung wurde durch Bestrahlung in beiden Glioblastom-Zelllinien erhöht. Die 257RDB-Zellen wurden nicht weiter untersucht, weil dl520 schon ohne Bestrahlung wie Wildtyp-Adenovirus bei gleichen mo is replizierte.

Bestrahlung konnte somit Zelllyse, Replikation, Virusproduktion und virale Freisetzung von dl520 in beiden Glioblastom-Zelllinien erhöhen, wobei U373 p53-mutiert ist und U87 normales p53 exprimiert. Daher schienen diese Ergebnisse unabhängig von p53 zu sein. Der onkolytische Effekt von dl520 wurde durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt und bestätigte somit Daten aus der Literatur, dass das virale Genom mit seinen 36 kb zu klein ist, um von Bestrahlung geschädigt zu werden<sup>194, 232</sup>. Aus unseren vorliegenden Ergebnissen mit Bestrahlung konnte eine Korrelation zum Transkriptionsfaktor YB-1 gezogen werden. Bestrahlung führte zu keiner Erhöhung der viralen Replikation in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen, in denen YB-1 schon vor Bestrahlung hauptsächlich im Kern lokalisiert ist. Sie erhöhte jedoch den onkolytischen Effekt von dl520 in den Glioblastom-Zellen, in denen vor Bestrahlung YB-1 nur zum Teil und nach Bestrahlung hauptsächlich im Kern lokalisiert war. Dies bestätigt unsere Hypothese, dass Bestrahlung zu einer Akkumulation von YB-1 im Kern führt, in welchem es die virale Replikation von dl520 über Aktivierung des E2*late*-Promoters vermittelt.

Eine weitere mögliche Erklärung für den erhöhten therapeutischen Effekt der Radiovirotherapie war die Beobachtung, dass YB-1 eine Rolle bei Reparaturmechanismen

## 4.2 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Bestrahlung

spielt und mit verschiedenen Reparaturenzymen interagiert<sup>59, 137, 153, 154</sup>. Nach adenoviraler Infektion ist YB-1 in den viralen Einschlusskörperchen, in denen die virale Replikation stattfindet, lokalisiert. YB-1, welches zur Vermittlung der viralen Replikation an den E2<sub>late</sub>-Promoter bindet, steht nicht mehr für Reparaturmechanismen zur Verfügung. Somit kann der durch Bestrahlung verursachte Zellschaden weniger effizient behoben werden und resultiert in einem zusätzlichen Zelltod, welcher ein weiterer Grund des additiven (möglicherweise synergistischen) Effektes sein könnte.

Es konnte *in vitro* demonstriert werden, dass der zytopathische Effekt von dl520 in Kombination mit Bestrahlung erhöht wird, und dies auf eine erhöhte Akkumulation des Transkriptionsfaktors YB-1 im Kern zurückzuführen ist. Weil die Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten für Hirntumoren vorangetrieben werden sollte, war die Umsetzung eines Therapieansatzes *in vivo* von Bedeutung. Hierzu wurde ein der klinischen Anwendung ähnelndes Therapiekonzept mit fraktionierter Bestrahlung entwickelt (Abb. 32-39). In einem Xenograft-Modell mit subkutan applizierten U87-Tumoren in Nacktmäusen wurden die Tumoren dreimal mit 4 Gy bestrahlt und bekamen in den Zwischentagen insgesamt zweimal  $5 \times 10^8$  pfu dl520 intratumoral appliziert. Insgesamt wurde das Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 3 Wochen um 61 % inhibiert. Bei alleiniger Virusapplikation konnte eine Inhibition von 48 % gesehen werden. Da sich die U87-Zelllinie als strahlensensibler herausstellte, als nach den Voruntersuchungen zu erwarten gewesen wäre, wurde durch die alleinige fraktionierte Bestrahlung mit insgesamt 12 Gy ebenfalls eine Wachstumsinhibition von 49 % erzielt. Die extrem hohe Wachstumsrate der U87-Zellen verstärkte ebenfalls die Effizienz der Bestrahlung. Schon 14 d nach subkutaner Applikation der Tumorzellen hatten sie eine Größe um die  $200 \text{ mm}^3$  erreicht und konnten therapiert werden. Bei Vergleich dieses Xenograft-Modells mit dem von Holm et al., bei dem 257RDB- und HeLa-Zellen subkutan in Nacktmäusen gesetzt und mit  $2,5 \times 10^8$  pfu dl520 appliziert worden waren, wiesen die dortigen Tumoren eine wesentlich langsamere Wachstumsfrequenz auf, so dass sie erst nach 4 Wochen bei einer Größe um die  $200 \text{ mm}^3$  therapiert wurden (nicht veröffentlichte Daten) und auch eine wesentlich stärkere Wachstumsinhibition von 73 % erreichten. Das Wachstum der Tumoren, die mit Onyx-015<sup>60</sup> und mit CV706<sup>31</sup> in Kombination mit Bestrahlung therapiert wurden, war im Vergleich zu den U87-Tumoren wesentlich langsamer, so dass das Tumorstadium wie auch bei Holm et al. über einen längeren Zeitraum verfolgt werden konnte und auch im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker inhibiert wurde. Bei Betrachtung der Einzeltumorwerte war eine erhebliche Schwankungsbreite in der Tumorstadiumgröße der

## 4.2 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Bestrahlung

3 Therapiegruppen – die Kontrolle ausgeschlossen – erkennbar. Am stärksten war dies an den mit „Virus alleine“ therapierten Tumoren deutlich, von denen einer in komplette Remission gegangen ist, jedoch ein anderer eine Größe von 3000 mm<sup>3</sup> erreicht hat. Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Virus alleine“, „Bestrahlung alleine“ und „Radiovirotherapie“ festgestellt werden. Trotzdem konnte ein signifikanter, onkolytischer Effekt von dl520 im Vergleich zur Kontrolle im Glioblastom-Modell *in vivo* nachgewiesen werden.

Um den additiven (und möglicherweise synergistischen) Effekt der fraktionierten Radiotherapie zusammen mit dl520, der erfolgreich *in vitro* gezeigt worden war, zu beweisen, wurde ein zweites Xenograft-Modell mit subkutanen U373-Tumoren entwickelt. Neben einem langsameren Wachstumsverhalten wies die U373-Zelllinie eine größere Strahlenresistenz auf. Trotzdem wurde die Einzelstrahlendosis von 4 auf 2 Gy gesenkt, da davon ausgegangen wurde, dass die Strahlendosis im ersten Xenograft-Modell zu hoch gewählt worden war, um einen additiven Effekt der Radiovirotherapie zu sehen. Des Weiteren wurde eine niedrigere Virusdosis von dreimal  $3 \times 10^8$  pfu dl520 gewählt. Einige der U373-Tumoren sind nicht angewachsen, so dass nur eine kleine Tierzahl in die Gruppen eingeschlossen werden konnte und somit nur ein *Proof of Principle* aufgestellt werden konnte. Nach 50 d wurde bei alleiniger Bestrahlung das Tumorwachstum um 46 % inhibiert, wobei bei alleiniger Gabe von dl520 das Wachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgrund eines *Non-Responder* Tieres nur um 26 % gehemmt wurde. Das Tumorwachstum der mit Radiovirotherapie behandelten Gruppe wurde um 86 % gehemmt. Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere konnte keine statistisch signifikante Aussage über die Effizienz der Kombinationstherapie abgegeben werden. Jedoch bestätigten die Ergebnisse des *Proof of Principle* die *in vitro* Resultate, dass der onkolytische Effekt von dl520 durch Bestrahlung erhöht wurde, und müssen als nächstes in einem Tiermodell mit signifikanten Fallzahlen untersucht werden.

**Die hier vorliegenden *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse demonstrierten eine Verstärkung des zytopathischen Effektes von dl520 nach Bestrahlung und eine Erhöhung der Replikation, Virusproduktion und -freisetzung in Zelllinien mit unterschiedlichem p53 Status. Eine p53-unabhängige Vermittlung des nach Bestrahlung erzielten Effektes war somit zu vermuten. Die Ergebnisse zusammen mit der Literatur wiesen eher auf eine YB-1 abhängige Replikation und eine YB-1 vermittelte Verstärkung der Lyse durch Bestrahlung hin.**

#### \_ 4.3 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Chemotherapie

Nach Betrachtung der Untersuchungen von dl520 in Kombination mit Bestrahlung eröffnen sich vielversprechende Möglichkeiten zur Entwicklung einerseits neuer onkolytischer Viren, deren Replikation in und Lysefähigkeit von Tumoren über nuklear akkumuliertes Y-Box bindende Protein vermittelt wird. Andererseits können neue Therapiekombinationen aus onkolytischen Viren und Bestrahlung entwickelt werden, welche die nukleare Akkumulation von YB-1 erhöhen und damit den viralen, onkolytischen Effekt verbessern.

#### **4.3 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Zytostatika und Verbesserung der Transduktionseffizienz durch einen Histondeacetylase-Inhibitor**

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Bestrahlung von Tumoren bzw. Tumorzellen die Replikation und Zellyse des ansonsten replikationsdefizienten Adenovirus dl520 erhöhen konnte, wurde die Verbesserung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Kombination mit Chemotherapie analysiert. YB-1 ist eines der am häufigsten überexprimierten Gene in resistenten Tumorzellen und neben Bestrahlung bzw. UV-Licht kann die Kernakkumulation von YB-1 auch durch Zytostatika vermittelt werden<sup>137, 176, 177</sup>.

Eine Erhöhung des zytopathischen Effektes vom Adenovirus dl520 konnte durch Inkubation mit den Zytostatika Docetaxel, Irinotecan, Trichostatin A und Daunorubicin demonstriert werden. Dabei waren Irinotecan und Trichostatin A als Einzelchemotherapeutika die potentesten und die Kombination von Trichostatin A mit Irinotecan noch effektiver.

In der Literatur wurde die Verstärkung des zytopathischen Effektes durch Chemotherapie mit verschiedenen onkolytischen Viren nachgewiesen, jedoch blieb die Ursache zum Teil ohne mechanistische Erklärung<sup>32, 77, 246, 256</sup> und zum Teil umstritten. Onyx-015 wurde zwar schon alleine in Phase II Studien angewandt<sup>81, 168, 188</sup>, jedoch konnte eine signifikante Tumoringhibition nur in Kombination mit Chemotherapeutika gesehen werden<sup>81, 119, 135, 201</sup>. Ein synergistischer Effekt aus Chemovirotherapie konnte neben Onyx-015 mit AdΔ24<sup>179</sup>, dem AFP-spezifischen CV890<sup>77</sup>, dem PSA-spezifischen CV787<sup>256</sup> und weiteren Adenoviren<sup>110</sup> in Kombination mit verschiedenen Zytostatika nachgewiesen werden. Jedoch gibt es Studien mit onkolytischen Viren, bei denen Zytostatika sowohl zu einer Erhöhung<sup>17, 70, 110, 119</sup> als auch zu keiner Veränderung<sup>118, 179, 195, 196</sup> der viralen Replikation geführt haben.

#### \_ 4.3 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Chemotherapie

In unseren Untersuchungen konnte eine Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 durch Inkubation mit Daunorubicin, Docetaxel, Irinotecan, Trichostatin A und der Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A gezeigt werden. Die beiden potentesten Chemotherapeutika Irinotecan und Trichostatin A wurden näher mechanistisch untersucht. Dabei führte Irinotecan zu einer Kernakkumulation von YB-1 und Trichostatin A zu einer Hochregulation der CAR-Expression in den Glioblastom-Zellen. Dies ließ – wie schon bei den Untersuchungen mit Bestrahlung – vermuten, dass genotoxische Substanzen zu einer Erhöhung der Lokalisation von YB-1 im Kern führen, wo YB-1 die virale Replikation von dl520 über den *E2late*-Promoter vermittelt und somit den onkolytischen Effekt von dl520 erhöht. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse an den vielfachresistenten 257RDB-Zellen unterstützt, in denen der onkolytischer Effekt von dl520 nicht erhöht wurde, da in diesen Zellen YB-1 schon hauptsächlich im Kern akkumuliert ist und ihre CAR-Expression an die 100 % beträgt<sup>19</sup>.

Eine weitere mögliche Erklärung des verbesserten Antitumor-Effektes von dl520 durch Zytostatika ist die Beobachtung, dass YB-1 mit verschiedenen Reparaturenzymen interagiert<sup>59, 137, 153, 154</sup>. Während YB-1 unter viraler Replikation in den viralen Einschlusskörperchen akkumuliert, steht es weniger für Reparaturmechanismen zur Verfügung. Somit kann der durch die Zytostatika verursachte Zellschaden weniger effizient behoben werden und zu vermehrter Zellschädigung führen.

Zusätzlich wird berichtet, dass das adenovirale E1A neben der Strahlensensibilisierung eine Sensibilisierung gegenüber Zytostatika verursacht<sup>147, 201</sup>. Auch die bei der adenoviralen Infektion vorkommende Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , soll eine Chemosensibilisierung verursachen<sup>130, 141, 216</sup>.

