

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

**Analyse der E2 Gen vermittelten adenoviralen Replikation und
Untersuchung eines neuen, adenoviralen, YB-1 abhängigen
onkolytischen Vektors**

Nadia Alejandra Köhler Vargas

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. Priv.-Doz. Dr. P.S. Holm

Die Dissertation wurde am 14.12.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007
angenommen.

Für Kiki

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	Onkologische Erkrankungen	8
1.2	<i>MDR 1</i> und <i>MRP 1</i> Expression in vielfachresistente Tumorzellen	10
1.3	Der Transkriptionsfaktor YB-1	12
1.4	Adenovirale Vektoren in der Gentherapie	16
1.4.1	Aufbau der Adenoviren	17
1.4.2	Infektion und Aufnahme in die Zelle	18
1.4.3	Adenovirale Replikation	18
1.4.3.1	E1 Gene	19
1.4.3.2	E2 Gene	21
1.4.3.3	E3 und E4 Gene	23
1.4.4	Onkolytische Adenoviren	23
1.5	Kombinationstherapie	27
2	ZIELSETZUNG	29
3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Materialien	30
3.2	Bakterienkultur	32
3.3	Viren	33
3.4	Puffer und Lösungen	33
3.4.1	PCR	33
3.4.2	DNA Präparation	33
3.4.3	Agarosegelelektrophorese	34
3.4.4	Southern Blot	34
3.4.5	Northern Blot	34
3.4.6	Plaque Test	34
3.4.7	Kristallviolett färbung	35

3.4.8	Sulforhodamintest	35
3.4.9	Kits	35
3.5	Methoden.....	35
3.5.1	PCR.....	35
3.5.2	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.5.3	Reinigung der DNA	37
3.5.4	Messung der DNA.....	37
3.5.5	Enzymverdau von DNA.....	38
3.5.6	Ligation der DNA.....	38
3.5.7	Herstellung glatter DNA-Enden.....	38
3.5.8	Transformation von DNA in DH10B-Zellen.....	38
3.5.9	DNA-Minipräparation	39
3.5.10	DNA-Maxipräparation	39
3.5.11	Southern Blot Analyse	40
3.5.11.1	Sondenherstellung	40
3.5.11.2	DNA-Gewinnung	41
3.5.11.3	DNA-Verdau	41
3.5.11.4	Membrantransfer	42
3.5.11.5	Prähybridisierung, Hybridisierung und Filmentwicklung	42
3.5.12	Northern Blot Analyse.....	43
3.5.12.1	Sondenherstellung	43
3.5.12.2	RNA Isolierung	44
3.5.12.3	Formaldehyd-Gelelektrophorese.....	45
3.5.12.4	Membrantransfer, (Prä)Hybridisierung und Filmentwicklung	45
3.5.13	Konstruktion von Xvir03.....	46
3.5.14	Virusamplifikation.....	47
3.5.14.1	Herstellung des G1-Stocks.....	48
3.5.14.2	Herstellung des G2-Stocks.....	48
3.5.14.3	Maxiprep-Isolierung von Viren	48
3.5.15	Zellkultur	49
3.5.16	Plaquetest zur pfu Bestimmung.....	50
3.5.17	Infektion von Zellen mit Virus	50
3.5.18	Kristallviolettffärbung	51
3.5.19	Sulforhodamin-Test zur Bestimmung von Zytostatika IC ₅₀ Werten.....	52
3.5.20	Kombination von Xvir03 und Zytostatika	53
3.5.21	FACS Analyse	53
3.5.22	Immunhistochemie.....	54

4	ERGEBNISSE	55
4.1	Zytopathischer Effekt Versuch mit Ad312, dl520 und Δ24	55
4.1.1	Replikation von Δ 24 in HeLa, DU145 und U2OS Zellen im Vergleich zu Ad312 und dl520 Virus am effektivsten	55
4.1.2	Lichtmikroskopische Analyse von U2OS-Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Δ 24 Virus	59
4.2	Analyse der Replikationskinetik mittel E2 early und E2 late Nachweis	60
4.2.1	Synthese und Überprüfung der verwendeten E2 early und E2 late Sonden	60
4.2.2	Stärkere E2 late Expression im Vergleich zu E2 early in Δ 24 infizierten HeLa, U2OS und U87 Zellen	60
4.2.3	Stärkere E2 late Expression im Vergleich zur E2 early Expression in AdWT infizierten U2OS Zellen	65
4.3	Untersuchung der E1B55K und E4orf6 Expression	67
4.3.1	Herstellung von E1B55K und E4orf6 Sonden für Northern Blot mittels PCR	67
4.3.2	E1B55K Expression nach Infektion mit dl520 nur bei hoher MOI vergleichbar mit den Ergebnissen der Δ 24 Infektion	67
4.3.3	E4orf6 Expression nach Infektion mit dl520 nur bei hoher MOI vergleichbar mit den Ergebnissen der Δ 24 Infektion	69
4.3.4	Auswertung der Infektion von U2OS Zellen mit jeweils 5 und 50 pfu dl520 und Δ 24 durch Plaque Assay	70
4.4	Xvir03	71
4.4.1	Überprüfung der E1A Negativität von Xvir03 mittels PCR	71
4.4.2	IRES Nachweis in Xvir03 infizierten U2OS Zellen	72
4.4.3	Replikationsnachweis von Xvir03 mittels Southern Blot	72
4.4.4	Zytopathischer Effekt Versuch mit Xvir03 in verschiedenen Zelllinien	73
4.4.4.1	Replikation von Xvir03 im Vergleich zu Ad312 und dl520 am effektivsten in allen Zelllinien	73
4.4.4.2	Bestätigung der Replikation von Xvir03 durch lichtmikroskopische Analyse	80
4.4.5	Keine S-Phase Induktion durch Xvir03 in HeLa Zellen	82
4.4.6	E2 late Expression in Xvir03 infizierten DU145 und U2OS Zellen stärker als die E2 early Expression	83
4.4.7	Immunhistochemie	86
4.4.8	Erniedrigung der <i>MRP</i> Expression in infizierten DU145 und PC3 Zellen nach Infektion mit Xvir03 Virus	87
4.4.9	Erniedrigung der <i>MDR</i> Expression in infizierten 257RDB Zellen nach Infektion mit Xvir03 Virus	90

4.5	Kombination verschiedener Zytostatika mit Xvir03	91
4.5.1	Sulforhodamintest zur Bestimmung der IC ₅₀ Werte von Daunorubicin, Docetaxel und Irinotecan auf DU145 Zellen	91
4.5.2	Sulforhodamintest zur Bestimmung der IC ₅₀ Werte von Daunorubicin, Docetaxel und Irinotecan auf PC3 Zellen	94
4.5.3	Bessere Zelllyse durch Xvir03 im Vergleich zu Ad312 in Kombination mit Docetaxel in PC3 Zellen.....	97
4.5.4	Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Xvir03 infizierten PC3 Zellen in Kombination mit Docetaxel	100
4.5.5	Effektive Zelllyse durch Xvir03 in Kombination mit Irinotecan in PC3 Zellen	102
4.5.6	Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Xvir03 infizierten und mit Irinotecan inkubierten PC3 Zellen.....	105
4.5.7	Effektive Zelllyse durch Xvir03 in Kombination mit Daunorubicin in DU145 Zellen.	107
5	DISKUSSION.....	110
5.1	Der Einsatz von adenoviralen Vektoren in der Gentherapie.....	110
5.2	Die Aktivierung der E2 Gene durch die untersuchten Vektoren	111
5.2.1	Ad312.....	111
5.2.2	dl520	112
5.2.3	Δ24	112
5.2.4	Kinetik der E2 early und E2 late Aktivierung.....	113
5.3	Die besondere Rolle von E1B55K und E4orf6.....	115
5.4	Replikation und Charakteristika von Xvir03.....	116
5.4.1	Replikation von Xvir03 in Tumorzellen	116
5.4.2	Keine Induktion der S-Phase durch Xvir03.....	118
5.4.3	Kinetik der E2 early und E2 late Expression bei Xvir03	118
5.4.4	YB-1 Nachweis im Kern nach Infektion mit Xvir03	119
5.5	Xvir03 und Vielfachresistenz	119
5.5.1	Abschwächung des <i>MDR</i> oder <i>MRP</i> Signals durch Xvir03	119
5.6	Kombinationstherapie	121
5.6.1	Kombination von adenoviralen Vektoren mit Zytostatika.....	121
5.6.2	Xvir03 und Docetaxel in PC3 Zellen	121
5.6.3	Xvir03 und Irinotecan in PC3 Zellen	122
5.6.4	Xvir03 und Daunorubicin in DU145 Zellen.....	123

5.7	Ausblick.....	124
5.8	Zusammenfassung.....	126
6	DANKSAGUNG	128
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	129
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
9	TABELLENVERZEICHNIS	134
10	LITERATURVERZEICHNIS	136

1 Einleitung

1.1 Onkologische Erkrankungen

Krebserkrankungen stellen heutzutage nach den Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache für die Bevölkerung der westlichen Welt dar [215].

Die Entstehung von Krebs beginnt mit der bösartigen Transformation einer bis dahin normalen somatischen Zelle, ausgelöst durch UV-Strahlung, karzinogene Verbindungen oder Viren (HPV, EBV, HBV). Dabei sind insbesondere Rezeptoren, Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren und Botenstoffe, die die Regulation der Zellproliferation beeinflussen, betroffen. Auch Tumorsuppressorgene wie p53 und pRb, die eine zentrale Rolle in der normalen Regulation des Zellzyklus spielen und ein ungehemmtes Wachstum entarteter Zellen verhindern können, gehören zu den am häufigsten mutierten Genen in Tumorzellen. Meistens erfolgen mehrere Mutationen nach- oder nebeneinander, bis die nun neoplastisch transformierte Zelle sich ungehindert vermehren kann. Diese Ansammlung transformierter Zellen wird durch Diffusion ernährt, erst ab einer Größe von 2 mm erfolgt die Bildung neuer Blutgefäße (Tumorangiogenese). Letztere bestimmt wesentlich die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors mit. Ab einem gewissen Umfang findet zunehmend ein Eindringen in die umgebenden Organstrukturen statt. Hierbei wird mit Hilfe von Enzymen und aktiver Migration der Tumorzellen die Invasion in Lymph- und Blutgefäße vorangetrieben. Einzelne Zellen werden aus dem Tumor gelöst, verschleppt und siedeln sich ihrer neuen Umgebung an, um dort einen neuen Tumorzellverband zu bilden [167].

Im Verlauf dieser Entwicklung kann es jederzeit zu klinischen Symptomen im Sinne von Organfunktionsstörungen, Stenosen, Tumorthrombosen- oder embolien und Gefäßarrosionen kommen. Der Patient verstirbt entweder an den direkten Folgen oder schwindet durch die zunehmende Verschlechterung seines Allgemein- und Ernährungszustandes dahin [167].

Die Therapie onkologischer Erkrankungen, insbesondere deren Verbesserung, ist Gegenstand zahlreicher Forschungsansätze.

In dieser Arbeit wurde vor allem mit Tumorzelllinien zweier Karzinome gearbeitet, deren Prognosen und gängigen Therapieschemata hier kurz umrissen werden sollen.

Das Prostatakarzinom ist heutzutage die häufigste Krebsart bei Männern und steht bei der Mortalitätsstatistik der verschiedenen Krebsarten an zweiter Stelle, eine Zahl, die sich innerhalb der letzten 20 Jahre verdoppelt hat [18, 88].

Bei der Erstdiagnose ist das Prostatakarzinom nur in 30% aller Fälle noch lokalisiert, d.h. nur diese können mittels radikaler Prostatektomie mit Entfernung der Lymphknoten geheilt werden. Solange keine Lymphknotenmetastasen vorhanden sind, rangiert die 10 Jahres-Überlebensrate bei 80% [189].

Wenn der Zustand des Patienten eine erfolgreiche Operation nicht zulässt oder falls der Tumor bereits Organ überschreitend gewachsen ist, kann die Strahlentherapie unter gewissen Umständen als gleichwertig angesehen werden [164]. Das bereits metastasierte Prostatakarzinom ist einer kurativen Therapie nicht mehr zugänglich. Hier wird als palliative Maßnahme der Androgenentzug der Tumorzellen mittels Orchiektomie, LHRH-Analoga, Antiandrogenen oder Östrogenen eingeleitet. Kommt es trotz kompletter Androgenblockade zum Fortschreiten der Erkrankung, können verschiedene Möglichkeiten wie das Absetzen der Antiandrogene, kombinierte Hormonchemotherapien oder Chemotherapie allein versucht werden [189].

Entgegen der Annahme, das Prostatakarzinom sei zytostatikaresistent, konnten Kombinationen wie Estramustin und Docetaxel oder Paclitaxel allein Ansprechraten bis zu 50 % erzielen [81-83, 149, 158, 159]. Ebenfalls versucht werden kann eine Kombination aus Mitoxantron und Prednisolon [21, 201]. Trotzdem bleibt die Überlebensrate beim androgenunabhängigen, disseminierten Prostatakarzinom mit 12-18 Monaten schlecht [188].

Auch die Diagnose eines Glioblastoma multiforme, einer der bösartigsten Hirntumore, lässt nur wenige, bei weitem nicht ausreichende Therapieoptionen zu. Dieser Tumor geht zudem mit einem wesentlich schnelleren und aggressiveren Wachstum einher [176]. Auch hier gibt es die Möglichkeit einer chirurgischen Therapie soweit die Lokalisation im Hirn dies zulässt, gefolgt von einer Bestrahlung und gegebenenfalls Chemotherapie. Es zeigt sich zwar

mittlerweile, dass eine Therapie z.B. mit Temozolomid in Kombination mit Bestrahlung die Überlebenszeit der Patienten immerhin von 12 (mit Bestrahlung allein) auf 15 Monate verlängerte. Auch Irinotecan konnte zumindest einen kleinen Effekt erzielen [193]. Doch selbst die zunehmende Tendenz Kombinationsregime mit Chemotherapeutika möglichst frühzeitig einzusetzen um eine entsprechende Einwirkungszeit zu garantieren [193], konnte die Überlebenszeit bisher nur unzureichend verlängern.

1.2 MDR 1 und MRP 1 Expression in vielfachresistente Tumorzellen

Ein wesentliches Problem in der Behandlung maligner Erkrankungen ist die Resistenzentwicklung vieler Tumoren gegenüber den Standardtherapien.

Bereits 1950 wurde eine Tumorresistenz gegenüber Zytostatika beschrieben [20], doch erst sehr viel später konnte ein Teil des zugrunde liegenden Mechanismus aufgezeigt werden, nämlich der aktive Transport von Daunomycin aus der Tumorzelle heraus [31].

Genau 10 Jahre später wurde der hierfür verantwortliche Transporter, p-Glykoprotein, ein ATP abhängiger Transporter aus der Familie der ABC-Transporter, entdeckt [94]. 1987 konnte dann auch die hierfür codierende Gensequenz, das *MDR1* Gen, identifiziert werden [206], [207]. Seitdem wurde eine Vielzahl dieser Transportersysteme entdeckt: neben dem „Mismatch repair system“ (MMR) [105], dem Cytochrom P450 Oxidase System [174] und der O⁶-Methylguanin-Transferase (MGMT) [155, 156] gehören die *MDR1* und *MRP1* Proteine als Gruppe der ATP-bindenden Transporter (ABC) nach wie vor zu einer der wichtigsten Ursachen der Vielfachresistenz von Tumorzellen. Sie ermöglichen den Zellen chemische Substanzen aktiv aus dem Inneren der Zelle zu befördern [62, 120, 207] und die Zelle so vor toxischen und potentiell schädigenden Stoffen zu schützen. Ihre Überexpression führt zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie.

Das Transportprotein selbst besteht aus zwei homologen Hälften mit hydrophoben Anteilen und einem Benzolring, einer ATP Bindungsstelle und einer Öffnung zum Extrazellulärraum [61, 62]. Ursprünglich dazu bestimmt die Zelle vor fremden Einflüssen zu schützen, sind sie in hohem Maße Ursache der

Vielfachresistenz von Tumorzellen [15]. Man unterscheidet dabei die *MDR* Überexpression [206] von der atypischen *MRP1* Überexpression [29]. Die in dieser Arbeit verwendeten PC3 und DU145 Zellen zeigen zuletzt genannte Form der Vielfachresistenz, während die 257RDB Zellen *MDR* exprimieren.

Bisher wurden bereits einige speziell gegen vielfachresistente Tumorzellen gerichtete Stoffe entwickelt und getestet. Diese konnten zwar Teilerfolge verbuchen, aber letztendlich nicht voll und ganz überzeugen [146, 194]. Aufgrund der geringen Homologie der Vielfachresistenzproteine wäre es sinnvoll, einen Inhibitionsmechanismus zu finden, der bereits auf Gen-Ebene angreift.

Sowohl die Expression von *MDR1* als auch die von *MRP1* wird durch den Transkriptionsfaktor YB-1 reguliert, der innerhalb der Promotoren bindet, offensichtlich eine tragende Rolle in deren Regulation spielt [150] und einen möglichen Angriffspunkt für neue Therapiestrategien darstellt.

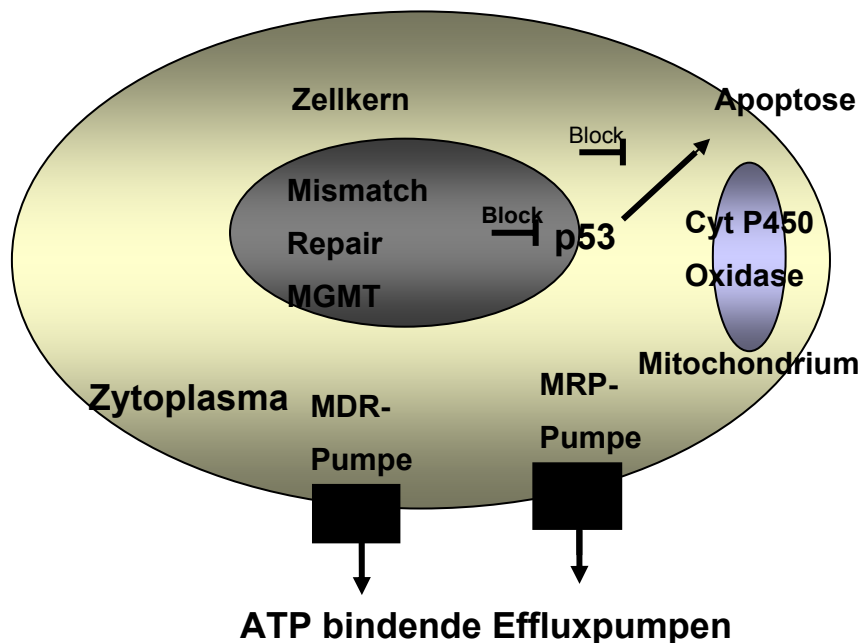


Abb. 1: Mechanismen der Vielfachresistenz
MDR und MRP Pumpen befördern Toxine aus der Zelle heraus, das CytP450 System im Mitochondrium baut Toxine direkt ab, während Mismatch Repair und MGMT für eine Blockade von p53 sorgen und die Apoptose verhindern.

1.3 Der Transkriptionsfaktor YB-1

YB-1 ist ein evolutionsgeschichtlich hochkonservierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der DNA bindenden Proteine.

Nachdem er 1988 durch Nachweis der Bindung an MHC II Promotoren als ein 43 kDa großes Protein entdeckt wurde [34], konnte gezeigt werden, dass YB-1 aus einem Amino (N) Terminus, einer „cold shock domain“ (CSD) und einem Carboxyl (C) Terminus besteht [220]. YB-1 bindet vorzugsweise einzelsträngige DNA und RNA über eine hochkonservierte Nukleinsäure-Erkennungssequenz, eine so genannten „Y-box“, die über eine umgekehrte 5'-CCAAT-3' Sequenz verfügt [129, 219] und natürlich auch innerhalb der MHC II Rezeptorsequenz vorkommt.

Der C-Terminus scheint insbesondere für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich zu sein sowie eine starke Affinität zu Einzelstrang DNA und RNA zu besitzen [96]. YB-1 kann als mRNA „Chaperon“ fungieren und die RNA gegen Abbau schützen [42, 219].

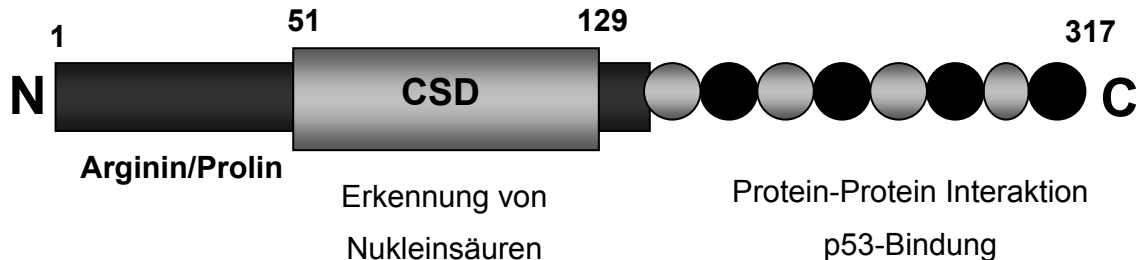


Abb. 2: Aufbau des Transkriptionsfaktors YB-1
CSD=Cold shock domain, N=N-Terminus, C=C-Terminus, die jeweils wichtigsten Funktionen der einzelnen Komponenten sind untenstehend angegeben

YB-1 kann über verschiedene Signalwege Einfluß auf die Regulation der Zellproliferation nehmen [104]. Der Transkriptionsfaktor wird in fetalem, aber auch in sich regenerierendem Gewebe überexprimiert [92]. Die gezielte Unterbrechung eines Allels führt zu abnormer Zellmorphologie und langsamerer Wachstumsrate, vergleichbar mit einem Block des Zellzyklus in der G2 – Phase [198]. Hierzu passt, dass Y-Boxen unter anderem den EGF Rezeptor [13], die Thymidinkinase und die Topoisomerase II α [179] aktivieren können. Außerdem kann YB-1 die Signaltransduktion der Zellproliferation unabhängig von der

TATA Box aktivieren. Am Übergang der G1-Phase zur S-Phase sammelt sich YB-1 im Kern an und führt zur transkriptionellen Aktivierung von Cyclin A1 und B1. In der späten S-Phase ist es nicht mehr im Kern nachweisbar [92].

p73 kann über Verstärkung von c-Myc, einem Protoonkogen, direkt den YB-1 Promotor und konsekutiv die Zellproliferation aktivieren [209]. Okamoto et. al. konnten zeigen, dass YB-1 selbst durch direkte Interaktion Einfluss auf p53 nimmt. Ein Bindung von antisense YB-1 führte hierbei zur Inhibierung der p53 Aktivität [152].

Die negative Regulation von p53 durch YB-1 wurde 2003 von Lasham et. al. bestätigt. Dieselbe Arbeitsgruppe hatte zuvor nachgewiesen, dass YB-1 zudem ein Transkriptionsrepressor des Zelltod assoziierten *fas* (CD95) Gens ist, welches am Beginn der Einleitung der Apoptose steht [107]. Alle bisherigen Ergebnisse zeichnen YB-1 als wichtigen Regulationspunkt des Zellwachstums und Repressor der Apoptose aus.

Doch YB-1 vermag nicht nur Spleißen [191], Transkription und Translation [104, 181] zu beeinflussen, es ist auch an der Reparatur beschädigter DNA mit Hilfe verschiedener Reparaturenzyme beteiligt [84, 85, 96, 150]. So führt YB-1 insbesondere zur Trennung doppelsträngiger DNA, die durch Cisplatin verursachten Mutationen aufweist, und bindet Reparaturenzyme wie MSH2 oder Ku80 um die fehlerhaften Basenpaarungen zu exzidieren [53]. Dabei besitzt es selbst auch eine 3'-5' Exonuclease Aktivität und kann das Proliferations Zell Nukleäre Antigen binden, das ebenfalls für die Nukleotidexzision- und reparatur benötigt wird [84, 179].

Durch diese zahlreichen Funktionen spielt YB-1 bei der Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten, die an der DNA angreifen, eine zentrale Rolle [112]. So wird zum Beispiel die Cisplatin Empfindlichkeit durch antisense YB-1 deutlich erhöht [150]. Durch genotoxischen Stress wie UV-Licht [97, 151], Chemotherapie, Bestrahlung oder Hyperthermie [185] kann YB-1 vom Zytoplasma, wo es normalerweise an ein Ankerprotein gebunden vorliegt, in den Kern getrieben werden, was von einer verstärkten Expression der Gene für Vielfachresistenz begleitet wird [151, 185, 205]. Bargou et. al. konnten als erste einen direkten Zusammenhang zwischen *MDR1* Expression und der

Kernlokalisierung von YB-1 in Mammakarzinomzellen herstellen. Weitere Arbeiten bestätigten, dass seine Kernlokalisierung gleichzeitig auch ein negativ prädiktiver Parameter für die Vielfachresistenz von Tumorzellen und das Fortschreiten der Tumorerkrankung bei Mamma-, Ovarial, Colon- und Prostatakarzinom [6, 55, 80, 86, 93, 179], nichtkleinzelligem Lungenkarzinom [178] sowie bei Synovial- und Osteosarkomen ist [147, 148]. Hierzu passend konnte festgestellt werden, dass YB-1 eines der am stärksten hochregulierten Gene in vielfachresistenten Zelllinien [112] verglichen mit nicht resistenten ist [224].

Eindrucksvoll wird dies durch die Tatsache untermauert, dass Adenokarzinom-, Hepatom-, Fibrosarkom- und Colonkarzinomzellen über einen p53 vermittelten Signalweg absterben, wenn die YB-1 Expression durch siRNA gehemmt wird [108]. Da Y-Boxen sowohl in *MDR1* als auch *MRP1* Promotoren enthalten sind [197], deuten alle Ergebnisse der bisherigen Literatur auf eine Schlüsselrolle der Kernlokalisierung von YB-1 in der Entstehung vielfachresistenter Tumorzellen hin. Ergebnisse von Stein et. al. untermauern die Rolle von YB-1 bei der Entstehung von Vielfachresistenz, indem sie eine Induktion des MVP (*major vault protein*), dessen Promotor ebenfalls eine Y-Box enthält, durch YB-1 zeigen konnten [184]. Diese *vault* Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Vielfachresistenz [134].

Der Transport von YB-1 in den Kern kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen: Stenina et. al. zeigten 2000, dass der durch Thrombin vermittelte Kerntransport von YB-1 durch Zugabe von Tyrosinphosphataseinhibitor gehemmt werden konnte [187], andere Arbeitsgruppen entdeckten, dass die Proteolyse des C-terminalen Fragments, welches das zytoplasmatische Retentionssignal beinhaltet [182] durch bestimmte Zytostatika ausgelöst wurde und Dooley et. al. konnten eine Abhängigkeit des YB-1 Kerntransports von der Jak1 Kinase nachweisen [39]. Neueste Ergebnisse legen eine Aktivierung von Akt als weiteren wichtigen Transportmechanismus nahe. So zeigten Sutherland et. al. die Abhängigkeit der YB-1 Translokation in den Kern von der Phosphorylierung durch Akt am Serinrest 102 der YB-1 *cold shock domain* [195]. Diese Ergebnisse konnten nicht nur mittels siRNA bestätigt werden, sie

wurden auch um den Nachweis des direkten Einfluss der Akt Inhibierung auf die Expression vielfachresistenter Gen erweitert [7].

Zudem spielt YB-1 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Metastasierung, da es die Metalloproteinase 2, die Kollagen Typ IV abbaut und damit die Degradierung der Basalmembran von Gefäßzellen und umgebenden Zellen begünstigt, aktivieren und inhibieren kann [128, 132].

Auch im Genom des Adenovirus Typ 5 konnten drei Y-Boxen nachgewiesen werden. Durch eine Bindung ermöglicht YB-1 hier eine E1A unabhängige Aktivierung der adenoviralen E2 Gene [77]. Daher lassen sich Yb-1 abhängige onkolytische Viren zur effektiven Tumorthherapie herstellen.

Für diese Arbeit ist YB-1 sowohl hinsichtlich der Beeinflussung der Vielfachresistenz als auch der Herstellung von onkolytischen Vektoren zur Tumorthherapie von zentraler Bedeutung.

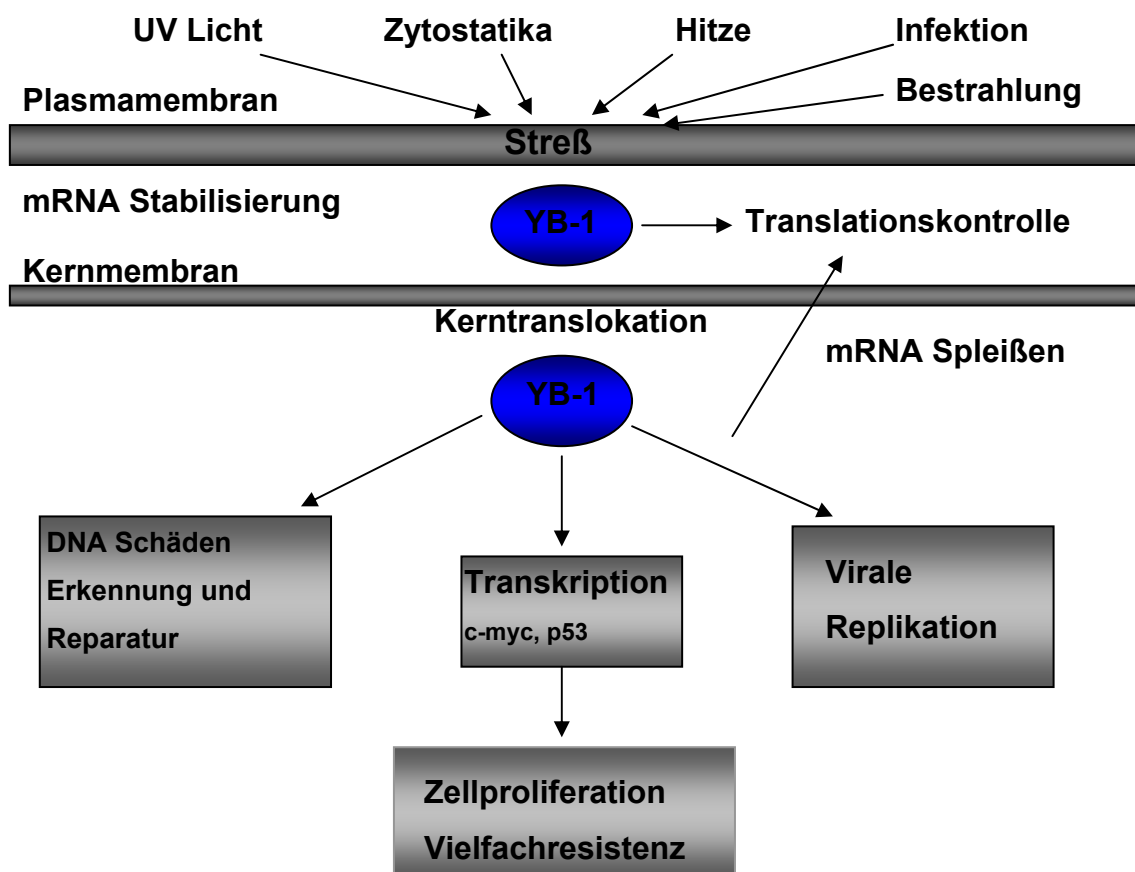


Abb. 3: Pleiotropische Funktionen von YB-1
Stress in Form von UV-Licht, Zytostatika, Hitze etc. führt zur Kerntranslokation von YB-1 und damit zur Beeinflussung der Transkription, Zellproliferation und Behebung von DNA Schäden, ermöglicht aber auch die virale Replikation (modifiziert nach Kohno K. et. al., *BioEssays* 25 (2003) 691-698)

1.4 Adenovirale Vektoren in der Gentherapie

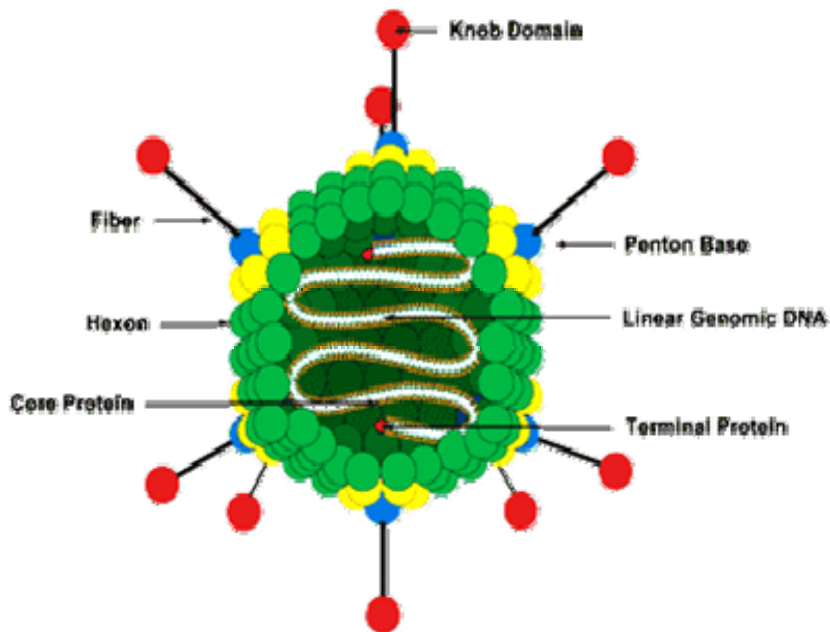


Abb. 4: Aufbau eines Adenovirus
(Shenk T., *Adenoviridae: The viruses and their replication, Fields Virology, 3rd edition* (1996) 2111-147)

Gentherapie bezeichnete ursprünglich das Einbringen von Genen in eine Zelle um einen dort vorhandenen Defekt auszugleichen [154]. Prinzipiell muss man zwischen somatischer Gentherapie und Keimbahngentherapie unterscheiden. Diese Arbeit erstreckt sich ausschließlich auf das Gebiet der somatischen Gentherapie.

Der früher eng gefasste Begriff hat sich heutzutage deutlich erweitert. Mittlerweile steht eine Vielzahl an Vektoren zur Verfügung um Gene in die Zellen einzubringen. Dabei kann das genetische Material dauerhaft oder nur vorübergehend in die Zellen integriert werden, im Idealfall sogar exakt an einer bestimmten Stelle innerhalb des Genoms. Zahlreiche Modifikationen der einzelnen Vektoren sind möglich, beispielsweise zur Veränderung des Zelltropismus oder Unterdrückung der Immunantwort des Wirtsorganismus.

Die Anforderungen an einen Vektor zur Krebstherapie sind hoch: Effizienz und Selektivität der Replikation und Tumorzelllyse, leichte Handhabung und Veränderbarkeit im Labor sowie gleichzeitig hohe Sicherheit. Dies alles charakterisiert den idealen, leider nicht existenten Vektor.

Adenoviren sind seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt und werden in Mastadenoviren und Aviaadenoviren unterteilt. Bislang sind 47 verschiedene Serogruppen von Adenoviren beschrieben [170]. Klinisch verursachen sie zumeist Infektionen des oberen Respirationstraktes, Pneumonien, epidemische Keratokonjunktivitis oder akute hämorrhagische Cystitis [170]; bei Kleinkindern können einige Serotypen auch zu Gastroenteritiden führen.

Adenoviren sind einfach in Kultur zu halten, leicht zu amplifizieren und besitzen neben einem allgemein geringen Gefährdungspotential den Vorteil, dass sie ihre DNA nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren [40, 126]. Sie können sowohl teilende als auch nicht teilende Zellen infizieren. Zumindest in einigen Punkten entsprechen sie den Vorstellungen des idealen Vektors. Doch kam es unter Therapie mit nicht replizierenden adenoviralen Vektoren auch bereits zu Todesfällen bedingt durch eine starke Immunantwort auf die Injektion der Adenoviren [192]. Für den gentherapeutischen Ansatz werden fast ausschließlich Adenovirus 2 und 5 der Serogruppe C verwendet [131].

1.4.1 Aufbau der Adenoviren

Es handelt sich um unbehüllte, lineare, doppelsträngige (etwa 36kb Länge) DNA Viren, umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid, das aus insgesamt 240 Hexonen, 12 Pentonbasisproteinen und antennenförmigen Fiberproteinen besteht [190]. Beide Enden der DNA weisen so genannte „inverted terminal repeats“ von 100-165 bp Länge auf, die mit einem terminalen Protein über einen Serinrest kovalent verbunden sind [166]. Dies ermöglicht die Initiation der viralen DNA Replikation. Die DNA ist außerdem mit dem basischen Protein VII assoziiert und enthält ein *cis* -agierendes Verpackungssignal für die Interaktion mit den zur Verpackung der DNA benötigten Proteinen [3].

1.4.2 Infektion und Aufnahme in die Zelle

Für die Infektion ist bei Adenovirus 5 insbesondere der Coxsackie/Adenovirus Rezeptor (CAR) auf der Zelle wichtig, der über die Fiberproteine der adenoviralen Hülle mit diesem interagiert [10], [27, 28, 212] und die Bindung des Adenovirus an die Zelle ermöglicht. Somit bestimmt sein Vorkommen auf den Zellen auch ganz wesentlich die infektiöse Potenz eines Vektors. Die Aufnahme erfolgt über Klathrin vermittelte Endocytose [211], die vor allem von dem so genannten RGD-Motiv (Arginyl-Glycyl-Asparagyl) auf der Pentonbase abhängt und auf die Interaktion mit zellulären $\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_3$ und $\alpha\beta_5$ Integrinen angewiesen ist [190, 217, Davison, 1997 #549]. Nachdem mit Hilfe der Protease die Kapsidhülle teilweise aufgeschlossen wurde [65], wird das Virus durch die Membran des Nukleus transportiert und das Genom durch eine nukleare Pore in den Nukleus injiziert [130]. Schon eine Stunde nach Infektion kann man virusähnliche Partikelformung an der Nukleusmembran beobachten und virale DNA kann nach ein bis zwei Stunden im Kern selbst nachgewiesen werden [64, 130].

1.4.3 Adenovirale Replikation

Die Transkription selbst kann in eine frühe und späte Phase unterteilt werden. Die „frühen“ Gene umfassen E1, E2, E3, E4. Die späte Phase wird vom „Major Late Promoter“ dominiert, der die späten Gene L1 bis L4 steuert. Dazwischen kann man die verzögerten frühen Gene (IX, IV2a) unterscheiden. Ein Vermehrungszyklus dauert 20 - 24 h [171].