Die Zytostatika wurden zusätzlich im Speziellen betrachtet. Der Topoisomerase-I-Inhibitor **Irinotecan** verursacht Strangbrüche und führte in den Glioblastom-Zellen zu einer nuklearen Akkumulation von YB-1. Das in Reparaturmechanismen involvierte YB-1 wird aufgrund von genotoxischem Stress im Kern hochreguliert. Dies weist zusammen mit der signifikanten Erhöhung des onkolytischen Effektes und der Replikation von dl520 durch Irinotecan auf eine YB-1 vermittelte Replikation von dl520 hin. Des Weiteren konnten Bernt und Takara et al. eine erhöhte virale Replikation nach Irinotecan-Inkubation nachweisen<sup>17, 227</sup>. Ein zusätzlicher positiver Effekt auf die virale Replikation könnte jedoch auch der durch Irinotecan verursachte G<sub>2</sub>-Arrest sein, der sich durch ausreichende Versorgung mit Nukleotiden und anderen für die virale Replikation benötigten zellulären Faktoren positiv auf

#### \_ 4.3 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Chemotherapie

die virale Replikation auswirkt<sup>17, 87, 220, 243</sup>. Andererseits wird von einem inhibitorischen Effekt von Topoisomerase-I-Inhibitoren auf die adenovirale Replikation berichtet<sup>206</sup>. In dieser Studie wurden die Inhibitoren jedoch während der kompletten viralen Replikation auf den Zellen belassen, im Gegensatz zu unseren Versuchen, in denen Irinotecan vor Infektion von den Zellen entfernt wurde. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Partikelbildung von dl520 mit Irinotecan in den U87-Zellen nicht und in den U373-Zellen nur gering vermindert wurde. Der konträre Einfluss von Irinotecan auf die virale Replikation und Partikelbildung könnte durch einen inhibitorischen Effekt von Irinotecan auf die späte Virusexpression und die Viruszusammensetzung verursacht werden<sup>251</sup>.

Neben Irinotecan wies der Histondeacetylase-Inhibitor **Trichostatin A** den stärksten zytopathischen Effekt und die größte Replikationssteigerung in Kombination mit dl520 auf. Trichostatin A führte in den Glioblastom-Zellen zu einer erhöhten Expression des Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptors, was durch Ergebnisse aus der Literatur an anderen Tumorzellen bestätigt wird<sup>41, 66, 123, 133</sup>. Da Adenoviren neben Integrinen hauptsächlich über den Coxsackie-Adenoviralen-Rezeptor in Zellen internalisiert werden, und die CAR-Expression in vielen Tumorzellen erniedrigt ist, kann somit die Virusinternalisierung erhöht werden.

Zusätzlich wird in der Literatur von einer erhöhten adenoviralen Transgenexpression nach Inkubation mit Histondeacetylase-Inhibitoren berichtet<sup>25, 41, 66, 72, 123, 254</sup>. Es wurde jedoch keine mechanistische Ursache genannt und könnte auf einer erhöhten CAR-Expression basieren, welche über eine erhöhte virale Internalisierung zu einer erhöhten Transgenexpression geführt haben könnte. In unveröffentlichten Daten von Holm et al. konnte ebenfalls keine Erhöhung der nuklearen YB-1 Lokalisation in den Glioblastom-Zellen U87 und U373 nach Trichostatin A-Inkubation nachgewiesen werden. Somit wurde die Erhöhung der Replikation durch Trichostatin A vermutlich hauptsächlich durch die CAR-Hochregulation verursacht. Zusätzlich führt Trichostatin A noch zu einem G<sub>2</sub>-Arrest der Zelle<sup>73,90</sup>, der vorteilhaft für die virale Replikation ist.

Die Kombination aus **Irinotecan + Trichostatin A** verbesserte den onkolytischen Effekt von dl520 im Vergleich zur Einzelinkubation über vermehrte Kernlokalisierung von YB-1 und erhöhte CAR-Expression. Es hat sich somit gezeigt, dass die Kombination einer tumorschädigenden Substanz und die Erhöhung der Infektionsfähigkeit durch Erhöhung der CAR-Expression die wirksamste Strategie ist, um mit dl520 eine effiziente Virotherapie durchzuführen. Zusätzlich berichten Kim et al., dass die durch Trichostatin A verursachte Lockerung der Chromatinstruktur die Toxizität verschiedener DNA-schädigender Zytostatika erhöht. Dazu gehört auch Camptothecin, dessen Derivat Irinotecan ist<sup>121</sup>.

#### \_ 4.3 YB-1 vermittelte Erhöhung des onkolytischen Effektes von dl520 durch Chemotherapie

Der Mitose-Hemmstoff **Docetaxel** und der interkalierende Topoisomerase-II-Inhibitor **Daunorubicin** verursachten den geringsten zytopathischen Effekt in Kombination mit dl520 und die geringste Erhöhung der Replikation in beiden Glioblastom-Zelllinien. Bernt et al. konnten einen positiven Effekt durch das mit Docetaxel verwandte Taxol und durch Daunorubicin auf die virale Replikation feststellen<sup>17</sup>. Docetaxel und Daunorubicin sind beides Substrate des P-Glykoproteins – welches Zytostatika zum Schutze der Zelle aus dem Zytoplasma pumpt – und regulieren die Expression des P-Glykoprotein Genes MDR1 hoch<sup>227</sup>. Da das Y-Box bindende Protein u.a. zu einer Überexpression von MDR1 führt und dadurch YB-1 vermehrt im Kern lokalisiert ist, könnte die verstärkte Replikation von dl520 durch vermehrtes, nuklear akkumuliertes YB-1 vermittelt worden sein<sup>9, 89, 137</sup>. Weiterhin konnte für Docetaxel in der Literatur ein synergistischer adenoviraler Effekt *in vitro* und *in vivo*<sup>256</sup> und eine erhöhte Transgenexpression<sup>139</sup> nachgewiesen werden. Bei Daunorubicin konnte ein positiver Effekt auf die virale Replikation gezeigt werden<sup>176, 177</sup> und es induziert wie Irinotecan einen G<sub>2</sub>-Arrest<sup>226</sup>, der sich positiv auf die virale Replikation ausübt.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen stark auf eine YB-1 vermittelte Replikation des replikationsdefizienten Adenovirus dl520 hin, dessen zytopathischer Effekt durch Bestrahlung und Zytostatika über eine Erhöhung der YB-1 Kernakkumulation verbessert wird.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen lässt sich ein Modell eines *Circulus vitiosus* für Tumorzellen entwickeln (Abb. 58). Die vielfach- bzw. teilweise resistenten Tumorzellen werden mit Bestrahlung bzw. Zytostatika behandelt, um dadurch besser auf eine YB-1 abhängige Virustherapie anzusprechen. Das Virus kann sich über YB-1 vermittelte Replikation vermehren und einen Teil der Zellen lysieren. Dabei akkumuliert YB-1 in nuklearen Einschlusskörperchen, in denen das Virus das Y-Box bindende Protein für seine Replikation benötigt. Damit entzieht das Virus einerseits YB-1 für Reparaturmechanismen und andererseits für die Resistenzentwicklung, da YB-1 u.a. die Genexpression von MDR und MRP vermittelt hat. Somit werden die Tumorzellen, welche nicht durch das Virus lysiert worden sind, erneut sensibilisiert für Chemotherapie oder Bestrahlung durch Entzug von YB-1. Somit können die verbleibenden Tumorzellen durch Chemo- oder Radiotherapie eliminiert werden.

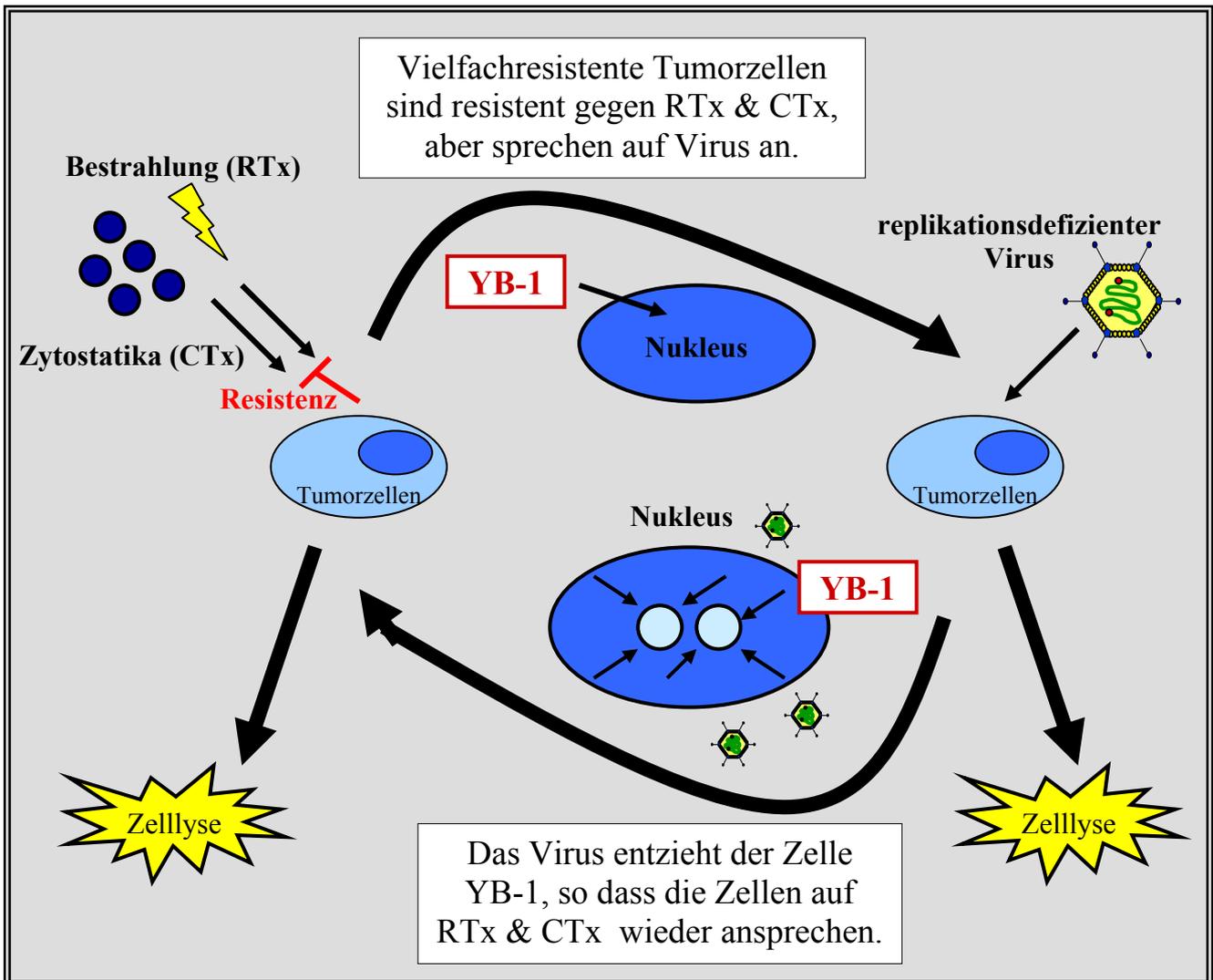


Abb. 58 Circulus Vitiosus der onkolytischen Therapie mit YB-1. Weitere Informationen siehe Text.  
 CTx: Chemotherapie, RTx: Radiotherapie, YB-1: Y-Box bindendes Protein 1.

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick - Möglichkeiten der Verbesserung eines über YB-1 replizierenden Adenovirus

Chemotherapie und Bestrahlung werden als adjuvante oder neoadjuvante Therapiemöglichkeiten neben der chirurgischen Tumorresektion eingesetzt, welche die primäre Behandlungstechnik solider Tumoren darstellt. Im klinischen Alltag wurden Chemotherapie und Bestrahlung bereits kombiniert, wobei die Zytostatika zur Strahlensensibilisierung dienen. Zusätzlich sollte einerseits die Toxizität für den Organismus gesenkt werden, da niedrigere Konzentrationen bzw. Strahlendosen eingesetzt werden konnten, andererseits sollte die Tumorletalität erhöht und auch die Rezidivrate gesenkt werden, da der Tumor an verschiedenen Fronten angegriffen werden konnte. Docetaxel, das

zu einem G<sub>2</sub>/M-Arrest führt, wirkt ebenso wie das mit Irinotecan verwandte Topotecan strahlensensibilisierend<sup>42, 120, 158, 186</sup>. Auch andere Zytostatika sind erfolgreich in Kombination mit Strahlentherapie eingesetzt worden<sup>10, 46, 96, 174, 199</sup>. Im nächsten Schritt hat man beide Therapieoptionen mit genterapeutischen Vektoren kombiniert. Neben anderen Studien<sup>172, 197</sup> konnte ein trimodales adenovirales Therapiekonzept in Phase I / II am Prostatakarzinom von Freytag et al. eine 80-prozentige Rezidivfreiheit 2 Jahre nach Therapiebeginn im Vergleich zu einer 50-prozentigen nach alleiniger Bestrahlung erzielen<sup>53, 54</sup>. Auf Grundlage unserer vorliegenden Ergebnisse mit dl520 in Kombination mit Bestrahlung oder Chemotherapeutika müsste als nächstes ein trimodales Therapiekonzept entwickelt werden, um einerseits den onkolytischen Effekt des Virus weiter zu erhöhen und andererseits zusätzliche onkolytische Tumortoxizität durch die adjuvanten Chemotherapeutika zu erzielen. Unsere Ergebnisse erweitern das Anwendungsspektrum des E1-teildeletierten Adenovirus dl520 von vielfachresistenten, MDR-positiven Tumorzellen, in denen YB-1 hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, auf Tumorzellen mit nuklearer Teilakkumulation von YB-1, wie den Glioblastom-Zellen U87 und U373.

Einen limitierenden Faktor in der Anwendung von onkolytischen Viren stellt die Infektionsfähigkeit vieler Tumoren dar, da Tumorzellen im Vergleich zu normalem Gewebe wesentlich weniger Coxsackie-Adenovirale-Rezeptoren exprimieren<sup>82, 140</sup>. Da Adenoviren jedoch hauptsächlich über Bindung an CAR internalisiert werden, müssen sie mit zusätzlichen „Waffen“ ausgestattet werden, um Tumorzellen effizienter infizieren zu können. Wir haben in unseren Versuchen die Transduktionseffizienz über CAR-Hochregulation mit Histondeacetylase-Inhibitoren verbessern können. In der Literatur wurden über genetische adenovirale Veränderungen eine verbesserte virale Infektion entwickelt, die über Antikörper<sup>64</sup>, über Tumorzell-spezifische Rezeptoren<sup>21, 45, 129, 161, 193</sup> und über den Austausch des adenoviralen Typ 5 gegen Typ 3 oder 2 *Fiber*<sup>63, 115</sup> vermittelt wird. Die stabilste CAR-unabhängige Rezeptor-Variation wird jedoch durch eine Fiber-integrierte Arg-Gly-Asp-(RGD)-Sequenz vermittelt, die an die auf einer Vielzahl von Tumoren exprimierten  $\alpha_v$ -Integrine bindet<sup>43, 114, 223</sup>. Die außergewöhnlich positiven *in vivo* Befunde mit dem Adenovirus  $\Delta$ 24-RGD-Vektor haben dazu geführt, dass das NIH eine von der FDA zugelassene klinische Studie mit  $\Delta$ 24-RGD finanziell unterstützt. Durch Verbesserung der Infektionsfähigkeit von onkolytischen Adenoviren mittels der RGD-Sequenz würden niedrigere Titer ausreichen, um die gleiche Anzahl an Tumorzellen zu erreichen, und gleichzeitig würde die Toxizität auf das normale Gewebe weiter gesenkt werden.

In den vorliegenden Versuchen an Glioblastom-Zellen konnte der onkolytische Effekt von dl520 durch Kombination mit Bestrahlung oder Zytostatika verstärkt werden. Durch Translokation von YB-1 mittels Chemo- bzw. Radiotherapie konnte das Adenovirus dl520 über Transaktivierung des *E2late*-Promoters besser replizieren, die Tumorzellen effizienter lysieren und schneller die umliegenden Tumorzellen infizieren. Des Weiteren wurden die Tumorzellen durch Kombination von Chemo- bzw. Radiotherapie mit dem Virus durch die unterschiedlichen Mechanismen an verschiedenen Fronten angegriffen und somit zusätzlich geschädigt. In einem weiteren Aspekt der Arbeit wurde durch Einsatz von Histondeacetylase-Inhibitoren die Effizienz der Infektion merklich gesteigert. Es hat sich gezeigt, dass die Kombination einer tumorschädigenden Substanz und die Erhöhung der Infektionsfähigkeit durch Erhöhung der CAR-Expression die wirksamste Strategie ist, um mit dl520 eine effiziente Virotherapie durchzuführen. Des Weiteren hat sich die Kombination von dl520 mit Bestrahlung *in vitro* und als *Proof of Principle in vivo* als eine effiziente Radiovirotherapie herausgestellt. Weitere Tierversuche sind jedoch angezeigt.

Überträgt man die Erkenntnisse der Arbeit generell auf onkolytische Viren, wäre ein tetramodales Therapiekonzept aus Bestrahlung, Chemotherapie und Virotherapie als adjuvante oder neoadjuvante Strategie zusammen mit chirurgischer Tumoresektion denkbar. Das Konzept könnte die lokale Rezidivrate von vielen soliden Tumoren sowie die Metastasierungsrate verringern. Es könnte die Möglichkeit eröffnen, die Größe der zu rezidierenden Tumoren zu verkleinern und damit vorher nicht mehr resektable Tumoren chirurgisch zu entfernen, anstatt sie nur noch palliativ zu behandeln. Im Speziellen, bezogen auf Hirntumore ließen sich möglicherweise die in einem Großteil der Patienten vorkommenden lokoregionalen Rezidive vermindern und damit die mittlere Überlebensrate verlängern.

## 5. Zusammenfassung

In der Behandlung von Glioblastomen stellt die Vielfachresistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie ein großes Problem dar. Die Hochregulation des *Multidrug Resistance Genes* (MDR), welches u.a. über nukleare Akkumulation des Y-Box bindenden Proteins (YB-1) vermittelt wird, ist ein Entstehungsmechanismus von Vielfachresistenz. Das an Reparaturmechanismen beteiligte YB-1 ist in resistenten Tumorzellen eines der am häufigsten überexprimierten Gene, und seine Kernakkumulation kann durch Bestrahlung und Zytostatika erhöht werden. YB-1 ermöglicht in vielfachresistenten Zellen ebenfalls eine E1-unabhängige Replikation des sonst replikationsdefizienten Adenovirus dl520.

Am Beispiel von Glioblastomzellen wurde *in vitro* versucht nachzuweisen, dass dl520 Tumorzellen lysiert, in denen YB-1 nur zum Teil im Zellkern lokalisiert ist, und dass Bestrahlung und Chemotherapie die Konzentration von YB-1 im Kern erhöhen. Es wurde analysiert, ob Bestrahlung und Chemotherapie die Replikation von dl520 und die damit verbundene Tumorzelllyse verbessern. *In vitro* wurde zusätzlich untersucht, ob die virale Konzentration in den Tumorzellen durch den Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin erhöht werden kann. Der Effekt einer Kombination von dl520 mit Bestrahlung wurde *in vivo* im Mausmodell nachgeprüft.

Das Adenovirus dl520 replizierte nicht nur effizient in vielfachresistenten Zellen, sondern auch in Glioblastom-Zellen, in denen das Y-Box bindende Protein sowohl im Kern als auch im Zytoplasma akkumuliert war, und löste einen zytopathischen Effekt aus. Durch Bestrahlung und die Chemotherapeutika Irinotecan, Daunorubicin, sowie Docetaxel, konnte die YB-1 Kernlokalisierung in den Glioblastom-Zellen erhöht werden. Dadurch kam es zu einer Verbesserung der Replikation von dl520 und damit verbunden zur Lyse der Tumorzellen. Zusätzlich erhöhte Trichostatin die Expression des Coxsackie-Adenoviralen Rezeptors und verbesserte die damit verbundene Infektionsfähigkeit von dl520. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines Zytostatikums zur nuklearen YB-1 Akkumulation mit einem Histondeacetylase-Inhibitoren zur Erhöhung der Infektionsfähigkeit die wirksamste Strategie war, um mit dl520 eine effiziente Virotherapie durchzuführen. Die Kombination von dl520 mit Bestrahlung führte *in vivo* zu verstärkter Wachstumsinhibition der Glioblastome im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe und zu ausschließlich mit Virus bzw. Bestrahlung behandelten Gruppen.

Die Arbeit eröffnet vielversprechende Therapiemöglichkeiten von onkolytischen Viren in Kombination mit Bestrahlung und Zytostatika als adjuvante oder neoadjuvante Therapie im Kampf gegen solide Tumoren.

## 6. Summary

Resistance to irradiation and chemotherapy remains an obstacle to the treatment of brain tumors. Upregulation of the multidrug resistance (MDR) gene, which is mediated by nuclear accumulation of the Y-box binding protein (YB-1), is one mechanism to develop multidrug resistance. YB-1 is involved in cellular repair mechanisms and is one of the most highly overexpressed genes in drug-resistant tumors. Moreover, nuclear accumulation of the Y-box binding protein is elevated by irradiation and chemotherapy. In multidrug resistant cells, YB-1 mediates an E1-independent replication of the otherwise replication-deficient adenovirus dl520.

It was analyzed *in vitro* – exemplified in glioblastoma cells – whether dl520 lyses tumor cells, in which YB-1 is only partially accumulated in the nucleus, and whether irradiation and chemotherapy elevate nuclear concentration of YB-1 in these cells. Besides, it was examined whether irradiation and chemotherapy ameliorated replication of dl520 and consequential tumor cell lysis. Furthermore, we determined *in vitro* whether viral concentration of dl520 is elevated in the tumor cells by treatment with the histone deacetylase inhibitor Trichostatin. The treatment effect of the combination of dl520 with irradiation was verified in an *in vivo* mouse model.

Dl520 replicated efficiently not only in multidrug resistant tumor cells, but also in glioblastoma cells in which the Y-box binding protein was partially accumulated in the nucleus and the cytoplasm. Dl520 consequentially caused a cytopathic effect. Moreover, irradiation and the chemotherapeutic agents Irinotecan, Daunorubicin and Docetaxel elevated nuclear accumulation of YB-1 in the glioblastoma cells. Thus, replication of dl520 was increased in the glioblastoma cells by irradiation and chemotherapeutic substances and consequently resulted in tumor cell lysis. Besides, Trichostatin upregulated the expression of the coxsackie adenoviral receptor and, thus, elevated the transduction rate of dl520. It could be demonstrated that the combination of cytopathic agents to elevate nuclear accumulation of YB-1 on one hand and histone deacetylase inhibitors to improve the transduction efficiency on the other hand was the most potent strategy for an efficient virotherapy with dl520. The combination of dl520 with irradiation led to an increased glioblastoma growth inhibition compared to the control group and to the groups exclusively treated with virus or irradiation.

This thesis opens up promising therapy options of oncolytic viruses in combination with irradiation and chemotherapy as adjuvant or neoadjuvant treatment regimens in the fight against solid tumors.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abe T, Mori T, Wakabayashi Y, Nakagawa M, Cole SP, Koike K, Kuwano M und Hori S. Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. *J Neurooncol* 1998; 40:11-8
2. Advani SJ, Sibley GS, Song PY, Hallahan DE, Kataoka Y, Roizman B und Weichselbaum RR. Enhancement of replication of genetically engineered herpes simplex viruses by ionizing radiation: a new paradigm for destruction of therapeutically intractable tumors. *Gene Ther* 1998; 5:160-5
3. Alemany R, Balague C und Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000; 18:723-7
4. Alemany R, Lai S, Lou YC, Jan HY, Fang X und Zhang WW. Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer Gene Ther* 1999; 6:21-5
5. Alwine JC, Kemp DJ und Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:5350-4
6. Ashizuka M, Fukuda T, Nakamura T, Shirasuna K, Iwai K, Izumi H, Kohno K, Kuwano M und Uchiumi T. Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol Cell Biol* 2002; 22:6375-83
7. Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Trope CG und Kristensen GB. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:1061-7
8. Bannister AJ und Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 1996; 384:641-3
9. Bargou RC, Jurchott K, Wagener C, Bergmann S, Metzner S, Bommert K, Mapara MY, Winzer KJ, Dietel M, Dorken B und Royer HD. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med* 1997; 3:447-50
10. Bartelink H, Kallman RF, Rapacchietta D und Hart GA. Therapeutic enhancement in mice by clinically relevant dose and fractionation schedules of cis-diamminedichloroplatinum (II) and irradiation. *Radiother Oncol* 1986; 6:61-74
11. Bayley ST, Mymryk, J. S. Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. Oncol.* 1994; 5:425-444
12. Ben-Israel H und Kleinberger T. Adenovirus and cell cycle control. *Front Biosci* 2002; 7:d1369-95
13. Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW und Brodsky FM. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol* 1999; 162:5049-52
14. Berget SM, Moore C und Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977. *Rev Med Virol* 2000; 10:356-62; discussion 355-6
15. Berk AJ, Lee F, Harrison T, Williams J und Sharp PA. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 1979; 17:935-44
16. Berkner KL und Sharp PA. Effect of the tripartite leader on synthesis of a non-viral protein in an adenovirus 5 recombinant. *Nucleic Acids Res* 1985; 13:841-57
17. Bernt KM, Steinwaerder DS, Ni S, Li ZY, Roffler SR und Lieber A. Enzyme-activated Prodrug Therapy Enhances Tumor-specific Replication of Adenovirus Vectors. *Cancer Res* 2002; 62:6089-98