Die Replikation der viralen DNA erfolgt semikonservativ, hierzu lagert sich an den nicht zu replizierenden Strang das DNA bindende Protein an und verhindert die Bildung doppelsträngiger Strukturen oder gar den Abbau der DNA. Während der parenterale Strang also sofort kontinuierlich repliziert wird, muss der stabilisierte Einzelstrang erst an beiden Enden eine so genannte Pfannenstielstruktur bilden, an die der Initiationskomplex aus präterminalem

Protein, NF I-III und viraler DNA Polymerase binden kann. Danach erfolgt auch hier eine kontinuierliche Replikation [171].

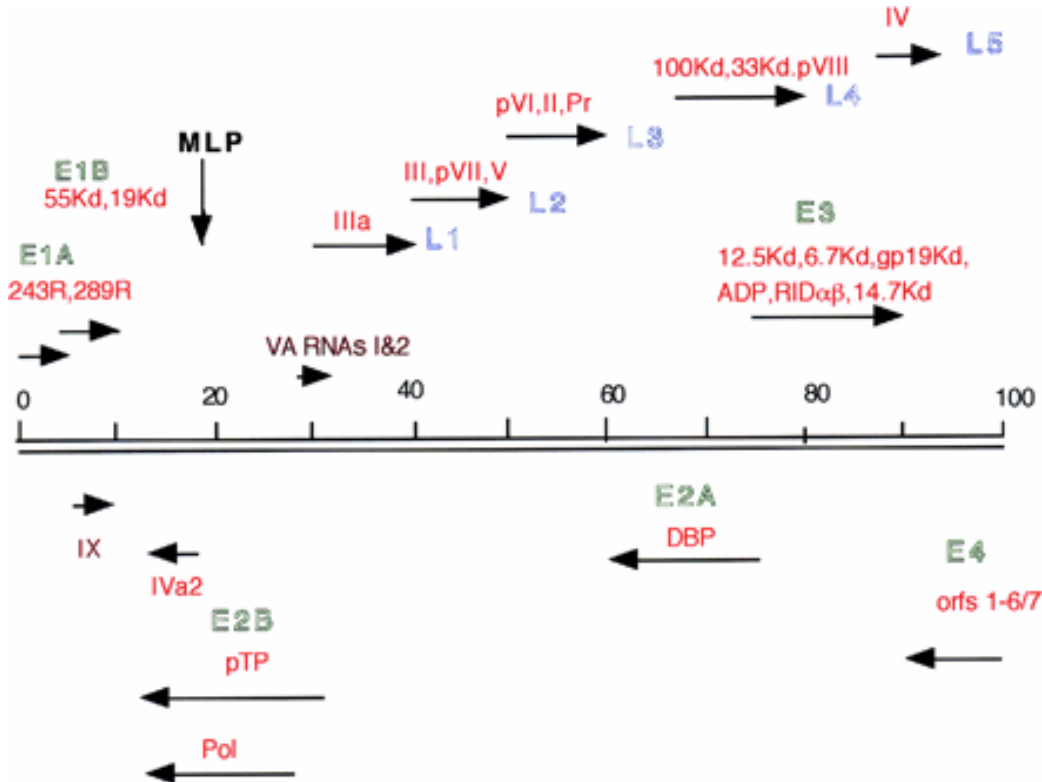


Abb. 5: Schematischer Aufbau der Transkriptionsregulation von Ad5 (Russell W.C., *J Gen Virol* 81 (2000) 2573-604)

1.4.3.1 E1 Gene

Generell aktiviert das E1A Gen die frühen viralen Gene und induziert den Übertritt in die S - Phase.

Aus dem E1A Gen werden unter anderem zwei unterschiedlich lange Proteine generiert, 289R und 243R, je nach der Anzahl der Aminosäuren [11, 157]. Ein Vergleich ergab, dass drei hochkonservierte Domänen entscheidend sind: CR1 (AS 41-80), CR2 (AS120-139) und CR3 (AS140-188) [221].

Das 13S Protein induziert die Transkription der E2 bis E4 Gene sowie des E1B55K Gens [11, 91, 142]. Hierbei spielt der C-Terminus der CR3 Domäne, der die Bindung an das Zinkfingermotiv des Zielpromotors ermöglicht, die entscheidende Rolle. Das kürzere Produkt 12S, dem die CR3 Region fehlt,

vermag die frühen Gene nicht zu aktivieren [11, 67]. Ihm kommen Funktionen bei der Transkriptionsrepression, der Induktion der DNA Synthese und der viralen Transformation infizierter Zellen zu. Hierfür sind insbesondere die CR1 und CR2 Domänen wichtig.

So wird durch Bindung an pRb und dessen Phosphorylierung der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt [216, 230] und durch Bindung an p300 die Chromatinstruktur modifiziert [5, 79]. Auch die zur pRb Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren p105 und p107 werden durch CR1 und CR2 aktiviert [19, 143, 216]. Am hervorstechendsten ist die Rolle von E2F, das c-myc, die DNA Polymerase α , PCNA und andere die Zellproliferation fördernde Gene aktivieren kann. Jedoch fehlt dem kürzeren 12S Protein die Möglichkeit an die ATF Bindungsstelle des E2 early Promotors zu binden, es kann somit nur die S-Phase induzieren und vermag den Promotor nicht zu aktivieren.

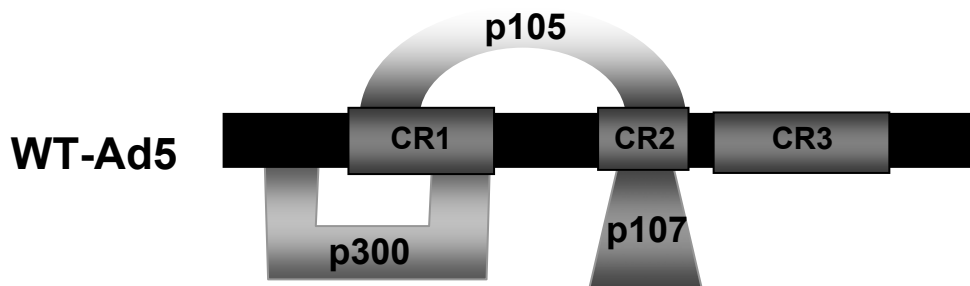


Abb. 6: Schema der E1A Bindungsstellen

p105 kann durch gleichzeitige Bindung an CR1 und CR2 aktiviert werden, p107 wird durch Bindung an CR2 allein aktiviert, p300 benötigt die Bindung an CR1 um Einfluß auf die Chromatinstruktur zu nehmen (modifiziert nach Holm, persönliche Mitteilung)

E1A kann direkt mit p53 interagieren. Hierbei handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, das sich bei genotoxischem Stress anhäuft und zum Zellzyklusarrest und Apoptose führt [72]. p53 stellt einen Überprüfungspunkt für Vollständigkeit und Stabilität des Genoms und der Zelle vor dem Eintritt in die S-Phase dar [119]. In über der Hälfte aller malignen Tumoren ist es mutiert [76]. Einer der Regulationswege für p53 ist die Interaktion mit mdm2, das p53 dem Abbau in Proteosomen zuführt, daran wiederum durch die Blockierung durch p14^{arf} gehindert werden kann [213]. Die frühen E1A Proteine binden an pRb

und setzen E2F frei [99, 141], welches die S-Phase induziert und unter anderem auch p14^{arf} transaktiviert. Bindet p14^{arf} nun an MDM2, kommt es zu einem Anstieg von p53, da der normalerweise erfolgende Abbau blockiert ist. Folglich kann es zum Zellzyklusarrest und nachfolgender Apoptose kommen [37].

Die adenoviralen E1B Gene haben die Aufgabe eine eventuelle Zellapoptose zu verhindern. E1B55K bindet zusammen mit E4orf6 an p53. Es verhindert die p53 Transkription [33, 225] und sorgt für den Transport von p53 ins Zytoplasma, wo es abgebaut wird. So inhibiert es den sonst durch p53 induzierten Zellzyklusarrest [38, 165, 173] und schützt die DNA [66]. Hierdurch wird der für die adenovirale Replikation notwendige Eintritt in die S-Phase ermöglicht; einer der wichtigsten Schritte des Replikationszyklus. Zusätzlich steht mit E1B19k ein adenovirales Protein zur Verfügung, das als Mitglied der bcl2-Familie der Apoptose entgegenwirkt.

Später beteiligen sich E1B55K und E4orf6 an der Anhäufung der viralen mRNA im Zytoplasma sowie am Transport dieser aus dem Kern ins Zytoplasma. Nebenbei verhindern sie die Fortsetzung der zelleigenen Proteinsynthese [171].

1.4.3.2 E2 Gene

Die E2 Genprodukte liefern aus den zwei großen Untereinheiten E2A und E2B durch alternatives Spleißen die für die adenovirale Replikation notwendigen Proteine. E2A generiert das DNA bindende Protein (DBP), während E2B für das pTP, ein Vorläuferprotein des 5' gebundenen terminalen Proteins, und die virale Polymerase kodiert [196]. Das DBP vermag ausschließlich einzelsträngige DNA zu binden [69, 144].

Die E2 Gene werden von den E2 early und E2 late Promotoren kontrolliert [196]. Der E2 early Promotor übernimmt die Kontrolle bis 6 h nach Infektion, anschließend erfolgt ein Wechsel auf den E2 late Promotor, dessen genauer Mechanismus bislang unbekannt ist [26, 58]. Der E2 early Promotor verfügt über atypische TATA-Boxen, die eine Bindung des humanen TATA-Box bindenden Proteins ermöglichen, zwei E2F Bindungsstellen, sowie eine ATF (aktivierender Transkriptionsfaktor)-Bindungsstelle, die alle durch Interaktion mit

E1A bzw. E4orf6/7 bei der Regulierung der E2 Genexpression eine wichtige Rolle spielen.

Wie bereits erwähnt setzt E1A zelleigenes E2F aus seiner Bindung mit pRb frei und aktiviert den E2 early Promotor [99]. E4orf6/7 stabilisiert die E2F Bindung an E2 early. Außerdem scheint eine direkte Bindung von E1A an das ATF und TB Protein über eine Art Brückenbildung notwendig zu sein [196].

Zajchowski et. al. haben für die komplette E1A Induktion des E2 early Promotors drei essentielle Sequenzen identifiziert [227].

Der E2 late Promotor wird durch E1A nicht transaktiviert. Auch er verfügt über eine TATA ähnliche Sequenz in Region I und eine Sp1 Bindungsstelle in Region I und II [196]. Bereits 1987 konnten potentielle YB-1 Bindungsstellen innerhalb des E2 late Promotors identifiziert werden [14]. Holm et. al. konnten mittlerweile zeigen, dass eine Aktivierung des E2 Promotors durch Yb-1 möglich ist [77].

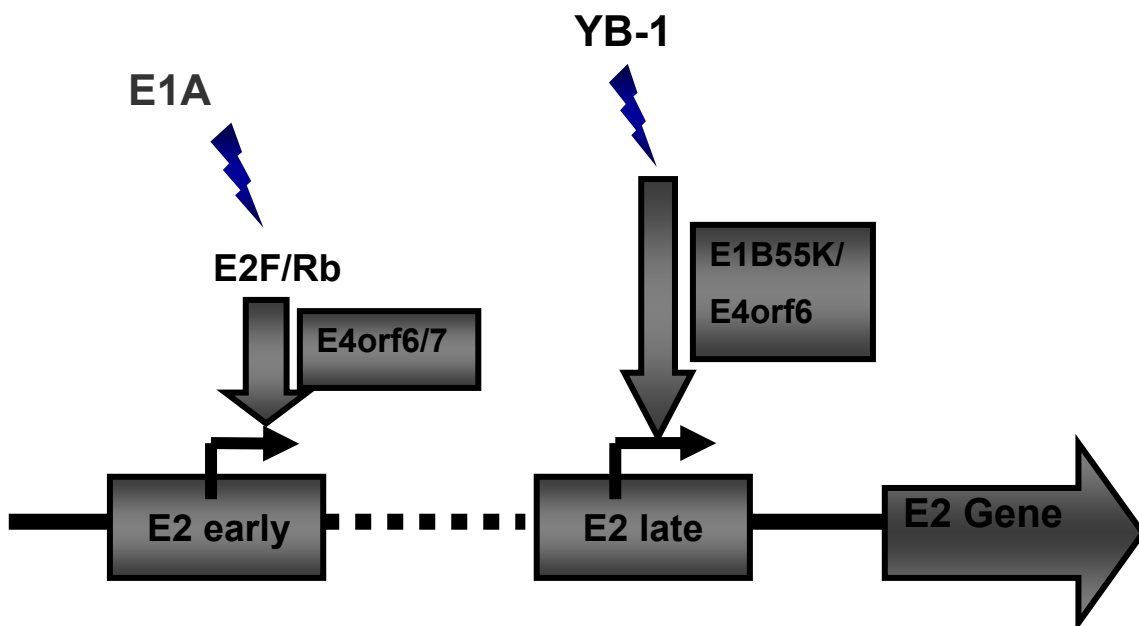


Abb. 7: Regulation der E2 Gene

Nach Abspaltung von pRb aus dem Komplex mit E2F durch E1A kann das freigesetzte E2F den E2 early Promotor aktivieren, E4orf6 stabilisiert diese Bindung; YB-1 aktiviert direkt den E2 late Promotor, wobei E1B55K und E4orf6 den Transport von YB-1 in den Zellkern unterstützen (nach Mantwill K., Kohler Vargas N., *Cancer Res.* 66 (2006) 7195-202)

1.4.3.3 E3 und E4 Gene

In der späten Phase werden die viralen Strukturproteine unter Einfluss des Major Late Promotors hergestellt, die DNA verpackt und die viralen Partikel freigesetzt. Hierbei spielen die E3 Gene eine Rolle, deren Expression nicht zwangsläufig notwendig ist für die virale Replikation. Sie dienen in erster Linie dazu, der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Unter ihnen befindet sich das „Adenovirus Death Protein“ (ADP), das Zytolyse und virale Partikelfreisetzung begünstigt [203]. ADP wird im Gegensatz zu den anderen E3 Proteinen über den Major Late Promotor aktiviert. Es führt zu einer atypischen Apoptose und damit zu einer Freisetzung der hergestellten Viren. Andere E3 Proteine wie das 14,7 kD inhibieren die TNF α vermittelte Zellyse [177] oder verhindern den Transport und die Expression von MHC I Rezeptoren an der Zelloberfläche wie das E3gp19K Protein [9] um der Immunantwort zu entgehen.

Proteine, die von der Transkription der E4 Kasette stammen, sorgen vor allem für günstige Bedingungen für die virale Replikation und das Abschalten des Wirtszellhaushaltes [66]. Neben E4orf6, das die Transkription fördern [71], aber auch die virale Translation im Gegensatz zur zellulären beschleunigen kann [66, 111], scheint es auch eine Gegenregulation durch E4orf4 zu geben, das zusammen mit E1A die Apoptose der infizierten Zelle induzieren kann [122-124].

Bei den *Late unit* Genprodukten handelt es sich im Wesentlichen um Strukturproteine.

1.4.4 Onkolytische Adenoviren

Prinzipiell kann man in der adenoviralen Tumorthherapie unterscheiden zwischen Versuchen defekte Protoonkogene zu ersetzen, Suizidgene, Immunmodulationsgene oder gegen die Angiogenese gerichtete Gene in die Zelle einzubringen oder die Sensitivität der Tumorzellen mittels Transgen wiederherzustellen.

Das erste selektiv tumorlytische Virus wurde bereits 1991 von Martuza et. al. beschrieben [126]. Die Vektoren der 1. Generation waren sowohl E1 als E3 deletiert, d.h. konnten bis zu 6,5 kB fremde DNA aufnehmen, gleichzeitig war mit Deletion der E1 Gene die Transkription der E2 Gene und damit die virale Replikation eingeschränkt [8]. Vektoren der 2. Generation wiesen zusätzliche Deletionen in der E2 und E4 Region auf [2]. In der 3. Generation besaßen die Vektoren nur noch so geringe Anteile des adenoviralen Genoms, dass sie ein Helfervirus zur Vermehrung benötigten [1, 171]. In diese konnte man die höchste DNA Mengen einbringen, leider wog die sehr mühsame Herstellung der Vektoren mittels Helfer-Virus diesen Vorteil wieder auf.

Die Vermehrung der Viren fand und findet auch heute noch in HEK293 Zellen statt, die über die E1A und E1B Gene verfügen [63]. Ein Problem hierbei stellt die Möglichkeit der *crossover* Rekombination zwischen zellulären und viralen Genen dar, die zur Entstehung von replikationskompetenten Viren (RCA) führen kann [136]. Kürzlich konnten Farson et. al. jedoch eine neue E1 komplementäre Zelllinie etablieren, in der E1A und E1B Gene an getrennten Orten ins Genom integriert wurden und sich das Risiko der RCA Entstehung erheblich reduzierte [43].

In vivo lag das Problem vornehmlich auf Seiten der ungenügenden und zu kurzen Transgenexpression, der Replikationsinkompetenz, die zu einer nicht genügenden Durchdringung des Tumors führten, und der starken Immunantwort mit teilweise schon vorbestehenden neutralisierenden Antikörpern auf Adenoviren.

Momentan werden vor allem drei Ansätze verfolgt um eine tumorselektive adenovirale Replikation zu erreichen.

Zum einen Deletion des E1B55K Gens für selektive Replikation in Zellen, in denen der p53 Signalweg defekt ist [17]. Dieser Vektor wurde bereits 1987 beschrieben [11], jedoch erst ca. 10 Jahre später unter dem Namen Onyx-015 weiter analysiert. Es handelt sich um einen Vektor mit einer 827 bp Deletion in der E1B Region. Die Expression des E1B55K Proteins ist beeinträchtigt, während E1B19k weiterhin transkribiert wird. Da E1B55K normalerweise p53

inaktiviert und dadurch die adenovirale Replikation ermöglicht, soll dieser Vektor nur in Zellen replizieren, die p53 negativ sind, was auf das Gros der Tumorzellen zutrifft. Mittlerweile sind Zweifel an den zuerst publizierten Erfolgen von ONYX-015 [17, 74], insbesondere an seiner Selektivität, aufgekommen. Obwohl der Vektor sich in mehreren klinischen Studien erfolgreich zeigte [95], konnten Goodrum et. al. eine Replikation unabhängig vom p53 Status der Tumorzelle nachweisen, die vielmehr durch Temperatur und Zellzyklusstatus zum Zeitpunkt der Infektion beeinflussbar war [60]. Offensichtlich sind die Mutationen in Tumorzellen und deren Einfluß auf die adenovirale Replikation von Vektoren komplexer und nicht allein auf den p53 Status zu reduzieren [23]. Zweitens gibt es den adenoviralen Vektor $\Delta 24$, der über eine Deletion der CR2-Domäne im E1A Gen verfügt, was zur ausschließlichen Vermehrung in pRb Signalweg defizienten Zellen führt, da der Vektor pRb nicht binden und damit E2F nicht freisetzen kann [51]. Heise et. al. konnten eine Selektivität des Vektors für pRb mutierte Tumorzellen zeigen, während in primären Epithelzellen keine Replikation erfolgte. Der Vektor zeigte eine reduzierte Induktion der S-Phase und lag in seiner Effektivität teilweise über den von Adenovirus Wildtyp erzielten Werten [73]. In den folgenden Jahren wurde seine infektiöse Potenz mit Hilfe eines eingefügten RGD-Motivs verbessert [50] und in verschiedenen Kombinationstherapien unter anderem mit Bestrahlung getestet [106].

Die dritte Möglichkeit besteht in der Verwendung tumorselektiver Promotor, um die Expression der frühen viralen Gene und damit der Replikation zu steuern [168, 226]. Hier finden sich eine Reihe unterschiedlichster Promotoren wie Telomerase, AFP oder PSA Promotoren, die entweder E1A oder ein Suizidgen steuern [1, 24, 140] und eine mehr oder weniger große Spezifität für die entsprechenden Tumorarten besitzen sollen.

Eine weitere Methode basiert auf dem Transkriptionsfaktor YB-1 und seiner Lokalisation im Zellkern [77, 78]. Die Kernlokalisation von YB-1 ermöglicht eine E1-unabhängige Replikation der Adenoviren durch Induktion des E2 late Promotors, ein Weg, der vor allem in vielfachresistenten Tumorzellen beschritten werden kann, so dass auch replikationsdefiziente Adenoviren diese lysieren können [78].

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren handelt es sich zum einen um $\Delta 24$, freundlicherweise von Dr. Nettelbeck, Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt, der eine 19 bp Deletion in der CR2 Domäne aufweist und somit weder ein komplett funktionstüchtiges 12S noch 13S Protein herstellen kann. Der ebenfalls verwendete Vektor dl520 wiederum verfügt über eine Deletion der CR3 Domäne. In normalen Zellen kann er die E2, E3 und E4 Gene nicht aktivieren [19, 137], in vielfachresistenten Zellen können diese durch dl520 jedoch in ausreichender Menge generiert werden [87]. Ad312 wurde bereits 1979 beschrieben [90]. Es handelt sich um einen E1A deletierten Virus, der folglich keines der adenoviralen Gene aktivieren kann; lediglich sehr hohe MOI können eine Replikation verursachen [142].

Xvir03 wurde eigens von K. Mantwill, Klinikum rechts der Isar, neu konstruiert.

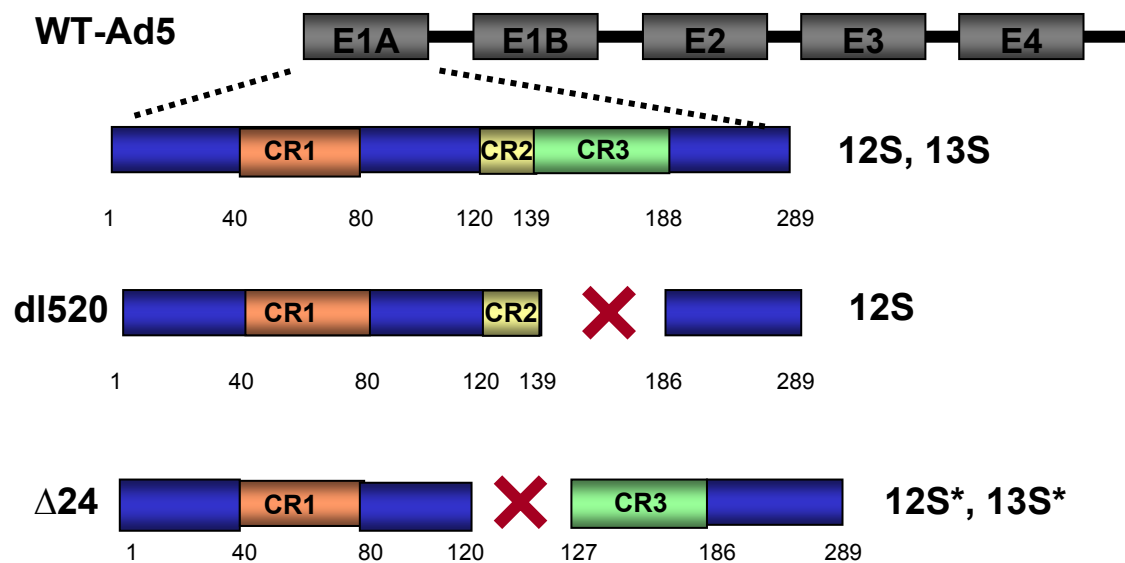


Abb. 8: Charakteristische Mutationen der verwendeten dl520 und $\Delta 24$ Viren im E1A Gen

Dargestellt sind die 3 CR Domänen des E1A Gens, Kreuze markieren die jeweiligen Deletionen, deren Genprodukte seitlich angegeben sind, * markiert die nicht voll gegebene Funktionsfähigkeit der Genprodukte

1.5 Kombinationstherapie

Chemotherapie und Bestrahlung reichen als zusätzliche Therapien im fortgeschrittenen Stadium oft nicht aus. Die Chemotherapie des Prostatakarzinoms und des Glioblastoms ist noch in der Entwicklung und Gegenstand zahlreicher Studien, galten doch beide Tumoren bisher als zytostatikaresistent [109, 175, 176].

Insbesondere beim Prostatakarzinom kommt zunehmend Docetaxel, ein Derivat der Eibenrinde, zum Einsatz. Es führt durch Anlagerung an die β -Tubulin Untereinheit der Mikrotubuli zur Mitosehemmung. Neben dem metastasierten Prostatakarzinom wurde es auch schon in Mamma- und Ovarialkarzinomen [70, 202] sowie in Glioblastomen [172] erprobt.

Neben Docetaxel fanden in dieser Arbeit auch Irinotecan, ein Topoisomerase I Hemmer, der zu Strangbrüchen führt und klinisch gegen Glioblastome und metastasierte Prostatakarzinome eingesetzt wird [49, 54, 98], sowie Daunorubicin, ein zwischen der DNA interkalierendes Anthracyclin Derivat, das die DNA und RNA Synthese hemmt [200], Verwendung. Gerade die bei Resistenzen notwendigen Erhöhungen der Dosis dieser Chemotherapeutika schädigen oftmals auch gesundes Gewebe.

Hier ermöglicht die Kombination mit viraler Genterapie im Idealfall eine Erhöhung der Wirkung ohne gleichzeitige Toxizitätssteigerung.

Wenn auch die virale Therapie selbst noch durch eine allgemein ungenügende Penetration und Replikation in soliden Tumoren limitiert ist, bietet gerade die Kombination mit Standardtherapien den Vorteil, den Tumor gleichzeitig an verschiedenen Stellen anzugreifen.

So ist bereits mehrfach durch Wiedereinbringen von p53 in die Tumorzellen mittels adenoviraler Vektoren die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung in verschiedenen Tumorzellen vermindert, wenn nicht sogar aufgehoben worden [145].

Neben synergistischen Effekten mit Radiotherapie [22, 169, 204] konnten ähnliche Nachweise für die Kombination von ONYX-015 mit Cisplatin und 5-Fluoruracil in einer klinischen Phase II Studie erbracht werden [95]. Yu et al.

konnten sogar nachweisen, dass bei Kombination von CV706 mit Docetaxel p53 verstärkt exprimiert wurde, während keinerlei Einschränkung bezüglich Replikation oder Virusspezifität zu verzeichnen war [226]. Auch Daunorubicin und ein Topoisomerase I Hemmer konnten die tumorspezifische, adenovirale Replikation verstärken [12]. Wie bereits erwähnt ist die Entwicklung von ONYX-015 am weitesten fortgeschritten. Der Vektor wurde bereits in einer Phase III klinischen Studie in Kombination mit Cisplatin gegen Kopf/Hals Karzinome eingesetzt [223] und hat in China mittlerweile die Zulassung erhalten [52].

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse in der Literatur und angesichts der bereits mit einem adenovirale YB-1 exprimierenden Vektor erhobenen Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe Holm, erschien es nahe liegend, den neu entwickelten YB-1 abhängigen Vektor Xvir03 in vielfachresistenten Tumorzellen zu testen und in einer der klinischen Praxis ähnlichen Kombinationstherapie mit Zytostatika auf seine Wirksamkeit in vitro zu überprüfen.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde ausgehend von dem Vergleich zwischen verschiedenen E1A deletierten Vektoren und deren Replikation in Tumorzelllinien sowie der Analyse der zur adenoviralen Replikation benötigten Genexpression, ein neuer adenoviraler E1A unabhängiger Vektor namens Xvir03 untersucht.

Zunächst wurden Ad312, dl520 und $\Delta 24$ in einer Reihe von Zelllinien getestet. Die Kinetik der Replikation sollte bei dem am besten lysierenden Virus mit Hilfe von E2 early und E2 late genauer untersucht werden. Auch die Genexpression bei unterschiedlichen MOI wurde verglichen und insbesondere die Rolle von E1B55K und E4orf6 untersucht, die Yb-1 in den Kern transportieren und somit eine Rolle bei der Aktivierung des E2 late Promotor spielen.

Der neu konstruierte Vektor Xvir03 exprimierte E1B55K und E4orf6 über einen CMV Promotor. Er wurde nicht nur im Hinblick auf seine Replikation in verschiedenen Zelllinien, seine E1A Unabhängigkeit und seine onkolytische Potenz untersucht, sondern auch darauf getestet, ob er die S-Phase in Zellen induzieren und die Expression der vielfachresistenten Gene beeinflussen kann. Besonderes Augenmerk richtete sich in diesem Zusammenhang auf die klinisch angewandte Kombinationstherapie, der die Virotherapie als weiterer Bestandteil hinzugefügt wurde.

Es zeigte sich nicht nur, dass ein E1A unabhängiger Vektor effizient in Tumorzellen replizierte und diese lysierte, sondern auch dass dieser eine deutliche Erniedrigung der Expression der Vielfachresistenzgene bewirken konnte.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Verwendete Geräte (neben der Labor Grundausstattung):

Hybridisierungsöfen:	GFL 7601
Kühlzentrifuge:	Hettich EBA 12 R, Heraeus Biofuge „fresco“, Biofuge fresco, Megafuge 2.0 R, Varifuge 3.0 R Heraeus Instruments / Kendro; Hanau
Zentrifugen:	EBA 12 Hettich Zentrifugen; Tuttlingen J2-HS Centrifuge Beckman Instruments
Ultrazentrifuge:	Optima™ LE-80K Beckman Instruments
Posphorimager:	Fuji BAS 2000
PCR Gerät:	Stratagene Robocycler Gradient 40
UV-Linker:	Stratagene Stratalinker UV 2400
Ultrazentrifuge:	Beckmann Optima LE-80K
FACS:	Becton Dickinson FACS Vantage
Lichtmikroskop	Axiovert 135 Phasenkontrast-/Fluoreszenzmikroskop Zeiss; Jena Coolpix Kamera Nikon

Verwendete Reagenzien:

α -32P-dCTP	0133004X.2	MP Biomedical, Eschwege
Alkalische Phosphatase	P8361	Sigma, Taufkirchen, BRD
Agarose	35-1020	PEQLab
Ampicillin	A9518	Sigma, Taufkirchen, BRD
Bovines Serum Albumin	A7906	Sigma, Taufkirchen, BRD
Chloroform	B2629	Sigma, Taufkirchen, BRD
Cäsiumchlorid	CSCL1KG	Quantum Appligene
Dimethylsulfoxid	D2650	Sigma, Taufkirchen, BRD
DH10B Bakterien	18297-010	Gibco, BRL, Karlsruhe, BRD
DMEM	FG0435	Biochrom AG, Berlin, BRD

dNTPs	R0181	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Docetaxel	O1885	Aldrich, BRD
Ethanol	100986	Merck, Schwalbach, BRD
Ethidiumbromid	200271	Roche, Mannheim, BRD
ExpressHyb Hybrid- isierungslösung	80151	Clontech, USA
Fetales Kälberserum	3702-P232310	Pan, Biochrom AG, USA
Formaldehyd	F8775	Sigma, Taufkirchen, BRD
20G 1½0,9x40 Nadel	301300	B&D Biosciences, Fraga, Spanien
Glutamin	K0283	Biochrom AG, Berlin, BRD
Glykogen	G8751	Sigma, Taufkirchen, BRD
Glyzerin	50049	Sigma, Taufkirchen, BRD
Hefeextrakt	212750	B&D Biosciences, Fraga, Spanien
Isoamylalkohol	W205702	Sigma, Taufkirchen, BRD
Isopropanol	109634	Merck, Schwalbach, BRD
1 kbp Leiter	25-2040	Gibco, BRL, Karlsruhe, BRD
<i>KpnI</i>	ER0501	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
<i>KpnI</i> Puffer	B29	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Kristallviolett	C6158	Sigma, Taufkirchen, BRD
Kresolrot	K4000	Sigma, Taufkirchen, BRD
L-15 Leibovitz's	BE12700F	BioWhittaker, USA
6x Ladepuffer	R0611	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
MicroSpin G25 Säule	27-5325-01	Amersham, USA
Nukleasefreie H ₂ O	P1193	Promega, Madison, USA
OptiMEM	51985-026	Gibco, BRL, Karlsruhe, BRD
Penicillin/Streptomycin	A2213	Biochrom AG, Berlin, BRD
Pferdeserum	H1270	Sigma, Taufkirchen, BRD
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol	P3803	Sigma, Taufkirchen, BRD
PBS Dulbecco	L1825	Biochrom AG, Berlin, BRD
10x PCR Puffer	B34	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
RNAse	109126	Roche, Mannheim, BRD

RNAse freies H ₂ O	P119C	Promega, Madison, USA
RNA-Ladepuffer	R4268	Sigma, Taufkirchen, BRD
RPMI	FG1215	Biochrom AG, Berlin, BRD
Slide A Lyzer Buoy	66430	Pierce, USA
Slide A Lyzer Dialyse	66333	Pierce, USA
Sulforhodamin B	S 1402	Sigma, Taufkirchen, BRD
Taq-Polymerase	1146165	Roche
T4-Ligase	EL0016	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
T4-Ligase Puffer	EL0015	MBI Fermentas, Ontario, Kanada
Trichloressigsäure	T8657	Sigma, Taufkirchen, BRD
TRIzol Reagenz	15596-026	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypanblau	T8154	Sigma, Taufkirchen, BRD
Trypsin	L2163	Biochrom AG, USA

Docetaxel, Daunorubicin und Irinotecan wurden jeweils frisch von der Apotheke des Klinikums rechts der Isar bezogen.

3.2 Bakterienkultur

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	5 g
mit Ampicillin (LB-amp)	Hefe-Extrakt	9 g
	NaCl	10 g/
	ddH ₂ O	ad 1 l

Auf pH 7 mit NaOH eingestellt, 20 min bei 121°C autoklaviert, nach Abkühlen auf 60°C mit 100 mg Ampicillin/l versetzt.

LB-Ampicillin-Platten	NZ-Amin-Casein-Hydrolysat	5 g
LB-Kanamycin-Platten	Hefe-Extrakt	9 g
	NaCl	10 g
	Agar-Agar	20 g
	ddH ₂ O	ad 1 l

mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, 20 min bei 121°C autoklaviert, nach Abkühlen auf 60°C, 100 mg Ampicillin/l zugegeben und unter sterilen Bedingungen auf 40 Petrischalen verteilt.

3.3 Viren

	E1A	E1B	E2	E3	E4	L1-5
Wt Ad5	+	+	+	+	+	+
Ad312		+	+	+ ¹⁾	+	+
dI520	+ ²⁾	+	+	+	+	+
Δ24	+ ³⁾	+	+	+	+	+

1)E3-ADP enthalten

2)CR3 Deletion

3)CR2 Deletion

3.4 Puffer und Lösungen

3.4.1 PCR

Die Zusammensetzung eines Ansatzes auf 50 µl lautete:

100 ng DNA Template

0,5 µM 5'-3'Primer

0,5 µM 3'-5'Primer

5 µl 10x PCR Puffer

10 µM dNTPs

6 µl Glyzerin

3 µl MgCl₂

3 µl Kresolrot

2 U Taq Polymerase

32 µl ddH₂O

3.4.2 DNA Präparation

P1 Puffer

50 nM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA

RNAse zusetzen

P2 Puffer

0,2 M NaOH

1% SDS

N3 Puffer

2,55 M Kaliumacetat pH 4,8

3.4.3 Agarosegelelektrophorese

TAE Puffer

242 g Tris- Base
57,1 ml Essigsäure
100 ml EDTA pH 8,0
ad 1l H₂O

TBE Puffer

108 g Tris-Base
55 g Borsäure
8,3 g Na₄-EDTA
ad 1l H₂O

3.4.4 Southern Blot

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
ad 1l dd H₂O

Neutralisierungslösung

5 M NaCl
1 M Tris pH 7,0
ad 800 ml dd H₂O

20x SSC

3 M NaCl
0,3 M NaCitrat
ad 100 ml ddH₂O pH 7,0

3.4.5 Northern Blot

25x MOPS Puffer

250 mM NaAc
25 mM EDTA
1 M 3-N-Morpholinopropansulfonsäure
ad 250 ml dd H₂O pH 7,0

20x SSC

3 M NaCl
0,3 M NaCitrat
ad 100 ml ddH₂O pH 7,0

3.4.6 Plaque Test

Plaque Test Medium

100 ml 1x F11 Medium
12 ml 10x F11 Medium
3,2 ml NaHCO₃ 7,5%
0,4 ml Fungizone (500x)
2 ml Penicillin/Streptomycin
2 ml L-Glutamin
2 ml Yeast Extrakt 5%
10 ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

3.4.7 Kristallviolettffärbung

Kristallviolettlösung

60% Ethanol

3,3% Formalin

4,3% Essigsäure

10 mg/ml Kristallviolett

3.4.8 Sulforhodamintest

10% TCA Puffer

3.4.9 Kits

Prime-It Random Labeling Kit	300385	Stratagene, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen, Hilden, BRD
QIAquick Nucleotide Removal Kit	28306	Qiagen, Hilden, BRD
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106	Qiagen, Hilden, BRD
Turboblotter™ Rapid Downward Transfer System	10416328	Schleicher&Schuell, BRD

3.5 Methoden

3.5.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen, deren Prinzip auf einer Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 90°C und Auftrennung in jeweils einzelne Stränge beruht [135]. Beim anschließenden Abkühlen auf 52°C lagern sich aus 15 bis 25 Basenpaaren bestehende Oligonukleotide, auch Primer genannt, ihrer spezifischen Sequenz nach an die einzelnen komplementären Stränge an. Hier von ausgehend kann die zugesetzte thermostabile Taq-Polymerase die im Ansatz ebenfalls enthaltenen Desoxyribonukleotide der Sequenz entsprechend an die Stränge heransynthetisieren. Auf diese Weise wird durch die Vorgabe der spezifischen Primer eine ausgesuchte DNA-Sequenz vervielfältigt. Dieser Schritt wird nun im

Durchschnitt 30 Zyklen wiederholt um eine ausreichende Menge, etwa 2^{96} , der spezifischen DNA herzustellen. Die Auftrennung erfolgte bei 95°C für 1½ min, das *Annealing* bei 48°C; bei 72°C fand die Elongation statt.

Zusätzlich waren im Ansatz MgCl₂ und Glycerin zur Stabilisierung enthalten, sowie Kresolrot, das gleichzeitig als Gelelektrophoresepuffer diente. Für den E1A Nachweis wurden folgende Primer verwendet: 5'-ATGGCCGCCAGTCTTTTG-3' vorwärts und 5'-GCCATGCAAGTTAAACATTATC-3' rückwärts, die Größe des Signals betrug 1042 bp, für den E2 Nachweis benutzte man 5'-GTCGGAGATCAGATCCGCGT-3' vorwärts und 5'-GGTCCTCGTCGTCTTCGCTT-3' rückwärts.

3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von PCR-Produkten und Enzymverdaus konnte entweder ein Tris-Acetat-EDTA-Puffer oder ein Tris-Borat-EDTA-Puffer verwendet werden, wobei ersterer für präparatorische Gele besser geeignet war, letzterer aber über eine höhere Pufferkapazität verfügte. Auf einem 1%igen Agarosegel konnten DNA-Fragmente einer Größe zwischen 0,3 und 10 kb aufgetrennt werden. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen die einzelnen Nukleinsäuren interkalierte und unter UV-Licht der Länge 270-360 nm fluoreszierte, wurden kleinsten Mengen bis 5 ng DNA dargestellt.

Es wurden 60 ml Gelelektrophoresepuffer, entweder Tris-Acetat-Puffer oder ein Tris-Borat-Puffer, mit 60 mg Agarosepulver vermischt, erwärmt und mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. In die DNA Proben wurden jeweils 4 µl 6x Ladepuffer pipettiert. 10 µl des 1kb PEQ Gold DNA Molekulargewichtsleiter (0,5mg/ml) dienten als Leiter, an der die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abgelesen werden konnte. Das fertige Gel wurde mit dem Gelträger in einer Elektrophoresekammer platziert und am Strom- und Spannungsgerät eine Spannung zwischen 70 und 90 Volt eingestellt, so dass die dem elektrischen Feld ausgesetzten negativ geladenen DNA-Moleküle zur positiven Anode wanderten.

Die Gele wurden unter UV-Licht am Gerät von LFT Labortechnik durch den oben erklärten Fluoreszenz-Mechanismus analysiert und photographiert.

3.5.3 Reinigung der DNA

Handelte es sich um ein präparatorisches Gel, wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Das weitere Verfahren wurde mit einem Kit der Firma QIAgen durchgeführt, alle Schritte entsprachen dem dazugehörigen Protokoll.

Das dreifache Volumen des Gewichts der ausgeschnittenen Gel-Bande in mg wurde von QG-Puffer in μl , d.h. 100 mg entsprachen 100 μl , aus dem QIAquickGel Extraction Kit hinzugegeben.

Nach Inkubation bei 50°C im Thermomixer für 10 min und Zentrifugation durch eine QIAquick Filtersäule, wusch man die DNA mit 750 μl QBC, zentrifugierte erneut zweimal bei 14000 rpm und verwarf den Durchfluß. Zur Elution gab man 30 μl EB-Puffer direkt auf die Membran, inkubierte für 1 min und zentrifugierte für 3 min. Die so gewonnene DNA konnte nach Messung der Konzentration direkt weiterverarbeitet werden.

3.5.4 Messung der DNA

Vor der Messung erfolgte die Bestimmung des Leerwertes von 100 μl H₂O im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Die zu analysierende Probe wurde mit H₂O in einer 1:50 Verdünnung (98 μl H₂O und 2 μl Probe) in eine DNA-Messküvette pipettiert und die Absorption bei 260, 280 und 320 nm UV-Licht gemessen. Dabei entsprach 1 Absorptionseinheit 0,5 Einheiten DNA bzw. 0,4 Einheiten RNA. Die Reinheit der Probe ergab sich durch den Quotienten der Absorption bei 260/280 nm, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

Allgemein errechnete sich die Konzentration nach der Formel:

$$C [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

V=Verdünnungsfaktor
F= 50 für dsDNA
40 für RNA

3.5.5 Enzymverdau von DNA

Ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen erlaubt den Nachweis einer gelungenen Präparation, Ligation oder PCR. Diese Enzyme erkennen bestimmte Sequenzen in der DNA und schneiden neben oder innerhalb dieser Erkennungsfrequenz.

Es wurden 1-2 µg DNA zum Verdau eingesetzt, 2 µl des je nach Enzym zugehörigen Restriktionspuffers um den pH während der Reaktion im optimalen Bereich zu halten, sowie 1 U des Restriktionsenzym und je nach Enzym evt. BSA. Nach Inkubation für mindestens 3 h bei 37°C, wurde das Enzym mittels Erhitzen auf 70°C im Thermomixer inaktiviert und mit 2 µl CIP-Puffer und 1 U (intestinaler Kälber) Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert um eine Selbstligation zu verhindern.

3.5.6 Ligation der DNA

Für Ligationen wurden ca. 10 µl des zu ligierenden Fragments (etwa 80 ng) im Verhältnis 5:1 zum Plasmid eingesetzt. Nach Zusatz von 2 µl T4- Ligase Puffer und 1 µl T4-Ligase sowie nukleasefreiem H₂O auf 20 µl, erfolgte die Ligation bei 16°C im Wasserbad über Nacht. Hierbei fügt die Ligase die überstehenden Enden der geschnittenen Plasmide und Fragmente zusammen.

3.5.7 Herstellung glatter DNA-Enden

Zum abgeschlossenen Enzymverdau gab man nach vorheriger Reinigung 1 µl dNTP, 2 µl Puffer sowie 1 U T4-DNA-Polymerase, inkubierte für 5 min bei Raumtemperatur und inaktivierte das Enzym anschliessend bei 70°C im Thermomixer.

3.5.8 Transformation von DNA in DH10B-Zellen

Für die Transformation wurden die bei -80 °C gelagerten DH10B-Bakterien sofort auf Eis überführt und dort langsam aufgetaut. Es wurden 10 µl eines

Ligationsansatzes oder Plasmids hinzugegeben, durch Rühren vermischt, 30 min auf Eis gelagert und für 90 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Abkühlen auf Eis, gab man zu jedem Ansatz 600 µl LB-Medium hinzu, inkubierte die Proben bei 37°C im Brutschrank und plattierte die Ansätze nach 1 h auf vorgewärmten und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agarplatten aus. Diese wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt, das zugesetzte Antibiotikum garantierte, dass nur die Bakterien wuchsen, in die das Plasmid oder der Ligationsansatz mit dem Resistenzgen erfolgreich hineinkloniert worden war. Nach erfolgreicher Inkubation über Nacht wurden etwa 5-10 Kolonien gepickt, jede in ein 15 ml Gefäß mit je 4 ml LB-Medium und 1 µl Antibiotikum der Konzentration 100 µg/ml je ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden 1 ml LB-Medium als Stocklösung zurückbehalten und mit 1 ml 100%igem Glycerin versetzt.

3.5.9 DNA-Minipräparation

Sämtliche bei dieser Methode verwendeten Puffer waren im QIAprep Spin Miniprep Kit enthalten. Die zurückbehaltene Bakteriensuspension wurde bei 4000 rpm in einer Heraeus Zentrifuge für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde völlig entfernt und das Pellet in 300 µl P1-Puffer aus dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgelöst, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 300 µl P2-Puffer zur Lyse der Bakterienwände zugegeben. Dann 300 µl N3(Neutralisations)-Puffer hinzugefügt und jeweils anschließend das Gefäß 4-6x geschwenkt. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm, 4°C für 10 min, überführte man 860 µl des Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß und gab 600 µl Isopropanol und 2 µl Glykogen hinzu. Nochmaliges Zentrifugieren und Waschen mit 80%igem Ethanol schloß sich an, Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und in 30 µl EB-Puffer aufgelöst.

3.5.10 DNA-Maxipräparation

Die Vorbereitungen für die Maxipräparation umfassten ebenfalls eine normale Transformation mit Picken der Kolonien und Inkubation über Nacht in LB-

Medium. Diese Ansätze wurden nun aber in 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum in der Konzentration 100 µg/ml über Nacht bei 37°C inkubiert. Die nächsten Schritte entsprachen exakt der DNA Minipräparation, lediglich das Volumen der einzelnen Pufferzugaben betrug jeweils 10 ml. Nachdem bei 12000 rpm und 4°C für 30 min in einer Beckmann J2-HS Zentrifuge zentrifugiert wurde, konnte der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, nochmals abzentrifugiert (12000 rpm, 4°C, 15 min) und über eine zuvor mit QBT-Puffer äquilibrierte QIAgen tip 100 Filtersäule gegeben werden. Dabei blieb die DNA im Filter zurück, wurde 2x mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen und in ein neues Gefäß mit 15 ml QF-Elutionspuffer eluiert.

Die Ausfällung erfolgte mit 10,5 (0,7 Volumen) ml raumtemperierten Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 800 rpm für 30 min, die Waschschrte mit 7,5 ml 80%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 min. Das Pellet wurde mit 20-30 µl EB-Puffer aufgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA konnte nun gemessen und verarbeitet werden.

3.5.11 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse ist ein Verfahren zum Nachweis von per Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmenten auf einer Membran mittels radioaktiv oder anderweitig markierter Sonden. Das Verfahren wurde 1975 erstmals von E.M. Southern eingeführt [183], es folgten Weiterentwicklungen für RNA (Northern) und Protein (Western) Nachweis.

3.5.11.1 Sondenherstellung

Die Sondenherstellung erfolgte mittels PCR. Jedem Ansatz wurden den oben stehenden Angaben entsprechende Mengen an spezifischen Primern zugegeben, die die selektive Vervielfältigung der für die Sonde benötigten Abschnitte garantierte. Der Nachweis der Replikation erfolgte mit Hilfe der E2 late Sonde. Die Sonden für den Northern Blot Nachweis wurden nach dem

gleichen Verfahren hergestellt. Eine Auflistung der verwendeten Sonden findet sich unter 3.5.12.1.

3.5.11.2 DNA-Gewinnung

Es wurden 2×10^5 Zellen auf 6-Schalen-Platten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, mit der entsprechend angegebenen MOI Virus/Zelle in 500 µl OPTI-Mem infiziert und die DNA nach 72 h isoliert. Dazu wurde das DNA QIAGEN Tissue Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Nach Waschen mit 200 µl PBS, wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst, bei 1300 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS sowie 200 µl AL-Puffer aufgelöst und 20 µl (200 µg) Proteinase K hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei 70°C für 60 min inkubiert. Dann gab man 200 µl 100% Ethanol dazu und pipettierte die Lösung auf eine QIAGEN Tissue Kit Säule, die bei 14000 rpm und 4°C für 1 min zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde verworfen und 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben, diese unter den gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert und der Schritt mit 500 µl AW2-Puffer und 3 min Zentrifugation noch einmal wiederholt.

In ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß platziert, wurden 100 µl AE(Elutions)-Puffer pro Ansatz auf die Säule pipettiert, bei Raumtemperatur 1 min inkubiert und für 3 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Die Konzentration der DNA wurde am Beckmann-Photometer nach oben beschriebener Methode bestimmt und berechnet.

3.5.11.3 DNA-Verdau

Es wurden jeweils 2 µg DNA mit 2 µl 10x *KpnI*-Puffer (mit BSA), 5 U *KpnI* und ddH₂O auf 20 µl gemischt, über Nacht bei 37°C verdaut und anschliessend inaktiviert. Die Proben wurden zusammen mit einer Positivkontrolle und 1kb PEQLAB Gold DNA Leiter auf ein 1% TBE-Gel aufgetragen und bei 70 V für 120 min aufgetrennt.

3.5.11.4 Membrantransfer

Vor der weiteren Verwendung photographierte man das Gel unter dem UV-Lesegerät. Dann wurde das Gel auf einer Waage für 20 min zur DNA Auftrennung in soviel Denaturierungslösung geschwenkt, dass es immer vollständig bedeckt war.

Daran schloss sich einmal Waschen mit ddH₂O an und Neutralisieren mit einmaligem Wechsel der Neutralisierungslösung für jeweils 20 min an, um den pH-Wert wieder unter 9,0 zu senken. Für den DNA-Transfer auf die Membran wurde ein Kapillartransfersystem der Firma Schleicher & Schuell verwendet.

Nach Markierung der Membran wurde diese 20 min in Wasser gewaschen und kurz in 20x SSC getaucht. Zum Aufbau des Blots wurden die im Kit enthaltenen Whatman-Papiere GB004 verwendet, der Blot nach Anleitung aufgebaut und die Vorrichtung mit 20x SSC gefüllt. Über Kapillarkräfte wurde nun die DNA über Nacht auf die Nylonmembran überführt. Nach Abschluss des Blottens bestrahlte man die DNA im UV-Stratalinker 2400 bei einer Wellenlänge von 254 nm mit 120 mJ UV-Licht.

3.5.11.5 Prähybridisierung, Hybridisierung und Filmentwicklung

Für die Prähybridisierung wurde die Hybridisierungslösung in ein Röhrchen gefüllt, in einem Hybridisierungsofen bei 58°C unter ständiger Rotation erwärmt und die Membran hierin für 1½ h prähybridisiert.

Die Markierung der Sonde sowie die Hybridisierung erfolgten mit Hilfe des Random Primer Labeling Kits von Stratagene.

Es wurden 25 ng der entsprechenden spezifischen Sonde mit 10 µl Random Oligonukleotid Primer und entsprechenden Volumina Wasser auf ein Gesamtvolumen von 34 µl zusammen pipettiert. Nach einer kurzen Erwärmung (2 min) bei 96°C im Thermomixer und Zentrifugation bei Raumtemperatur konnten 10 µl 5x CTP-Primer Puffer hinzu gegeben werden, gefolgt von 3 µl dCT³²P markierten Nukleotiden und 1 µl Klenow-Fragment. Nach einer Inkubation von 35 min bei 37°C, bei der die mit ³²P markierten Nukleotide in die

Sonde eingebaut wurden, konnte die radioaktiv markierte Sonde mit Hilfe einer MicroSpin™ G25 Säule von Amersham durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 2500 g getrennt werden.

Die im 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aufgefangene markierte Säule wurde 2½ min in einem Wasserbad gekocht um die Stränge der DNA zu trennen und auf Eis gestellt, um eine erneute Zusammenlagerung zu verhindern. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Hybridsierungssofen bei 58°C, ebenso wie die sich am nächsten Tag anschließenden Waschschrirte bei 60°C mit zweimal 2% SSC und 0,1% SDS enthaltender Pufferlösung für jeweils 30 min und einmal mit 0,2% SSC und 0,1% SDS enthaltender Pufferlösung für 30 min.

Die Membran wurde in eine Filmkassette platziert und unter Lichtabschluss ein Film in die Kassette eingelegt, der über Nacht darin belassen wurde.

Zur Entwicklung des Films legte man ihn in das FLA 2000 Lesegerät von Fuji. Für Darstellung des Ergebnisses wurde das Irfan View Programm verwendet, die weitere Bearbeitung wurde mit Hilfe des Aida Programms ausgeführt. Die Sonde hatte aufgrund ihrer spezifischen Sequenz entsprechende Bereiche der auf die Membran geblotteten RNA gebunden und dort dank ihrer radioaktiven Markierung die entsprechenden Bereiche auf der Filmplatte geschwärzt. Diese wurden dann bei der Entwicklung sichtbar und mit Hilfe der oben genannten Programme auswertbar.

3.5.12 Northern Blot Analyse

3.5.12.1 Sondenherstellung

Es wurden folgende Primer für die Sondenherstellung verwendet:

Sequenz		Sonde
E2 early		
code	5'-GGATAGCAAGACTCTGACAAAG-3'	240 bp
anti	5'-AGCTGATCTTCGCTTTTG-3'	
E2 late		
code	5'-GTCGGAGATCAGATCCGCGT-3'	1502 bp
anti	5'-GGTCCTCGTCGTCTTCGCTT-3'	

E1B55K		
code	5'-CCTGCGAGT-GTGGCGGTAAA-3'	108 bp
anti	5'-CAAACCTCAGCGCGGGTGACAG-3'	
E4orf6		
code	5'-CAATGACAGTGGAGAGCCCA-3'	378 bp
anti	5'-TATGACTACGTCCGGCGTTC-3'	
IRES		
code	5'-TCCGGTTATTTTCCACCA-TATTGC-3'	300 bp
anti	5'-TTATCATCGTGTTTTTCAAAGG-3'	
GAPDH		
code	5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3'	501 bp
anti	5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	
MRP1		
code	5'-AGAACCTCAGTGTCTGGGCAGCC-3'	527 bp
anti	5'-TGCCATCTCTGTCTCTCCTGGG-3'	
MDR1		
code	5'-AAGCTTAGTACC AAAGAGGCTCTG-3'	785 bp
anti	5'-GGCTAGAAACAATAGTGAAAACAA-3'	

3.5.12.2 RNA Isolierung

Bei einer Northern Blot Analyse wird aus Zellen isolierte RNA auf eine Membran geblottet und mittels einer spezifischen DNA-Sonde, die radioaktiv markiert ist, im FLA Lesegerät nachgewiesen.

Für den Nachweis der *MRP/MDR* Expression wurden die Zellen mit den jeweils angegebenen MOI infiziert und am 7. Tag aus 10 cm Schalen isoliert. Bei den Zeitreihen isolierte man die RNA nach 3, 6, 9, 12 und 24 h. Als Kontrolle diente eine Infektion der jeweiligen Zellreihe mit 10 pfu Adenovirus Wildtyp, die nach 24 h isoliert wurde. Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, dann mit 1,5 ml TRIzol versetzt und durch Schwenken zum Ablösen gebracht. Nach Resuspendierung und Zentrifugation bei 13000 rpm, wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1000 µl TRIzol aufgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 2 min gab man 200 µl Chloroform dazu, zentrifugierte erneut bei 13000 rpm, 4°C für 15 min und nahm anschliessend die wässrige Phase, die die RNA enthielt, unter einem Abzug ab um sie in ein vorbereitetes Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Isopropanol zu geben. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl

80%igem Ethanol gewaschen, bei 7500 rpm für 10 min abzentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Schluss löste man das Pellet in 20 µl reinem, nucleasefreiem Wasser.

3.5.12.3 Formaldehyd-Gelelektrophorese

Nach Bestimmung der Konzentration wurde ein 1% Agarose-Gel aus 0,65 Agarose, 60 ml 1x MOPS-Puffer und 3,2 ml 37% Formaldehyd hergestellt.

Es wurden gleiche Konzentrationen in Höhe von 5 µg bzw. 10 µg RNA mit entsprechenden µl nucleasefreien Wassers zu gleichen Volumina vermischt und mit 2/3 Volumina RNA-Puffer versetzt. Die Kontrolle nach Wildtyp Infektion wurde aufgrund der starken Expression in einer Konzentration von 2 µg aufgetragen und genormt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 67°C im Thermomixer zum Denaturieren aufgekocht und bei 50 V 2½-3 h in dem Gel aufgetrennt. Man photographierte das Gel möglichst kurz unter UV-Licht, gab es in Wasser und äquilibrierte es vor dem Blotten in 20x SSC.

3.5.12.4 Membrantransfer, (Prä)Hybridisierung und Filmentwicklung

Auch hier wurde das Kapillartransfersystem der Firma Schleicher & Schuell verwendet und der Blot mit der Membran nach Anleitung wie oben beschrieben aufgebaut.

Die Prähybridisierung erfolgt wie unter 3.5.11.5. angegeben, allerdings bei 56°C. Derweil wurde wieder die Sonde wie beim Southern Blot radioaktiv markiert. Auch das Protokoll der Hybridisierung entsprach dem unter 3.5.11.5. erwähnten und fand bei 58°C statt. Die Waschschritte waren identisch.

Auch die Northern Blot Membranen wurde in eine Filmkassette eingelegt und die Filme im Phospho-Imager FLA 2000-Reader entwickelt.

Zur quantitativen Auswertung wurde das Image J Programm verwendet, dabei wurde die Signalstärke markiert, quantifiziert und in Bezug zur Signalstärke der Gel-Bande oder der GAPDH-Bande gesetzt. Dies geschah mit Hilfe der Formel:

$$2^{(-\Delta Ct)} = 2^{(Ct(GAPDH)-Ct(Probe))} \quad C = \text{Signalstärke}$$

3.5.13 Konstruktion von Xvir03

Der adenovirale Vektor wurde freundlicherweise von K.Mantwill, Klinikum rechts der Isar, München, konstruiert [121].

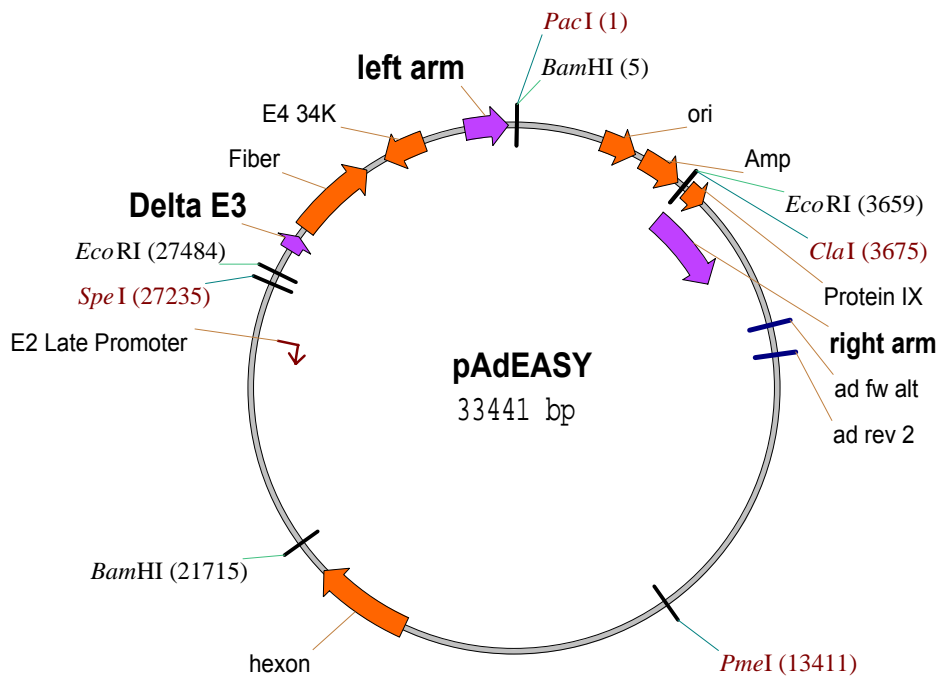


Abb. 9: Schematische Darstellung des verwendeten pAdEasy Vektors

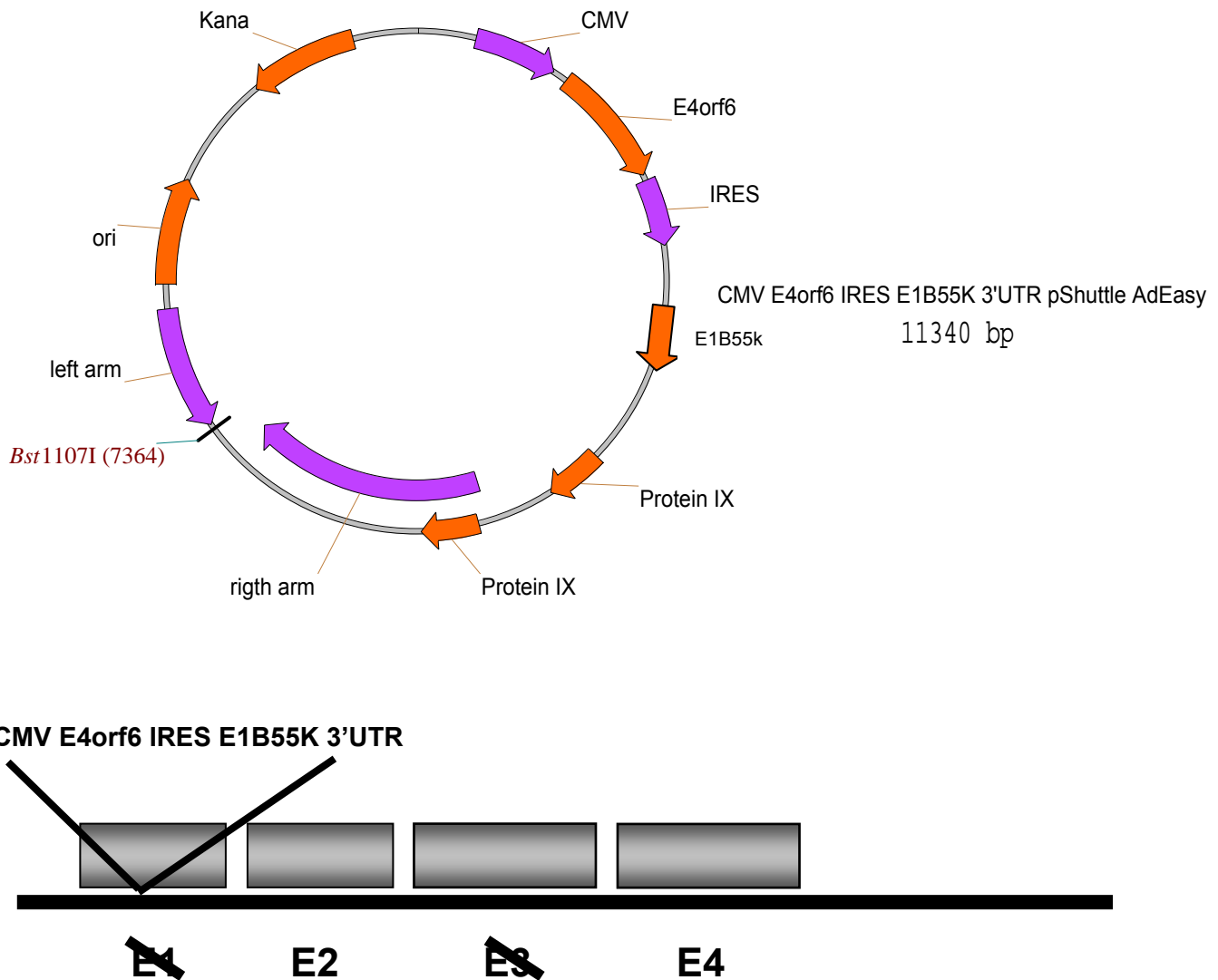


Abb. 10: Schematische Darstellung des neu konstruierten Xvir03 Shuttle Vektors (nach Mantwill K, Kohler Vargas N et.al., *Canc. Res.* 66 (2006) 7195-202)

3.5.14 Virusamplifikation

HEK293 Zellen enthalten in ihrem Genom die adenoviralen E1A- und E1B-Gene, so dass replikationsinkompetente Adenoviren dort problemlos replizieren können.

3.5.14.1 Herstellung des G1-Stocks

Zuerst wurde eine 75 cm³-Kulturflasche mit HEK293-Zellen mit dem jeweiligen Virus für 1 h infiziert, dann 8 ml Vollmedium zugefügt. Nach ca. 3-4 Tagen zeigten sich die ersten Anzeichen des zytopathischen Effekts, die noch adhärennten Zellen wurden abgeklopft, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. und die Zellwände durch mehrmaliges schockartiges Gefrieren auf Trockeneis für jeweils 20 min und anschließendes Auftauen bei 37°C im Wasserbad zerstört. Dieses „*thaw and freeze*“ genannte Prozedere wurde insgesamt viermal durchgeführt. Dann wurde die Lösung bei 4000 rpm und 4°C in einer Heraeus Megafuge 2,0 Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 15 ml Falconröhrchen überführt. Man konnte den entstandenen G1-Stock nun in jeweils 1 ml aufteilen und bei -80°C lagern.

3.5.14.2 Herstellung des G2-Stocks

Hierbei wurde eine 150 cm³-Kulturflasche mit 1 ml des G1-Stocks in OptiMEM über 1 h infiziert und danach 16 ml Vollmedium zugegeben. Man verfuhr wie bei Herstellung des G1-Stocks.

3.5.14.3 Maxiprep-Isolierung von Viren

Für die Infektion wurden 10 große 175 cm³-Kulturflasche mit 1-2 ml G2-Stock in 40 ml OptiMEM, d.h. 4 ml pro Flasche, versetzt. Nach 3-4 Tagen begannen die Zellen sich abzukugeln, wurden gelöst und in 5-7 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 3500 rpm für 15 min, nahm man den Überstand ab und löste das Pellet in insgesamt 8 ml Viral Preservation Medium. Nach viermaligem „*thaw and freeze*“ zentrifugierte man die Zellreste bei 4°C und 4000 rpm für 10 min. Den Überstand gab man in ein 15 ml Falconröhrchen, das bis zur Virusreinigung bei -80°C lagerte. Diese erfolgte mit Hilfe der Cäsiumchloridmethode.

3.5.15 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien wurden in Brutschränken von Forma Scientific, Inc., bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Luft gehalten.

Die HEK 293 Zellen [63], eine embryonale Nierenzelllinie, die HeLa Zervixkarzinom-Zellen [210], die U2OS Osteosarkom-Zellen [160] sowie die U87-MG Glioblastom-Zellen stammten von der American Type Culture Collection aus Manassas, VA, USA.

Sie wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS), 2 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gehalten.

Die EPG85-257RDB Magenkarzinomzellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dietel, Charité Berlin, zur Verfügung gestellt und in L15-Medium mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS), 2 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1,1g/l Natriumcarbonat, 1g/l Glucose, 6,25 mg/ml Fetuin, 80 IU/l Insulin und 20000 kl U/l Trasyolol kultiviert.

Alle 4 Wochen wurden die Zelllinie mit 100 ng/ml Daunoblastin versetzt um die Expression des p-Glykoproteins sicherzustellen.

DU145 und PC3 waren beide Prostatakarzinomzelllinien und wurden in RPMI mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS), 2 mmol/l Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bzw. in einer 1:1 Mischung aus RPMI und F12-Medium gehalten.

Bei den EJ28 Zellen handelte es sich um eine metastasierte Blasenkarzinomzellreihe, die in RPMI mit 10% Fetalem Kälberserum (FKS), 200 µg/ml L-Glutamin, 100 µg/ml Penicillin und 25 µg/ml Streptomycin kultiviert wurde.

Alle Zellreihen wurden zweimal die Woche im Verhältnis 1:10 gesplittet und in neue Zellkulturflaschen überführt um die Zellen subkonfluent zu halten. Dazu wurden sie nach einmaligem Waschen mit PBS mit Hilfe von Trypsin abgelöst, in Vollmedium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:10 in eine neue Kulturflasche überführt.

Nur bei den HEK293 Zellen wurden jeweils 5 und 1 ml 1x Citric Saline verwendet.

3.5.16 Plaquetest zur pfu Bestimmung

HEK293 Zellen wurden als Monolayer à 2×10^5 in 6 cm Schalen ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungsstufen eines Virus infiziert.

Aus dem ursprünglichen Virusstock wurde eine Verdünnungsreihe auf 10^{-11} hergestellt, indem man 10 µl Virus mit 90 µl OptiMEM vermischt und von der vorausgehenden Verdünnungsstufe 60 µl mit 540 µl OptiMEM weiter verdünnte. Jeweils zwei 6 cm Petrischalen wurden mit 250 µl einer Verdünnungsstufe infiziert und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Das F11 Plaque-Medium wurde frisch hergestellt (siehe Puffer und Lösungen), bei 37 °C aufgewärmt und 5 min in ein 44°C warmes Wasserbad gestellt, mit steriler 1% Agarose 1:1 vermischt und in 50 ml Falkonröhrchen abgefüllt. Das Infektionsmedium wurde abgesaugt und die Zellen vom Rand aus mit 10 ml Agarose-Plaque-Medium-Gemisch pro Schale überschichtet. Die Petrischalen kühlten bei Raumtemperatur ab, bevor man sie bei 37°C in den Brutschrank stellte. Die Plaques zählte man das erste Mal nach 7 Tagen aus und ein zweites Mal nach 10 Tagen.

Die Pfu Zahl konnte nach der Formel

$$A * \text{Plaques} \times 4 \times \text{Verdünnung} = \text{pfu/ml} \quad A = \text{Anzahl}$$

berechnet werden.

3.5.17 Infektion von Zellen mit Virus

Die für die Infektion benötigten MOI wurde nach folgendem Schema berechnet:

$$\text{Virustiter} / \text{Zellzahl (pro Schale)} = \text{pfu} / \text{Zelle}$$

Für alle Infektionen wurde OptiMEM mit 2% Fetalem Kälberserum verwendet. Für Ad312 wurde ein Titer von 5×10^{10} etabliert, für dl520 berechnete sich bei

einem Titer von 5×10^{10} die pfu Zahl. $\Delta 24$ zeigte im Plaquetest einen Titer von 5×10^9 , während die verwendeten Chargen von Xvir03 einen 1×10^9 Titer hatten. Die adenoviralen Wildtyp Kontrollen wiesen einen Titer von 5×10^9 auf.

Die Viren wurden entsprechend mit OptiMEM auf eine pipettierbare Menge verdünnt. Nach einmaligem Waschen mit PBS gab man 1,4 ml OptiMEM auf eine 10 cm Petrischale (500 μ l auf 6-Schalen-Platten, 100 μ l auf 96-Schalen-Platten), pipettierte die entsprechende Menge Virus hinzu, inkubierte den Ansatz im Brutschrank für 1 h und schwenkte die Schalen alle 10 min. Das Infektionsmedium wurde nicht abgesaugt, sondern nur 10, 2 ml oder 100 μ l Vollmedium dazugegeben und die Zellen weiterhin inkubiert. Im Verlauf wurde das Medium nicht mehr gewechselt, lediglich frisches Medium bei Bedarf dazugegeben. Nach 3-4 Tagen zeigten sich erste Anzeichen des zytopathischen Effekts in Form von verstärkter Lichtbrechung und Abrundung der Zellen. Am Zeiss-Lichtmikroskop wurde eine Nikon Digitalkamera angebracht und unter einem Blaufilter bei 10 und 20x Vergrößerung Photos gemacht.

3.5.18 Kristallviolett färbung

Kristallviolett färbt lebende Zellen an und ermöglicht so den zytopathischen Effekt sichtbar zu machen. Dazu werden die U2OS, HeLa, U373, U87, DU145, PC3 und EJ28 Zellen zweimal mit PBS gespült, jede Kavität mit einer gerade den Boden bedeckenden Menge Kristallviolett versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Kristallviolett mit einer 10 ml Pipette wieder abgenommen und im Sonderabfall entsorgt. Die Zellen wurden in sterilem Wasser gespült und bei Lufttemperatur getrocknet. Das Ergebnis wurde eingescannt und im Adobe Photoshop Programm dargestellt.

Um die überlebenden Zellen auch prozentual quantifizieren zu können, wurde die Färbung mit 1x PBS und 0,1% SSC über Nacht auf dem Schüttler im Brutschrank gelöst. Man pipettierte jeweils 100 μ l einer Kavität in die Vertiefung einer 96-Schalen-Platte und las die Absorption dieser im Wallac - Lesegerät bei einer Wellenlänge von 560 nm ab. Die Daten wurden in Microsoft Excel Programm eingelesen und mit Hilfe der Formel

$A_{540\text{nm}}-A_{650\text{nm}}$ infizierte Zellen

A=Absorption

$A_{560\text{nm}}-A_{650\text{nm}}$ nicht infizierte Zellen

ausgewertet.

3.5.19 Sulforhodamin-Test zur Bestimmung von Zytostatika IC_{50} Werten

Die IC_{50} Werte für die Zytostatika Daunorubicin, Docetaxel und Irinotecan wurden auf DU145 und PC3-Zellen bestimmt. Für die Versuchsreihe wurden die beiden Zelllinien zu 5×10^3 pro Vertiefung in 96-Schalen-Platten ausgesät und über Nacht in jeweils 100 μl Vollmedium inkubiert.

Die Zytostatika Konzentrationen wurden auf 200 μl berechnet mit Daunorubicin (Stocklösung 1000 mg/ml) 0,27; 0,55; 18; 54; 108 und 180 nM, Docetaxel (Stocklösung 5 mg/ml=6,2 mM) 0,1; 0,5; 1; 3; 6 und 9 nM und Irinotecan (Stocklösung 20 mg/ml=57 mM) 0,1; 0,5; 1; 3; 6 und 10 μM als Konzentrationen und zu den mit 100 μl OptiMEM versehenen Vertiefungen pipettiert. Für jede Konzentration wurden 3 Vertiefungen beimpft und nach 24, 48 oder 72 h das Inkubationsmedium durch 200 μl Vollmedium ersetzt. Nach 5 Tagen schüttete man das Medium ab, gab 200 μl eiskalte 10% TCA-Lösung zur Fixierung dazu. und spülte nach 2 h bei 4°C jeweils viermal mit ddH₂O. Dann gab man 100 μl 0,4% Sulforhodaminlösung zum Anfärben hinzu, ließ dieses 10 min einwirken, bevor jede Schale fünfmal mit 1% Essigsäure gespült und über Nacht zum Trocknen bei Raumtemperatur belassen wurde.

Am nächsten Tag gab man 300 μl 20mM Tris-Puffer (pH 10) in jede Vertiefung, schüttelte die Schalen bei Raumtemperatur für 2 h und bestimmte die Konzentrationen im Victor² 1420 Multilabel Counter von Wallac bei einer Wellenlänge von 540 nm.

Die Versuchsreihe wurde dreimal wiederholt, mit Hilfe der Formel

$$\frac{A_{540\text{nm}} - A_{650\text{nm}} \text{ infizierte Zellen}}{A_{560\text{nm}} - A_{650\text{nm}} \text{ nicht infizierte Zellen}} \quad A = \text{Absorption}$$

berechnet, die Ergebnisse gemittelt und mit Microsoft Excel verarbeitet.

3.5.20 Kombination von Xvir03 und Zytostatika

PC3 Zellen wurden zu 2×10^5 Zellen in 6-Schalen-Platten ausgesät. Nach 36 h wurden sowohl Xvir03 als auch Ad312 in je zwei Vertiefungen mit einmal 10, 20 und 30 pfu/Zelle infiziert und für 1h inkubiert.

Nach 12 h konnten jeweils 1; 9 und 18 nM Daunorubicin zu den bereits infizierten Zellen zugegeben werden. Am nächsten Tag, also nach 24 h, wurde das Medium gewechselt.

Bei der Kombination mit Irinotecan auf PC3 Zellen und Xvir03 mit Daunorubicin auf DU145 Zellen ging man genauso vor.

3.5.21 FACS Analyse

DU145, PC3 und EJ28 Zellen wurden zu 3×10^5 Zellen in jeweils drei 6 cm Petrischalen ausplattiert und nach 24 h im Brutschrank bei 37°C mit 30 pfu Xvir03 infiziert. Einen Tag später konnte man die Zellen abschaben und bei 1300 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugieren. Das Pellet wurde mit 3 ml PBS resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Den Überstand verwarf man und fixierte die Zellen mit 85% Ethanol. Nun wurden die Zellen nochmals gewaschen und in 1x PBS mit 10 µg/ml Propidiumjodid gegeben, das die DNA in Zellen spezifisch anfärbt. Dieses wurde zusammen mit 250 µg/ml RNase für 30 min bei 37°C inkubiert. Bei einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden ungebundene Antikörper entfernt, dann konnte die unterschiedliche Phasenverteilung mittels COULTER®EPICS XC-MCL™ von Beckmann Coulter dargestellt und durch die Expo™32 Software analysiert werden.