18. Biedler JL und Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970; 30:1174-84
19. Bieler A, Mantwill K, Dravits T, Bernshausen A, Glockzin G, Kohler-Vargas N, Lage H, Gansbacher B und Holm PS. Novel three-pronged strategy to enhance cancer cell killing in glioblastoma cell lines: histone deacetylase inhibitor, chemotherapy, and oncolytic adenovirus dl520. *Hum Gene Ther* 2006; 17:55-70
20. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A und McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996; 274:373-6
21. Blackwell JL, Miller CR, Douglas JT, Li H, Reynolds PN, Carroll WR, Peters GE, Strong TV und Curiel DT. Retargeting to EGFR enhances adenovirus infection efficiency of squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125:856-63
22. Böcker W, Höfler HK, Kleihues P, Denk H und Heitz PH. Allgemeine Tumorpathologie. In Böcker W, Denk H, Heitz PH, eds. *Pathologie*. München, Jena: Urban & Fischer, 2001. pp. 163-211.
23. Boulanger PA und Blair GE. Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem J* 1991; 275 ( Pt 2):281-99
24. Braithwaite AW, Nelson CC und Bellett AJ. E1a revisited: the case for multiple cooperative trans-activation domains. *New Biol* 1991; 3:18-26
25. Brooks A, Cashion, L., Reiter, K., Wang, P., Qian, H. S., Harkins, R. H., Harkins, R. N., Rubanyi, G. M. Histone Deacetylase Inhibition Up-Regulates CAR and Increases Adenovirus Infection and Transgene Expression in Skeletal Muscle. *Mol. Ther.* 2003; 1, Suppl. 9:300
26. Burger PC. Pathologic anatomy and CT correlations in the glioblastoma multiforme. *Appl Neurophysiol* 1983; 46:180-7
27. Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G und Ling V. P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1706-15
28. Chan HS, Thorner PS, Haddad G und Ling V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 1990; 8:689-704
29. Chansky HA, Hu M, Hickstein DD und Yang L. Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res* 2001; 61:3586-90
30. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM und Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47:381-9
31. Chen Y, DeWeese T, Dilley J, Zhang Y, Li Y, Ramesh N, Lee J, Pennathur-Das R, Radzyminski J, Wypych J, Brignetti D, Scott S, Stephens J, Karpf DB, Henderson DR und Yu DC. CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity. *Cancer Res* 2001; 61:5453-60
32. Cheon J, Ko SC, Gardner TA, Shirakawa T, Gotoh A, Kao C und Chung LW. Chemogene therapy: osteocalcin promoter-based suicide gene therapy in combination with methotrexate in a murine osteosarcoma model. *Cancer Gene Ther* 1997; 4:359-65
33. Chmura SJ, Advani SJ, Kufe DW und Weichselbaum RR. Strategies for enhancing viral-based gene therapy using ionizing radiation. *Radiat Oncol Investig* 1999; 7:261-9

34. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR und Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 1977; 12:1-8
35. Chung SM, Advani SJ, Bradley JD, Kataoka Y, Vashistha K, Yan SY, Markert JM, Gillespie GY, Whitley RJ, Roizman B und Weichselbaum RR. The use of a genetically engineered herpes simplex virus (R7020) with ionizing radiation for experimental hepatoma. *Gene Ther* 2002; 9:75-80
36. Cohen SM, Jamieson ER und Lippard SJ. Enhanced binding of the TATA-binding protein to TATA boxes containing flanking cisplatin 1,2-cross-links. *Biochemistry* 2000; 39:8259-65
37. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM und Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258:1650-4
38. Coultas L und Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:115-23
39. Danks MK, Schmidt CA, Cirtain MC, Suttle DP und Beck WT. Altered catalytic activity of and DNA cleavage by DNA topoisomerase II from human leukemic cells selected for resistance to VM-26. *Biochemistry* 1988; 27:8861-9
40. Denhardt DT. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 23:641-6
41. Dion LD, Goldsmith KT, Tang DC, Engler JA, Yoshida M und Garver RI, Jr. Amplification of recombinant adenoviral transgene products occurs by inhibition of histone deacetylase. *Virology* 1997; 231:201-9
42. Distelmans W und Storme G. The effect of pretreatment with docetaxel (taxotere; RP 56976) on irradiated subcutaneous MA 16/C murine tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18:167-72
43. Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N und Curiel DT. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 1998; 72:9706-13
44. Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S und Shenk T. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 1996; 272:1470-3
45. Douglas JT, Rogers BE, Rosenfeld ME, Michael SI, Feng M und Curiel DT. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1574-8
46. Durand RE und LePard NE. Effects of mitomycin C on the oxygenation and radiosensitivity of murine and human tumours in mice. *Radiother Oncol* 2000; 56:245-52
47. Efferth T, Mattern J und Volm M. Immunohistochemical detection of P glycoprotein, glutathione S transferase and DNA topoisomerase II in human tumors. *Oncology* 1992; 49:368-75
48. Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, Raught B, Svitkin Y, Ovchinnikov LP und Sonenberg N. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *Embo J* 2001; 20:5491-502
49. Evdokimova VM, Kovrigina EA, Nashchekin DV, Davydova EK, Hershey JW und Ovchinnikov LP. The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273:3574-81
50. Facchini LM und Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* 1998; 12:633-51

51. Fink U und Sendler A. Magenkarzinom. *In* Hiddemann W, Huber H, Bartram C, eds. Die Onkologie, Vol. 1. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. pp. 837-865.
52. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM und Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:265-9
53. Freytag SO, Stricker H, Pegg J, Lu M, Brown S, Peabody J und Kim JH. Clinical Trials: Combining Oncolytic Viral Therapy and Gene Therapy with Conventional Cancer Therapies. American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting - Executive Summaries, 2004. pp. 19-20.
54. Freytag SO, Stricker H, Pegg J, Paielli D, Pradhan DG, Peabody J, DePeralta-Venturina M, Xia X, Brown S, Lu M und Kim JH. 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* 2003; 63:7497-506
55. Friedman HS, Keir ST und Houghton PJ. The emerging role of irinotecan (CPT-11) in the treatment of malignant glioma in brain tumors. *Cancer* 2003; 97:2359-62
56. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK und Kyritsis AP. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 2000; 19:2-12
57. Gai XX, Lipson KE und Prystowsky MB. Unusual DNA binding characteristics of an in vitro translation product of the CCAAT binding protein mYB-1. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:601-6
58. Ganly I, Kirn D, Eckhardt G, Rodriguez GI, Soutar DS, Otto R, Robertson AG, Park O, Gulley ML, Heise C, Von Hoff DD und Kaye SB. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:798-806
59. Gaudreault I, Guay D und Lebel M. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:316-27
60. Georger B, Grill J, Opolon P, Morizet J, Aubert G, Lecluse Y, van Beusechem VW, Gerritsen WR, Kirn DH und Vassal G. Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (ONYX-015) in human malignant glioma xenografts. *Br J Cancer* 2003; 89:577-84
61. Germann UA. P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 1996; 32A:927-44
62. Gilbert MR, Supko JG, Batchelor T, Lesser G, Fisher JD, Piantadosi S und Grossman S. Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2940-9
63. Glasgow JN, Bauerschmitz GJ, Curiel DT und Hemminki A. Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications. *Curr Gene Ther* 2004; 4:1-14
64. Glasgow JN, Mhashilkar, A., Curiel, D. T., Korohov, N. Adenovirus Targeting Via Leucine Zipper Peptide Ligand Attachment. *Mol. Ther.* 2004; 9, Suppl. 1:250
65. Gleixner C, Müller M und Wirth S. Glioblastome. *Neurologie und Psychiatrie*, Vol. 3. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2002/2003. pp. 178-179.
66. Goldsmith ME, Kitazono M, Fok P, Aikou T, Bates S und Fojo T. The histone deacetylase inhibitor FK228 preferentially enhances adenovirus transgene expression in malignant cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9:5394-401

67. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM und et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:116-24
68. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Jr., Levrero M und Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999; 399:806-9
69. Goodrum FD und Ornelles DA. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J Virol* 1999; 73:7474-88
70. Graat H, Witlox, M. A., Schagen, F. H. E., Kaspers, G. J. L., Curiel, D. T., Helder, M. N., Bras, J., Schaap, G. R., Gerritsen, W. J., Wuisman, P. I. J. M., van Beusechem, V. W. Cisplatin and Doxorubicin Enhance the Activity of the CRAd Ad5-delta24RGD Against Osteosarcoma Cell Lines but Not Primary Osteosarcoma Cells. *Mol. Ther.* 2004; 9, Suppl. 1:110
71. Graumann PL und Marahiel MA. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 1998; 23:286-90
72. Griffith TS, Moore, J., van Oosten, R. The Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide (FR901228) Enhances the Cytotoxic Activity of Ad5-TRAIL Against Human Prostate Tumor Cells. *Mol. Ther.* 2004; 1, Suppl. 9:361-362
73. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389:349-52
74. Gu C, Oyama T, Osaki T, Kohno K und Yasumoto K. Expression of Y box-binding protein-1 correlates with DNA topoisomerase IIalpha and proliferating cell nuclear antigen expression in lung cancer. *Anticancer Res* 2001; 21:2357-62
75. Haley KP, Overhauser J, Babiss LE, Ginsberg HS und Jones NC. Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:5734-8
76. Haley KP, Overhauser, J., Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., Jones, N. C. Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81:5734-5738
77. Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, Golightly D, Stewart D, Lin J, Phipps S und Chiang YL. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1999; 10:1721-33
78. Hardy S, Engel DA und Shenk T. An adenovirus early region 4 gene product is required for induction of the infection-specific form of cellular E2F activity. *Genes Dev* 1989; 3:1062-74
79. Hardy S und Shenk T. E2F from adenovirus-infected cells binds cooperatively to DNA containing two properly oriented and spaced recognition sites. *Mol Cell Biol* 1989; 9:4495-506
80. Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, Hawkins L und Kirn D. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 2000; 6:1134-9
81. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD und Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997; 3:639-45
82. Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, Peter I und Dummer R. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 1998; 9:2363-73

83. Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Hermann M, Geerts A, Hahn EG und Schuppan D. The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J Hepatol* 2002; 36:233-40
84. Herold G. Bronchialkarzinom. *In* Herold G, ed. *Innere Medizin*. Köln: Herold, G., 2002. pp. 326-330.
85. Herold G. Magenkarzinom. *In* Herold G, ed. *Innere Medizin*. Köln: Herold G., 2002. pp. 370-373.
86. Herold G. Pankreaskarzinom. *In* Herold G, ed. *Innere Medizin*. Köln: Herold, G., 2002. pp. 420-421.
87. Hodge LD und Scharff MD. Effect of adenovirus on host cell DNA synthesis in synchronized cells. *Virology* 1969; 37:554-64
88. Holm PS, Bergmann S, Jurchott K, Lage H, Brand K, Ladhoff A, Mantwill K, Curiel DT, Dobbelsstein M, Dietel M, Gansbacher B und Royer HD. 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* 2002; 277:10427-34
89. Holm PS, Lage H, Bergmann S, Jurchott K, Glockzin G, Bernshausen A, Mantwill K, Ladhoff A, Wichert A, Mymryk JS, Ritter T, Dietel M, Gansbacher B und Royer HD. Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy. *Cancer Res* 2004; 64:322-8
90. Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P und Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 1993; 268:305-14
91. Horwitz MS. Adenoviruses. *Fields Virology* 1996; 3:2149-2171
92. Howe JA, Mymryk JS, Egan C, Branton PE und Bayley ST. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:5883-7
93. Hu Z, Jin S und Scotto KW. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem* 2000; 275:2979-85
94. Huang H, Zhang ZX, Xu YJ und Shao JF. [HDAC1 expression and effect of TSA on proliferation and apoptosis of A549 cells]. *Ai Zheng* 2003; 22:922-6
95. Huang MM und Hearing P. Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol* 1989; 63:2605-15
96. Huang SM und Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2166-74
97. Huang X, Ushijima K, Komai K, Takemoto Y, Motoshima S, Kamura T und Kohno K. Co-expression of Y box-binding protein-1 and P-glycoprotein as a prognostic marker for survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93:287-91
98. Huber H, Zochbauer-Müller S, Drings P und Pirker R. Bronchialkarzinom. *In* Hiddemann W, Huber H, Bartram C, eds. *Die Onkologie*, Vol. 1. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. pp. 1326-1355.
99. Huebner RJ, Rowe WP, Schatten WE, Smith RR und Thomas LB. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 1956; 9:1211-8
100. Hutter G und Sinha P. Proteomics for studying cancer cells and the development of chemoresistance. *Proteomics* 2001; 1:1233-48
101. Ise T, Nagatani G, Imamura T, Kato K, Takano H, Nomoto M, Izumi H, Ohmori H, Okamoto T, Ohga T, Uchiumi T, Kuwano M und Kohno K. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* 1999; 59:342-6