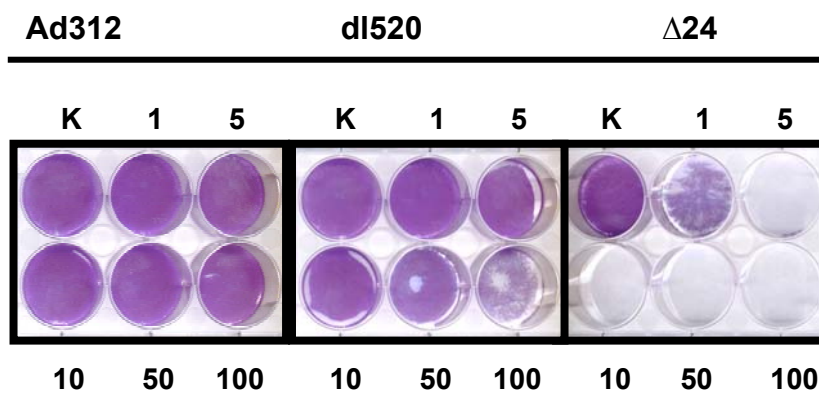
3.5.22 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Analysen wurden freundlicherweise in der Charité Berlin durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die U2OS Zellen zu 1×10^5 auf Objektträgern ausgesät und wuchsen bis zu einer ausreichenden Dichte heran. Anschließend wurden sie für 10 min in einem 1:1 Methanol-Aceton-Gemisch bei -20°C fixiert, bei Luft getrocknet und anschließend verschickt [121].

4 Ergebnisse

4.1 Zytopathischer Effekt Versuch mit Ad312, dl520 und $\Delta 24$

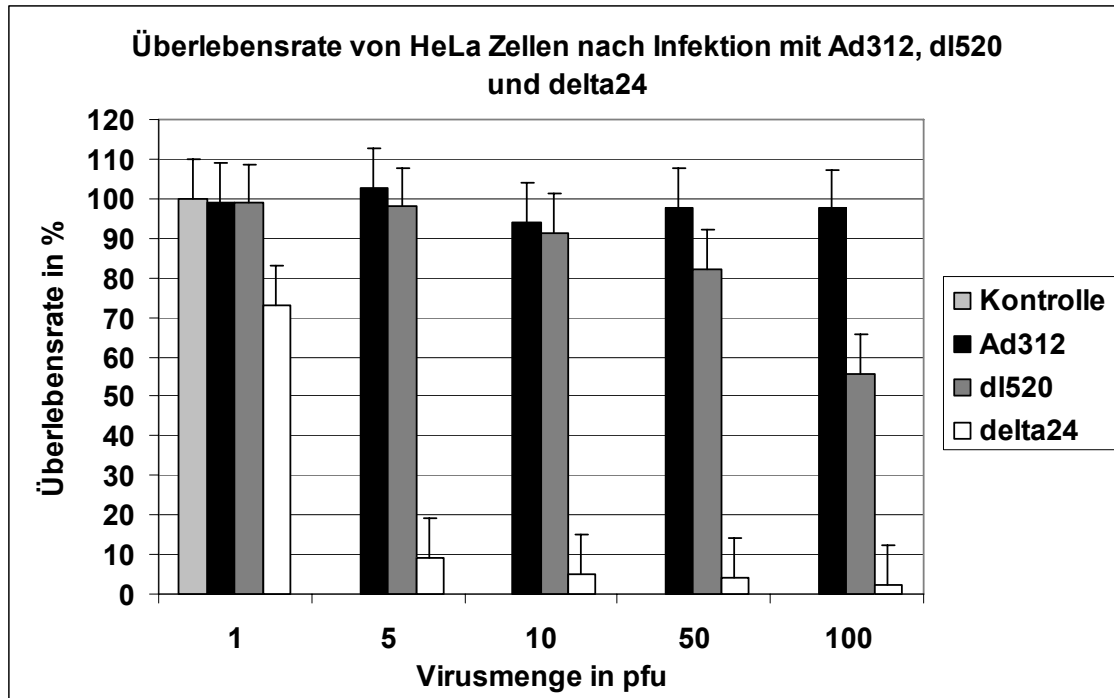
4.1.1 Replikation von $\Delta 24$ in HeLa, DU145 und U2OS Zellen im Vergleich zu Ad312 und dl520 Virus am effektivsten



**Abb. 11: Infektion von Hela Zellen mit unterschiedlichen pfu Zahlen
K=Kontrolle, Angaben in pfu/Zelle, Kristallviolettffärbung**

Die Replikation von Ad312 in Hela Zellen ließ bei 1 pfu fast alle Tumorzellen (99,21%) überleben und vermochte auch bei Steigerung auf 10, 50 und 100 pfu nur zwischen einer Überlebensrate von 94,2; 97,75 und 97,42% zu schwanken. Der dl520 Virus erreichte bei 1 pfu mit 99,89% eine vergleichbare Tumorzellüberlebensrate wie der Ad312 Virus, mit 50 pfu beginnend schaffte er es aber 17,66% der Zellen abzutöten und sich bei 100 pfu auf über die Hälfte (55,56%) zu steigern.

$\Delta 24$ zeigte die höchste Effektivität, bereits ab 1 pfu überlebten nur noch 73,04% der Zellen, ab 5 pfu waren es 9,2% aller Zellen. Diese Zahl ließ sich durch Erhöhung auf 100 pfu weiter auf 2,5% reduzieren. Somit replizierte $\Delta 24$ am effektivsten von allen drei Viren in HeLa Zellen. Um dieses Ergebnis zu reproduzieren wurden weitere Zelllinien infiziert und getestet



Tab. 1: Überlebensrate von HeLa Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Δ 24 (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

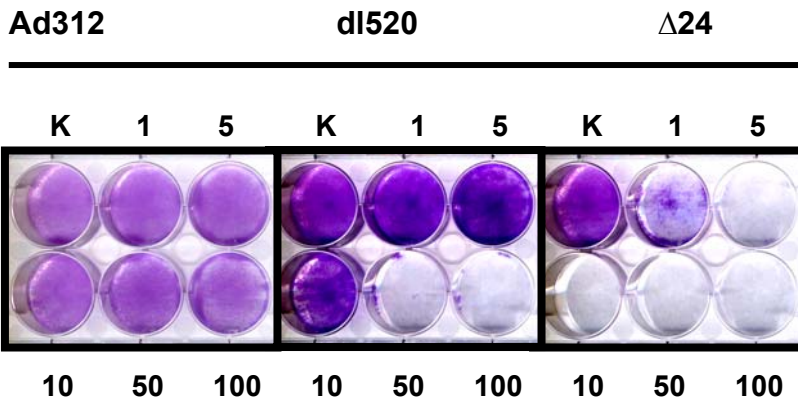
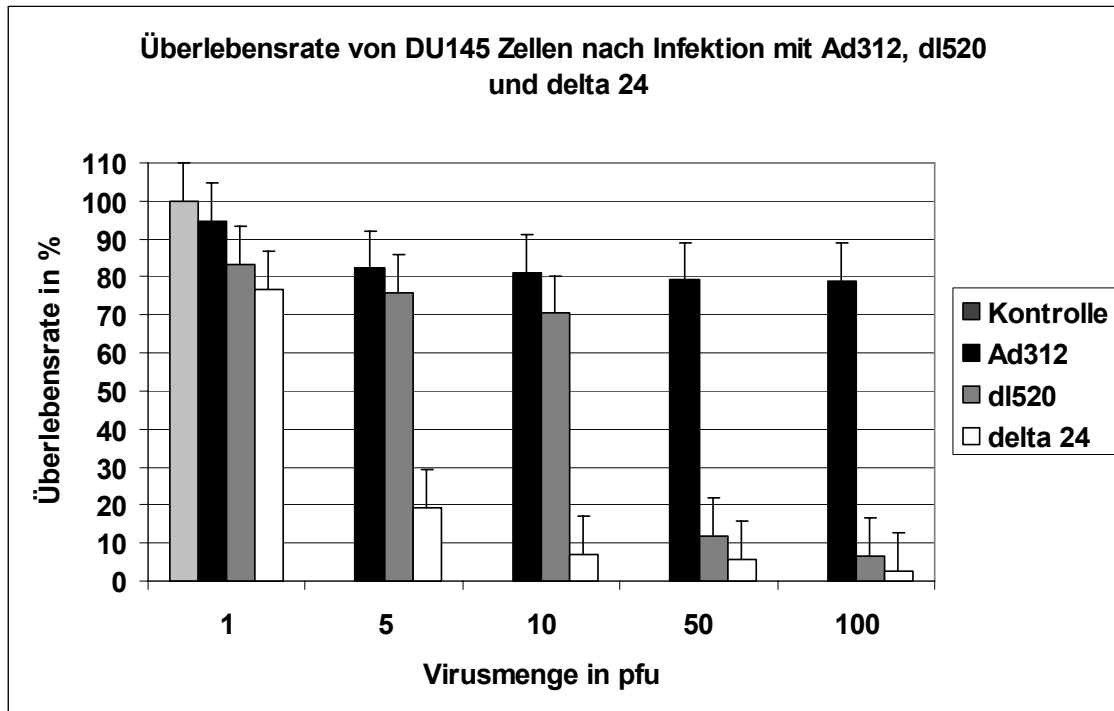


Abb. 12: Infektion von DU145 Zellen mit unterschiedlichen pfu Zahlen K=Kontrolle, Angaben in pfu/Zelle, Kristallviolettffärbung

Die Infektion der DU145 Zellen zeigte für den Ad312 Virus eine Zellüberlebensrate von 94,56% bei 1 pfu, lediglich ab 50 pfu sank die Zellzahl auf 79,12%, bei 100 pfu auf 78,83% ab.

Der dl520 Virus vermochte ab 10 pfu 70,34% der Tumorzellen abzutöten. Bei 50 pfu reduzierte sich die Zellzahl auf 11,72%, ab 100 pfu sogar auf 6,46%. Am

effektivsten tötete wiederum $\Delta 24$ bei 5 pfu 90,74% der Tumorzellen ab. Nach Infektion mit 50 pfu $\Delta 24$ überlebten nur noch 5,6% der Zellen, ab 100 pfu waren es nur noch 2,56% aller Tumorzellen



Tab. 2: Überlebensrate von DU145 Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und $\Delta 24$
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Infektion der U2OS Zellen. Selbst bei einer pfu Zahl von 100 fanden sich bei Ad312 noch 73,3% lebende U2OS Zellen, dl520 hingegen vermochte bei 100 pfu immerhin die Tumorzellzahl auf 34,4% zu reduzieren und zeigte hier einen vergleichbaren Effekt wie in HeLa Zellen. $\Delta 24$ konnte bei 1 pfu 90,36% aller Tumorzellen abtöten, ab 5 pfu überlebten 3,59%. Dies ließ sich auch durch Erhöhung auf bis zu 100 pfu nur noch auf 2,48% lebende Zellen erniedrigen.

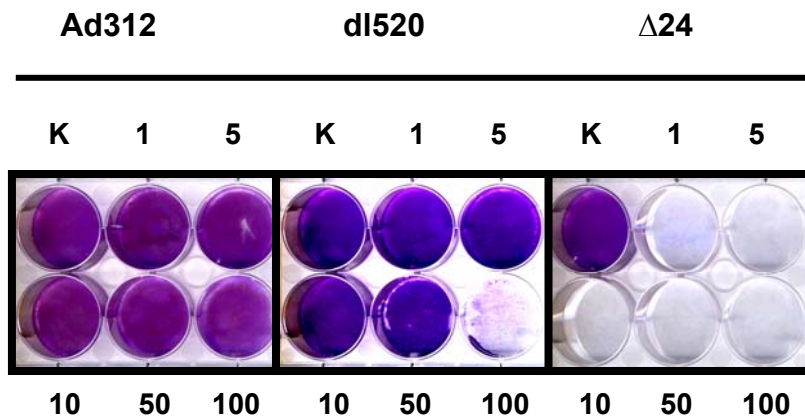
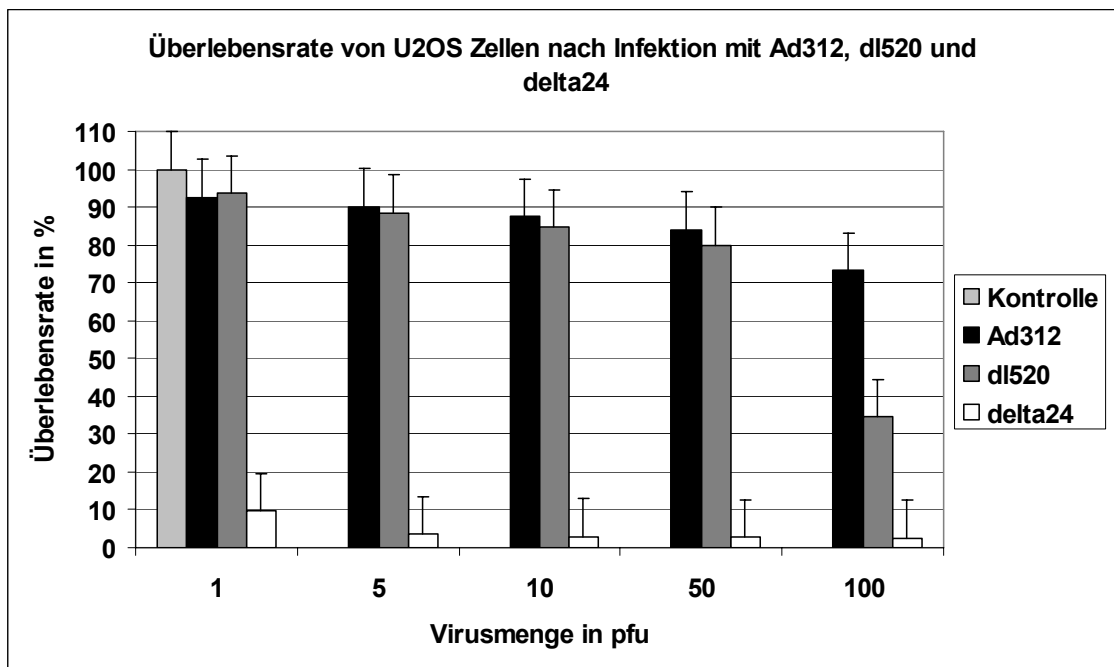


Abb. 13: Infektion von U2OS Zellen mit unterschiedlichen pfu Zahlen
K=Kontrolle, Angaben in pfu/Zelle, Kristallviolettffärbung



Tab. 3: Überlebensrate von U2OS Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Δ24
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Die Ergebnisse ließen sich also in drei verschiedenen Zelllinien reproduzieren. Die Zellen wurden vor der Färbung mit Kristallviolett auch unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um die für die virale Replikation typischen Zeichen identifizieren zu können.

4.1.2 Lichtmikroskopische Analyse von U2OS-Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Δ 24 Virus

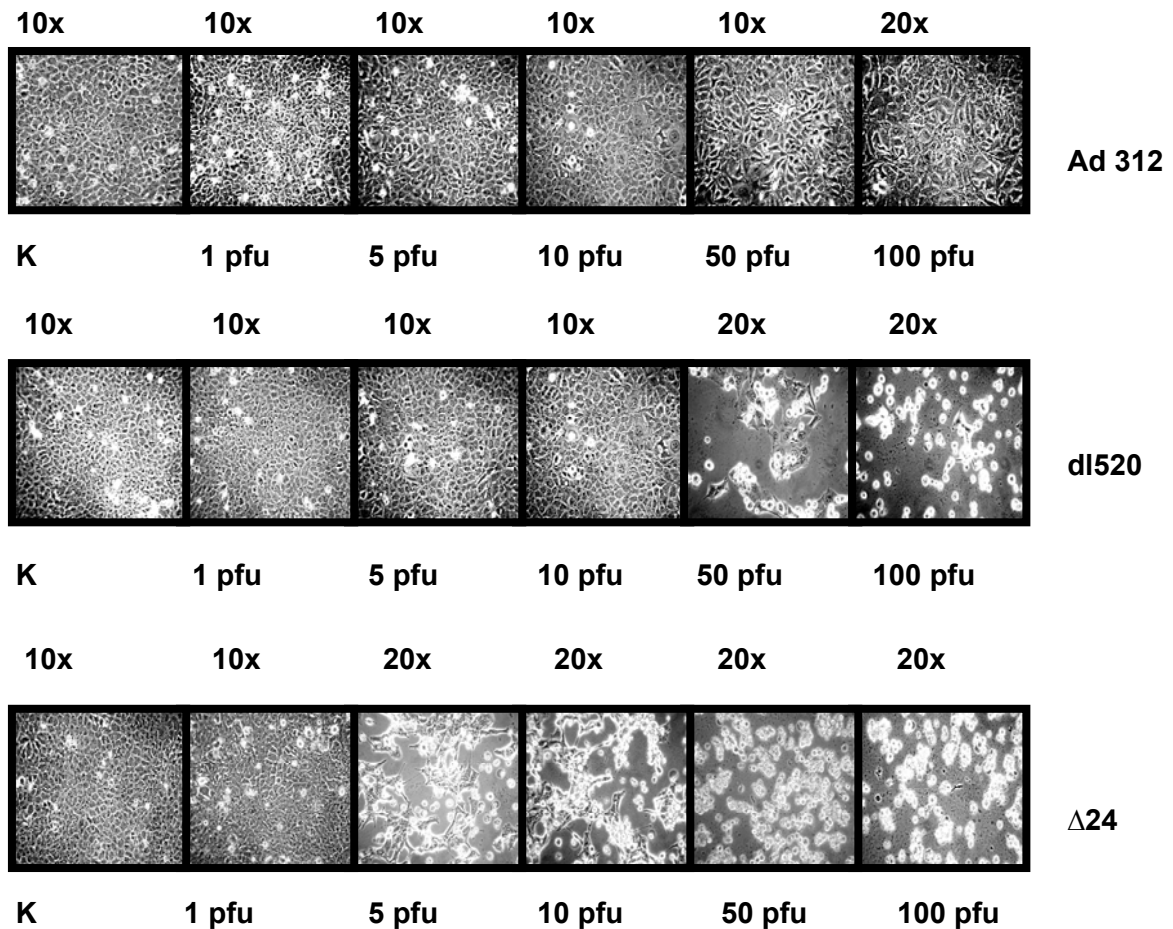


Abb.14: Infektion von U2OS Zellen mit angegebenen Viren in verschiedenen pfu Zahlen

Virale Replikation stellte sich als vermehrte Lichtbrechung mit Abrundung der Zellränder bis zur völligen Zerstörung der Zelle im späteren Verlauf dar Lichtmikroskop, Vergrößerung jeweils über der Abbildung angegeben

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der mit Ad312 infizierten U2OS Zellen zeigten unter der 10x Vergrößerung bis 50 pfu keine Anzeichen viraler Infektion oder Vermehrung. Ab 50 und auch bei 100 pfu fielen jedoch stellenweise eine Abrundung und erhöhte Lichtbrechung der Tumorzellen auf, jedoch kein zytopathischer Effekt.

Auch bei dl520 konnte man erst ab 50 pfu eine Abnahme der Zellrasendichte feststellen, die bei Verdopplung auf 100 pfu zur kompletten Zellyse führte.

Die Infektion mit Δ 24 zeigte bereits bei 1 pfu erste Anzeichen für verstärkte Lichtbrechung und Abrundung der Zellen. Übereinstimmend mit dem Befund

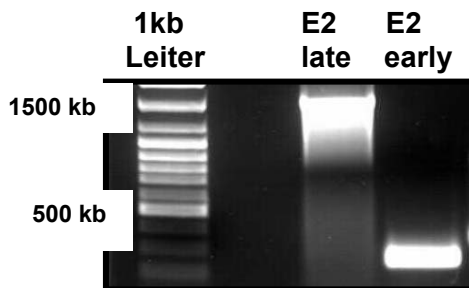
aus der Kristallviolettffärbung war ab 5 pfu eine deutliche Lyse zu sehen mit Löchern im Zellrasen und stark lichtbrechenden, abgerundeten Zellen. Bei 50 pfu war der Zellrasen völlig aufgelöst. Zur besseren Darstellung wurde teilweise die 20fache Vergrößerung gewählt.

Die Regulation der Replikation auf molekularer Ebene wurde durch Analyse der E2 early und E2 late Promotoren untersucht.

4.2 Analyse der Replikationskinetik mittel E2 early und E2 late Nachweis

4.2.1 Synthese und Überprüfung der verwendeten E2 early und E2 late Sonden

Die genauere Untersuchung der Replikationsmechanismen erfolgte mit den E2 early und E2 late Primern. Zunächst wurden die E2 early und E2 late Sonden mit Hilfe der spezifischen Primer aus Adenovirus5 Wildtyp DNA hergestellt. Sie zeigten bei 240 kb für E2 early und 1502 kb für E2 late die erwarteten Signale.



**Abb.15: Überprüfung der E2 early und E2 late Primer durch PCR mit Wt Ad5 DNA
E2 late Signal bei 1502 kb, E2 early Signal bei 240 kb**

4.2.2 Stärkere E2 late Expression im Vergleich zu E2 early in $\Delta 24$ infizierten HeLa, U2OS und U87 Zellen

Aus HeLa Zellen, die mit 10 pfu $\Delta 24$ infiziert wurden, isolierte man nach 3, 6, 9, 12 und 24 h die RNA. Als Kontrolle diente RNA, die nach 24 h aus mit 10 pfu Wildtyp infizierten HeLa Zellen gewonnen wurde. Im Northern Blot zeigte sich bei der Hybridisierung mit E2 early bei 3 h eine Signalstärke von lediglich 4,6%,

die sich im zeitlichen Verlauf auf nur 22% bei 12 h steigerte, bevor die Expression bei 24 h mit 150% sogar die der Wildtyp Kontrolle übertraf.

Für E2 late hingegen konnte schon nach 6 h mit 20,5% ein Signal von ähnlicher Stärke wie im Fall von E2 early nach 12 h detektiert werden. Nach 9 h steigerte sich die Expression auf 49,9%, nach 12 h auf 70,1%, um nach 24 h ebenfalls 150% zu erreichen. Dieses Ergebnis wurde in weiteren Zelllinien überprüft.

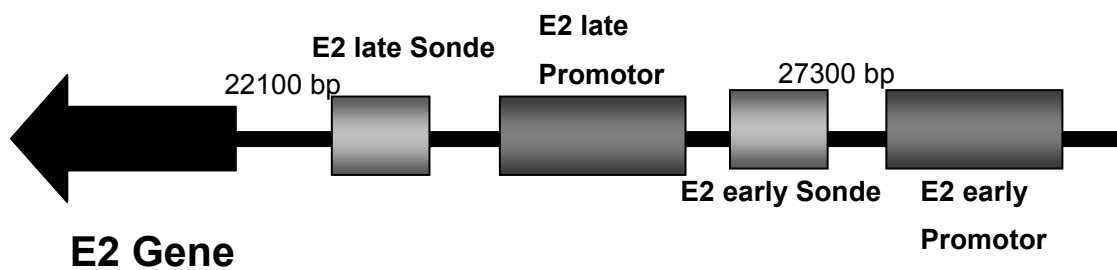


Abb. 16: Lokalisation der E2 early und late Sonde im E2 Gen
(nach Mantwill K, Kohler Vargas N et.al., *Canc. Res.* 66 (2006) 7195-202)

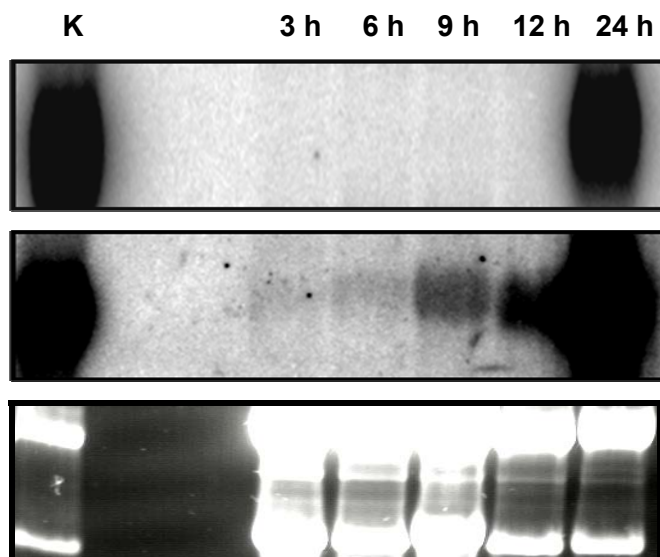
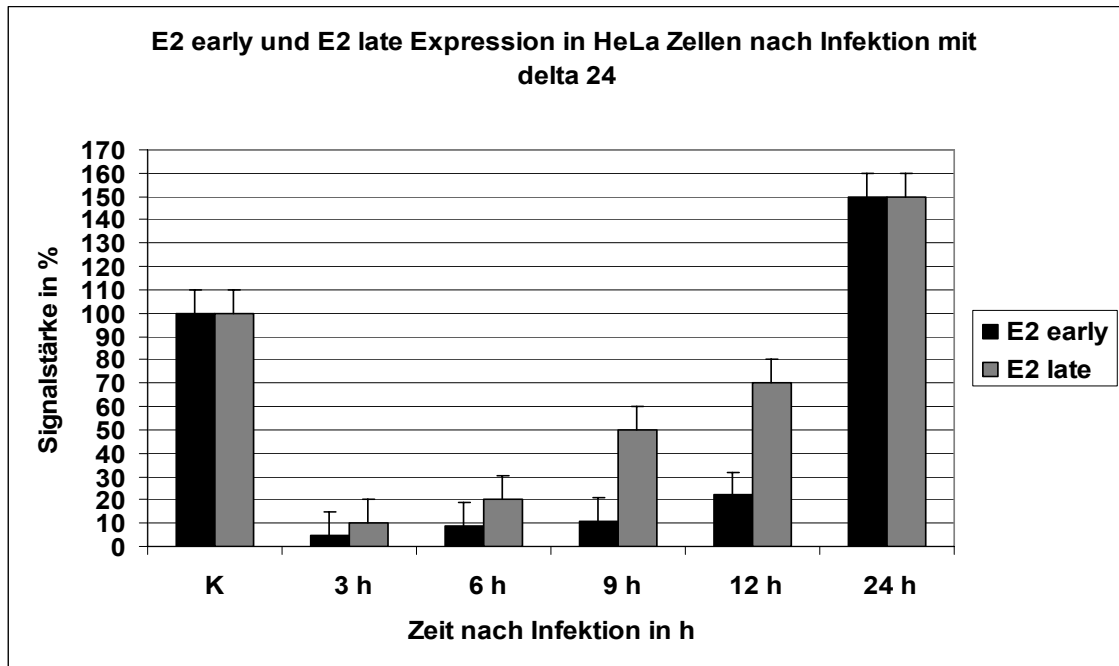


Abb. 17: E2 early und E2 late Expression in $\Delta 24$ infizierten HeLa Zellen
Oben: E2 early Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in HeLa Zellen nach Infektion mit 10 pfu $\Delta 24$, Mitte: E2 late Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in HeLa Zellen nach Infektion mit 10 pfu $\Delta 24$, Unten: 1%MOPS-Gel mit RNA aus HeLa Zellen infiziert mit $\Delta 24$ und Wildtyp RNA als Kontrolle



Tab. 4: Quantifizierung der E2 early und E2 late Expression in HeLa Zellen (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

In U2OS Zellen zeigte sich nach 3 h bei E2 early ein Signal der Stärke 3,22%, bis 12 h stieg es auf 7,35% und erreichte nach 24 h eine Expressionsstärke von 98%. Auch hier stellte sich die E2 late Expression mit 6,12% 3 h nach Infektion bereits stärker dar, nach 9 h steigerte sie sich auf 30,44% und übertraf E2 early bei der 12 h Probe mit 89,93% um mehr als das 7fache. 24 h nach Infektion war die E2 late Expression mit 98,7% ebenfalls der Wildtyp-Kontrolle vergleichbar.

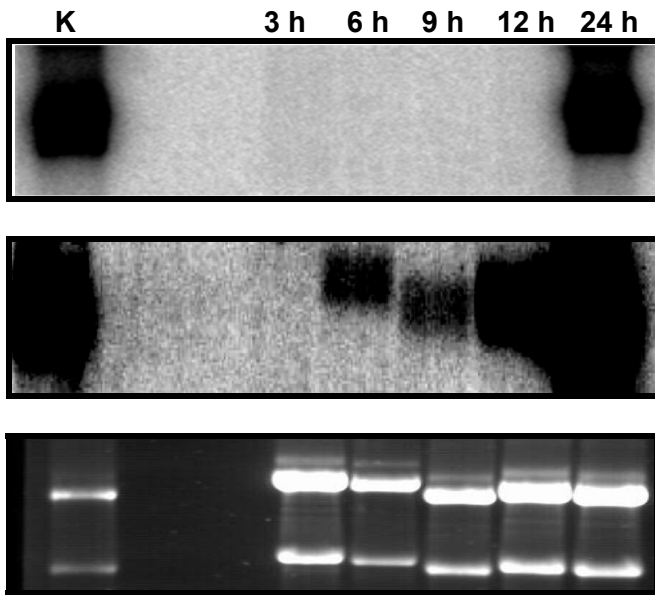
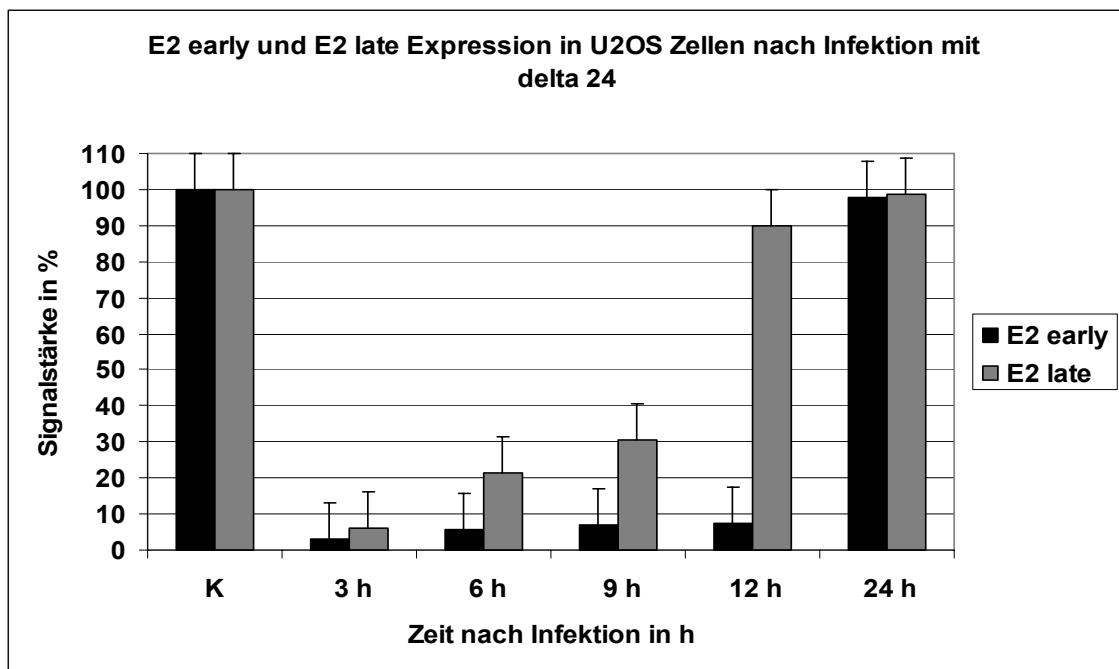


Abb. 18: E2 early und E2 late Expression in $\Delta 24$ infizierten U2OS Zellen
Oben: E2 early Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in U2OS Zellen nach Infektion mit 10 pfu $\Delta 24$, Mitte: E2 late Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in U2OS Zellen nach Infektion mit 10 pfu $\Delta 24$, Unten: 1%MOPS-Gel mit RNA aus U2OS Zellen infiziert mit $\Delta 24$ und Wildtyp RNA als Kontrolle



Tab. 5: Quantifizierung der E2 early und E2 late Expression mit U2OS Zellen
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Wildtyp als Kontrollreferenz, Standardabweichung angegeben)

In U87 Zellen betrug nach Infektion mit $\Delta 24$ die 3 h E2 early Expression 1,55%, nach 6 h 2,01% und stieg auch nach 9 h nur auf 2,2% an. Selbst nach 12 h war die Expression erst auf dem Niveau von 3,25%, erreichte aber nach weiteren 12 h, also insgesamt 24 h nach Infektion, 138,2%.

Die E2 late Sonde zeigte nach 3 h nur eine Signalstärke von 1,73%, nach 6 h erreichte sie 2,32% der Signalstärke der Kontrolle. Dieser Wert stieg nach 9 h auf 49,5%, weitere 3 h später auf 128,71% und übertraf nach 24 h mit 130,15% den Kontrollwert.

Die hier gezeigten Ergebnisse wurden ebenfalls für Adenovirus Wildtyp Ad5 in U2OS Zellen überprüft.

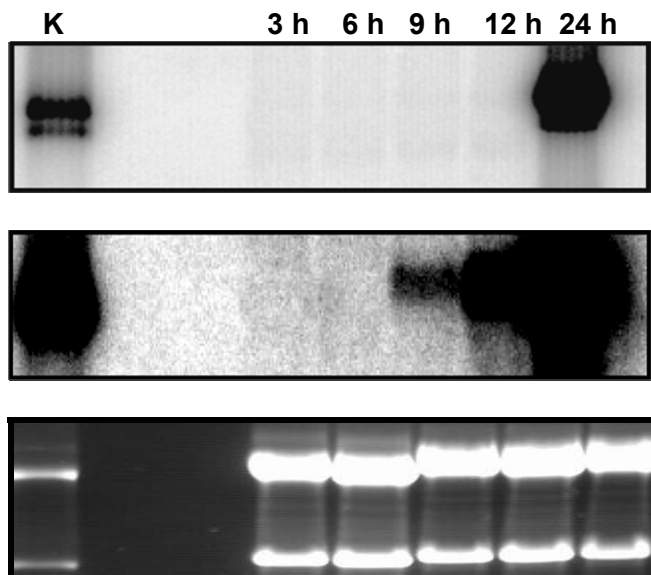
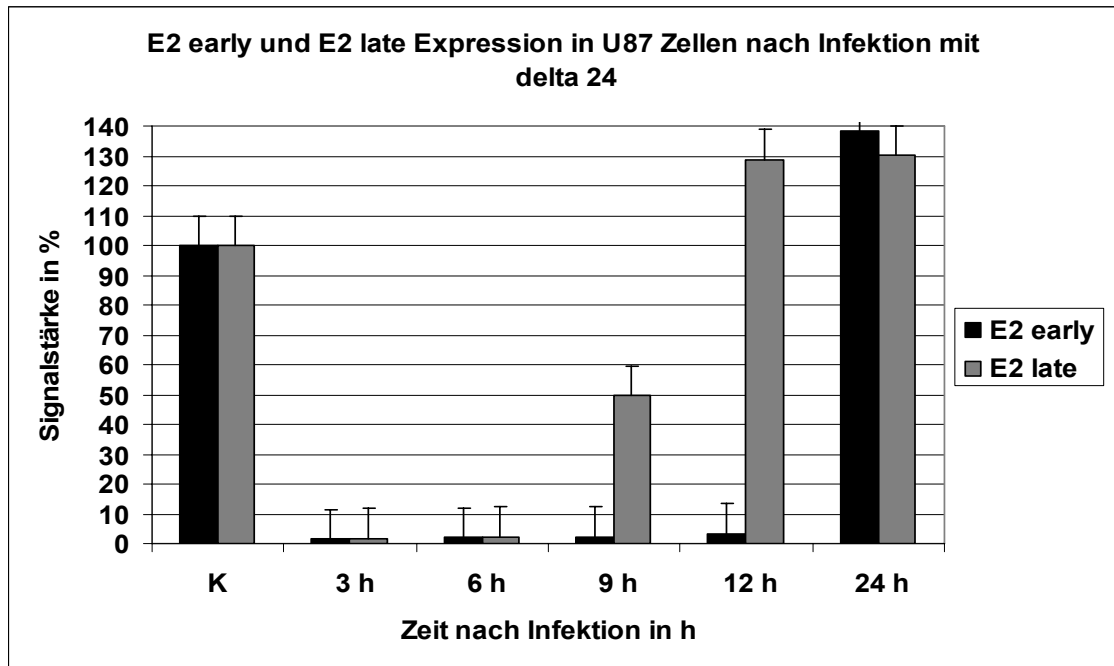


Abb. 19: E2 early und E2 late Expression in $\Delta 24$ infizierten U87 Zellen
Oben: E2 early Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in U87 Zellen nach Infektion mit 10 pfu $\Delta 24$, Mitte: E2 late Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in U87 Zellen nach Infektion mit 10 pfu $\Delta 24$, unten: 1%MOPS-Gel mit RNA aus U87 Zellen infiziert mit $\Delta 24$ und Wildtyp RNA als Kontrolle



Tab. 6: Quantifizierung der E2 early und E2 late Expression in U87 Zellen (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.2.3 Stärkere E2 late Expression im Vergleich zur E2 early Expression in AdWT infizierten U2OS Zellen

E2 early zeigte nach 6 h ein Signal der Stärke 5,95% im Vergleich zur Kontrolle, E2 late hingegen lieferte zum selben Zeitpunkt eine Signalstärke von 54,78%. Weitere 3 h später, also insgesamt 9 h nach Infektion, ließ sich bei E2 early eine Expression von 25,15% feststellen, E2 late entsprach nun 84,56% im Vergleich zur Kontrolle.

E2 early veränderte sich 12 h nach Infektion mit 35,7% um ca. 10%, während E2 late auf 110% anstieg. Der 24 h Wert diente in diesem Fall als Kontrolle, die mit 100% gleich gesetzt wurde.

Auch für Wildtyp konnte dasselbe wie für den $\Delta 24$ Virus festgestellt werden.

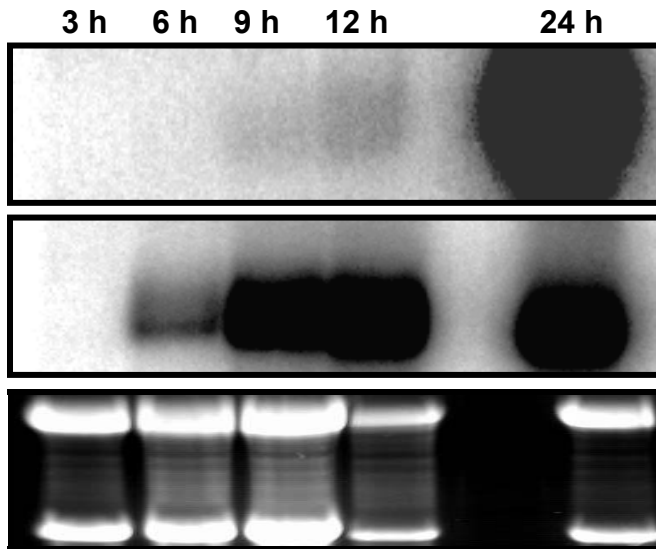
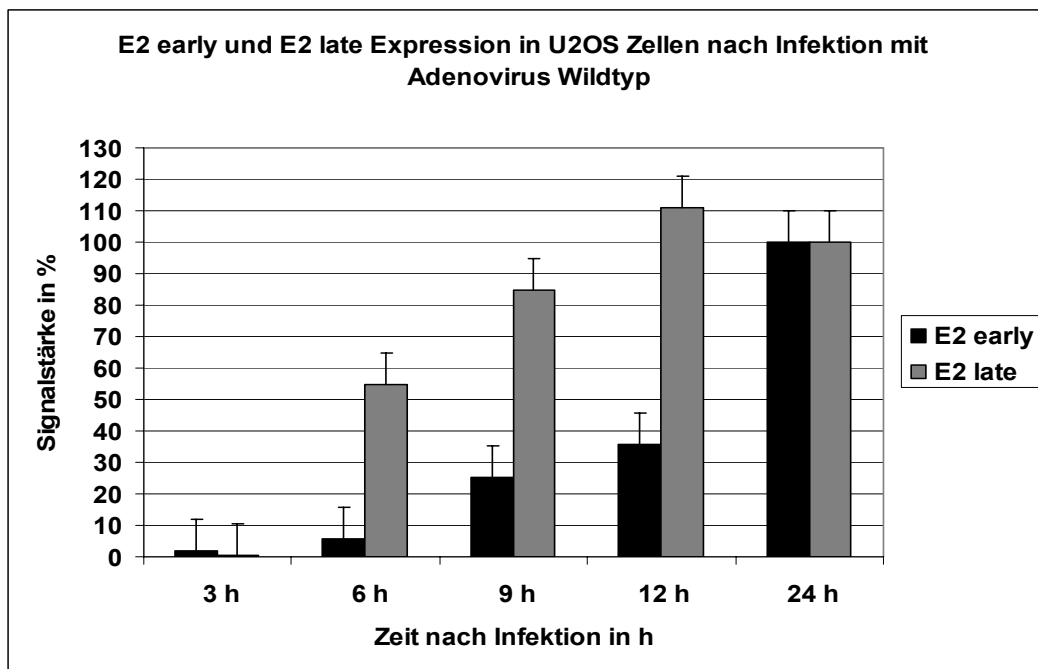


Abb. 20: E2 early und E2 late Expression in U2OS Zellen nach AdWt Infektion
Oben: E2 early Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in U2OS Zellen nach Infektion mit 10 pfu Wildtyp, Mitte: E2 late Expression 3, 6, 9, 12 und 24 h in U2OS Zellen nach Infektion mit 10 pfu Wildtyp, Unten: 1%MOPS-Gel mit RNA aus U2OS Zellen nach Infektion mit 10 pfu Wildtyp



Tab. 7: Quantifizierung der E2 early und E2 late Expression in U2OS Zellen nach Infektion mit Adenovirus Wildtyp
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.3 Untersuchung der E1B55K und E4orf6 Expression

4.3.1 Herstellung von E1B55K und E4orf6 Sonden für Northern Blot mittels PCR

Zunächst wurden die für den Northern Blot benötigten E1B55K und E4orf6 Sonden durch PCR hergestellt. Beide wurden ausgeschnitten, nach Protokoll eluiert und gemessen. Für die Anwendung wurde jeweils ein Stock mit der Konzentration von 0,25 ng/μl hergestellt.

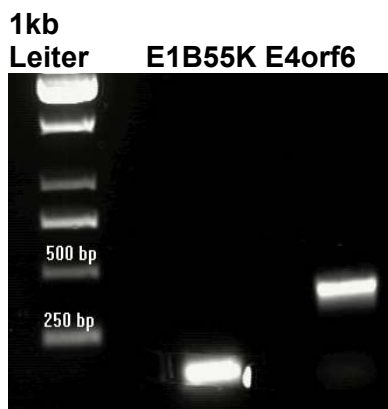


Abb. 21: Herstellung der E1B55K und E4orf6 Sonde
Nachweis der E1B55K (108 bp) und E4orf6 (378 bp) Sonde zur Überprüfung der PCR mittels Gelelektrophorese auf 1%TAE-Gel

4.3.2 E1B55K Expression nach Infektion mit dl520 nur bei hoher MOI vergleichbar mit den Ergebnissen der Δ24 Infektion

In mit 50 pfu dl520 infizierten U2OS Zellen erreichte die Expressionsstärke von E1B55K mit 93,54% fast Wildtyp-Niveau. Wurden die gleiche Zelllinie nur mit 5 pfu infiziert, ließ sich kein Signal (0,94%) nachweisen. Anders verhielt es sich bei Δ24, der sowohl bei 50 pfu als auch bei 5 pfu eine Signalstärke von 107,24 bzw. 70,75% bot. Wildtyp Adenovirus diente als Kontrolle.

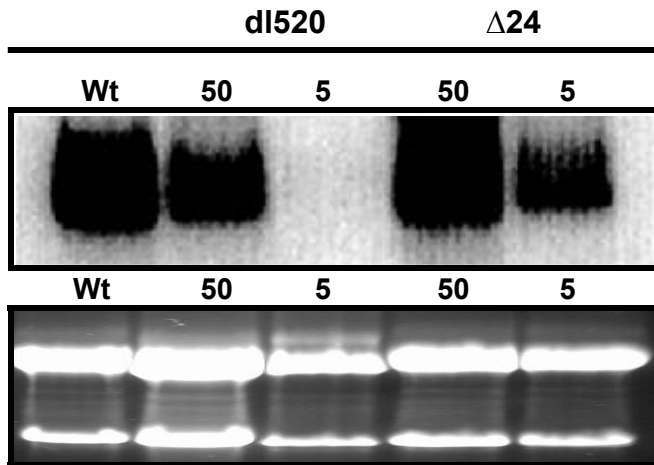
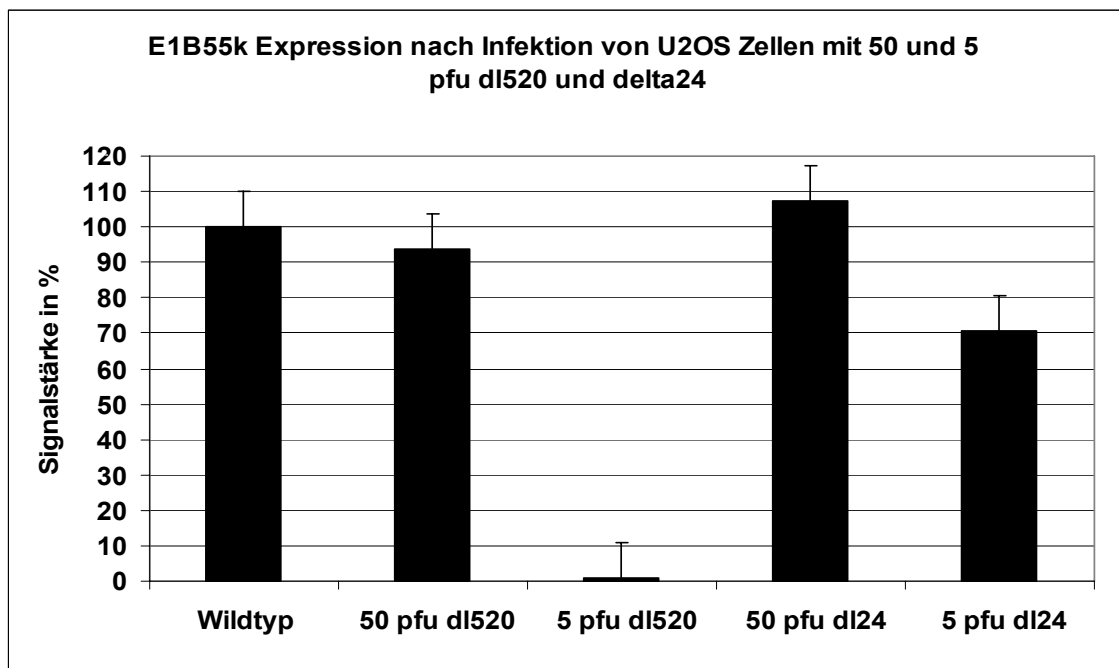


Abb. 22: E1B55K Expression im Vergleich von 5 und 50 pfu dl520
Oben links: E1B55K Expression nach Infektion von U2OS Zellen mit 5 und 50 pfu dl520, oben rechts: E1B55K Expression nach Infektion von U2OS Zellen mit 5 und 50 pfu $\Delta 24$, Unten: 1%MOPS-Gel mit RNA aus U2OS Zellen infiziert mit 5 und 50 pfu $\Delta 24$ und dl520, Wildtyp RNA als Kontrolle



Tab. 8: Vergleich der E1B55K Expression in U2OS Zellen infiziert mit 5 und 50 pfu dl520 und $\Delta 24$
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.3.3 E4orf6 Expression nach Infektion mit dl520 nur bei hoher MOI vergleichbar mit den Ergebnissen der $\Delta 24$ Infektion

Die E4orf6 Expression zeigte bei Infektion von U2OS Zellen mit 50 pfu dl520 83% an. Verringerte man hier die pfu Zahl um ein Zehnfaches, reduzierte sich die Expressionsstärke um ca. ein Achtfaches auf 1,13%. Auch hier konnte gezeigt werden, dass $\Delta 24$ sowohl bei 50 pfu als auch bei 5 pfu eine mit 110 und 93% fast gleichstarke Expression aufwies.

Die Überstände dieses Versuches wurden im Plaqueversuch auf ihre Partikelbildung getestet.

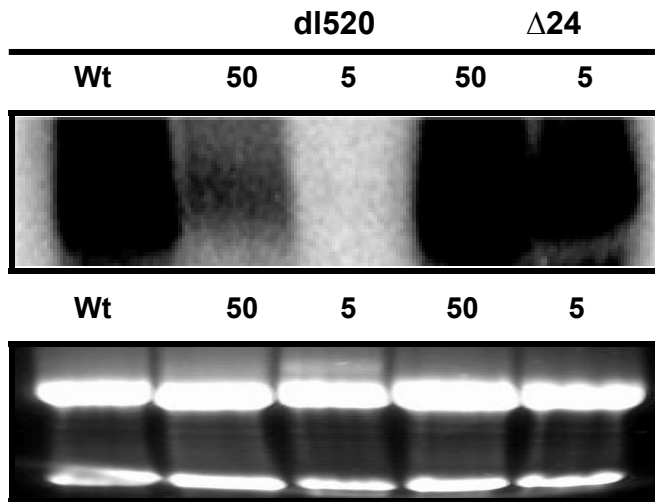
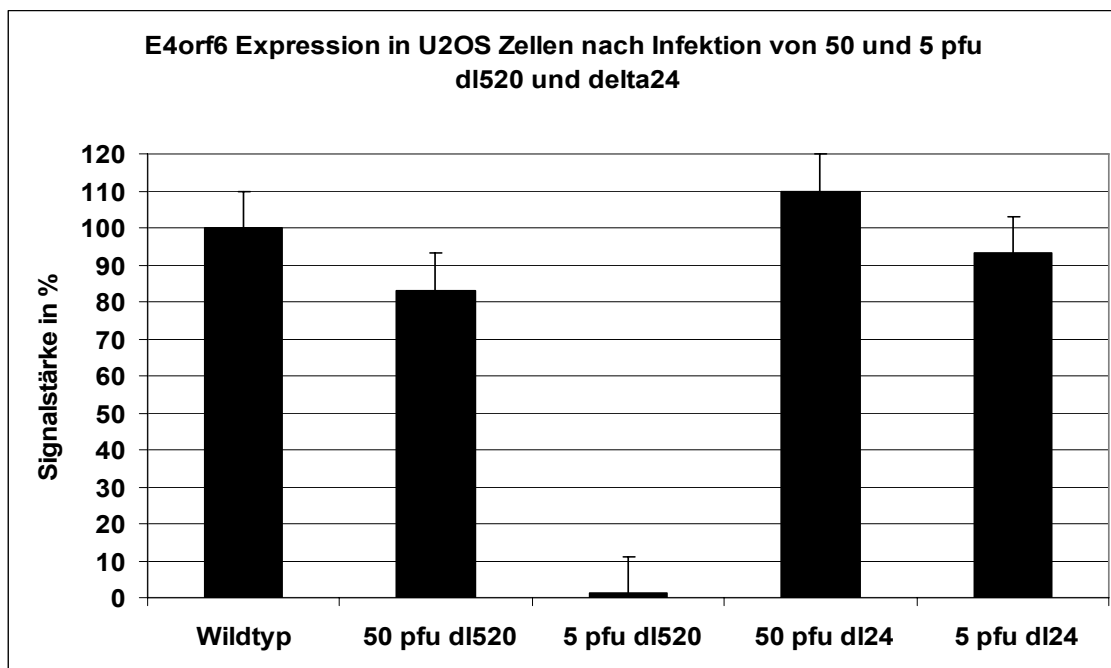


Abb. 23: E4orf6 Expression im Vergleich von 5 und 50 pfu dl520

Oben links: E4orf6 Expression nach Infektion von U2OS Zellen mit 5 und 50 pfu dl520, oben rechts: E4orf6 Expression nach Infektion von U2OS Zellen mit 5 und 50 pfu $\Delta 24$, unten: 1%MOPS-Gel mit RNA aus U2OS Zellen infiziert mit 5 und 50 pfu $\Delta 24$ und dl520, Wildtyp RNA als Kontrolle

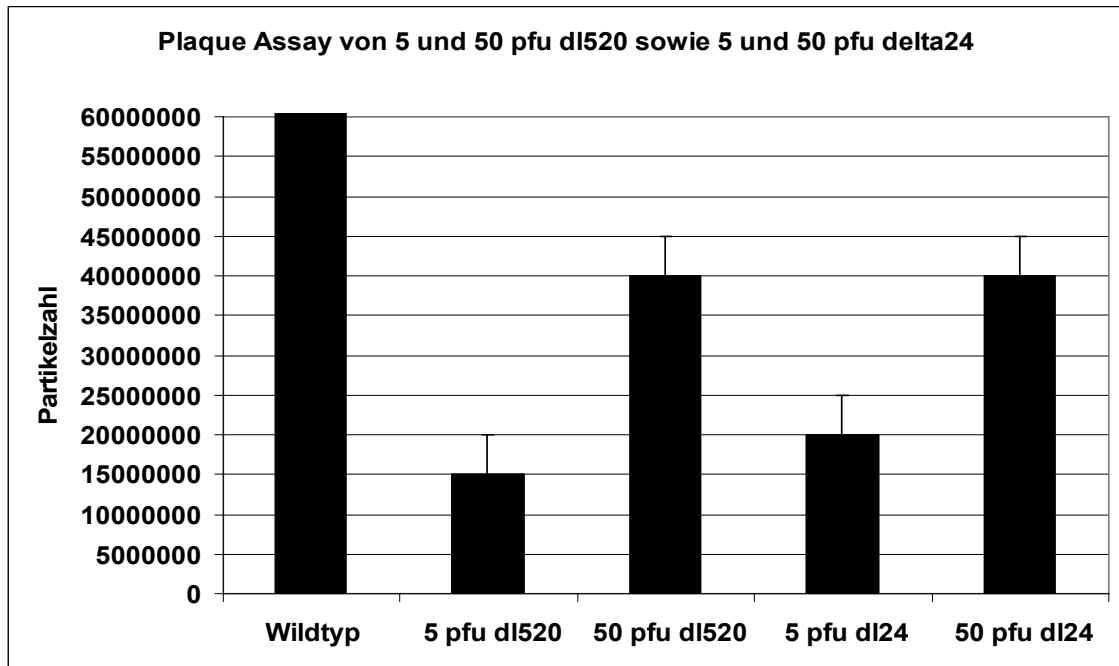


Tab. 9: Vergleich der E4orf6 Expression in U2OS Zellen infiziert mit 5 und 50 pfu dl520 und $\Delta 24$ (Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.3.4 Auswertung der Infektion von U2OS Zellen mit jeweils 5 und 50 pfu dl520 und $\Delta 24$ durch Plaque Assay

Für den Überstand der mit 5 pfu dl520 infizierten HEK293 Zellen ergaben sich, bei der letzten Auszählung nach 10 Tagen 4 Plaques bei einer Verdünnung von 10^5 , d.h. ein Titer von 1×10^6 . Der Ansatz mit der auf 50 pfu erhöhten Menge dl520 zeigte im selben Zeitraum 1 Plaque bei einer Verdünnung von 10^7 , also betrug der Virustiter 4×10^7 .

HEK293 Zellen, die mit 5 pfu $\Delta 24$ versetzt worden waren, zeigten nach 10 Tagen 6 Plaques bei einer Verdünnungsstufe von 10^6 , alles in allem also einen Titer von 4×10^7 . 50 pfu $\Delta 24$ führten bei einer Verdünnung von 10^7 zu 2 Plaques und erreichten damit 8×10^7 . Der Titer der Wildtyp Kontrolle bewegte sich mit einem Wert von 3×10^9 weit über allen anderen.



Tab. 10: Vergleich der mit 5 und 50 pfu dl520 und Δ 24 infizierten U2OS Zellen im Plaque Assay, Standardabweichung angegeben (zur besseren Darstellung der hier interessanten Bereiche von dl520 und Δ 24 wurde die y-Achse des Diagramms auf 6×10^7 begrenzt)

Die bisherigen Ergebnisse führten zur Konstruktion und Untersuchung eines neuen YB-1 abhängigen adenoviralen Vektors, der E1B55K und E4orf6 unter der Kontrolle eines CMV Promotors exprimieren konnte.

4.4 Xvir03

4.4.1 Überprüfung der E1A Negativität von Xvir03 mittels PCR

Zuerst wurde sichergestellt, dass keine der eventuell durch Xvir03 verursachten Effekte durch Kontamination des Virus mit E1A bedingt war. Eine PCR wies nach, dass bei Xvir03 kein E1-Signal detektierbar war, für E2 hingegen schon. Die Kontrolle mit Wildtyp zeigte ein deutliches E1 und E2 Signal.

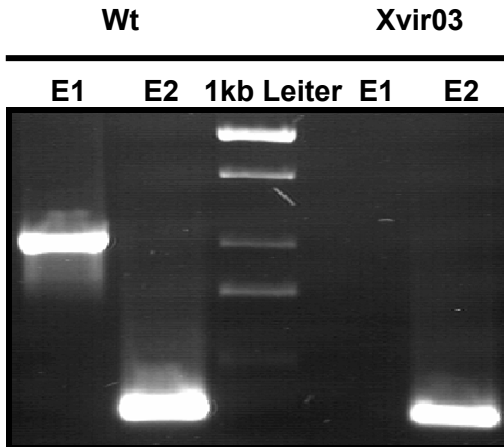


Abb. 24: Überprüfung der E1A Deletion von Xvir03, Wildtyp als Kontrolle
Xvir03 (rechts) zeigt kein E1A Signal im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle (links), beide zeigen E2 Expression

4.4.2 IRES Nachweis in Xvir03 infizierten U2OS Zellen

Um zu testen, ob sich im Xvir03 Virus das IRES Element nachweisen lässt, wurden U2OS Zellen mit 10 pfu Xvir03 infiziert und im Northern Blot mit der IRES-Sonde hybridisiert. Es zeigte sich jedes Mal ein deutliches Signal.

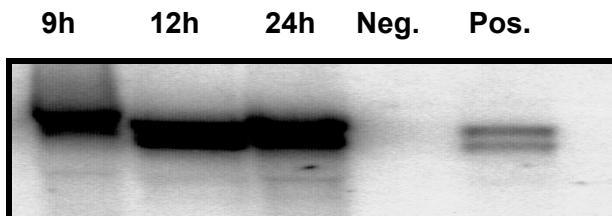


Abb. 25: Nachweis des IRES Elements
In der Zeitreihe gleichbleibend starke Expression des IRES Elements

4.4.3 Replikationsnachweis von Xvir03 mittels Southern Blot

Zum Replikationsnachweis wurden verschiedene Zelllinien mit 10 pfu Xvir03 infiziert. Als Kontrolle dienten zum einen Wildtyp und zum anderen U2OS Zellen, die mit 30 pfu Ad312 infiziert worden waren.

In allen Zelllinien, die mit Xvir03 infiziert worden waren, ließ sich 72 h danach ein deutliches E2 late Signal als Zeichen für die erfolgreiche Replikation nachweisen.

Wt U2OS+312 U373 PC3 DU145 EJ28 HeLa

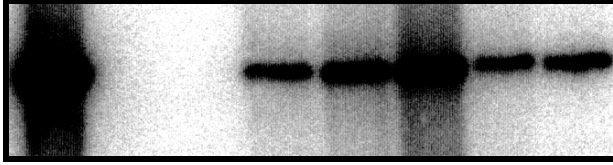


Abb. 26: Nachweis der Replikation im Southern Blot mit der E2 late Sonde auf oben angegebenen Zelllinien 72 h nach Infektion durch 10 pfu Xvir03 (bzw. zum Vergleich U2OS infiziert mit 30 pfu Ad312)

4.4.4 Zytopathischer Effekt Versuch mit Xvir03 in verschiedenen Zelllinien

4.4.4.1 Replikation von Xvir03 im Vergleich zu Ad312 und dl520 am effektivsten in allen Zelllinien

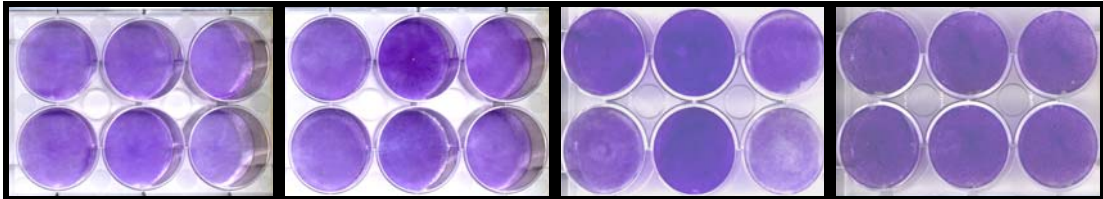
DU 145

PC3

EJ28

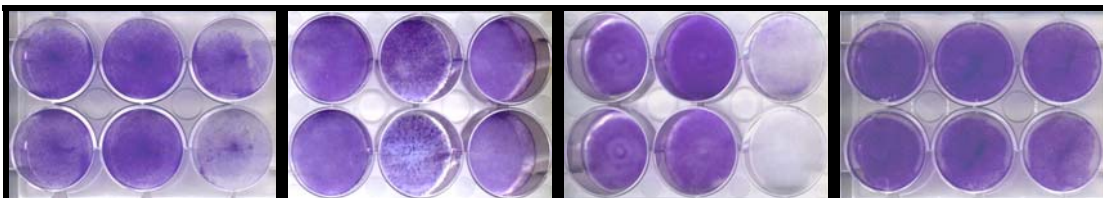
U87

Ad312 dl520 Xvir03 Ad312 dl520 Xvir03 Ad312 dl520 Xvir03 Ad312 dl520 Xvir03



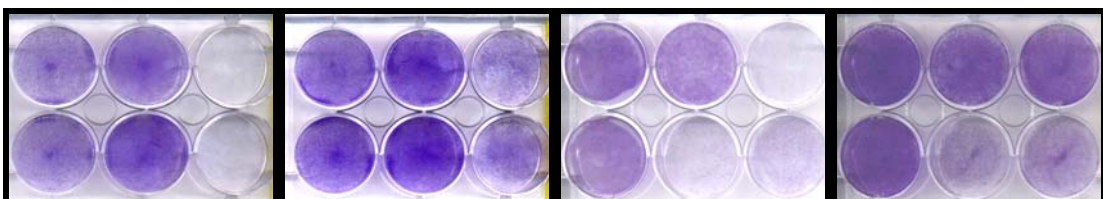
1 pfu

5 pfu



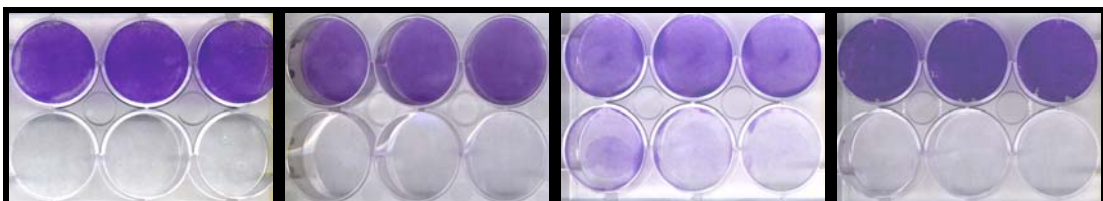
10 pfu

20 pfu



30 pfu

50 pfu



K

Wt

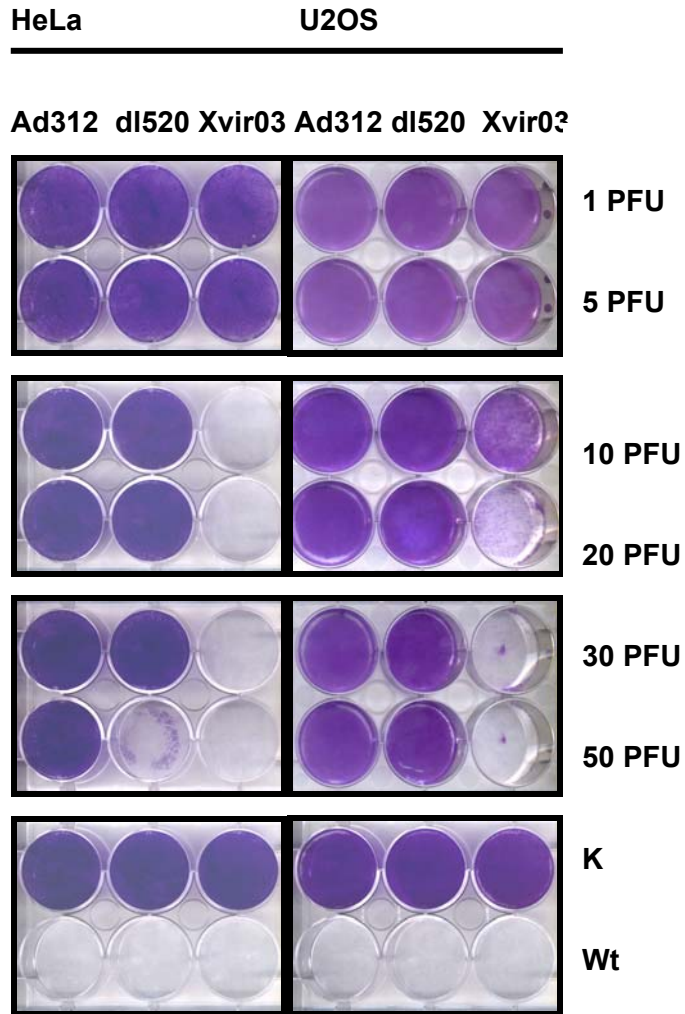
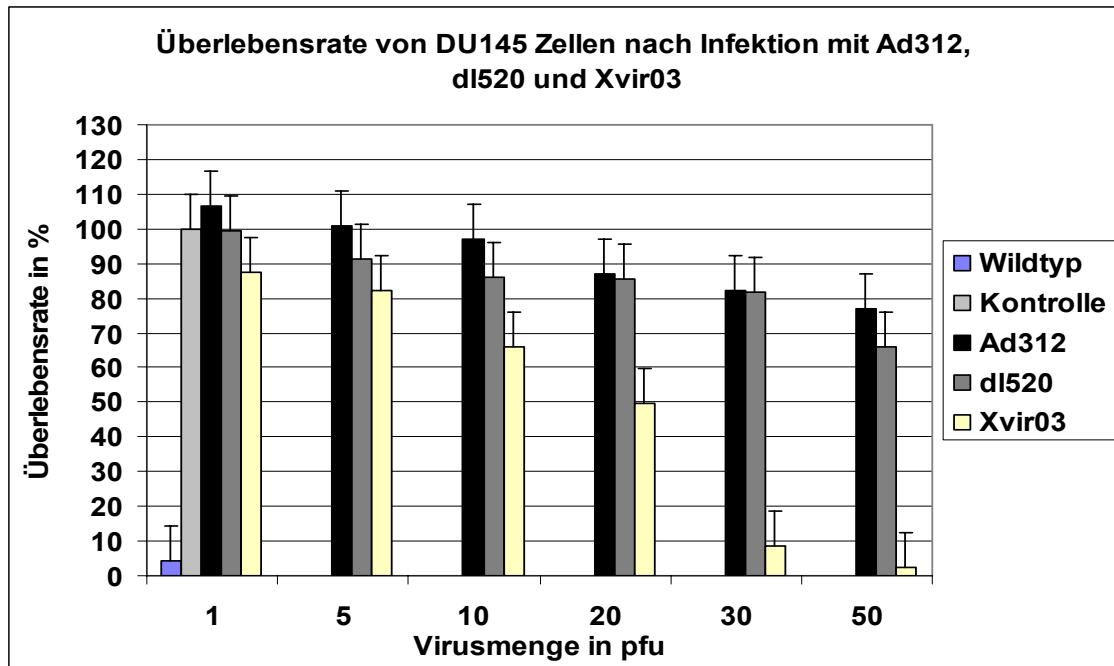
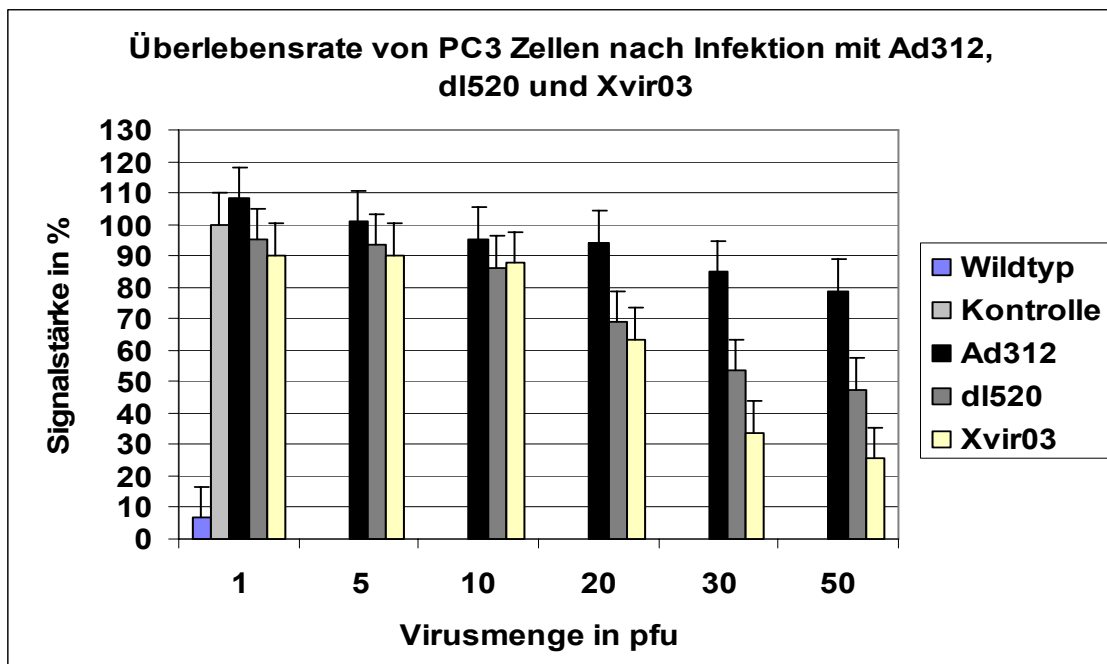


Abb. 27: Kristallviolettffärbung von DU145, PC3, U87, U373, EJ28, HeLa und U2OS Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03 pfu Zahlen wie randständig angegeben



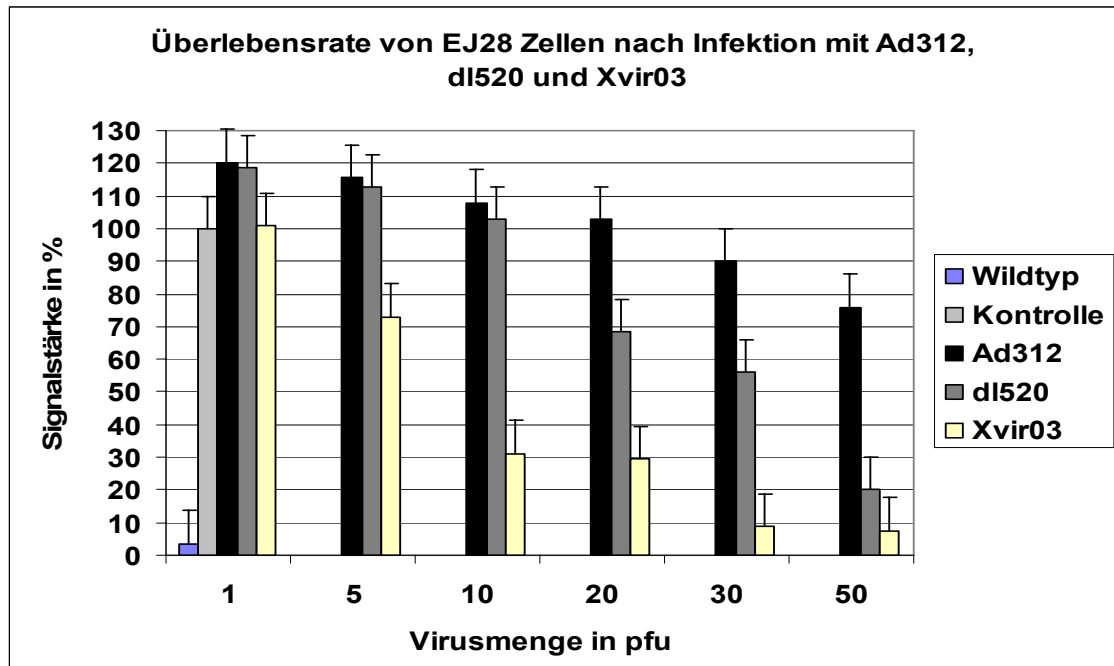
Tab. 11: Überlebensrate der DU145 Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

In DU145 Zellen zeigte der Ad312 Virus erst ab 30 pfu eine Verminderung der Zellzahl auf 82,4%, bei 50 pfu überlebten noch 76,8% aller Zellen. Der dl520 Virus konnte zwar schon bei 10 pfu eine Reduktion um 14,15% erreichen, führte aber bei höhere pfu Zahl von 30 auch nur zu einer Verringerung der Zellzahl auf 81,66% bzw. bei 50 pfu zu 66,1% überlebender Zellen. Xvir03 zeigte bereits ab 10 pfu eine deutliche lytische Aktivität mit einer Verminderung der Zellzahl auf 65,76%. Bei 30 pfu überlebten hier nur noch 8,61% aller Zellen und 50 pfu Xvir03 konnten fast alle Tumorzellen bis auf 2,23% abtöten.



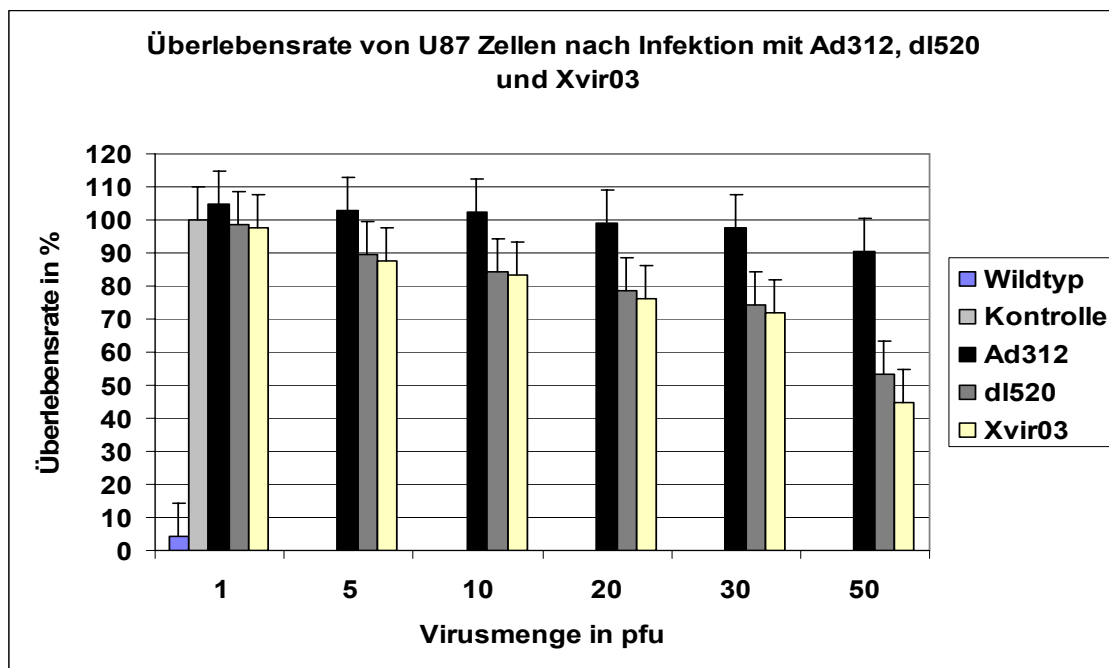
Tab. 12: Überlebensrate von PC3 Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Ad312 konnte in PC3 Zellen lediglich bei 30 pfu eine Verminderung um 15,18% und bei 50 pfu eine Reduktion um 21,11% erreichen. dl520 hingegen konnte bei 20 pfu 31,1% aller PC3 Zellen lysieren. Höhere pfu Zahlen wie 30 führten zu einer Tumorzellzahl von nur noch 53,51% bzw. 47,54% für 50 pfu. Xvir03 replizierte auch hier am besten: nach Infektion mit 20 pfu verminderte sich die Zellzahl auf 63,4%. Und im Vergleich zu dl520 wurden bei 30 pfu 66,24% abgetötet, bei 50 pfu sogar 74,55%.