102. Ito K, Fujimori M, Nakata S, Hama Y, Shingu K, Kobayashi S, Tsuchiya S, Kohno K, Kuwano M und Amano J. Clinical significance of the increased multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in patients with primary breast cancer. *Oncol Res* 1998; 10:99-109
103. Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB, van der Valk P, Belien JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P und et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1230-7
104. Izumi H, Imamura T, Nagatani G, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Yoshida Y, Nomoto M, Okamoto T, Uchiumi T, Kuwano M, Funa K und Kohno K. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-->5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:1200-7
105. Jacobsen H, Klenow H und Overgaard-Hansen K. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur J Biochem* 1974; 45:623-7
106. Jakubczak JL, Ryan P, Gorziglia M, Clarke L, Hawkins LK, Hay C, Huang Y, Kaloss M, Marinov A, Phipps S, Pinkstaff A, Shirley P, Skripchenko Y, Stewart D, Forry-Schaudies S und Hallenbeck PL. An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. *Cancer Res* 2003; 63:1490-9
107. Janz M, Harbeck N, Dettmar P, Berger U, Schmidt A, Jurchott K, Schmitt M und Royer HD. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int J Cancer* 2002; 97:278-82
108. Jelsma TN, Howe JA, Mymryk JS, Eveleigh CM, Cunniff NF und Bayley ST. Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen. *Virology* 1989; 171:120-30
109. Jones N. Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 199 ( Pt 3):59-80
110. Jounaidi Y und Waxman DJ. Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy. *Cancer Res* 2004; 64:292-303
111. Juliano RL und Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455:152-62
112. Kao CH, Tsai SC, Liu TJ, Ho YJ, Wang JJ, Ho ST und ChangLai SP. P-Glycoprotein and multidrug resistance-related protein expressions in relation to technetium-99m methoxyisobutylisonitrile scintimammography findings. *Cancer Res* 2001; 61:1412-4
113. Karow T. Zytostatika. In Karow T, ed. *Pharmakologie und Toxikologie*. Pulheim: Karow, T., 2002. pp. 636-646.
114. Kasono K, Blackwell JL, Douglas JT, Dmitriev I, Strong TV, Reynolds P, Kropf DA, Carroll WR, Peters GE, Bucy RP, Curiel DT und Krasnykh V. Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2571-9
115. Kawakami Y, Li H, Lam JT, Krasnykh V, Curiel DT und Blackwell JL. Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res* 2003; 63:1262-9

116. Kelly PJ, Dumas-Duport C, Kispert DB, Kall BA, Scheithauer BW und Illig JJ. Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. *J Neurosurg* 1987; 66:865-74
117. Kerbel RS, St Croix B, Florenes VA und Rak J. Induction and reversal of cell adhesion-dependent multicellular drug resistance in solid breast tumors. *Hum Cell* 1996; 9:257-64
118. Khil MS, Kim JH, Mullen CA, Kim SH und Freytag SO. Radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells in culture transduced with cytosine deaminase gene. *Clin Cancer Res* 1996; 2:53-7
119. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusco P, Kaye SB, Hong WK und Kirn DH. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000; 6:879-85
120. Kim ES und Khuri FR. Docetaxel and radiation as combined-modality therapy. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16:97-105
121. Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y und Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* 2003; 63:7291-300
122. Kirby KS. A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids; evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem J* 1957; 66:495-504
123. Kitazono M, Goldsmith ME, Aikou T, Bates S und Fojo T. Enhanced adenovirus transgene expression in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Cancer Res* 2001; 61:6328-30
124. Kloks CP, Spronk CA, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek S und Hilbers CW. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol* 2002; 316:317-26
125. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M und Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003; 25:691-8
126. Koike K, Uchiumi T, Ohga T, Toh S, Wada M, Kohno K und Kuwano M. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett* 1997; 417:390-4
127. Kollmannsberger C, Rick O, Klapproth H, Kubin T, Sayer HG, Hentrich M, Welslau M, Mayer F, Kuczyk M, Spott C, Kanz L und Bokemeyer C. Irinotecan in patients with relapsed or cisplatin-refractory germ cell cancer: a phase II study of the German Testicular Cancer Study Group. *Br J Cancer* 2002; 87:729-32
128. Kovesdi I, Reichel R und Nevins JR. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:2180-4
129. Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller CR, Belousova N und Curiel DT. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol* 1998; 72:1844-52
130. Krosnick JA, Mule JJ, McIntosh JK und Rosenberg SA. Augmentation of antitumor efficacy by the combination of recombinant tumor necrosis factor and chemotherapeutic agents in vivo. *Cancer Res* 1989; 49:3729-33
131. Ladomery M und Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* 1995; 17:9-11
132. Lage H und Dietel M. Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125:156-65

133. Lai YJ, Pong RC, McConnell JD und Hsieh JT. Surrogate marker for predicting the virus binding of urogenital cancer cells during adenovirus-based gene therapy. *Biotechniques* 2003; 35:186-90, 192-4
134. Lamfers ML, Grill J, Dirven CM, Van Beusechem VW, Georger B, Van Den Berg J, Alemany R, Fueyo J, Curiel DT, Vassal G, Pinedo HM, Vandertop WP und Gerritsen WR. Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy. *Cancer Res* 2002; 62:5736-42
135. Lamont JP, Nemunaitis J, Kuhn JA, Landers SA und McCarty TM. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann Surg Oncol* 2000; 7:588-92
136. Leff T, Elkaim R, Goding CR, Jalinot P, Sassone-Corsi P, Perricaudet M, Kedinger C und Chambon P. Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1a mRNAs stimulate viral E1a and E1b expression at the transcriptional level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:4381-5
137. Levenson VV, Davidovich IA und Roninson IB. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. *Cancer Res* 2000; 60:5027-30
138. Li Y, Graham C, Lacy S, Duncan AM und Whyte P. The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes Dev* 1993; 7:2366-77
139. Li Y, Okegawa T, Lombardi DP, Frenkel EP und Hsieh JT. Enhanced transgene expression in androgen independent prostate cancer gene therapy by taxane chemotherapeutic agents. *J Urol* 2002; 167:339-46
140. Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP, Wang Z und Hsieh JT. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 1999; 59:325-30
141. Lieber A, He CY, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B und Kay MA. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol* 1997; 71:8798-807
142. Lillie JW, Loewenstein PM, Green MR und Green M. Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell* 1987; 50:1091-100
143. Lipson KE, Chen ST, Koniecki J, Ku DH und Baserga R. S-phase-specific regulation by deletion mutants of the human thymidine kinase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:6848-52
144. Liu YY, Han TY, Giuliano AE und Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J* 2001; 15:719-30
145. Loe DW, Deeley RG und Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 1996; 32A:945-57
146. Lorence RM, Rood PA und Kelley KW. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:1305-12
147. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T und Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74:957-67
148. Lüllmann H und Mohr K. Interferenz mit Mikrotubuli der Mitosespindel. *In* Lüllmann H, Mohr K, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Georg Thieme, 1999. pp. 459.
149. Lüllmann H und Mohr K. Interkalierende Substanzen. *In* Lüllmann H, Mohr K, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Georg Thieme, 1999. pp. 455.

150. Lüllmann H und Mohr K. Topoisomerase-Hemmung. In Lüllmann H., Mohr K, eds. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Georg Thieme, 1999. pp. 456.
151. Maizel JV, Jr., White DO und Scharff MD. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 1968; 36:115-25
152. Mantwill K, Köhler-Vargas N, Bernshausen A, Bieler A, Lage H, A. K, P. S, U. T, R. H, Gansbacher B und Holm PS. Inhibition of the Multidrug-Resistant Phenotype by Targeting YB-1 with a Conditionally Oncolytic Adenovirus: Implications for Combinatorial Treatment Regimen with Chemotherapeutic Agents. *Cancer Res* 2006; 66
153. Marenstein DR, Chan MK, Altamirano A, Basu AK, Boorstein RJ, Cunningham RP und Teebor GW. Substrate specificity of human endonuclease III (hNTH1). Effect of human APE1 on hNTH1 activity. *J Biol Chem* 2003; 278:9005-12
154. Marenstein DR, Ocampo MT, Chan MK, Altamirano A, Basu AK, Boorstein RJ, Cunningham RP und Teebor GW. Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J Biol Chem* 2001; 276:21242-9
155. Marmur J und Schildkraut CL. Growth of bacteria labelled with heavy isotopes for the isolation of nucleic acids. *Nature* 1961; 189:636-8
156. Martin-Duque P, Sanchez-Prieto R, Romero J, Martinez-Lamparero A, Cebrian-Sagarriga S, Guinea-Viniegra J, Dominguez C, Leonart M, Cano A, Quintanilla M und Ramon YCS. In vivo radiosensitizing effect of the adenovirus E1A gene in murine and human malignant tumors. *Int J Oncol* 1999; 15:1163-8
157. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL und Coen DM. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 1991; 252:854-6
158. Mason KA, Kishi K, Hunter N, Buchmiller L, Akimoto T, Komaki R und Milas L. Effect of docetaxel on the therapeutic ratio of fractionated radiotherapy in vivo. *Clin Cancer Res* 1999; 5:4191-8
159. Massey V und Wallner KE. Patterns of second recurrence of malignant astrocytomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18:395-8
160. Mastrangelo MJ, Eisenlohr LC, Gomella L und Lattime EC. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. *J Clin Invest* 2000; 105:1031-4
161. Miller CR, Buchsbaum DJ, Reynolds PN, Douglas JT, Gillespie GY, Mayo MS, Raben D und Curiel DT. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res* 1998; 58:5738-48
162. Miyatake S, Iyer A, Martuza RL und Rabkin SD. Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J Virol* 1997; 71:5124-32
163. Mohri M, Nitta H und Yamashita J. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in human gliomas. *J Neurooncol* 2000; 49:105-15
164. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1:263-73
165. Mymryk JS und Bayley ST. Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5. *Virus Res* 1994; 33:89-97

166. Nagane M, Asai A, Shibui S, Oyama H, Nomura K und Kuchino Y. Expression pattern of chemoresistance-related genes in human malignant brain tumors: a working knowledge for proper selection of anticancer drugs. *Jpn J Clin Oncol* 1999; 29:527-34
167. Nemerow GR und Stewart PL. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:725-34
168. Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G, Maples P, Netto G, Tong A, Randlev B, Olson S und Kirn D. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther* 2001; 8:746-59
169. Nettelbeck DM, Rivera AA, Balague C, Alemany R und Curiel DT. Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res* 2002; 62:4663-70
170. Nevins JR. Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 1981; 26:213-20
171. Nevins JR und Wilson MC. Regulation of adenovirus-2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing. *Nature* 1981; 290:113-8
172. Nishizaki M, Meyn RE, Levy LB, Atkinson EN, White RA, Roth JA und Ji L. Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2887-97
173. Nooter K, Bosman FT, Burger H, van Wingerden KE, Flens MJ, Scheper RJ, Oostrum RG, Boersma AW, van der Gaast A und Stoter G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 1996; 7:75-81
174. Nylen U, Cekan E, Jonasson GB, Lewin F und Skog S. Effects of 5-fluorouracil on cell cycle arrest and toxicity induced by X-irradiation in normal mammalian cells. *Cell Prolif* 2001; 34:85-98
175. Oda Y, Ohishi Y, Saito T, Hinoshita E, Uchiumi T, Kinukawa N, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M und Tsuneyoshi M. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J Pathol* 2003; 199:251-8
176. Ohga T, Koike K, Ono M, Makino Y, Itagaki Y, Tanimoto M, Kuwano M und Kohno K. Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light. *Cancer Res* 1996; 56:4224-8
177. Ohga T, Uchiumi T, Makino Y, Koike K, Wada M, Kuwano M und Kohno K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem* 1998; 273:5997-6000
178. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M und Kohno K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* 2000; 19:6194-202
179. Oosterhoff D, van Beusechem, V. W., Boven, E., Pinedo, H. M., Gerritsen, W. R., Synergism between a Conditionally Replicating Adenovirus Expressing p53 and Oxaliplatin in the Antiproliferative Effects on Human Colon Cancer Cell Lines. *Mol. Ther.* 2004; 9, Suppl. 1:110
180. Ornelles DA und Shenk T. Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol* 1991; 65:424-9