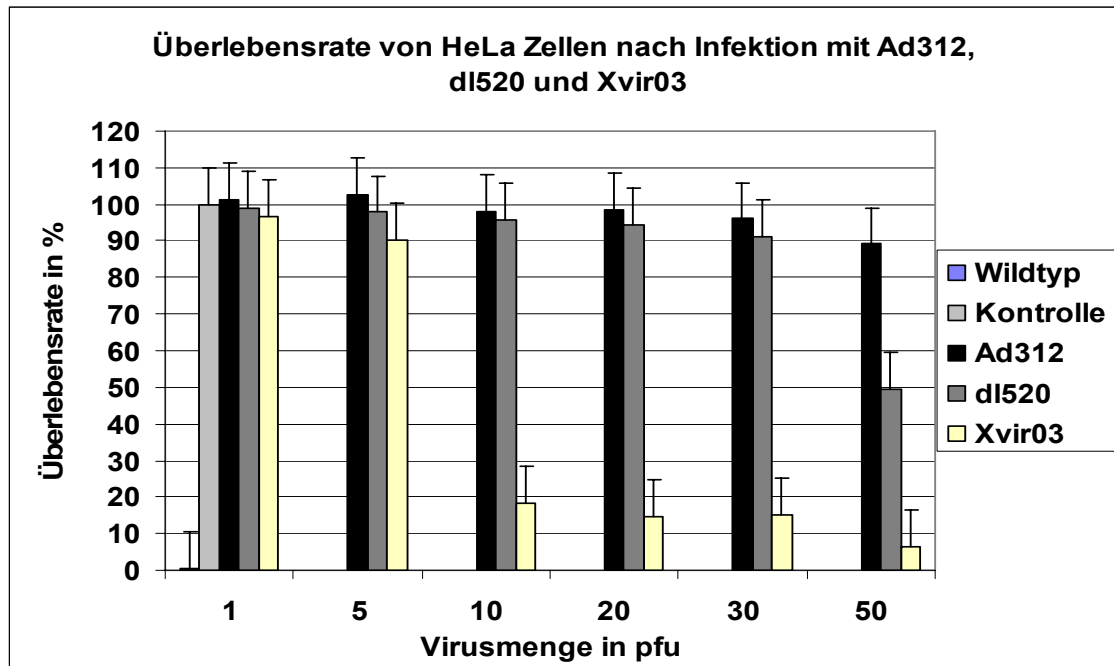
Tab. 13: Überlebensrate von EJ28 Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Auch die EJ28 Zellen wuchsen nach Infektion mit Ad312 größtenteils unbeeinträchtigt weiter. Nur bei 50 pfu wurde eine Zellzahlverminderung auf 76,1% erreicht. Eine Infektion mit dl520 führte ab 20 pfu zu einer Störung des Tumorzellwachstums und einer Zellzahl von 68,28%. Im weiteren Verlauf konnte diese Zahl durch Erhöhung der Virusmenge auf 56,1 und 20,1% überlebender Zellen erniedrigt werden. Xvir03 erreichte bereits bei 10 pfu eine Abtötung von 68,82% aller Tumorzellen. Bei 30 und 50 pfu überlebten nur noch 8,9 bzw. 7,5% aller Tumorzellen.



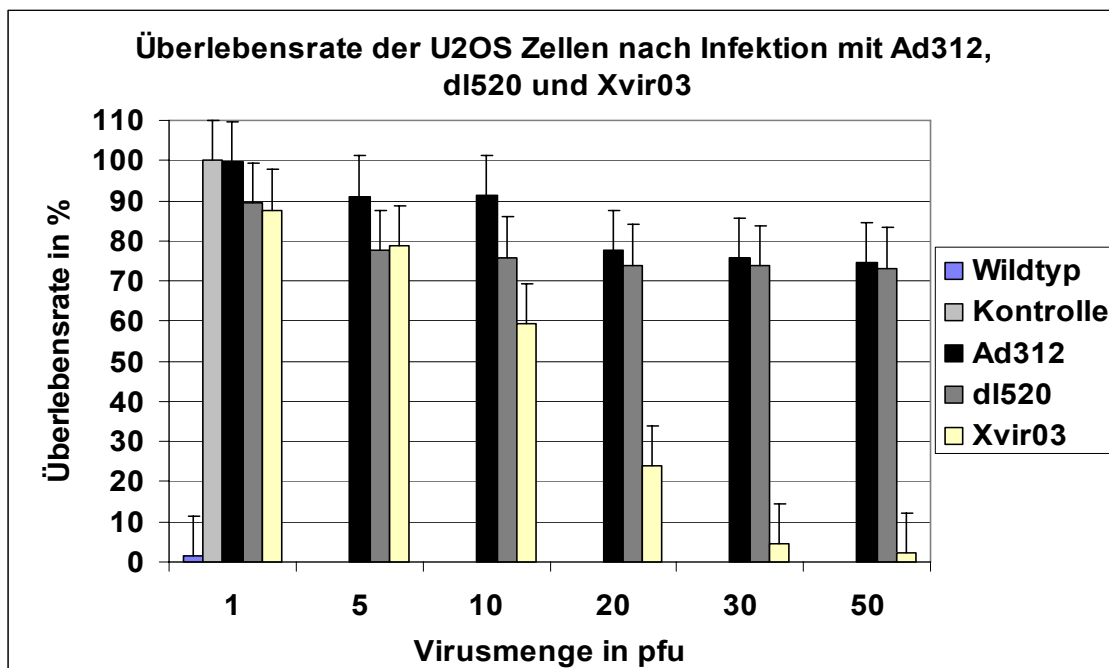
Tab. 14: Überlebensrate von U87 Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Die U87 Zellen zeigte sich relativ unempfindlich gegenüber allen Viren. Selbst bei 50 pfu Ad312 wuchsen 90,51% aller U87 Zellen unbeeinträchtigt weiter. dl520 konnte bei 30 und 50 pfu immerhin eine Reduktion auf 74,35 und 53,47% bewirken. Xvir03 war hier nur eine Spur effizienter: 30 pfu töteten 72,13%, 50 pfu immerhin über die Hälfte (44,86%) aller Zellen.



Tab. 15: Überlebensrate von HeLa Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

In HeLa Zellen führte Ad312 auch bei hohen pfu Zahlen wie 30 und 50 pfu nur zu einer Reduktion der Zellzahl auf 96,02 und 89,1%. Auch nach Infektion mit dl520 konnten erst 50 pfu die Zellzahl auf 49,49% erniedrigen. Davor überlebten mehr als 90% der Zellen. Xvir03 konnte ab 10 pfu signifikante Effekte bei der Lyse von Tumorzellen erreichen: nur noch 18,25% aller Zellen überlebten. Bei einer Steigerung auf 20 pfu konnte man die HeLa Zellen auf 14,7% reduzieren. Bei 30 pfu fanden sich nur noch 15,32% und bei 50 pfu sogar nur noch 6,3% lebende Zellen.



Tab. 16: Überlebensrate von U2OS Zellen nach Infektion mit Ad312, dl520 und Xvir03
(Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt, Standardabweichung angegeben)

In U2OS Zellen führte eine Infektion von Ad312 ab 20 pfu zu deutlicheren Auswirkungen: es fanden sich noch 77,66% lebende Tumorzellen. Die Reduktion der Zellzahl bewegte sich auch bei Erhöhung auf 30 und 50 pfu weiterhin zwischen 75,64 und 74,5%.

dl520 konnte bereits ab 5 pfu eine ähnliche Verminderung der Zellzahl wie Ad312 bei 20 pfu bewirken (77,63%). Es gelang jedoch nicht durch Erhöhung der pfu Zahl die Zellzahl weiter als 73,22% abzusenken. Xvir03 führte bereits bei 5 pfu zu einer Erniedrigung der Zellzahl auf 78,84%. Im weiteren Verlauf wurden bei 20 pfu bis auf 23,825% alle Tumorzellen abgetötet. 30 pfu Xvir03 überlebten 4,38%, 50 pfu nur 2,18% aller Zellen.

4.4.4.2 Bestätigung der Replikation von Xvir03 durch lichtmikroskopische Analyse

Unter dem Lichtmikroskop konnte man beobachten, dass die mit Ad312 infizierten DU145 Zellen kaum Anzeichen eines zytopathischen Effekts zeigten.

Auch dl520 führte lichtmikroskopisch nur zu geringfügigen Veränderungen. Xvir03 konnte bei 10 und 20 pfu schwache zytopathische Effekt Zeichen hervorrufen, deutlich starke Lichtbrechung und abgerundete Zellen waren erst ab 30 und 50 pfu zu beobachten. Im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle waren bei Xvir03 noch vereinzelt adhärenente, ballonierete und abgerundete Zellen sichtbar.

PC3

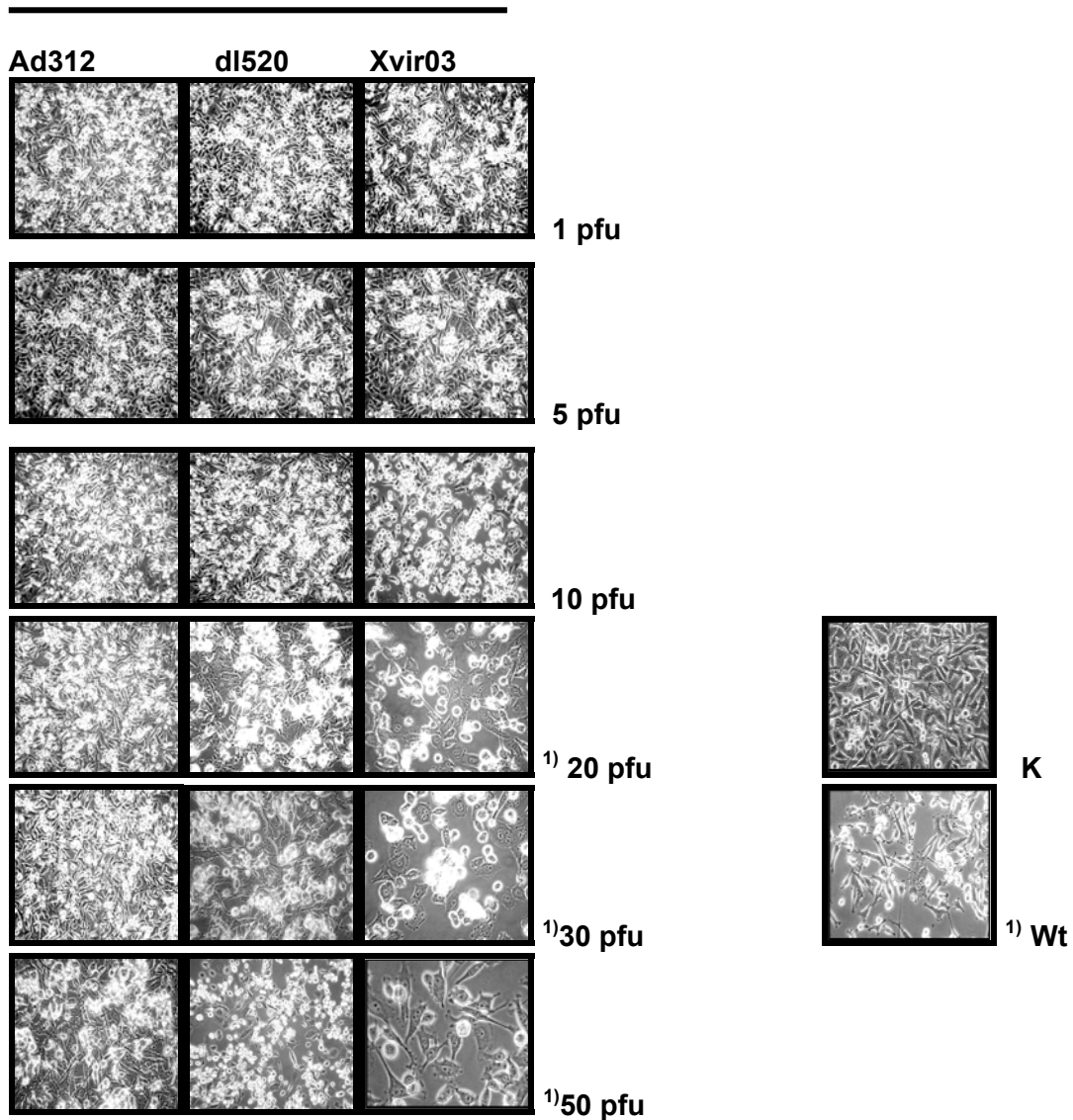


Abb. 28: Infektion von PC3 Zellen mit Ad312, dl520 und Xvir03
Infizierte Zellen fallen durch Abrundung und verstärkte Lichtbrechung auf Lichtmikroskop, 10x Vergrößerung, 1) = 20x Vergrößerung, pfu Zahlen randständig angegeben

PC3 Zellen stellten sich lichtmikroskopisch von allen verwendeten Zelllinien am besten dar und sind deshalb beispielhaft aufgeführt.

Bei Ad312 ließen sich keine deutlichen Lyse Zeichen erkennen.

dl520 bot unter dem Lichtmikroskop, genau wie in der Kristallviolett färbung, in PC3 Zellen einen deutlicheren zytopathischen Effekt als in DU145 Zellen. Ab 20 pfu ließ sich eine Auflockerung des Zellrasens feststellen, die sich bei 30 pfu noch verstärkte. Die Zellen präsentierten sich langgezogen, abgerundet und waren teilweise schon lysiert. Ab 50 pfu konnte man nur noch einzelne adhärenz Zellen unter dem Lichtmikroskop sehen, während der Großteil der Zellen abgetötet im Medium schwamm.

Xvir03 vermochte bereits bei 10 pfu die Zelldichte zu vermindern und zeigte bei 20 pfu deutliche Löcher im Zellrasen. Nach Infektion mit 30 pfu gab es nur noch stellenweise adhärenz Zellen, die aber die typischen Infektionszeichen aufwiesen, während über 90% der Zellen abgetötet waren und sich vom Boden gelöst hatten.

Es konnte sowohl durch Kristallviolett färbung mit anschließender Zellzahlbestimmung als auch durch lichtmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden, dass Xvir03 in alle untersuchten Zelllinien besser replizierte und Zellen lysierte als Ad312 und dl520. Um auszuschließen, dass diese Replikation nicht auf die Induktion der S-Phase zurückzuführen war, wurde dies per FACS Analyse überprüft.

4.4.5 Keine S-Phase Induktion durch Xvir03 in HeLa Zellen

Bei nicht infizierten Zellen fanden sich 15,7% in der S-Phase. Mit 10 pfu Wildtyp infizierte Zellen wiesen hingegen eine S-Phasen Rate von 52,7%. 50 pfu Xvir03 zeigten in der FACS Analyse mit 22,3% eine vergleichbare Ratio wie nicht infizierte Zellen. Als nächstes wurde die Replikationskinetik von Xvir03 mittels der bereits bekannten E2 early und E2 late Primer untersucht.

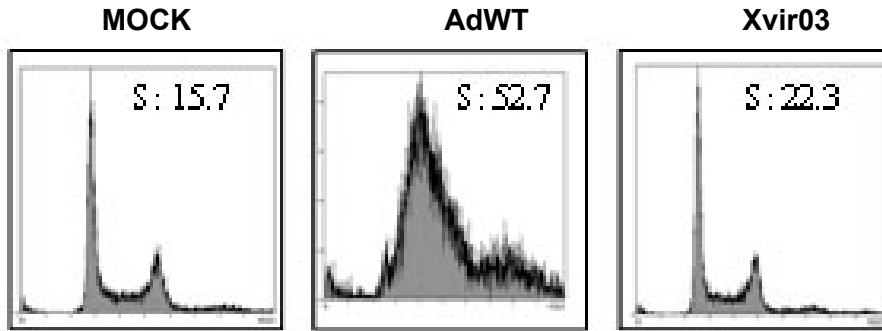


Abb. 29: FACS Analyse von nicht infizierten, mit Wildtyp infizierten und Xvir03 infizierten HeLa Zellen

4.4.6 E2 late Expression in Xvir03 infizierten DU145 und U2OS Zellen stärker als die E2 early Expression

In diesem Versuch zeigte sich 6 h nach Infektion von 20 pfu Xvir03 in DU145 Zellen für E2 early ein Signal von 18,34% im Vergleich zur Kontrolle, für E2 late eine Expression von 30,15%. Weitere 3 h später stieg das Signal für E2 early auf 22,51%, bei E2 late auf 67,32%. Insgesamt 12 h nach Infektion ließ sich bei E2 early eine Signalstärke von 25,4% detektieren, während E2 late mit 111,35% den Wert der Kontrolle überschritt. Erst nach 24 h erreichte E2 early mit 110,23% eine vergleichbare Expressionsstärke, das E2 late Signal lag jetzt bei 99,24%. Der Befund wurde für Xvir03 in einer weiteren Zelllinie überprüft.

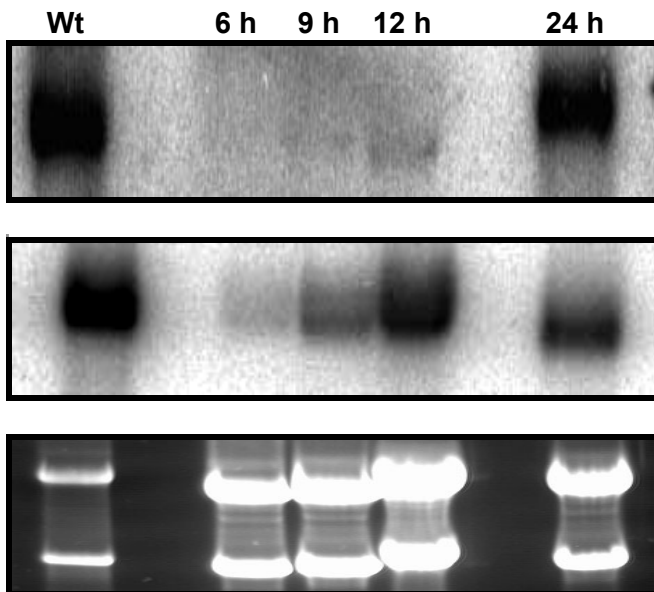
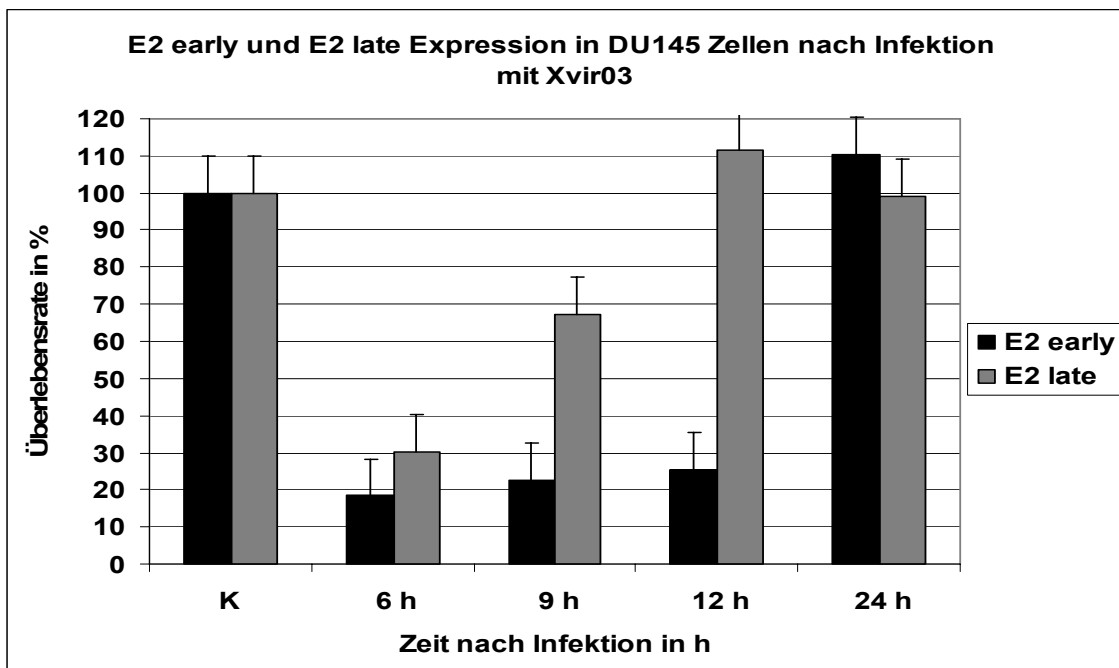


Abb. 30: E2 early und E2 late Expression in Xvir03 infizierten DU145 Zellen
obere Reihe: Zeitreihe der E2 early Expression nach Infektion von DU145 Zellen
mit Xvir03, 10 pfu, untere Reihe: Zeitreihe der E2 late Expression nach Infektion
von DU145 Zellen mit Xvir03, 10 pfu



Tab. 17: Quantifizierung der E2 early und E2 late Expression in DU145 Zellen
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung
angegeben)

Die RNA aus mit Xvir03 infizierten U2OS Zellen lieferte nach 3 h ein Signal der
Stärke 5,65% für die E2 early Sonde, E2 late stellte sich mit 30,91% dar. Nach

9 h betrug die Bande von E2 early 21,24%, E2 late hingegen erreichte schon 82,64%. Auch zum Zeitpunkt 12 h nach Infektion wurde E2 late mit 84,4% stärker exprimiert als E2 early mit 28,95%. Weitere 12 h später, also insgesamt 24 h nach Infektion, erreichten E2 early und E2 late mit 114,82 und 106,22% gleiche Expressionsstärke.

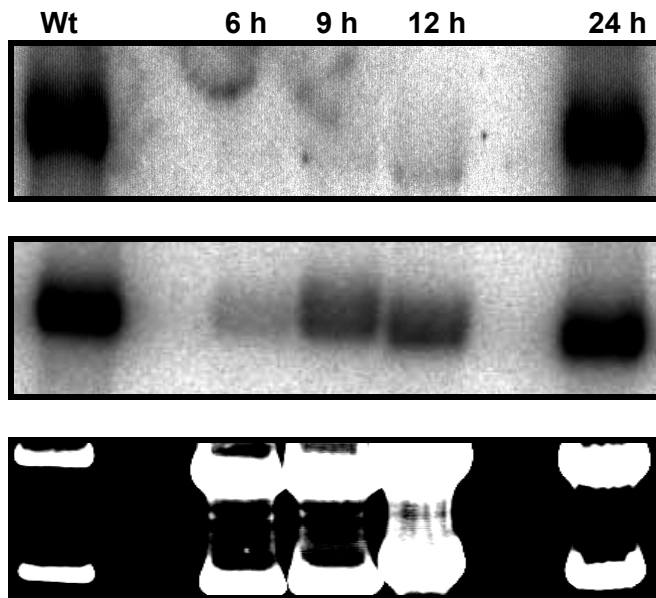
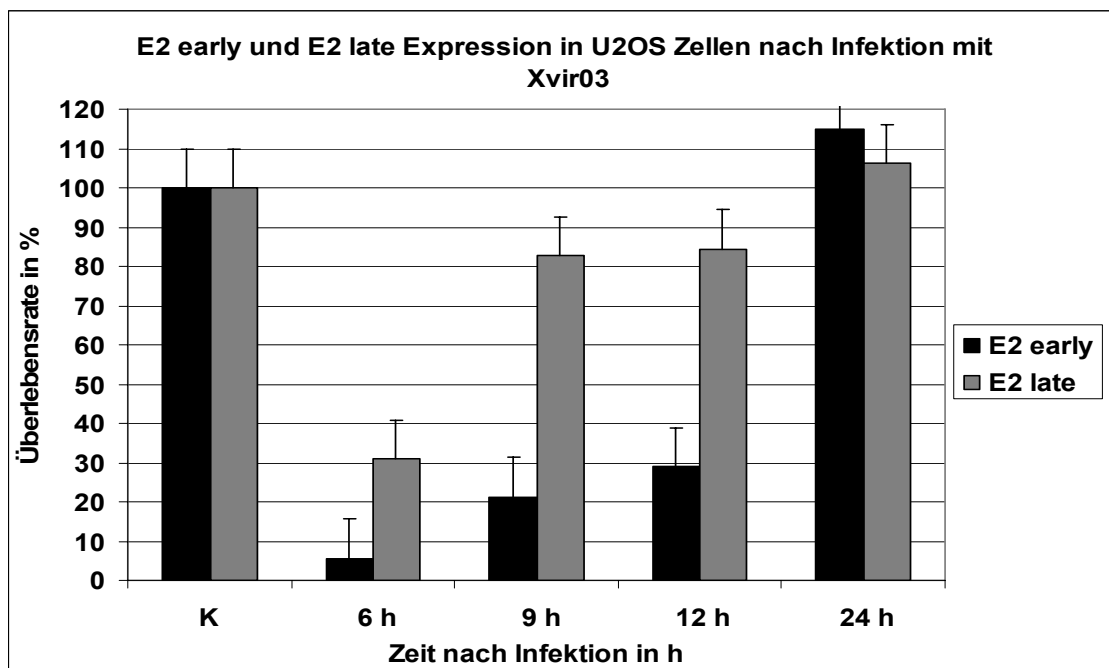


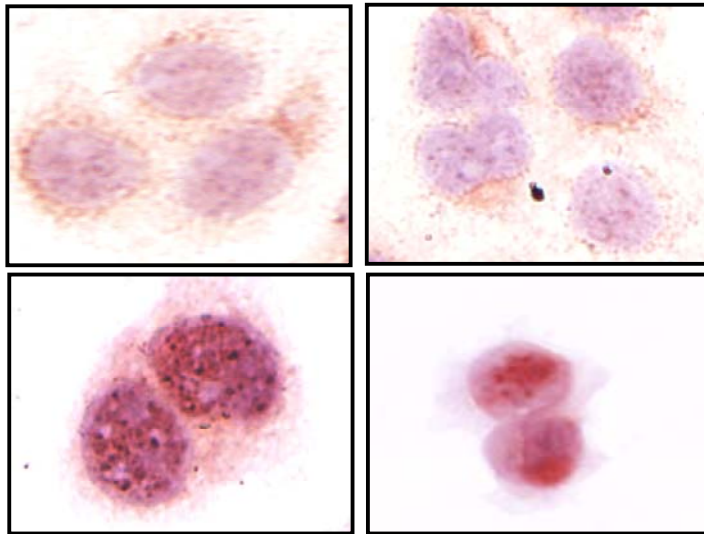
Abb. 31: E2 early und E2 late Expression in Xvir03 infizierten U2OS Zellen
obere Reihe: Zeitreihe der E2 early Expression nach Infektion von U2OS Zellen mit Xvir03, 10 pfu; untere Reihe: Zeitreihe der E2 late Expression nach Infektion von U2OS Zellen mit Xvir03, 10 pfu



Tab. 18: Quantifizierung der E2 early und E2 late Expression in U2OS Zellen (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.4.7 Immunhistochemie

Die Anfärbung von nicht infizierten Zellen mit dem spezifischen YB-1 Antikörper ergab wie erwartet kein besonderes Verteilungsmuster. Auch Ad312 zeigte nur zytoplasmatische und perinukleäre YB-1 Anfärbung. Etwas verstärkte Anfärbung in Kern zeigte sich zwar schon nach Infektion mit Wildtyp, doch nur Xvir03 führte zu ausschließlicher und spezifischer YB-1 Anfärbung im Kern. Ausgehend von diesen Ergebnissen und der in der Einleitung abgehandelten Literatur, wurde eine mögliche Beeinflussung der *MDR/MRP* Expression durch den Yb-1 abhängigen Vektor Xvir03 postuliert und untersucht.



**Abb. 32: Immunhistochemische Färbung von U2OS Zellen
oben links: nicht infizierte Zellen, oben rechts: Ad312 infizierte Zellen, unten
links: AdWT infizierte Zellen, unten rechts: Xvir03 infizierte Zellen
50x Vergrößerung**

4.4.8 Erniedrigung der *MRP* Expression in infizierten DU145 und PC3 Zellen nach Infektion mit Xvir03 Virus

Da YB-1 auch an der Regulation der *MDR/MRP* Expression in vielfach-resistenten Zellen beteiligt war, wurde der Einfluss der offensichtlich durch Xvir03 verursachten YB-1 Kernlokalisierung auf die *MDR/MRP* Expression untersucht. In einem ersten Vergleich wurde eine Kontrolle aus nicht infizierten DU145 Zellen den mit 50 pfu Ad312 und 20 pfu Xvir03 infizierten Zellen gegenübergestellt. Um eine noch bessere Quantifizierung zu gewährleisten, wurde eine Hybridisierung mit GAPDH durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass im Vergleich zur Kontrolle, die *MRP* Expression nach Infektion von Ad312 103,26% und nach Infektion von Xvir03 45,79%. Dies entspricht einer Reduktion um über die Hälfte.

Dieser Befund wurde nun in anderen Zelllinien überprüft.

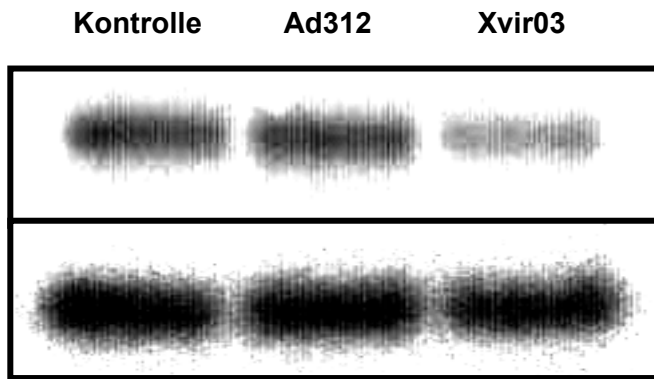
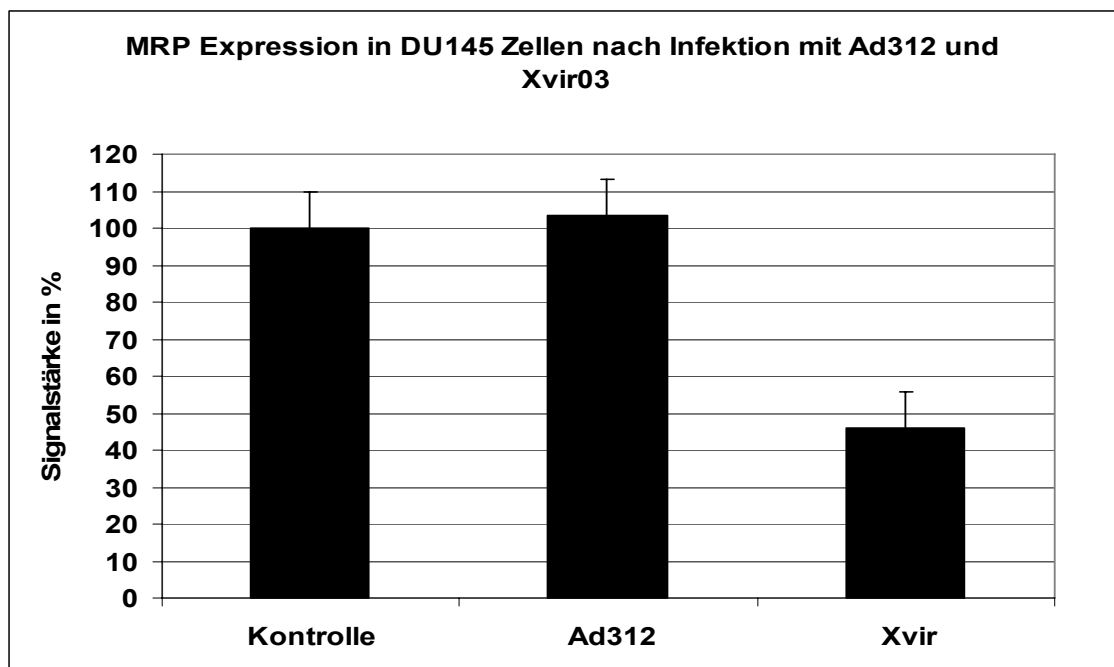


Abb. 33: MRP Expression in DU145 Zellen
oben: MRP Expression in DU145 Zellen nach Infektion mit 50 pfu Ad312, 10 pfu Xvir03 und nicht infizierte Zellen als Kontrolle
unten: GAPDH Expression nach Strippen des vorhergehenden Northern Blots und erneuter Hybridisierung zur Ladungskontrolle



Tab. 19: Quantifizierung der MRP Expression in DU145 Zellen
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

PC3 Zellen wurden neben 30 pfu Ad312 und Xvir03 auch mit 10 pfu Wildtyp Virus infiziert und die MRP Expression mittels Northern Blot untersucht.

Ad312 erreichte diesmal nur 91,43% der Expressionsstärke der Kontrolle, Wildtyp reduzierte das Signal auf 44,49%. Xvir03 führte zu einer verbleibenden Bande von 29,01% und reduzierte damit in PC3 Zellen die MRP Expression um

ca. 70%. Die GAPDH Kontrolle zeigte für alle gleich starke Signale bis auf Ad312, das GAPDH deutlich stärker exprimierte.

Bei weiteren Untersuchungen konzentrierte man sich auf die vielfachresistenten Zellen wie z.B. 257RDB, die *MRP* und *MDR* besonders stark exprimieren.

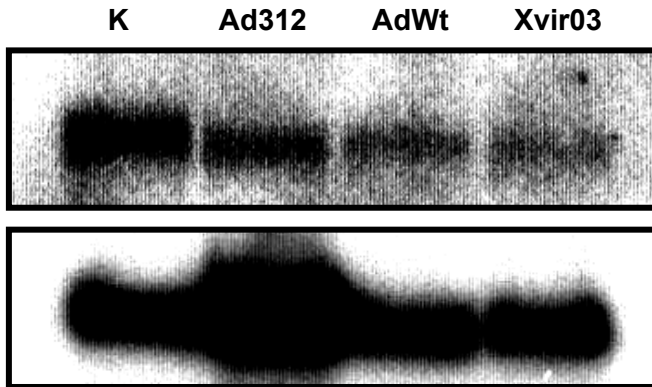
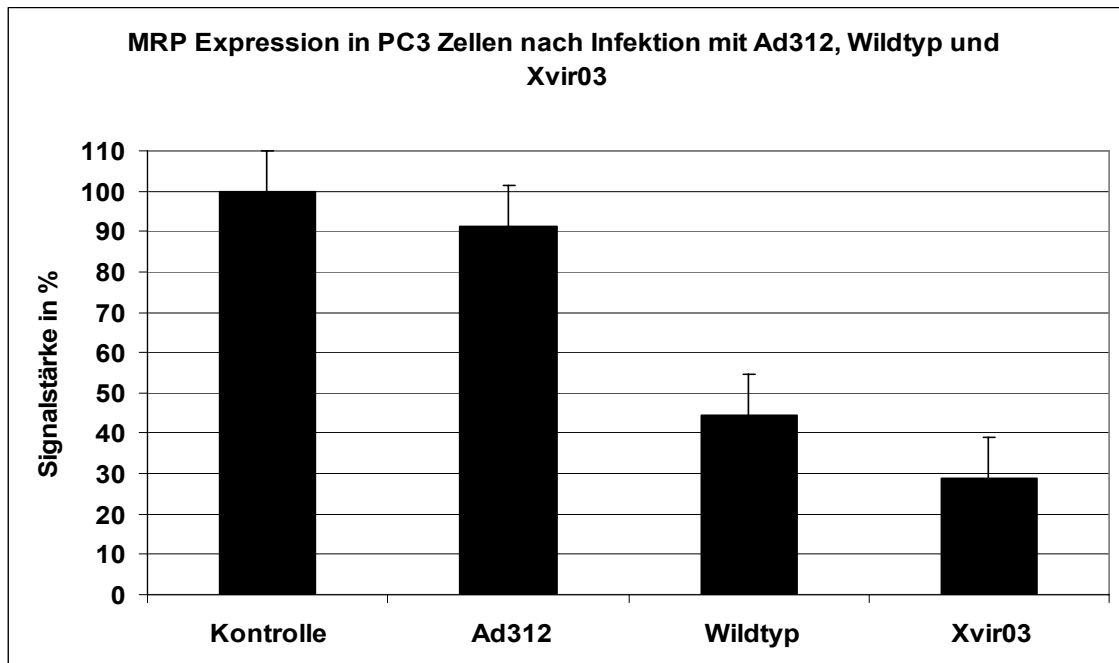


Abb. 34: *MRP* Expression in PC3 Zellen
oben: *MRP* Expression in PC3 Zellen nach Infektion mit 50 pfu Ad312, 10 pfu Wt oder Xvir03, nicht infizierte Zellen als Kontrolle
unten: GAPDH Expression nach Strippen des vorhergehenden Northern Blots und erneuter Hybridisierung zur Ladungskontrolle



Tab. 20: Quantifizierung der *MRP* Expression in PC3 Zellen
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.4.9 Erniedrigung der *MDR* Expression in infizierten 257RDB Zellen nach Infektion mit Xvir03 Virus

Auch hier zeigte Ad312 gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Veränderungen in der Signalstärke (104,4%). Wildtyp hingegen konnte mit nur noch 18,8% die *MDR* Expression am stärksten reduzieren. Doch auch Xvir03 vermochte mit 34,95% die Expression von *MDR* in 257RDB Zellen um 65% zu reduzieren.

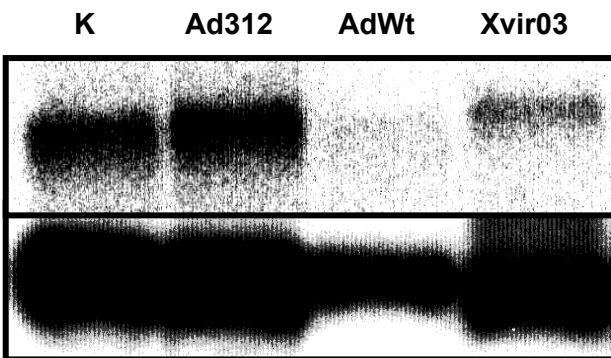
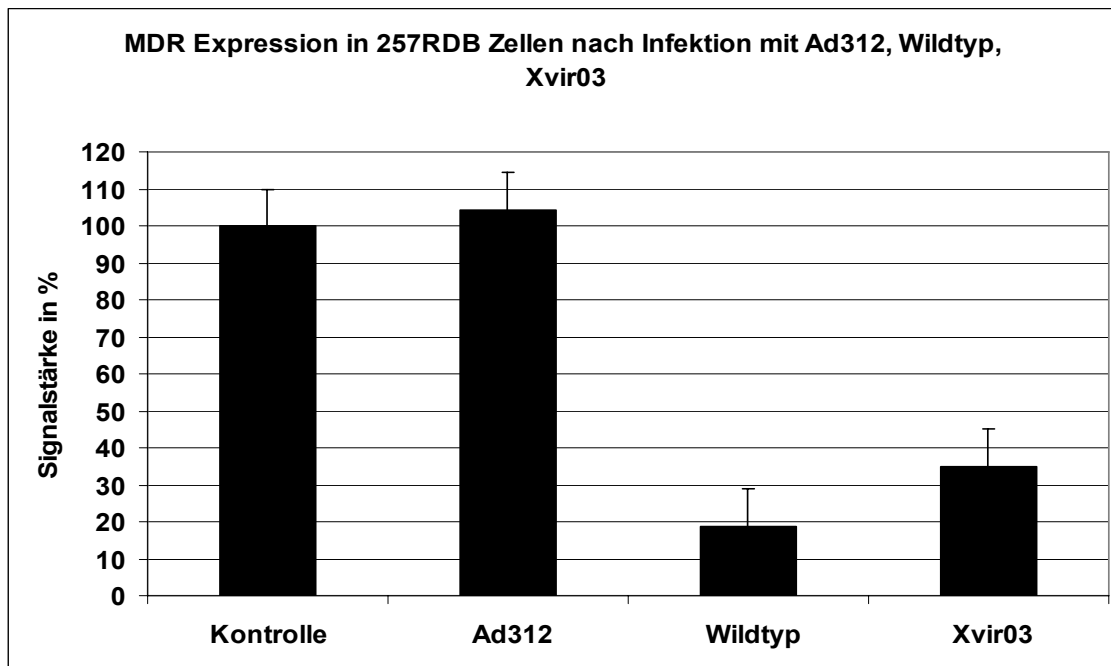


Abb. 35: *MDR* Expression in 257RDB Zellen
oben: *MDR* Expression in 257RDB Zellen nach Infektion mit 50 pfu Ad312, 10 pfu Wt oder Xvir03, nicht infizierte Zellen als Kontrolle
unten: GAPDH Expression nach Strippen des vorhergehenden Northern Blots und erneuter Hybridisierung zur Ladungskontrolle

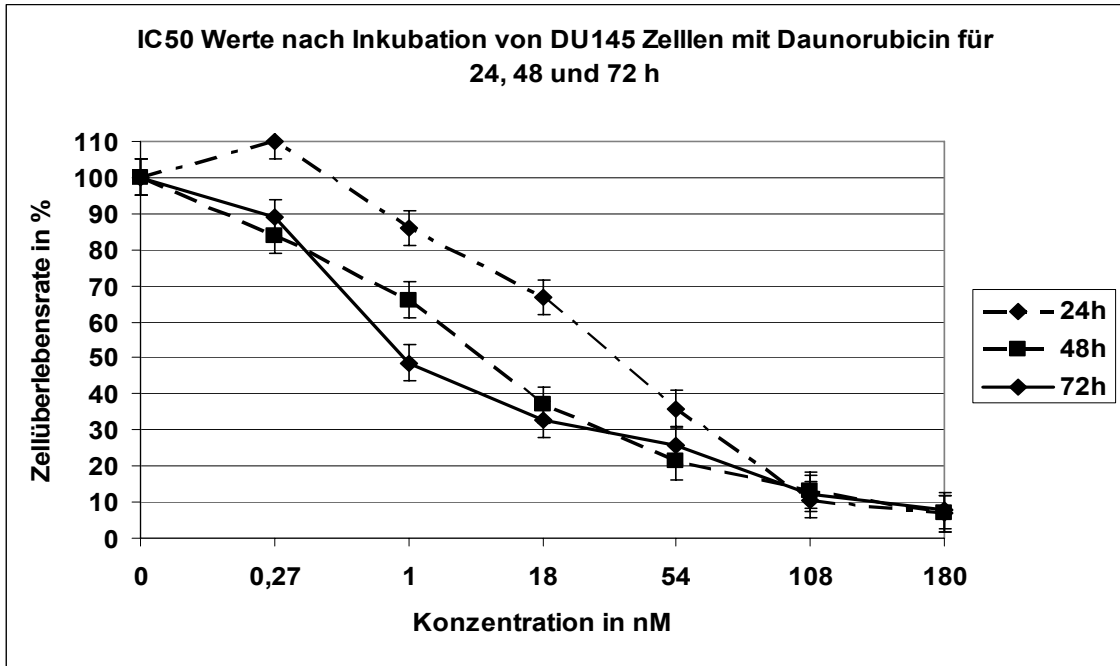


Tab. 21: Quantifizierung der *MDR* Expression in 257RDB Zellen (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

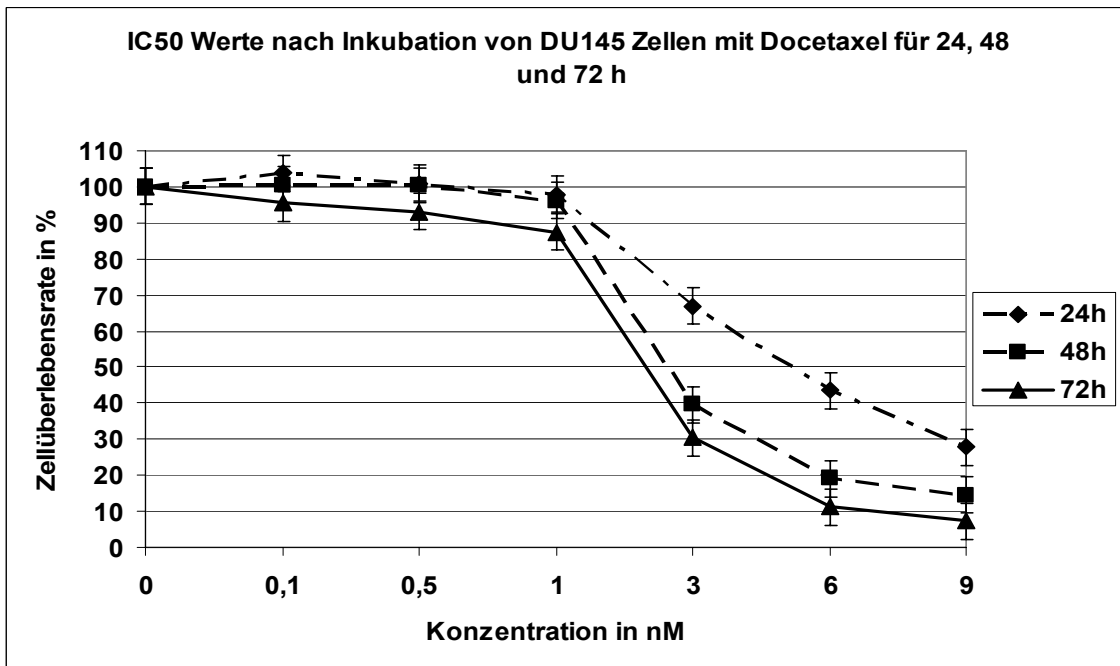
4.5 Kombination verschiedener Zytostatika mit Xvir03

4.5.1 Sulforhodamintest zur Bestimmung der IC_{50} Werte von Daunorubicin, Docetaxel und Irinotecan auf DU145 Zellen

Die Inkubation von DU145 Zellen mit Daunorubicin ergab bei einer Konzentration von 1 nM nach 24 h eine Überlebensrate der Zellen von 86%, während nach 48 und 72 h die Zellen schon auf 66,1 und 48,6% reduziert wurden. Erst bei 54 nM konnten in der 24 h Zeitreihe mehr als 50 % aller Zellen abgetötet werden (36%); bei längerer Inkubation konnten bereits 18 nM 63 % aller Zellen in der 48 h Reihe und 67,1% aller 72h inkubierten Zellen abtöten. Der IC_{50} Wert lag bei 36 nM für 24 h bzw. 9,23 nM für 48 h und 0,9 nM für 72 h.

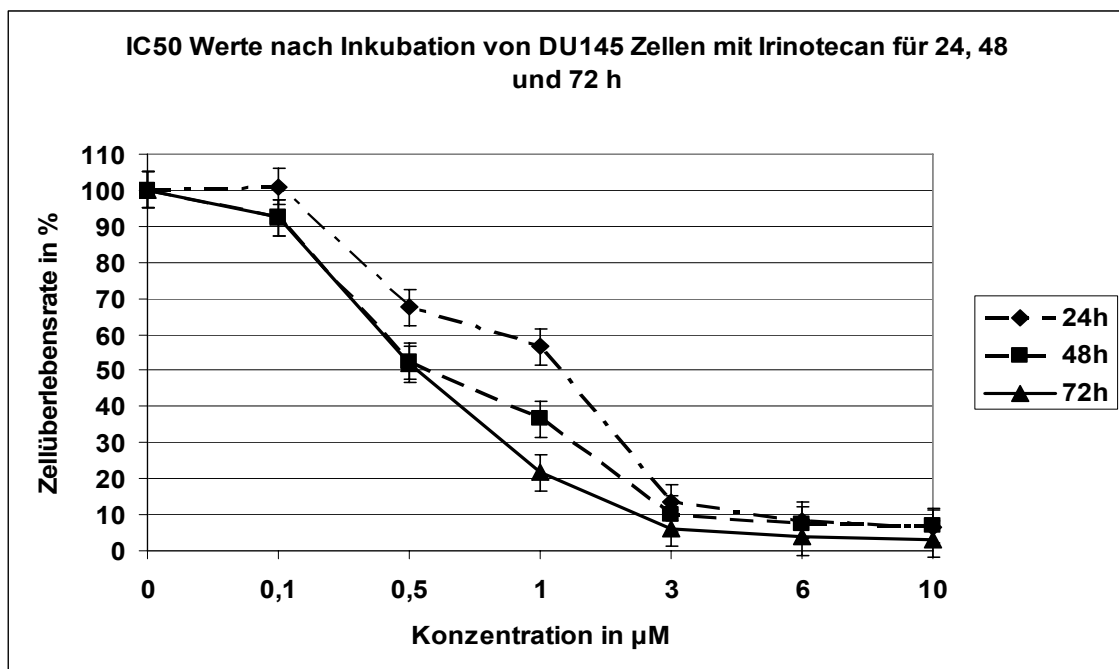


Tab. 22: IC₅₀ Werte nach Inkubation von DU145 Zellen mit Daunorubicin für 24, 48 und 72 h
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)



Tab. 23: IC₅₀ Werte nach Inkubation von DU145 Zellen mit Docetaxel für 24, 48 und 72 h
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Für Docetaxel konnte bei 1 nM noch kein nennenswerter Effekt festgestellt werden: bei 24 h Inkubation überlebten 97,8%, bei 48 h 96,2% und nach 72 h noch 87,5% aller Zellen. Bereits bei 3 nM reduzierte sich die Zellzahl nach 24 h auf 66,97% bzw. 39,7 und 30,4% für 48 und 72 h. Daher ergaben sich folgende IC_{50} Werte: für 24 h lag der Wert bei 5,2 nM, für 48 h bei 2,6 nM und für 72 h bei 2,3 nM.

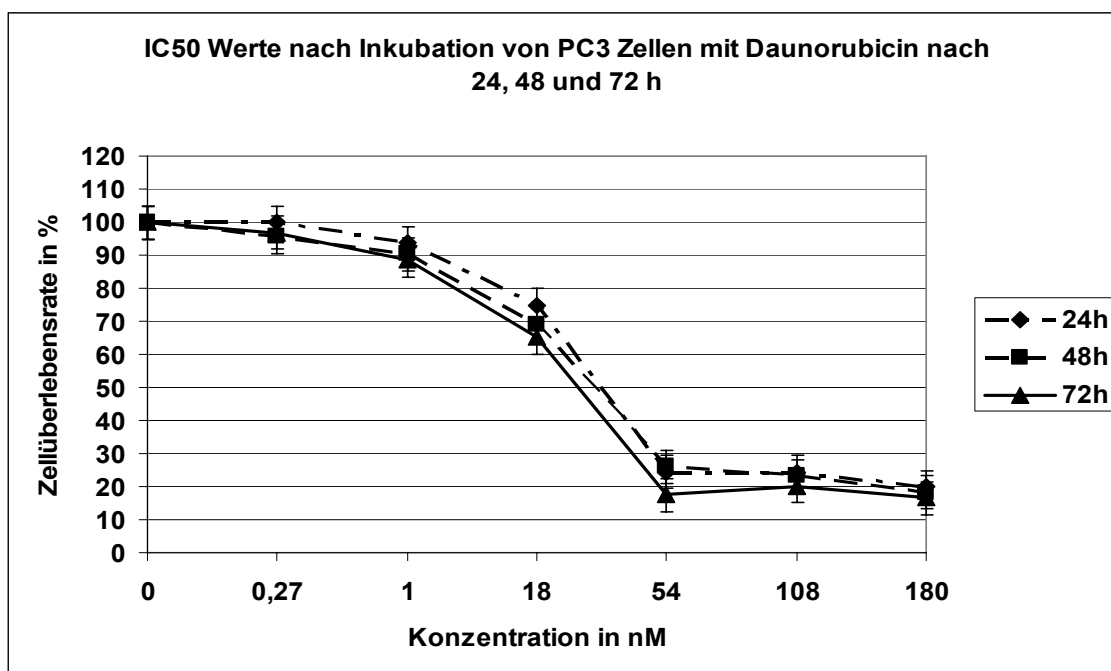


Tab. 24: IC_{50} Werte nach Inkubation von DU145 Zellen mit Irinotecan für 24, 48 und 72 h (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Irinotecan konnte in einer Konzentration von 0,5 µM nach 24 h 32,5% aller Zellen abtöten, nach 48 h starben immerhin 47,5% und nach 72 h 48,2% aller Zellen. Bei 1 µM überlebten nur noch 56,7% aller Zellen eine 24 h Inkubation, nach 48 bzw. 72 h waren es nur noch 36,5 bzw. 21,7%. Hieraus ergaben sich IC_{50} Werte von 1,3 µM für 24 h, 0,57 µM für 48 h und 0,55 µM für 72 h.

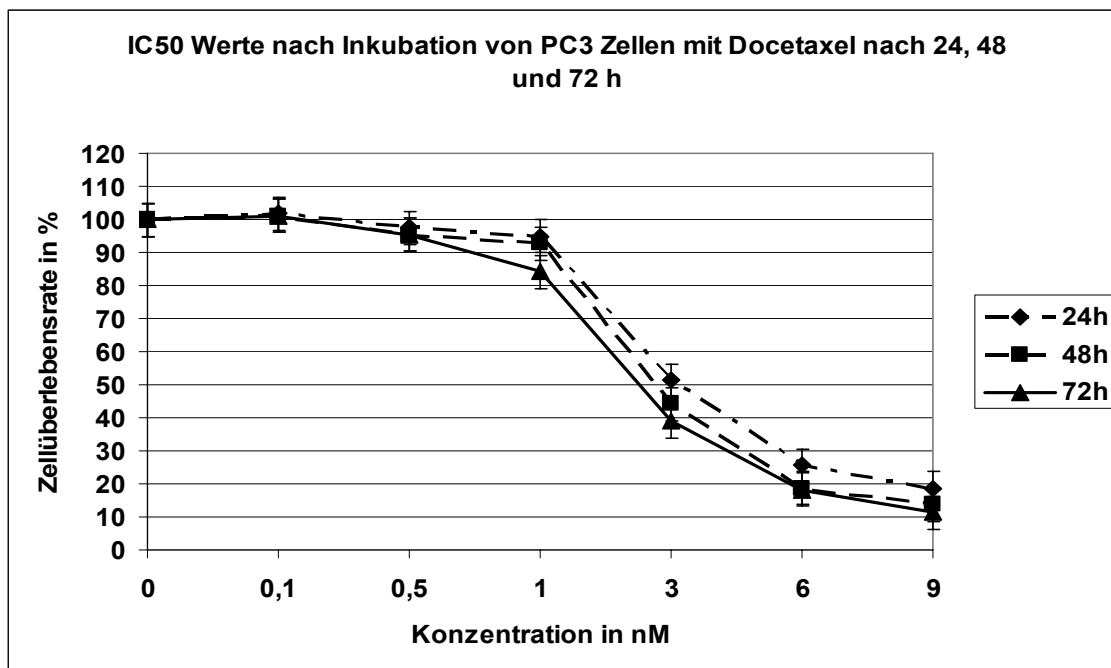
4.5.2 Sulforhodamintest zur Bestimmung der IC_{50} Werte von Daunorubicin, Docetaxel und Irinotecan auf PC3 Zellen

Die PC3 Zellen zeigten für 18 nM Daunorubicin nach 24 h eine Zellüberlebensrate von 74,8%, weitere 24 h später betrug sie nur noch 69% und nach 72 h reduzierte sie sich auf 65,1%. Über 50% aller Zellen starben jedoch erst nach Inkubation mit 54 nM Daunorubicin: nach 24 h überlebten nur 24,3%, nach 48 h 25,96% und nach 72 h nur noch 17,5%. Daraus ergab sich für die 24 h Zeitreihe mit Daunorubicin ein IC_{50} Wert von 36 nM, für 48 h waren es 34nM und nach 72 h vermochten bereits 28 nM Daunorubicin 50% aller Zellen abzutöten.



Tab. 25: IC_{50} Werte nach Inkubation von PC3 Zellen mit Daunorubicin für 24, 48 und 72 h (Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

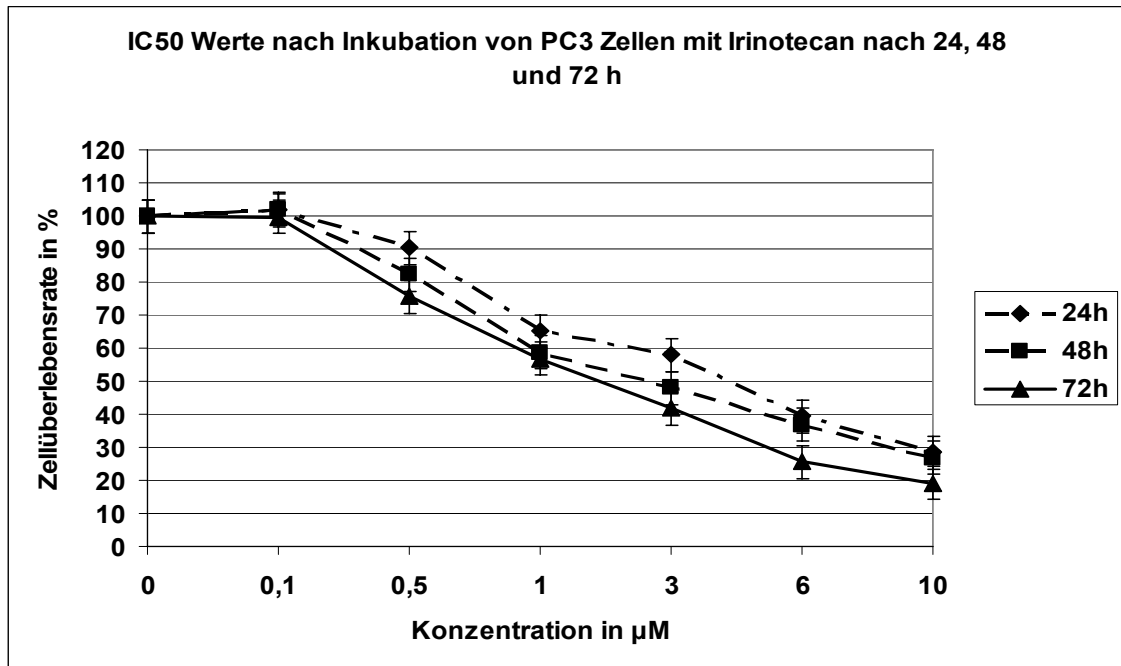
Docetaxel wiederum konnte erst ab einer Konzentration von 3 nM über 50% aller Zellen vernichten: 51,3% Zellüberlebensrate nach 24 h, 44,2% nach 48 h und nur noch 38,9% nach 72 h Inkubation. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse für 1 nM Konzentration Docetaxel lag der IC_{50} Wert hiermit bei 3,1 nM für die 24 h, 2,8 nM für die 48 h und 2,5 nM für die 72 h Zeitreihe.



Tab. 26: IC₅₀ Werte nach Inkubation von PC3 Zellen mit Docetaxel für 24, 48 und 72 h
(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

In der Versuchsreihe mit Irinotecan zeigte sich nach 24 h ab einer Konzentration von 1 μM eine verringerte Zellüberlebensrate von 65,1%, die jedoch erst ab einer Konzentration von 6 μM deutlich über die Hälfte auf 39,3% reduziert werden konnte. Für die 48 und 72 h Zeitreihe konnten ab 3 μM die Zellzahl auf 48 und 41,8% verringern. Hieraus ergaben sich für Irinotecan IC₅₀ Werte von 4 μM (24 h), 2,8 μM (48 h) sowie 1,9 μM (72 h).

Sämtliche Zeitreihen wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, nach den unter 3.5.22. beschriebenen Methoden berechnet und die gemittelten Ergebnisse graphisch dargestellt.



Tab. 27: IC₅₀ Werte nach Inkubation von PC3 Zellen mit Irinotecan für 24, 48 und 72 h

(Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.5.3 Bessere Zellyse durch Xvir03 im Vergleich zu Ad312 in Kombination mit Docetaxel in PC3 Zellen

PC3 Zellen

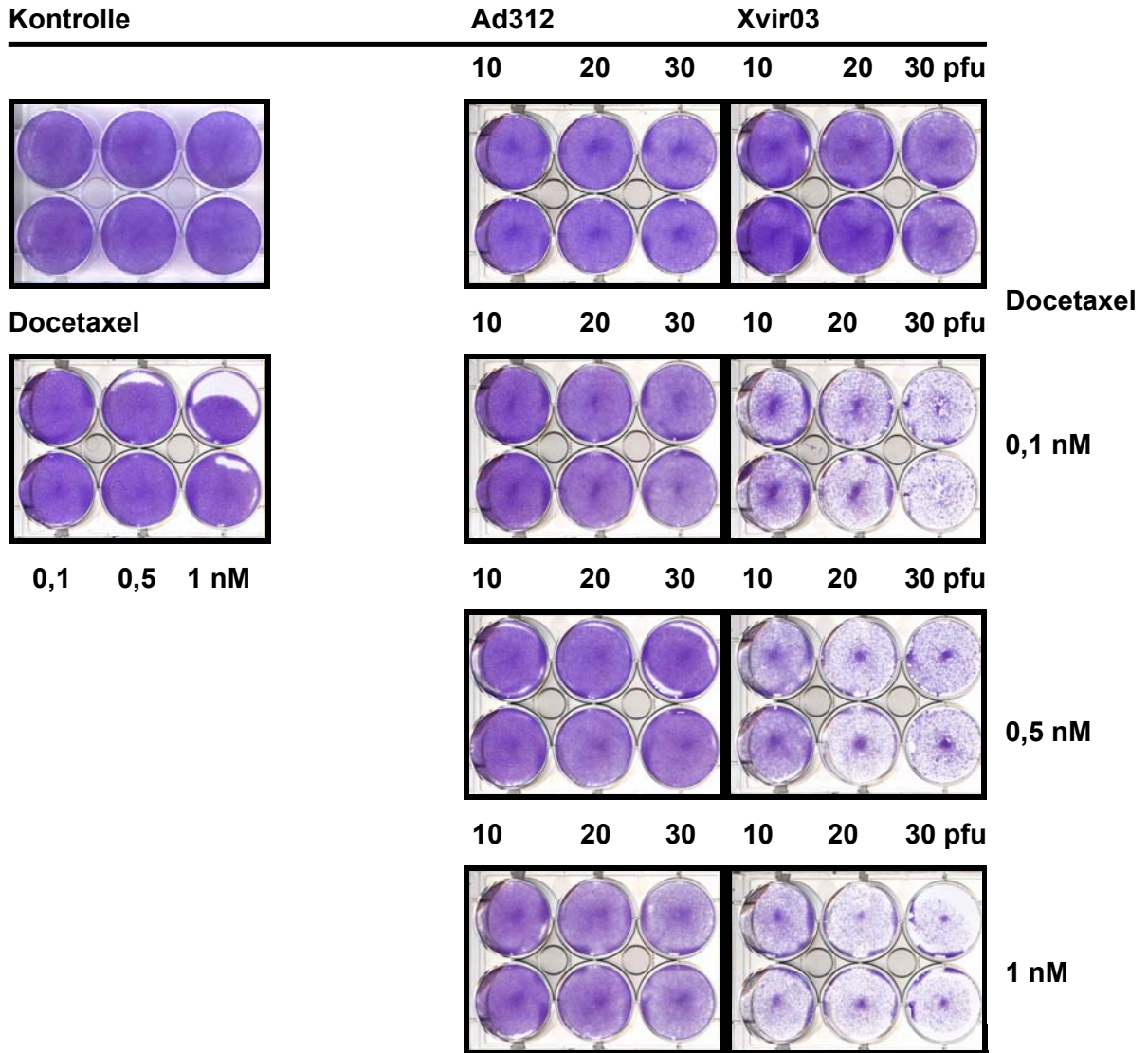
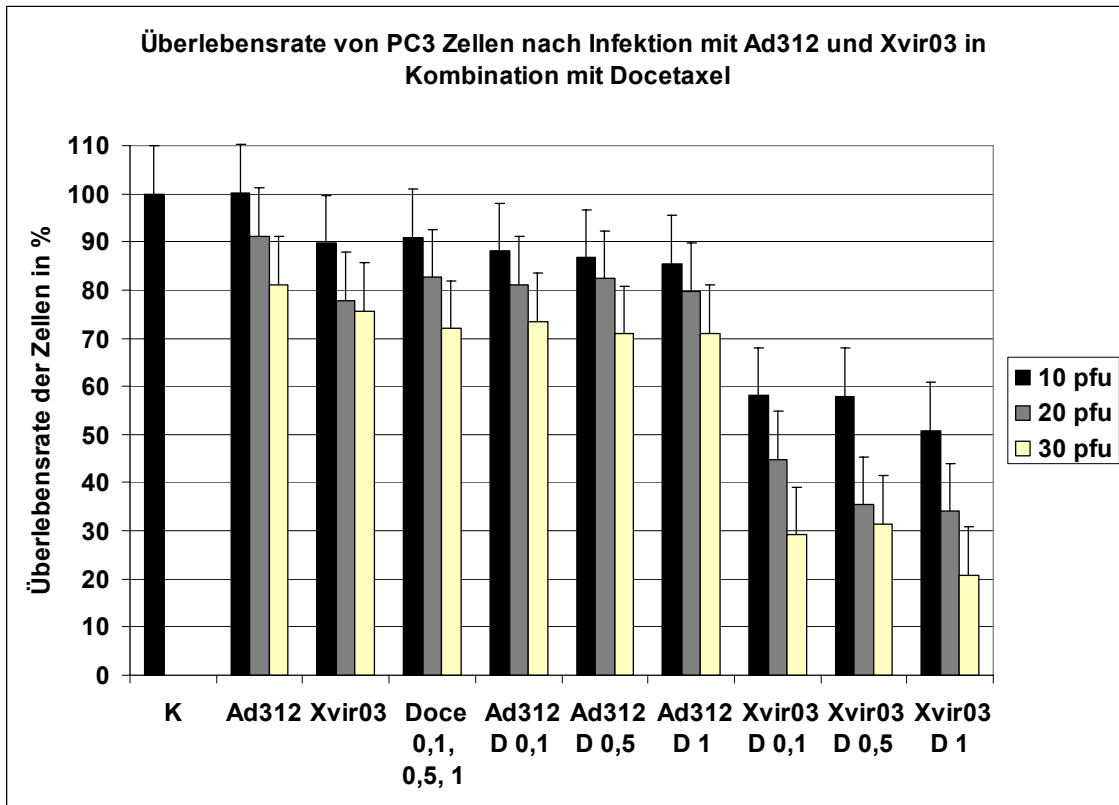


Abb. 36: Kristallviolettffärbung der PC3 Zellen nach Infektion mit Ad312 oder Xvir03 in Kombination mit Docetaxel (pfu Zahlen und Konzentrationen bei jeder Abbildung angegeben)



Tab. 28: Quantifizierung der Überlebensrate von PC3 Zellen nach Infektion mit Xvir03 und Ad312 in Kombination mit Docetaxel (Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

Es wurden unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Sulforhodamintests die Konzentrationen 0,1, 0,5 und 1 nM für Docetaxel gewählt, alle unter den IC_{50} Werten gelegen.

Im Vergleich zur Kontrolle, die als 100% überlebende Zellen gewertet wurde, konnte Ad312 bei Steigerung auf 30 pfu 18,9% aller PC3 Zellen abtöten, Xvir03 erreichte bei 30 pfu eine Erniedrigung der Zellzahl auf 75,6%. Docetaxel in einer Konzentration von 0,1 nM zeigte eine Überlebensrate von 90,9%, die sich durch Erhöhung der Konzentration bis auf 1 nM weiter auf 72% erniedrigen ließ. Die Kombination von 10 pfu Ad312 und 0,1 nM Docetaxel konnte durch Erhöhung der pfu Zahl eine Verminderung der überlebenden Zellen von 88,1% auf 73,4% bewirken.

Auch bei einer erhöhten Docetaxel Konzentration von 0,5 nM blieb die Zellüberlebensrate relativ konstant bei 86,7%. Eine alleinige Steigerung der pfu

Zahl bis auf 30 pfu konnte zusätzliche 15,8% der Tumorzellen vernichten. Diese Überlebensraten ließen sich auch durch eine weitere Erhöhung der Docetaxel Konzentration auf 1 nM kaum verringern.

Xvir03 in seiner niedrigsten pfu Zahl vermochte zusammen mit 0,1 nM Docetaxel die Zellzahl auf 58,1% zu reduzieren. Mit der Erhöhung der pfu Zahl fiel die Zellzahl bei 20 pfu auf 44,8% und bei 30 pfu auf 29,1% herab.

Die Kombination aus 0,5 nM Docetaxel und 10 pfu Xvir03 ließ 57,9% aller Zellen unbeeinträchtigt weiter wachsen, während 20 pfu über die Hälfte der Zellen sterben ließ (35,39% überlebende Zellen).

Bei 1 nM Docetaxel verringerte sich die Zellzahl schon bei 10 pfu Xvir03 deutlicher auf 50,9%. Zusammen mit 20 pfu Xvir03 wurde ein Wert von 34,1% erreicht. Hier gelang es durch Steigerung auf 30 pfu Xvir03 noch einmal signifikant mehr Zellen abzutöten (20,8% Zellüberlebensrate). Die mit der Kristallviolett-Färbung und im Wallac® Elisa-Reader verifizierten Beobachtungen ließen sich auch unter dem Lichtmikroskop bestätigen.

4.5.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Xvir03 infizierten PC3 Zellen in Kombination mit Docetaxel

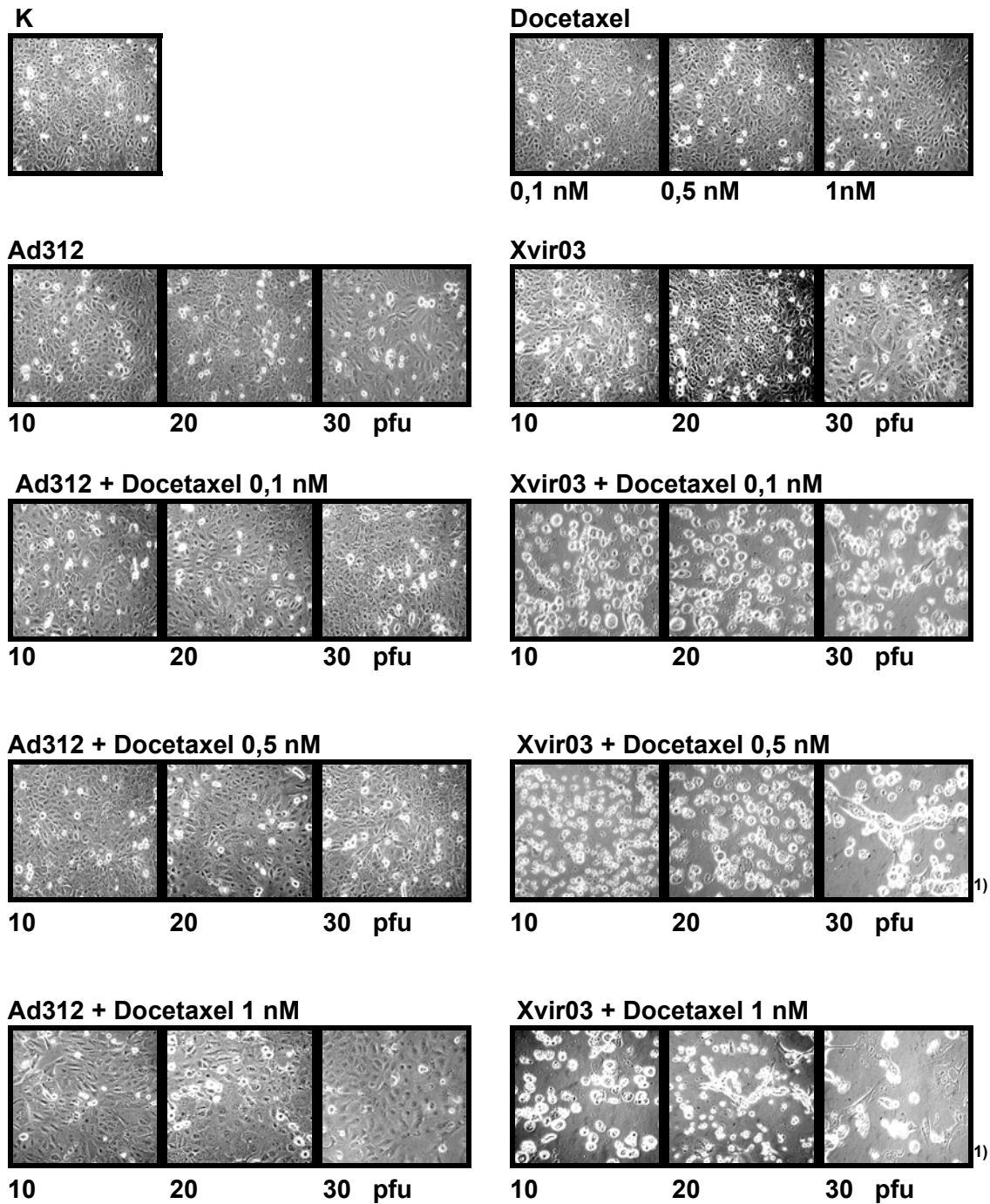


Abb. 37: Lichtmikroskopische Aufnahmen der PC3 Zellen nach Infektion mit Ad312 oder Xvir03 und Inkubation mit Docetaxel (10x Vergrößerungen, 1) = 20x Vergrößerung, pfu Zahlen und Konzentrationen bei jeder Abbildung angegeben)

Die Kontrolle, Ad312 allein und Docetaxel zeigten unter dem Lichtmikroskop einen im Wesentlichen unbeeinträchtigten Zellrasen, der gleichmäßig gewachsen war. Bei Xvir03 konnte man ab 30 pfu schwache Anzeichen der Lyse und Replikation erkennen. Anzeichen eines wirklichen zytopathischen Effekts waren für Ad312 in Kombination mit Docetaxel auch ab 30 pfu Virus und 1 nM Zytostatikum kaum auszumachen.

Xvir03 in niedrigster pfu Zahl und Docetaxel in geringster Konzentration zeigten von vornherein ein anderes Bild als die vorhergehenden Bilder der einzelnen Komponenten. Deutlich waren abgerundete, lysierte Zellen zu erkennen, der Zellverband wirkte völlig aufgelöst und nur vereinzelt waren am Boden noch adhärente Zellen zu beobachten, die aber meist schon die typische Abrundung und Lichtbrechung der virusinfizierten Zelle zeigten. Auch der in der Kristallviolett färbung offensichtliche Anstieg des zytopathischen Effekts mit Erhöhung der Konzentration und pfu Zahl ließ sich unter dem Lichtmikroskop nachvollziehen.

Aufgrund des bei Xvir03 von Anfang an so deutlich vorhandenen Effekts wurde in den folgenden Versuchen die pfu Zahl niedriger gewählt und die Inkubationszeit des Zytostatikums variiert.

4.5.5 Effektive Zellyse durch Xvir03 in Kombination mit Irinotecan in PC3 Zellen

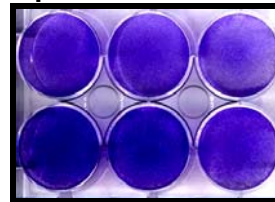
PC3 Zellen

Kontrolle



Xvir03

1 pfu

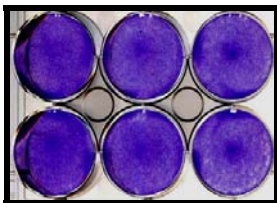


12 h

48 h

0,5 1 5 μ M Irinotecan

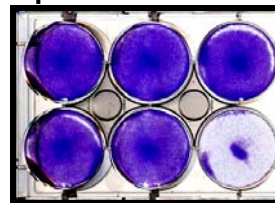
Xvir03



1 5 10pfu

Xvir03

5 pfu

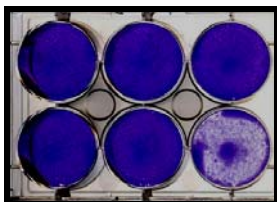


12 h

48 h

0,5 1 5 μ M Irinotecan

Irinotecan



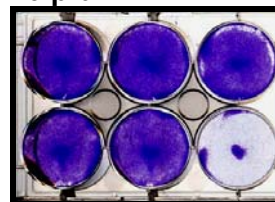
12 h

48 h

0,5 1 5 μ M

Xvir03

10 pfu



12 h

48 h

0,5 1 5 μ M

Abb. 38: Kristallviolettffärbung der mit Xvir03 und Irinotecan inkubierten PC3 Zellen (pfu Zahlen und Konzentrationen bei jeder Abbildung angegeben)

Nach Infektion von PC3 Zellen mit Xvir03 allein zeigte sich bei 1 pfu eine verringerte Zellzahl von 90,8%, die sich bis auf 77,5% bei 10 pfu reduzierte. Für Irinotecan konnte erst ab einer Konzentration von 5 μ M und einer Inkubation

von 12 h ein nennenswerter Effekt mit einer Überlebensrate von 86,2% beobachtet werden.

Eine Verdoppelung der Inkubationszeit führte auch zu einer höheren Zelllyse mit nur 66,6% Zellüberlebensrate nach Inkubation mit 5 μ M Irinotecan.

Auch bei der Kombination mit Xvir03 führte erst eine Erhöhung der Irinotecan Konzentration auf 5 μ M zu einer weiteren Verringerung der Zellüberlebensrate auf 88,6%.