181. Palmiter RD. Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes. Expedient techniques for the isolation of undergraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* 1974; 13:3606-15
182. Pearson BE, Nasheuer HP und Wang TS. Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11:2081-95
183. Pegg AE. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* 1990; 50:6119-29
184. Portella G, Pacelli R, Libertini S, Cella L, Vecchio G, Salvatore M und Fusco A. ONYX-015 enhances radiation-induced death of human anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5027-32
185. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG und Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111:229-33
186. Rave-Frank M, Glomme S, Hertig J, Weiss E, Pradier O, Hess CF, Virsik-Kopp P und Schmidberger H. Combined effect of topotecan and irradiation on the survival and the induction of chromosome aberrations in vitro. *Strahlenther Onkol* 2002; 178:497-503
187. Reichel R, Neill SD, Kovesdi I, Simon MC, Raychaudhuri P und Nevins JR. The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for trans-activation of E2 transcription and for E2F activation. *J Virol* 1989; 63:3643-50
188. Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Andrews J, Romel L, Hatfield M, Rubin J und Kirn D. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther* 2001; 8:1618-26
189. Reiser M, Kuhn FP und Debus J. Strahlentherapie. *In* Reiser M, Kuhn F-P, Debus J, eds. *Radiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme, 2004. pp. 97-117.
190. Ricciardi RP, Jones RL, Cepko CL, Sharp PA und Roberts BE. Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:6121-5
191. Richter JD, Young P, Jones NC, Krippel B, Rosenberg M und Ferguson B. A first exon-encoded domain of E1A sufficient for posttranslational modification, nuclear-localization, and induction of adenovirus E3 promoter expression in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:8434-8
192. Rodriguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW und Henderson DR. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57:2559-63
193. Rogers BE, Douglas JT, Ahlem C, Buchsbaum DJ, Frincke J und Curiel DT. Use of a novel cross-linking method to modify adenovirus tropism. *Gene Ther* 1997; 4:1387-92
194. Rogulski KR, Freytag SO, Zhang K, Gilbert JD, Paielli DL, Kim JH, Heise CC und Kirn DH. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Res* 2000; 60:1193-6
195. Rogulski KR, Kim JH, Kim SH und Freytag SO. Glioma cells transduced with an *Escherichia coli* CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther* 1997; 8:73-85
196. Rogulski KR, Zhang K, Kolozyvary A, Kim JH und Freytag SO. Pronounced antitumor effects and tumor radiosensitization of double suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 1997; 3:2081-8
197. Rosenberg E, Hawkins W, Holmes M, Amir C, Schmidt-Ullrich RK, Lin PS und Valerie K. Radiosensitization of human glioma cells in vitro and in vivo with

- acyclovir and mutant HSV-TK75 expressed from adenovirus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52:831-6
198. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH und Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84:570-3
199. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ und Verheij M. Alkyllysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59:2457-63
200. Sanchez-Prieto R, Lleonart M und Ramon y Cajal S. Lack of correlation between p53 protein level and sensitivity of DNA-damaging agents in keratinocytes carrying adenovirus E1a mutants. *Oncogene* 1995; 11:675-82
201. Sanchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, Leonart ML, Martin P, Anaya A und Ramon y Cajal S. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* 1996; 13:1083-92
202. Sanchez-Prieto R, Quintanilla M, Martin P, Lleonart M, Cano A, Dotto GP und Ramon y Cajal S. In vivo antitumor effect of retrovirus-mediated gene transfer of the adenovirus E1a gene. *Cancer Gene Ther* 1998; 5:215-24
203. Sanson M, Napolitano M, Yaya R, Keime-Guibert F, Broet P, Hoang-Xuan K und Delattre JY. Second line chemotherapy with docetaxel in patients with recurrent malignant glioma: a phase II study. *J Neurooncol* 2000; 50:245-9
204. Sarnow P, Ho YS, Williams J und Levine AJ. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28:387-94
205. Sauer R. Grundlagen der Strahlentherapie; Strahlenbiologie. In Sauer R, ed. *Strahlentherapie und Onkologie*, Vol. 4. München, Jena: Urban & Fischer, 2003. pp. 134-152.
206. Schaack J, Schedl P und Shenk T. Topoisomerase I and II cleavage of adenovirus DNA in vivo: both topoisomerase activities appear to be required for adenovirus DNA replication. *J Virol* 1990; 64:78-85
207. Scheithauer W und Hahn SA. Pankreaskarzinom. In Hiddemann W, Huber H, Bartram C, eds. *Die Onkologie*, Vol. 1. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. pp. 983-1008.
208. Schmidberger H, Rave-Frank M, Lehmann JJ, Weiss E, Gerl L, Dettmer N, Glomme S und Hess CF. Lack of interferon beta-induced radiosensitization in four out of five human glioblastoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55:1348-57
209. Schmitt CA und Lowe SW. Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *J Mol Med* 2002; 80:137-46
210. Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Marx D und Meden H. Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:2967-71
211. Schuetz EG, Beck WT und Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996; 49:311-8
212. Shao R, Karunakaran D, Zhou BP, Li K, Lo SS, Deng J, Chiao P und Hung MC. Inhibition of nuclear factor-kappaB activity is involved in E1A-mediated sensitization of radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272:32739-42
213. Sharp PA, Sugden B und Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973; 12:3055-63
214. Shenk T und Flint J. Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv Cancer Res* 1991; 57:47-85

215. Shibao K, Takano H, Nakayama Y, Okazaki K, Nagata N, Izumi H, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K und Itoh H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 83:732-7
216. Shisler J, Duerksen-Hughes P, Hermiston TM, Wold WS und Gooding LR. Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A is dependent on binding to either p300 or p105-Rb and induction of DNA synthesis. *J Virol* 1996; 70:68-77
217. Sinkovics J und Horvath J. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* 1993; 36:193-214
218. Sommerville J. Activities of cold-shock domain proteins in translation control. *Bioessays* 1999; 21:319-25
219. Stein U, Jurchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM und Royer HD. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J Biol Chem* 2001; 276:28562-9
220. Steinwaerder DS, Carlson CA und Lieber A. DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum Gene Ther* 2000; 11:1933-48
221. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N und Bell JC. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 2000; 6:821-5
222. Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Lee JK und Kao CH. Expression of mediated P-glycoprotein multidrug resistance related to Tc-99m MIBI scintimammography results. *Cancer Lett* 2000; 153:95-100
223. Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, Reynolds PN, Curiel DT und Alemany R. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Cancer Res* 2001; 7:120-6
224. Svensson C und Akusjarvi G. Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes. *Embo J* 1984; 3:789-94
225. Swamynathan SK, Nambiar A und Guntaka RV. Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *Faseb J* 1998; 12:515-22
226. Synold TW und Doroshow JH. Anthracycline dose intensity: clinical pharmacology and pharmacokinetics of high-dose doxorubicin administered as a 96-hour continuous intravenous infusion. *J Infus Chemother* 1996; 6:69-73
227. Takara K, Sakaeda T, Yagami T, Kobayashi H, Ohmoto N, Horinouchi M, Nishiguchi K und Okumura K. Cytotoxic effects of 27 anticancer drugs in HeLa and MDR1-overexpressing derivative cell lines. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:771-8
228. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 1966; 10:19-32
229. Tauber B und Dobner T. Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* 2001; 278:1-23
230. Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW und Wold WS. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 1996; 220:152-62
231. Tonn JC und Wiestler OD. Gehirntumoren. *In* Hiddemann W, Huber H, Bartram C, eds. *Die Onkologie*, Vol. 1. Berlin, Stuttgart: Springer, 2004. pp. 1380-1400.
232. Toth K, Tarakanova V, Doronin K, Ward P, Kuppuswamy M, Locke JE, Dawson JE, Kim HJ und Wold WS. Radiation increases the activity of oncolytic adenovirus cancer gene therapy vectors that overexpress the ADP (E3-11.6K) protein. *Cancer Gene Ther* 2003; 10:193-200

233. Trentin JJ, Yabe Y und Taylor G. The quest for human cancer viruses. *Science* 1962; 137:835-41
234. Trock BJ, Leonessa F und Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:917-31
235. Turnell AS, Grand RJ, Gorbea C, Zhang X, Wang W, Mymryk JS und Gallimore PH. Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *Embo J* 2000; 19:4759-73
236. Uchiumi T, Kohno K, Tanimura H, Matsuo K, Sato S, Uchida Y und Kuwano M. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 1993; 4:147-57
237. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM und Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:3004-8
238. Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM und Pastan I. The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem* 1987; 262:505-8
239. Uramoto H, Izumi H, Ise T, Tada M, Uchiumi T, Kuwano M, Yasumoto K, Funa K und Kohno K. p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* 2002; 277:31694-702
240. Vecchio SD, Ciarmiello A, Potena MI, Carriero MV, Mainolfi C, Botti G, Thomas R, Cerra M, D'Aiuto G, Tsuruo T und Salvatore M. In vivo detection of multidrug-resistant (MDR1) phenotype by technetium-99m sestamibi scan in untreated breast cancer patients. *Eur J Nucl Med* 1997; 24:150-9
241. Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I und Coombes RC. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res* 2001; 7:971-6
242. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E und Malkin MG. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16:1405-9
243. Wersto RP, Rosenthal ER, Seth PK, Eissa NT und Donahue RE. Recombinant, replication-defective adenovirus gene transfer vectors induce cell cycle dysregulation and inappropriate expression of cyclin proteins. *J Virol* 1998; 72:9491-502
244. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA und Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988; 334:124-9
245. Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL, 2nd, Roelvink PW, Li Y, Lee GM, Brough DE, Lizonova A und Kovesdi I. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 1997; 71:8221-9
246. Wildner O, Blaese RM und Morris JC. Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 1999; 59:410-3
247. Wilusz CJ, Wormington M und Peltz SW. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:237-46
248. Winberg G und Shenk T. Dissection of overlapping functions within the adenovirus type 5 E1A gene. *Embo J* 1984; 3:1907-12
249. Wolffe AP. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays* 1994; 16:245-51
250. Wolffe AP, Tafuri S, Ranjan M und Familari M. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol* 1992; 4:290-8

251. Wong ML und Hsu MT. Involvement of topoisomerases in replication, transcription, and packaging of the linear adenovirus genome. *J Virol* 1990; 64:691-9
252. Xie R, Hammarlund-Udenaes M, de Boer AG und de Lange EC. The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in *mdr1a* (-/-) and *mdr1a* (+/+) mice. *Br J Pharmacol* 1999; 128:563-8
253. Yahata H, Kobayashi H, Kamura T, Amada S, Hirakawa T, Kohno K, Kuwano M und Nakano H. Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128:621-6
254. Yamano T, Ura K, Morishita R, Nakajima H, Monden M und Kaneda Y. Amplification of transgene expression in vitro and in vivo using a novel inhibitor of histone deacetylase. *Mol Ther* 2000; 1:574-80
255. Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SP, Deeley RG und Gerlach JH. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res* 1999; 5:673-80
256. Yu DC, Chen Y, Dilley J, Li Y, Embry M, Zhang H, Nguyen N, Amin P, Oh J und Henderson DR. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res* 2001; 61:517-25
257. Yu DC, Sakamoto GT und Henderson DR. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res* 1999; 59:1498-504
258. Zerler B, Roberts RJ, Mathews MB und Moran E. Different functional domains of the adenovirus E1A gene are involved in regulation of host cell cycle products. *Mol Cell Biol* 1987; 7:821-9

## 8. Materialien

### 8.1 Angefertigte Lösungen

#### Citrat-Puffer 0,01 M pH6,0

für die Immunhistologie

Stammlösung A (0,1 M)

21,01 g Zitronensäure ( $C_6H_8O_7 \times H_2O$ )  
ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

Stammlösung B (0,1 M)

29,41 g Natriumcitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \times H_2O$ )  
ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

18 ml Stammlösung A

82 ml Stammlösung B

900 ml ddH<sub>2</sub>O

pH einstellen

#### Denaturierungslösung

für die Southern Blot Analyse

1,5 M NaCl

0,5M NaOH

ad 1 l ddH<sub>2</sub>O

#### 4 %-Formalin pH 7,4

für die Histologie und Immunhistologie

100 ml 40 %-Formalin

900 ml ddH<sub>2</sub>O

#### LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

zur Anzucht der Bakterien

5 g Bacto.Trypton

9 g Bacto-*Yeast*-Extrakt

10 g NaCl

ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 25 x MOPS-Puffer

für die Northern Blot Analyse

250 mM Na(CH<sub>3</sub>COO) $\times$ H<sub>2</sub>O (NaAc)

25 mM EDTA

1 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

ad 250 ml ddH<sub>2</sub>O

pH 7

#### Neutralisationslösung

für die Southern Blot Analyse

5M NaCl

1M Tris pH 7,0

ad 800 ml ddH<sub>2</sub>O

1 x PBS

für die Immunhistologie

8,0 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

Phosphat-Puffer

für die Immunhistochemie

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5  
150 mM NaCl  
1,5 % Pferdeserum

Plaquetest-Medium

für den Plaquetest auf 293-Zellen

100 ml MEM  
12 ml 10x F11  
3,2 ml 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>  
0,4 ml 500x Fungizone  
2 ml Penizillin/Streptomycin  
2 ml Glutamin  
2 ml 5 % Hefeextrakt  
9 ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

QIAgen-Puffer P1

für die Plasmid-Herstellung

50 nM Tris-HCl pH 8,0  
10 mM EDTA  
vor Gebrauch RNase zusetzen

QIAgen-Puffer P2

für die Plasmid-Herstellung

0,2 M NaOH  
1 % SDS

QIAgen-Puffer N3

für die Plasmid-Herstellung

2,55 M Kaliumacetat pH 4,8

20 x SSC

für die Northern & Southern Blot Analyse

3 M NaCl  
0,3 M Natriumcitrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O)  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O  
pH7

TAE-Puffer für die Gelelektrophorese

242 g Tris- Base  
 57,1 ml Essigsäure  
 100 ml 0,5M EDTA, pH 8,0  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O

TBE-Puffer für die Gelelektrophorese

108,0 g Tris-Base  
 55,0 g Borsäure  
 8,3 g Na<sub>4</sub>-EDTA  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O

TE-Puffer für die Bestimmung der Viruskonzentration

1,21 g Tris-HCl  
 0,327 g EDTA  
 800 ml H<sub>2</sub>O, pH 8,0  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O

0,01 M Tris-Puffer pH 7,6 (Stammlösung) für die Immunhistologie

60,5 g Trizma-Base  
 ad 700 ml ddH<sub>2</sub>O  
 mit 2 N Salzsäure pH 7,6 einstellen  
 ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O  
 pH überprüfen  
 90 g NaCl

Viral Preservation Medium für Virusaufreinigung

1 M Tris, pH 8,0  
 5 M NaCl  
 0,1 g BSA  
 50 µl Glyzerin  
 ad 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O

**8.2 Materialien**

Acc I (Xmi I)	ER1481	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Amphotericin B (Fungizone)	1081497	Roche, Mannheim, BRD
Ampizillin	A 9518	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Anti-CAR Clone RmcB	05-644	Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA
Anti-Rabbit IgG Fluorescin	F313	Dako, Hamburg, BRD
Agarose	35-1020	peq lab, Erlangen, BRD
Biotinylated Rabbit Anti-Goat Ig	E 0466	Dako, Hamburg, BRD
Bovines Serum Albumin	A 7906	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	EF0341	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Chloroform	B 2629	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Cäsiumchlorid	CSCL1KG	Quantum Appligene, Illkirch, F
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D 2650	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Dako-Pen / Fettstift	S 2002	Dako, Hamburg, BRD
Daunubicin / Daunoblastin		Pfizer, New York, USA
DH10B Bakterien	18297-010	Gibco, BRL, Karlsruhe, BRD
DMEM	FG 0435	Biochrom KG, Berlin, BRD
dNTPs	R 0161	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Docetaxel	O 1885	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Ethanol p.a.	1.00983.1000	Merck, Schwalbach, BRD
Ethidiumbromid	200271	Roche, Mannheim, BRD
Eukitt		Kindler, Freiburg, BRD
ExpressHyb Hybridisation Solution	636831	B&D Biosciences, Fraga, Spanien
Fetales Kälberserum	3702-P232310	Biochrom, Cambridge, UK
Fetuin	F3385	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Formaldehyd, Formalin	F 8775	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
20G 1½ 0,9x40 Nadel	301300	B&D Microlane 3, Fraga, Spanien
Glukose	1.08337.0250	Merck, Schwalbach, BRD
L-Glutamin	K 0283	Biochrom KG, Berlin, BRD
Glykogen	G 8751	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Glyzerin	50049	Fluka, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt, Select Yeast Extract	212750	B&D Biosciences, Fraga, Spanien
HRP-konjugierter Kaninchen Anti-Ziegen IgG	P 0449	Dako, Hamburg, BRD
Insulin	K 9030	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Irinotecan / Camptothecin		Sanofi-Aventis, Strasbourg, F
Isoamylalkohol	W205702	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Isopropanol p.a.	W200387	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Kaninchen Anti-Maus FITC (AK)	F 0313	Dako, Hamburg, BRD
1 kbp Leiter	25-2040	Gibco BRL, Karlsruhe, BRD
KpnI	ER 0501	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
KpnI-Puffer	B 29	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Kristallviolett	C 6158	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Kresolrot	K 4000	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Levamisol	X 3021	Dako, Hamburg, BRD
L-15 - Leibovitz's	BE 12-700 F	BioWhittaker / Cambrex, Vervies, Belgien
6x Loading Buffer	R0611	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
25 mM Magnesiumchlorid	R0971	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
MEM Vitamine	K 0373	Biochrom KG, Berlin, BRD
MOPS	M 5162	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
MicroSpin G-25 Säule	27-5325-01	Amersham, Buckinghamshire, UK
Natriumcarbonat	6329	Merck, Schwalbach, BRD
Nuklease freies Wasser	P 1193	Promega, Madison, USA
OptiMEN I	51985-026	Gibco BRL, Karlsruhe, BRD
Penizillin/Streptomycin	A 2213	Biochrom KG, Berlin, BRD
Pferdeserum	H 1270	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Prime-It Random Labeling Kit	300385	Stratagene, Amsterdam, N
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	P 3803	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA

Paraformaldehyd	P 6148	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
PBS – Dulbecco (1x)	L 1825	Biochrom KG, Berlin, BRD
10 x Taq Puffer + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	R0161	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Polyklonaler Anti-Adenovirus Antikörper	AB 1056	Chemicon, Temecula, CA, USA
Proteinase K	19131	Qiagen, Hilden, BRD
QIAgen Dneasy Tissue Kit	69504	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer AW1	19081	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer AW2	19072	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer AL	19075	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer ALT	19076	Qiagen, Hilden, BRD
Collection Tubes	19201	Qiagen, Hilden, BRD
Proteinase K	19131	Qiagen, Hilden, BRD
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer PB	19066	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer PE	19065	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer QG	19063	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer EB (10 mM TrisCl, pH 8,5)		Qiagen, Hilden, BRD
QIAquick Nucleotide Removal Kit	28306	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer PN	19071	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer PE	19065	Qiagen, Hilden, BRD
Puffer EB		Qiagen, Hilden, BRD
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen, Hilden, BRD
Rα mouse IgG RPE	R 0439	Dako, Hamburg, BRD
RNase	109126	Roche, Mannheim, BRD
RNase freies Wasser	P 119C	Promega, Madison, USA
RNA-Ladungspuffer	R 4268	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
RPM I	FG 1215	Biochrom KG, Berlin, BRD
Slide-A-Lyzer Buoy (White)	66430	Pierce, Rockford, IL, USA
Slide-A-Lyzer Dialysis Product MWCO 3,500	66110	Pierce, Rockford, IL, USA
Spritze 2 ml	300928	B&D Discardit II, Fraga, Spanien
Spritze 5 ml	3009050	B&D Discardit II, Fraga, Spanien
Spritze + Kanüle 0,3 ml Insulin 100	324884	B&D Biocsciences, Fraga, Spanien
Streptavidin	D 0396	Dako, Hamburg, BRD
Streptavidin – Peroxidase <i>conjugate</i>	S 5512	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Streptavidin – Alkalische Phosphatase	D 0396	Dako, Hamburg, BRD
Sulforhodamin B	S 1402	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
SW28-Röhrchen		Beckman, Fullerton, CA, USA
10 x Taq Puffer + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	R0161	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
T <sub>4</sub> -Ligase	EL 0021	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
T <sub>4</sub> -Ligase Puffer	DL0021	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Trazylol 0,5	34579.00.00	Bayer Vital, Leverkusen, BRD
Trichloressigsäure (Tris)	T 8657	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Trichostatin A	647925	Calbiochem, San Diego, USA
Trizol Reagent	15596-026	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau Lösung	T 8154	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA
Trypsin	L 2163	Biochrom KG, Berlin, BRD
Turbo Blotting System	10416330	Schleicher & Schuell
Tween 20	T 9286	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA

---

Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I	SK 5100	Vector, Burlingame, CA, USA
Whatman-Filterpapier 3 MM	162-0233	Whatman, Göttingen, USA
Xylapan	11882	Chassot, Ravensburg, BRD

### 8.3 Tiere

Cr1:CD1-nu Mäuse	CD1H0-W	Charles River Laboratories, Schweinfurt, BRD
------------------	---------	---

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Mechanismen der Vielfachresistenz
- Abb. 2** **A.** Funktionen des Y-Box bindenden Proteins YB-1 (nach Kohno et al., 2003<sup>125</sup>) **B.** Aufbau von YB-1
- Abb. 3** **A.** Adenovirus Typ 5 Kapsid-Aufbau. **B.** Adenovirus Typ 5 Genomstruktur
- Abb. 4** Zelluläre Interaktionen der frühen adenoviralen Proteine
- Abb. 5** Funktionsweise onkolytischer Adenoviren
- Abb. 6** Ansatz einer Polymerasekettenreaktion
- Abb. 7** Ausbreitung der E1A-Proteine 12S und 13S, die sich aus drei *conserved regions* CR1-3 zusammensetzen, und Darstellung der Deletion von dl520
- Abb. 8** Zytostatikakonzentrationen der IC<sub>50</sub>-Werte
- Abb. 9** Aufbau vom Plasmid pUC18 mit seinen Enzymschnittstellen
- Abb. 10** Aufbau der Bestrahlung im Xenograft Mausmodell
- Abb. 11** Beweis der Deletion von dl520
- Abb. 12** Northern Blot Analyse von der E1A (**A**) und der E3 (**D**) mRNA in MDR-positiven 257RDB-Zellen und MDR-sensiblen HeLa-Zellen
- Abb. 13** Transduktionseffizienz von Ad-GFP in U87-, U373- und 257RDB-Zellen
- Abb. 14** Effektive adenovirale Transduktion der U87-, U373- und 257RDB-Zellen, aber nicht der T98-G-Zellen
- Abb. 15** Effektive Infektionsfähigkeit der U87-Zellen in der FACS-Analyse
- Abb. 16** Effektive Transduktionsfähigkeit der U373-Glioblastom-Zellen in der FACS-Analyse
- Abb. 17** Schlechte Infektionsfähigkeit der T98-G-Glioblastom-Zellen in der FACS-Analyse
- Abb. 18** Effektive Transduktionsfähigkeit der 257RDB-Zellen in der FACS-Analyse
- Abb. 19** Steigerung der Kernlokalisation von YB-1 nach Bestrahlung und Irinotecan-Inkubation in den U373-Zellen
- Abb. 20** dl520 lysiert effektiv die Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, in denen YB-1 teilweise im Kern vorliegt
- Abb. 21** dl520 lysierte effektiv die Glioblastom-Zelllinien U87 und U373, in denen YB-1 teilweise im Kern vorliegt
- Abb. 22** Verstärkung der Zelllyse von dl520 durch Bestrahlung, Irinotecan, Docetaxel und Trichostatin A in der Glioblastom-Zelllinie U87
- Abb. 23** Verstärkung der Zelllyse von dl520 durch Bestrahlung, Irinotecan, Docetaxel und Trichostatin A in der Glioblastom-Zelllinie U373
- Abb. 24** Vergleichbare Expression des adenoviralen E1B55K nach Infektion mit dem Adenovirus dl520 und Ad5-WT in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373
- Abb. 25** Vergleichbare Virusproduktion von dl520 und Ad5-WT in den U373-Zellen, höhere Partikelbildung von dl520 in den U373- und 257RDB-Zellen
- Abb. 26** Höhere Zelllyse der Glioblastom-Zellen nach Infektion mit Ad5-WT als mit dl520
- Abb. 27** Moderate Wachstumsinhibition der U87-Zellen und mittlere Inhibition der U373-Zellen durch Bestrahlung mit 4+4 Gy
- Abb. 28** Verbesserter zytopathischer Effekt von dl520 nach Bestrahlung in den Glioblastom-Zelllinien U87 und U373
- Abb. 29** Verstärkung der Replikation von dl520 durch Bestrahlung in den Glioblastom-Zelllinien
- Abb. 30** Erhöhung der Virusproduktion von dl520 durch Bestrahlung

- Abb. 31** Erhöhung der Virusfreisetzung von dl520 aus den Glioblastom-Zellen durch Bestrahlung
- Abb. 32** Wachstumsinhibition der subkutanen U87-Tumoren im *in vivo* Xenograft-Modell durch dl520, Bestrahlung und die Kombination aus dl520 und Bestrahlung
- Abb. 33** Wachstumsinhibition der subkutanen *in vivo* U87-Tumoren durch dl520, Bestrahlung und die Kombination aus dl520 und Bestrahlung, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 genannten Therapien untereinander.
- Abb. 34** Stärkste Wachstumsinhibition der subkutanen U373-Tumoren im *in vivo* Xenograft-Mausmodell durch die Kombinationstherapie aus dl520 mit Bestrahlung
- Abb. 35** *Proof of Principle* der verbesserten Wachstumsinhibition von dl520 in Kombination mit Bestrahlung in subkutanen U373-Tumoren
- Abb. 36** Nachweis des Adenovirus dl520 in den mit Virus behandelten U87-Tumoren, jedoch nicht in den bestrahlten und den Kontrolltumoren
- Abb. 37** Signifikanter Größenunterschied des U87-Kontrolltumors im Vergleich zu den mit Bestrahlung alleine, dl520 alleine und mit dl520 + Bestrahlung behandelten Tumoren
- Abb. 38** Inhomogene Struktur der mit dl520 behandelten U87-Tumoren im Gegensatz zur homogenen Struktur der bestrahlten und Kontrolltumoren
- Abb. 39** Perivaskuläre Abwehrreaktion in der Leber der mit Virus behandelten Mäuse, hepatische Nekrosen der mit Bestrahlung behandelten Mäuse des U87-Xenograft-Modells
- Abb. 40** Niedrige Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Daunorubicin
- Abb. 41** Normale bis hohe Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber den Zytostatika Trichostatin A und Docetaxel, relative Resistenz gegenüber Irinotecan
- Abb. 42** Hohe Sensibilität der 257RDB-Zellen gegenüber Trichostatin A + Irinotecan bzw. + Docetaxel
- Abb. 43** Höchste Sensibilität der Glioblastom-Zellen gegenüber Trichostatin A + Irinotecan, mittlere Sensibilität gegenüber den Kombinationen Trichostatin A + Docetaxel und Docetaxel + Irinotecan
- Abb. 44** Stärkste Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 in den Glioblastom-Zellen nach Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A für 24 h
- Abb. 45** Stärkste Erhöhung der Zelllyse der Glioblastom-Zellen durch dl520 mittels der Kombination aus Irinotecan + Trichostatin A
- Abb. 46** Keine Erhöhung des zytopathischen Effektes von dl520 in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen durch Zytostatika
- Abb. 47** Nach 5 h Inkubation keine Verstärkung der Zelllyse durch dl520 in den U87-Zellen, schwache Verstärkung in den U373-Zellen
- Abb. 48** Verstärkte Zelllyse von dl50 durch Daunorubicin in den U87-Zellen, jedoch nicht in den U373-Zellen
- Abb. 49** Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 durch Daunorubicin in den Glioblastom-Zellen, jedoch nicht in den vielfachresistenten 257RDB-Zellen
- Abb. 50** Erhöhung der DNA-Replikation von dl520 durch Docetaxel in den Glioblastom-Zellen
- Abb. 51** Signifikante Erhöhung der Replikation von dl520 in den Glioblastom-Zellen durch Irinotecan-Inkubation

- Abb. 52** Starke konsekutive Steigerung der Replikation von dl520 durch Inkubation mit aufsteigenden Trichostatin A-Konzentrationen für 24 und 5 h in den Glioblastom-Zellen
- Abb. 53** Starke konsekutive Steigerung der Replikation von dl520 durch Inkubation mit aufsteigenden Trichostatin A-Konzentrationen für 24 und 5 h in den U87- und U373-Zellen
- Abb. 54** Signifikante Steigerung der viralen Replikation den Glioblastom-Zellen durch Inkubation mit Irinotecan + Trichostatin A
- Abb. 55** Kein bzw. ein nur gering inhibitorischer Effekt von Irinotecan auf die Virusproduktion von dl520
- Abb. 56** Erhöhung der CAR-Expression auf den Glioblastom-Zellen durch Trichostatin A-Inkubation
- Abb. 57** Zwei Aktivierungswege der adenoviralen Replikation
- Abb. 58** Circulus Vitiosus der onkolytischen Therapie mit YB-1

## 10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABC-Methode	<i>avidin binding complex</i> Methode
abh.	abhängig
ADP	<i>adenoviral death protein</i>
AdE1-	E1-deletiertes Adenovirus Typ 5
Ad312	E1A-deletiertes Adenovirus Typ 5
Ad5-WT	Wildtyp-Adenovirus Typ 5
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
ASGT	<i>American Society of Gene Therapy</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma</i>
bzw.	beziehungsweise
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca.	zirka
CAR	Coxsackie-Adenoviraler-Rezeptor
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CPE	<i>cytopathic effect</i>
CR1-3	<i>conserved region</i> 1-3
CsCl	Cäsiumchlorid
CSD	<i>cold shock domain</i>
Da	Dalton
Dauno.	Daunorubicin
D-MEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
dd	doppelt destilliert
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanintriphosphat
dl520	E1A-13S deletiertes Adenovirus dl520
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphat
Doce.	Docetaxel
Do. + Ir.	Docetaxel + Irinotecan
D-MEM Medium	Dulbecco's <i>Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein
et al.	<i>et alii</i> (und Mitarbeiter)
E1-4	<i>early genes</i> 1-4
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoreszenzstoff Isothiozyanat
FKS	fetales Kälberserum
GFP	Grün-Fluoreszierendes-Protein
IC	<i>induced cytotoxicity</i>

Irino.	Irinotecan
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
H <sub>2</sub> O	Wasser
Irino.	Irinotecan
Ir. + Tr.	Irinotecan + Trichostatin A
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Ko.	Kontrolle
Kombi.	Kombination
Konz.	Konzentration
L1-5	<i>late genes 1-5</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
Mech.	Mechanismus
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanine-DNA Methyltransferase
mind.	mindestens
MMR	<i>mismatch repair</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MRP	<i>multidrug resistance related protein</i>
NaAc	Natriumacetat
Na(CH <sub>3</sub> COO) <sub>x</sub> H <sub>2</sub> O	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumphosphit
NIH	National Institutes of Health
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P-Gp.	P-Glykoprotein
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RGD-Sequenz	Arg-Gly-Asp Sequenz = Arginin-Glycin-Aspartat Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>round(s) per minute</i>
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RTx	Bestrahlung
RTx + V	Bestrahlung + Virus
S.	Seite
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	<i>sodium chloride / trisodium citrate</i>
Sys.	System
TCA	Trichloressigsäure
Tricho.	Trichostatin A
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tr. + Do.	Trichostatin A + Docetaxel
u.a.	unter anderem
U87	U87-MG
U373	U373-MG
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

V.	Virus
YB-1	Y-Box bindendes Protein 1
z.B.	zum Beispiel
257RDB	EPG-257RDB = 257
#	Anzahl

### Einheiten

bp	<i>base pair(s)</i> = Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
cm	<i>centimeter(s)</i> = Zentimeter
cm <sup>2</sup>	<i>cubic centimeter(s)</i> = Quadratzentimeter
d	<i>day(s)</i> = Tag(e)
G	<i>gauge</i>
g	Gramm
Gy	<i>Gray</i>
h	<i>hour(s)</i> = Stunde(n)
I.E.	Internationale Einheiten
kb	Kilobase(n)
kg	Kilogramm
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
moi	<i>multiplicity of infection</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
pfu	<i>plaque forming unit(s)</i>
rpm	<i>round(s) per minute</i>
sec	<i>second(s)</i> = Sekunde(n)
V	Volt
W	Watt
%	Prozent
∑	Summe
√	Wurzel

## 11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. med. Dr. B. Gänsbacher, Direktor des Instituts für Experimentelle Onkologie der Technischen Universität München, für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn PD Dr. rer.-nat. P. S. Holm möchte ich außerdem ganz besonders herzlich für die interessante Themenstellung, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation, für die jederzeit gewährte riesige Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Dissertation, für unzählige Besprechungen und für die Durchsicht des Manuskriptes danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Holm, insbesondere Tanja Dravits, Alexandra Bernshausen und Klaus Mantwill möchte ich für die physische und psychische Unterstützung, für die Einarbeitung in die Zellkultur und andere gängige Labortechniken, für die Geduld bei immer neuen Laborversuchen und das hervorragende Klima danken.

Herzlich bedanke ich mich bei dem ganzen Team des Institutes für Strahlentherapie des Klinikums Rechts-der-Isar, insbesondere bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Molls, Frau PD Dr. med. A.-L. Grosu und Dipl.-Phys. S. Stärk für die Kooperation und die Unterstützung der durchgeführten Bestrahlungsversuche.

Ein besonderes Dankeschön geht an PD Dr. rer.-nat. H. Lage vom Institut für Pathologie der Charité in Berlin für die Kooperation und für die Unterstützung der immunhistochemischen Versuche.

Frau M.-L. Schmeller danke ich für die Hilfe bei der Analyse der Immunhistologie und Immunhistochemie.

Darüber hinaus sei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Experimentelle Onkologie für das kollegiale Miteinander, für das besonders angenehme Arbeitsklima und die vielen fachlichen und aber auch nichtfachlichen Diskussionen gedankt.

Meinen Freunden möchte ich ein besonderes Dankeschön für ihre Geduld und ihre stete Unterstützung aussprechen.

Mein größter Dank geht jedoch an meine Eltern, die mich immer gefördert und mich während meiner Ausbildung finanziell und moralisch unterstützt haben. Sie haben diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

## 12. Curriculum Vitae

### Persönliche Daten:

Name Alexa Bieler  
 Geburtsdatum 9. Juli 1981  
 Geburtsort Viersen, Deutschland  
 Eltern Rolf - Michael Bieler, Rechtsanwalt  
 Anne Bieler, geb. Thoms, Architektin  
 Familienstand ledig  
 Staatsbürgerschaft Deutsch



### Schul-/Weiterbildung:

1987-1991 katholische Grundschule Remigius, Viersen  
 1991-1997 Erasmus-von-Rotterdam-Gymnasium, Viersen  
 1997-1999 Robert Louis Stevenson School, Pebble Beach, Kalifornien, USA  
 Independent Private Highschool  
 Mai 1999 Graduation, Deutsche Hochschulreife, Note: „1,4“  
*Cum Laude*-Gesellschaft und *Honors*-Platzierung in 1998 und 1999  
*Best French Student 1999, Best Science Student 1999*  
 Okt. 1999 - Okt. 2001 Humanmedizin Studium, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
 vorklinischer Studienabschnitt  
 05.09.2001 Physikum, Note: „sehr gut“ (mündlich), „gut“ (schriftlich)  
 seit Okt. 2001 Technischen Universität München, klinischer Studienabschnitt  
 19.09.2002 1. Staatsexamen, Note: „gut“  
 13.03.2005 2. Staatsexamen, Note: „sehr gut“ (mündlich), „gut“ (schriftlich)  
 April 2005 - April 2006 Praktisches Jahr  
 1. Tertial - Weill Medical College der Cornell University, New York, NY, USA  
 Department for Internal Medicine; Memorial Sloan Kettering Cancer  
 Center, New York Presbyterian Hospital, Hospital for Special Surgery  
 2. Tertial - UniversitätsSpital Zürich, Schweiz  
 Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie  
 - University of Sydney, Australien  
 Department for Anesthesiology & Emergency Medicine, Concord Hospital  
 3. Tertial - TU München  
 Abteilung für Viszeralchirurgie, Klinikum Rechts-der-Isar  
 Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Klinikum Rechts-der-Isar  
 16.05.2006 3. Staatsexamen, Note: „gut“, Gesamtnote: „1,83“  
 19.05.2006 Approbation als Ärztin

### Stipendien:

- Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
- Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung
- Stipendium des DAAD (für den 4-monatigen PJ-Aufenthalt in den USA)

### Praktika:

Sommer 1997 Augenarztpraxis, Dr. Grefkes, Viersen  
 28.06. - 30.09.1999 Intensivstation des Allgemeinen Krankenhauses Viersen  
 15.02. - 23.02.2001 Plastische, Rekonstruktive & Handchirurgie, Klinikum Großhadern,  
 München  
 26.02. - 09.03.2001 Plastische & Rekonstruktive Chirurgie, Klinikum Rechts-der-Isar, München  
 14.03. - 14.04.2002 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Klinikums Rechts-der-Isar, München  
 01.09. - 30.09.2002 Orthopädie, Traumatologie & Handchirurgie, Universitätsklinikum  
 Lapeyronie, Montpellier, Frankreich  
 11.02. - 15.03.2003 Rekonstruktive Chirurgie, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA  
 21.07. - 15.09.2003 Institut für Experimentelle Onkologie, Klinikums Rechts-der-Isar, München  
 16.02. - 09.04.2004 Strategieberatung Roland Berger im Kompetenzbereich *Pharmaceuticals & Healthcare*

**Sprachkenntnisse:**

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend aufgrund des zweijährigen Auslandsaufenthaltes
Französisch	Fortgeschrittenenstatus
Latein	Abschluss des Großen Latinums mit „gut“

**PC-Kenntnisse:** fundierte Kenntnisse MS Office, SAP

**Sonstige Kurse:**

- Kursus Chirurgische Nahttechniken, München, 2002
- Seminar Notfallmedizin und Rettung, Anästhesie und Rettungsdienst, München 2002
- Kursus Laparoskopie und minimalinvasive Chirurgie, München 2002
- Kursus Mikrochirurgie, München, 2004
- Kursus Sonographie & Radiologie, München, 2003 bzw. 2004
- Kursus Elektrokardiographie, 2004

**Sonstiges Engagement:**

- LEO-Club Mitglied Oberkassel mit Sekretärstätigkeit & Gast Maximilianeum (Serving-Club) (seit 1999)
- Junge Union Viersen & München-Maxvorstadt (seit 1999)
- CDU/CSU Viersen & München-Maxvorstadt (seit 1999)
- RCDS Heinrich-Heine-Universität (1999 - 2001)  
stellvertretende Vorsitzende, Studierendenparlament, medizinischer Fakultätsrat, Ausschuss für Forschung & wissenschaftl. Nachwuchs
- dfa *Chief Exchange Officer*, Deutscher Famulantenaustausch der TU München (2001-2003)
- *Case Discussion Round* Koordinatorin des Vorbereitungskurses für das Cornell-Programm der TU München (2004-2005)
- Ferienakademie zweiwöchiger Kurs für ausgewählte Studenten aller Fachbereiche der TU München  
Teilnahme am Medizinerkurs in 2003, Koordinatorin & Betreuerin in 2004
- Management-Akademie Teilnahme an der Management-Akademie der Studienstiftung im Bereich Strategisches Marketing (2004)

**Hobbies:**

- Golf (Hdcp. 7)
- Tennis
- Klavier