Bei den niedrigeren Konzentrationen von Irinotecan reduzierte die Verdopplung der Inkubationszeit die Zellzahl (94%) bei gleicher pfu Zahl von Xvir03 nicht wesentlich, auch bei 5 μ M Irinotecan war mit 88,2% überlebenden Zellen kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

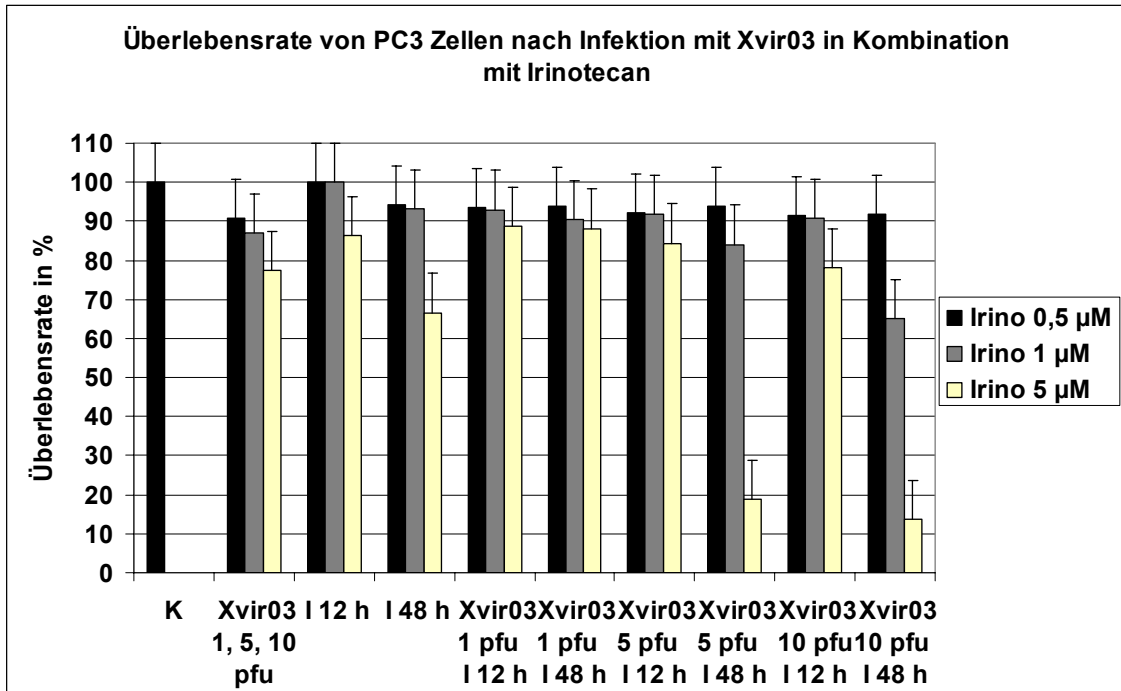
Eine Inkubationszeit von 48 h für Irinotecan bei einer Konzentration von 1 μ M führte zusammen mit 5 pfu Xvir03 zu einer Reduktion auf 84,1%. Fügte man 5 μ M Irinotecan zu 5 pfu Xvir03 erreichte man bei derselben Inkubationszeit von 48 h einen wirklich signifikanten Effekt mit einer Zahl von nur 18,85% überlebenden Zellen.

Betrug die Inkubationszeit jedoch nur 12 h brachte eine Kombination mit 10 pfu Xvir03 keine wesentlichen Vorteile: bei 0,5 μ M Irinotecan überlebten 91,5%, bei 1 μ M 90,8% und 5 μ M ließen 77,99% der Zellen unbeeinträchtigt.

Anders sah es aus bei 48 h Inkubation: zwar überlebten noch 91,89% aller Zellen 0,5 μ M Irinotecan, bei 1 μ M waren es nur noch 65,02%.

Eine Erhöhung der Irinotecan Konzentration auf 5 μ M mit einer Inkubationszeit von 48h und in Kombination mit 10 pfu Xvir03 führte zum deutlichsten und signifikantesten zytopathischen Effekt, d.h. eine Verringerung der Zellzahl auf 13,7%.

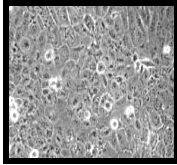
So konnte gezeigt werden, dass Irinotecan unterhalb seines IC_{50} Wertes zusammen mit Xvir03 in einer pfu Zahl, die normalerweise weniger als 50% der Zellen zu töten vermag, PC3 Zellen besser und effektiver lysieren konnte. Auch hier wurden die in der Kristallviolett färbung sichtbaren Effekte unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.



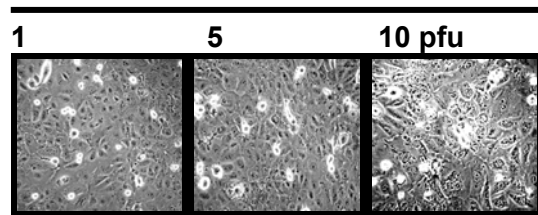
Tab. 29: Quantifizierung der Überlebensrate von PC3 Zellen nach Infektion mit Xvir03 in Kombination mit Irinotecan (Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

4.5.6 Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Xvir03 infizierten und mit Irinotecan inkubierten PC3 Zellen

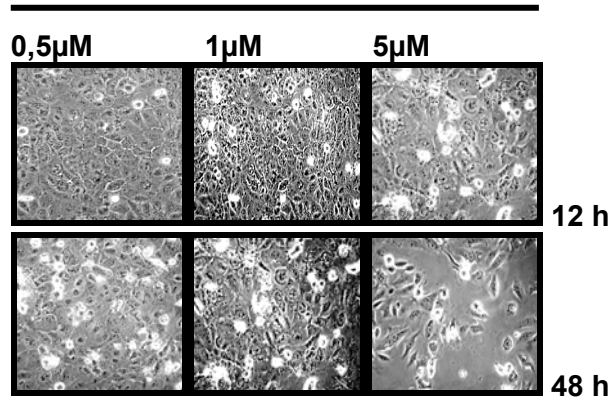
Kontrolle



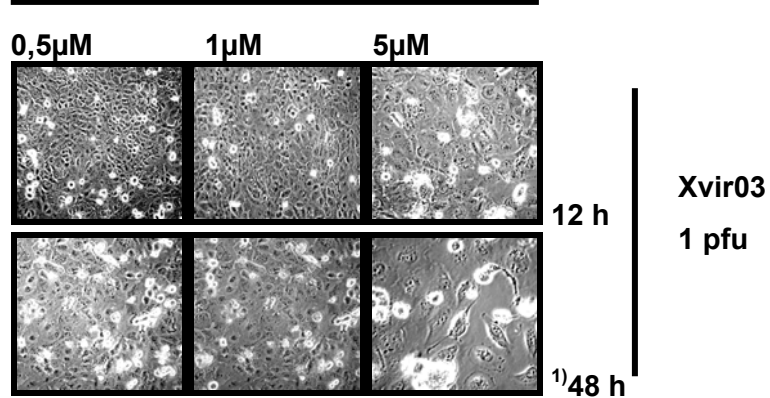
Xvir03



Irinotecan



Irinotecan



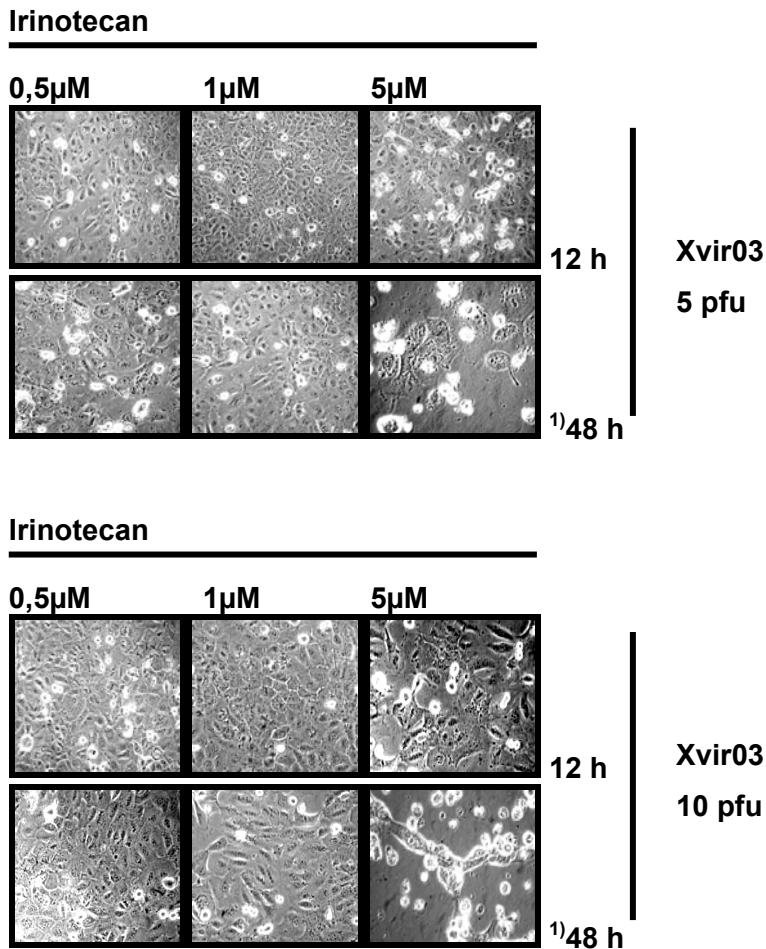


Abb. 39: Lichtmikroskopische Aufnahmen der PC3 Zellen nach Infektion mit Xvir03 und Inkubation mit Irinotecan in unterschiedlichen Kombinationen (Lichtmikroskopie, 10x Vergrößerung, 1) = 20x Vergrößerung, pfu Zahlen und Konzentrationen bei jeder Abbildung angegeben)

Die Konzentrationen für Irinotecan wurden mit 0,5, 1 und 5 µM zumindest für den letzten Wert etwas über den ermittelten IC₅₀ Werten angesetzt um einen möglicherweise noch deutlicheren zytopathischen Effekt zu erzielen.

Unter dem Lichtmikroskop zeigten die Kontrollen einen gleichmäßigen, ebenen Zellrasen ohne Unterbrechungen. Lediglich in der 20x Vergrößerung konnte man bei 10 pfu Xvir03 kleinere Anzeichen für verstärkte Lichtbrechung und abgerundete Zellen entdecken.

In Kombination mit Xvir03 waren zwar bei 5 µM für 12 h schon kleine Auffälligkeiten zu sehen, deutliche zytopathische Effekt Zeichen ließen sich aber erst nach 48 h lichtmikroskopisch nachweisen und überraschten durch ihre

Deutlichkeit im Vergleich zur Kristallviolettffärbung. Auch bei 5 pfu Xvir03 konnten in Kombination mit Irinotecan nur ab 5 μM und Inkubation für 48 h deutliche Zeichen der Virusreplikation und Lyse unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Diese standen im Einklang mit den Ergebnissen der Kristallviolettffärbung.

10 pfu Xvir03 zeigten zusammen mit 0,5 oder 1 μM Irinotecan kaum einen Effekt, hingegen erreichte dieselbe pfu Zahl mit 5 μM eine Verringerung der Zelldichte und Abrundung der Zellen schon bei einer Inkubationszeit von 12 h. Bei 0,5 μM konnte durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h kein zusätzlicher Effekt erzielt werden, während bei 1 μM Irinotecan immerhin eine Auflockerung der Zellrasens und stellenweise Lysezeichen zu erkennen waren. Am deutlichsten trat der synergistische Effekt unter dem Lichtmikroskop jedoch bei 10 pfu Xvir03 und 5 μM Irinotecan für 48 h hervor.

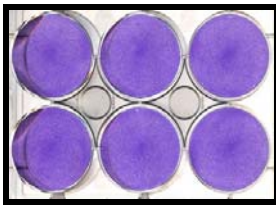
4.5.7 Effektive Zelllyse durch Xvir03 in Kombination mit Daunorubicin in DU145 Zellen

Nachdem sich für Irinotecan oberhalb der IC_{50} Werte kein signifikant besserer Effekt in Kombination mit Xvir03 gezeigt hatte, wurden für die Versuchsreihe der DU145 Zellen mit Daunorubicin die Konzentrationen unterhalb der IC_{50} Werte gewählt.

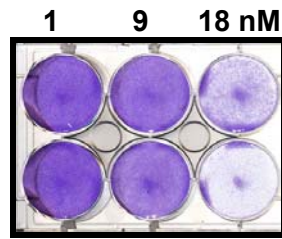
Die höchste Konzentration von 18 nM Daunorubicin vermochte nach 48h die Zellzahl auf 80,83% zu reduzieren. Die höchste pfu Zahl Xvir03 konnte diese auf immerhin 77,76% verringern.

Bereits 1 pfu Xvir03 konnte in Kombination mit 18 nM Daunorubicin eine Zellüberlebensrate von nur noch 25,45% nach 12 h bzw. 12,92% nach 48 h erreichen. Ein deutlich supraadditiver Effekt gegenüber den Werten, die Xvir03 und Daunorubicin allein erzielten. 5 und 10 pfu Xvir03 konnten den Effekt nur noch ein wenig verstärken und erreichten Zellüberlebensraten von 14,5 und 13,6% nach 12 h sowie 8,92 und 5,89% nach 48 h.

Kontrolle

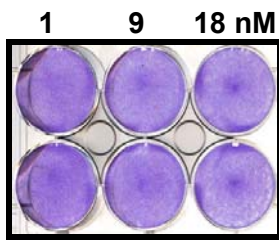


Daunorubicin



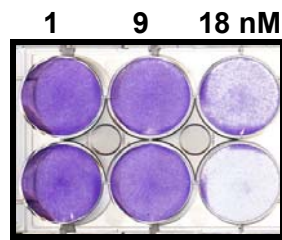
12 h | Xvir03
48 h | 1 pfu

Daunorubicin



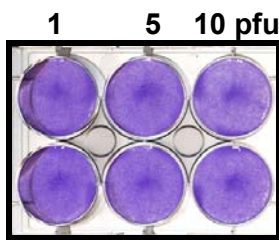
12h
48h

Daunorubicin

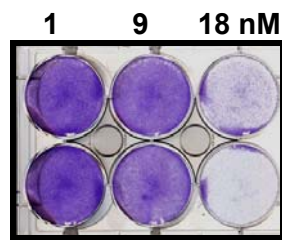


12 h | Xvir03
48 h | 5 pfu

Xvir03

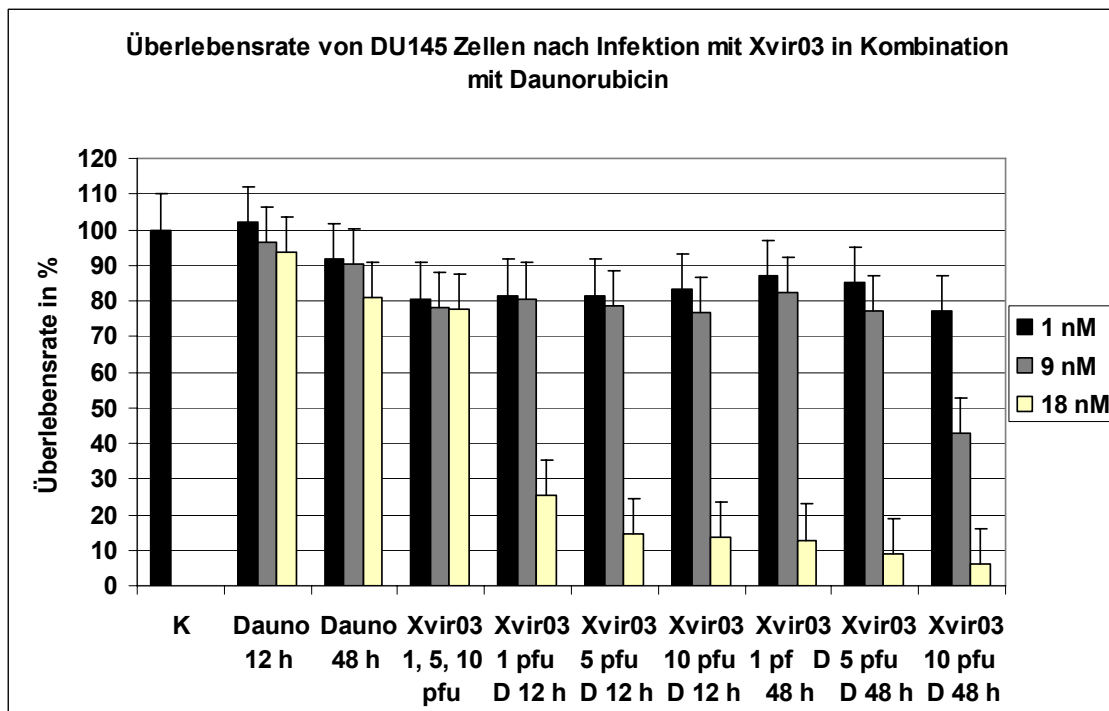


Daunorubicin



12 h | Xvir03
48 h | 10 pfu

Abb. 40: Kristallviolettffärbung von DU145 Zellen nach Infektion mit Xvir03 und Daunorubicin in unterschiedlichen Konzentrationen (pfu Zahlen und Konzentrationen bei jeder Abbildung angegeben)



Tab. 30: Quantifizierung der Überlebensrate von DU145 Zellen nach Infektion mit Xvir03 in Kombination mit Daunorubicin (Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten gemittelt, Standardabweichung angegeben)

5 Diskussion

5.1 Der Einsatz von adenoviralen Vektoren in der Gentherapie

Die Therapie von Tumorerkrankungen wird heutzutage vor allem durch die Resistenzentwicklung limitiert. Insbesondere die nach der chirurgischen Resektion bei vielen Tumorarten oftmals erforderlichen Zusatztherapien wie Chemo- oder Radiotherapie stoßen aufgrund ihrer Toxizität immer wieder an die Grenzen des Machbaren. Die Effektivität dieser Therapien zu erhöhen ohne gleichzeitig die toxischen Nebenwirkungen zu verstärken ist eine der wichtigsten Zielsetzungen in der onkolytischen Tumorthherapie.

Seit längerem wird auf dem Gebiet der viralen Gentherapie nach Möglichkeiten geforscht, diese möglichst selektiv und spezifisch zur Replikation und Zerstörung in Tumorzellen einzusetzen. Die bereits zuvor beschriebenen Möglichkeiten umfassen den Einsatz gewebespezifischer Promotoren in Vektorsystemen [68, 168, 226], p53 abhängige Vektoren [17], Adenoviren, die selektiv in Zellen mit defektem pRb Signalweg replizieren [51, 73] sowie YB-1 abhängige, onkolytische Viren [77, 78]. Insbesondere für die Selektivität der verwendeten Vektoren ist eine genaue Kenntnis des adenovirale Genoms und seiner Regulation unerlässlich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der adenovirale E2 late Promoter stärker und deutlicher als E2 early bei Replikation von E1A deletierten Adenoviren in verschiedenen Tumorzellen aktiviert wird und dies auch für den Wildtyp Adenovirus Ad5 nachweisbar ist. Zudem konnte bei dl520 eine deutliche Korrelation zwischen MOI der Adenoviren und Aktivierung der E1B55K und E4orf6 Gene hergestellt werden, die sich allerdings nicht eins zu eins in der Anzahl der Viruspartikel widerspiegelte. $\Delta 24$ hingegen zeigte eine gleich bleibend hohe Expression dieser beiden Gene, unbeeinflusst von der MOI. Basierend auf diesen und anderen in der Arbeitsgruppe Holm erhobenen Erkenntnissen wurde der E1A unabhängige Vektor Xvir03 entwickelt, der nur über E1B55K und E4orf6 unter Kontrolle eines CMV Promotors verfügte und in verschiedenen Tumorzellen erfolgreich replizieren und virale Lyse auslösen

konnte. Nach Infektion mit Xvir03 wurde YB-1 im Kern nachweisbar. Auch die Expression der Vielfachresistenzgene *MDR* und *MRP* verringerte sich. In Kombination mit Zytostatika zeigte er eine deutliche Steigerung des zytopathischen Effekts. Somit wurde ein neuer, vielversprechender Ansatz gefunden, vielfachresistente Tumorzellen durch einen YB-1 abhängigen, onkolytischen Adenovirus in Kombination mit üblichen Standardtherapien abzutöten.

5.2 Die Aktivierung der E2 Gene durch die untersuchten Vektoren

5.2.1 Ad312

Die hier zuerst getesteten Viren Ad312, dl520 und $\Delta 24$ sind schon in vielen Aspekten untersucht und beschrieben worden.

Ad312 wurde 1979 erstmals von Shenk und Jones beschrieben [91]. Er vermag E2F nicht zu aktivieren und seine Wirkung in Tumorzellen wird als nur schwach lytisch beschrieben.

Es ist jedoch bekannt, dass der E1A deletierte Ad312 bei hoher MOI auf einem E1A unabhängigen Weg in Tumorzellen zu replizieren vermag [142, 186]. Holm et. al. konnten zeigen, dass sowohl Ad312 als auch dl520 vielfachresistente Tumorzellen, bei denen YB-1 im Kern akkumuliert [6], lysieren kann [78]. Da Ad312 E2F nicht aktivieren kann, könnte diese Replikation durch den E2 late Promotor gesteuert sein. Zumal eine Ad312 Infektion mit hohen MOI zu einer diffusen Anhäufung von YB-1 im Kern führt [77]. Eine Erklärung dieser Korrelation zwischen E1A unabhängiger Replikation bei hohen MOI und gleichzeitiger Anhäufung von YB-1 im Kern könnte der Replikationsweg über den E2 late Promotor liefern.

Da MOI über 100 pfu/Zelle auch zur Partikelbildung führt, kann man schlussfolgern, dass der MLP Promotor die späten adenoviralen Gene ausreichend exprimieren kann. Der unzureichende zytopathische Effekt und die fehlende Freisetzung der viralen Partikel sind vermutlich auf die nicht ausreichende Expression des E3-ADP Gens trotz Aktivierung des MLPs zurückzuführen [56, 203]. Sowohl die Kristallviolett-färbungen als auch die

quantitativen Analysen und die lichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigten diese zuvor durch andere Arbeitsgruppen erhobenen Ergebnisse (Abb. 11-14, 27-28). Insbesondere ist zu berücksichtigen, dass auch in hier verwendeten vielfachresistenten Zelllinien keine MOI über 100 erreicht wurde. Der Vektor diente hier lediglich in seinem Unvermögen E2F zu aktivieren als Kontrolle für den E1A deletierten Vektor Xvir03. Die zuvor angesprochenen Ergebnisse unterstützen die These der E2 late vermittelten Replikation, ihr endgültiger Beweis war und konnte jedoch nicht das Ziel dieser Arbeit sein.

5.2.2 dl520

Der Vektor dl520 wurde unter anderem von Mymryk 1994 eingehend beschrieben [138]. Er weist eine Deletion der CR3 Domäne des E1A Gens auf und kann daher nur eine verkürzte 12S mRNA produzieren. Nur das vollständige 13S Protein aktiviert die viralen E2-E4 Gene [45, 46, 177]. Daher ist er als replikationsdefizienter Virus zu betrachten, obwohl er in Abhängigkeit von der Zelllinie auch den viralen E2 early Promotor aktivieren kann [89, 137]. Das 12S Protein vermag zumindest Gene der späten G2-Phase zu aktivieren, insbesondere Cyclin A [229].

Generell kann dieser Vektor ab einer MOI über 50 durchaus zur Zellyse führen. Zuletzt richtete sich besonderes Augenmerk auf seinen therapeutischen Effekt in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie [16]. Übereinstimmend mit der bisher verfügbaren Literatur konnte dl520 in allen drei Zelllinien erst ab 50 pfu einen deutlichen lytischen Effekt induzieren, der sich sowohl quantitativ als auch lichtmikroskopisch bestätigen ließ (Abb. 11-14). Der direkte Vergleich zu $\Delta 24$ in der Aktivierung von E4orf6 und E1B55K wird unter Absatz 5.3 besprochen.

5.2.3 $\Delta 24$

$\Delta 24$, zuerst im Jahr 1991 beschrieben [177] und durch eine kurze Deletion in der CR2-Domäne charakterisiert, die eine pRB abhängige Replikation bedingt, wurde ebenfalls eingehend studiert. So bietet sich dieses Virus gerade für Glioblastome an, bei denen überproportional häufig die pRB und p53

Signalwege defekt sind [30]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass $\Delta 24$ in verschiedenen Tumorzelllinien repliziert, während in gesunden Zellen keine Vermehrung stattfindet [73]. Auch wurde die Infektiosität des Vektors schon durch Einfügen eines RGD Motivs verbessert [106] und seine erhöhte Wirksamkeit in Kombination mit Irinotecan gezeigt [59].

Der direkte Vergleich dieser drei Viren zeigte, dass $\Delta 24$ in jeder Zelllinie am besten replizierte und lysierte (Abb. 11-14). Auch hier zeigte die quantitative und lichtmikroskopische Überprüfung das gleiche Ergebnis.

Damit bestätigen die bisherigen Versuche die Ergebnisse der Literatur, die im hier gezeigten direkten Vergleich eine deutliche Überlegenheit von $\Delta 24$ erwarten ließen.

Bei allen drei Vektoren handelte es sich um im E1A Gen veränderte Vektoren, deren Replikationsmechanismus über E1A und E2F an verschiedenen Punkten gestört war. Dennoch unterschieden sie sich teils bis zum 100 fachen in ihrer Potenz Zellen zu lysieren. Da $\Delta 24$ am effektivsten zur Zelllyse führte, wurde er auf seine Replikationskinetik untersucht.

5.2.4 Kinetik der E2 early und E2 late Aktivierung

Erste Hinweise ergaben im Northern Blot, dass der E1A abhängige über E2F aktivierte E2 early Promotor [100, 101, 115-117] nicht so früh und nicht so stark exprimiert wurde, wie bisher angenommen. Der E2 late Promotor war übereinstimmend mit bisherigen Erkenntnissen erst 6 h nach Infektion nachweisbar [26, 58, 196], dies aber im semiquantitativen Northern Blot Nachweis wesentlich stärker als E2 early (Abb. 17-19). Erstaunlich war jedoch, dass sich das E2 early Gen erst nach 12 h überhaupt nachweisen ließ. In der quantitativen Auswertung lagen die E2 late Signale jeweils deutlich über den E2 early Signalen (Tab. 4-6).

Desweiteren ließen sich diese Ergebnisse für den Zeitpunkt 3 h nach Infektion auch durch eine semiquantitative RT-PCR in HeLa und U2OS Zellen bestätigen (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine später durchgeführte quantitative Analyse mittels TaqMan RT-PCR zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen E2 early und E2 late (Holm P.S., persönliche Mitteilung).

Die Ergebnisse des Northern Blots deuten darauf hin, dass das E2 late Gen früher und vor allem stärker aktiv ist als bisher angenommen, während E2 early zwar nach 3 h aktiviert wird, die transkribierte RNA in ihrer Menge aber so gering ist, dass sie im Northern Blot nicht nachweisbar ist. Da die TaqMan Analyse diesem Befund zu widersprechen scheint, könnte man sich vorstellen, dass E2 early zwar am Anfang aktiv ist, jedoch nur in geringen Mengen unterhalb der Nachweisgrenze benötigt wird, um das E2 late Gen zu aktivieren, das quantitativ, aber eventuell auch qualitativ, eine wesentlich größere Rolle für die adenovirale Replikation spielt als bisher angenommen. Natürlich handelt es sich hier um Untersuchungen mit E1A deletierten oder mutierten adenoviralen Vektoren in Tumorzellen. Doch auch für den Wildtyp Adenovirus konnte dieses Ergebnis (Abb. 20) nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen müssen also klären, ob dieses Prinzip möglicherweise auf die allgemeine adenovirale Replikation anwendbar ist. Eine negative Beeinflussung der quantitativen Auswertung durch die Verwendung des Gels als Ladekontrolle ist prinzipiell nicht auszuschließen. Insbesondere die fehlende Bestätigung der Ergebnisse durch die RT-PCR lässt diese Möglichkeit zu. So wurde, wie unter 5.5.1 ausgeführt, im weiteren Verlauf ein so genanntes „house keeping“ Gen, GAPDH, welches in gleich bleibender Menge kontinuierlich exprimiert wird, ausgewählt, um eine validere Quantifizierung der Ergebnisse zu gewährleisten. Zu diskutieren wäre jedoch auch, ob es sich um ein durch die Auswahl der Sonden bedingtes Ergebnis handelt. Da jedoch beide jeweils nur ihren spezifischen Abschnitt im E2 Gen nachweisen, kann dies ausgeschlossen werden.

Insbesondere wären spezifischen Deletionen der beiden Promotoren und erneute Kinetikanalysen von Interesse. Dies dürfte sich aufgrund der beidseitigen Ableserichtung der adenoviralen DNA etwas schwierig gestalten, da man beispielsweise bei Deletion des E2 early Promotors automatisch die Expression der späten Gene beeinflussen würde.

5.3 Die besondere Rolle von E1B55K und E4orf6

E1B55K bringt zusammen mit E4orf6 den Transkriptionsfaktor p53 ins Zytoplasma, wo dieser degradiert und abgebaut wird. So wird der ansonsten durch p53 induzierten Apoptose entgegengewirkt [125, 161-163, 218]. Neuere Ergebnisse haben allerdings gezeigt, dass diese Apoptose nicht unbedingt hinderlich für die adenovirale Replikation sein muss [75].

In der späten Phase unterstützen beide die Anhäufung von viraler mRNA, indem sie diese für die virale Partikelproduktion vom Nukleus ins Zytoplasma transportieren [4]. Beide spielen eine wichtige Rolle bei der E1A unabhängigen adenoviralen Replikation [214].

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass YB-1 den E2 late Promoter durch seine Translokation in den Kern mit Hilfe von E1B55K und E4orf6 aktivieren kann [77] und man für $\Delta 24$ eine deutlich stärkere E2 late Aktivität als bisher angenommen nachwies, musste man natürlich annehmen, dass E1B55K und E4orf6 hier eventuell eine wichtige Rolle spielten. Es stellte sich heraus, dass geringe MOI $\Delta 24$ ausreichen, um sowohl eine starke Transkription von E1B55K als auch von E4orf6 zu induzieren (Abb. 21, Tab. 8). Im Gegensatz hierzu konnten geringe MOI dl520 beide Faktoren nur ungenügend aktivieren. Erst bei hohen MOI dl520 konnten beide wieder in gleichem Maße wie selbst bei niedrigen MOI $\Delta 24$ nachgewiesen werden (Abb. 22). Dies wurde durch die quantitativen Auswertungen bestätigt (Tab. 9).

Auch wenn man davon ausgehen muss, dass allein höhere MOI selbstverständlich zu einer stärkeren Expression aller adenoviralen Gene führen, zeigt die Betrachtung des Plaque Assays zwar einen Unterschied der Partikelzahl; dieser ist jedoch bei geringen MOI nicht hoch genug um als alleinige Erklärung der unterschiedlichen E1B55K und E4orf6 Genexpressionen zu genügen. Dagegen unterscheiden sich die Titer beider Viren bei hohen MOI nicht mehr (Tab. 10).

Der hohe Titer des Wildtyp Adenovirus könnte unter Umständen eine Kontamination vermuten lassen, da eine so hohe Partikelzahl im Plaque Assay sonst nicht erreicht wurde (Holm, P.S, persönliche Mitteilung).

Zwar ist diese nicht mit vollständiger Sicherheit auszuschließen, jedoch scheine die übrigen Partikelzahlen in ihrer Unterschiedlichkeit nicht durch Wildtyp kontaminiert zu sein. Eine effektivere Aktivierung von E2 late über eine verstärkte E1B55K und E4orf6 Expression müsste zu einer höheren Partikelzahl führen. Da diese Ergebnisse sich zum damaligen Zeitpunkt reproduzieren ließen, kann man einen möglichen anderen Replikationsweg als den hier postulierten nicht ausschließen. Mittlerweile hat eine Wiederholung der Versuchsreihe gezeigt, dass die unterschiedliche Aktivierung der Genexpression sich auch in der Partikelzahl widerspiegelt (Holm, P.S, persönliche Mitteilung). So kann hierbei auch eine eventuelle Kontamination der verwendeten Zellchargen nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die für Ad312 und dl520 effektivere Replikation in vielfachresistenten Zellen [78] ließe sich durch die in diesen Zellen nachgewiesene Anhäufung von YB-1 im Kern erklären [6], die den Transport durch E1B55K und E4orf6 schon nicht mehr benötigt. $\Delta 24$ hingegen kann effizient E1B55K und E4orf6 schon bei kleinen MOI aktivieren, daher E1A unabhängig replizieren und effektiv Tumorzellen lysieren.

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Theorie eines effektiven Replikationswegs abseits des über E2F aktivierten E2 early Gens und lassen hoffen mit dem E2 late Promotor und Hilfe von YB-1, E1B55K und E4orf6 eine Möglichkeit, selektiv Tumorzellen zu zerstören, gefunden zu haben. Insbesondere gilt dies für vielfachresistente Tumorzellen.

5.4 Replikation und Charakteristika von Xvir03

5.4.1 Replikation von Xvir03 in Tumorzellen

YB-1 ermöglicht E1A deletierten Viren die Vermehrung in Tumorzellen mit Induktion eines zytopathischen Effektes und viraler Partikelfreisetzung, indem es direkt die adenovirale Replikation unterstützt [56, 66, 77, 78]. Ausgehend

von diesen Ergebnissen wurde ein Vektor entwickelt, der E1B55K und E4orf6 enthält, aber eine Deletion sowohl des E1 als auch E3 Gens aufweist und somit in Tumorzellen mit überexprimierten YB-1 dieses in den Kern translozieren kann.

Um eine E1A Kontamination unter allen Umständen auszuschließen, wurde die erfolgreiche E1A Deletion durch PCR nachgewiesen (Abb. 24). Somit konnte keiner der beobachteten Effekte auf eine versehentliche Kontamination mit E1A zurückzuführen sein. Zusätzlich wurde ein IRES Element erfolgreich eingefügt (Abb. 25).

Im Vergleich mit Ad312 und dl520 zeigte Xvir03 eine bessere Replikation und Lyse in allen untersuchten Zelllinien, sowohl in der Kristallviolett färbung als auch unter dem Lichtmikroskop (Abb. 26-28). Berücksichtigt man dabei, dass es sich bei Ad312 um einen E1A deletierten Vektor handelt, zeigt die bessere Effektivität von Xvir03, seines Zeichens ebenfalls E1A und E3 deletiert, dass über YB-1 bzw. E2 late eine ausreichende und potente Replikation erfolgen kann. Auch im Vergleich zu dl520, der zwar als replikationsdefizienter Virus anzusehen ist, jedoch durch sein 12S Protein abhängig von der infizierten Zelllinie immerhin die Transkription des E2 early Promotors teilweise in Gang setzen kann [89, 118, 138], zeigte Xvir03 einen größeren zytopathischen Effekt. Die erfolgreiche Replikation ließ sich auch im Southern Blot bestätigen (Abb. 26). Jedoch muss man die Ergebnisse der HeLa Zelllinie kritisch betrachten. Sie unterschieden sich in den einzelnen Versuchsreihen stark in ihrer Lysierbarkeit durch Xvir03 und die gemittelten Werte entsprachen nicht der als einigermaßen repräsentativ ausgewählten Kristallviolett färbung. Dies könnte an der höheren Empfindlichkeit der HeLa Zellen im Vergleich zu den verwendeten vielfachresistenten Tumorzelllinien liegen, die daher vielleicht stärker durch die Dichte des Zellrasens im Vergleich zur Partikelzahl des Virus zum Zeitpunkt der Infektion beeinflusst wurden.

Die Analyse unter dem Lichtmikroskop bestätigte zudem, dass es sich in erster Linie um einen Effekt der viralen Replikation und Lyse handelte (Abb. 28).

Zwar konnte bereits nachgewiesen werden, dass Xvir03 in Fibroblasten auch bei sehr hohen MOI nicht repliziert, für die weiteren Schritte Richtung Klinik ist es jedoch unbedingt erforderlich, den Virus und eine eventuelle Replikation in nicht tumorigenen Zellen zu überprüfen und das Augenmerk insbesondere auf Gefäßzellen zu richten, die bei einer Applikation logischerweise als erste betroffen sind.

5.4.2 Keine Induktion der S-Phase durch Xvir03

Die Interaktion von E1A mit pRb setzt E2F frei und ermöglicht so den Übertritt in die S-Phase, ein wichtiger Schritt in der adenoviralen Replikation ohne den diese an Effektivität verliert [103]. Xvir03 induzierte im Vergleich mit Adenovirus Wildtyp infizierten Zellen keine S-Phase (Abb. 29) in der FACS Analyse. Zum einen konnte so nochmals eine mögliche E1A Kontamination ausgeschlossen werden. Zum anderen zeigten die zytopathischen Effekt Versuche eine starke Replikation und Zelllyse, während Xvir03 aber offensichtlich keine S-Phase inuzieren konnte. Die Replikation scheint in diesem Fall über E1B55K und E4orf6 und deren Mitwirkung bei der Translokation von YB-1 in den Kern zu erfolgen.

5.4.3 Kinetik der E2 early und E2 late Expression bei Xvir03

Auch für Xvir03 konnte die schon zuvor festgestellte Dominanz des E2 late Gens zumindest im Northern Blot nachgewiesen werden.

In DU145 und U2OS Zellen waren die quantitativen Unterschiede zwischen E2 early Gen und E2 late gerade bei den 9 und 12 h Zeitpunkten teilweise bis zu 4fach höher für E2 late. E2 early ließ sich wiederum kaum nach 12h nachweisen und entfaltete seine Signalstärke erst bei 24 h (Abb. 30-31, Tab. 16-17). Unter Berücksichtigung der TaqMan RT-PCR lässt sich dieser scheinbare Widerspruch zur bisherigen Literatur [26, 57]; [196], wie unter 5.2.4 aufgeführt, auflösen, wenn man davon ausgeht, dass auch bei der Replikation von Xvir03 E2 early in geringster Menge für den Beginn benötigt wird, dann jedoch der E2 late Promotor quantitativ überwiegt.

5.4.4 YB-1 Nachweis im Kern nach Infektion mit Xvir03

Die Immunhistochemie zeigte, dass nach Infektion mit Xvir03, im Gegensatz zu nicht infizierten, mit Wildtyp oder Ad312 infizierten Zellen, YB-1 sich im Kern der Zellen anfärben ließ. Bei einem E1B55K deletierten Vektor konnte YB-1 nicht im Kern angefärbt werden [77]. Für AdYB-1 konnte zusammen mit E1B55K nur ein geringer Einfluß auf die virale Partikelbildung nachgewiesen werden, lediglich die Kombination mit zusätzlich E4orf6 führte zu einer starken Erhöhung der Virusproduktion (Holm, P.S., persönliche Mitteilung). Folglich besteht eine Korrelation zwischen E1B55K, E4orf6, im Kern lokalisierten YB-1 und Virusproduktion bzw. -freisetzung.

Von Interesse wäre noch, ob ein E4orf6 deletierter Vektor YB-1 in den Kern treiben kann.

Fest steht, dass mit Xvir03 ein Vektor hergestellt worden ist, der aufgrund seiner E1A unabhängigen Expression in Tumorzellen replizieren kann ohne die S-Phase zu induzieren und dessen Replikation von YB-1 und dem E2 late Promotor wenn nicht abhängig, so doch zumindest aufgrund seiner E1A Deletion mit ihnen assoziiert sein muss.

5.5 Xvir03 und Vielfachresistenz

5.5.1 Abschwächung des *MDR* oder *MRP* Signals durch Xvir03

Viel wurde in den letzten Jahren unternommen um Herr des Problems der Vielfachresistenz von Tumorzellen zu werden [199]. So sind mittlerweile mit Sulindac [146] und Schisandrin B [113, 194] zwei spezifische MRP1-Inhibitoren entwickelt und zum Teil schon in Phase I klinischen Studien getestet worden [146]. Ein Problem bleibt nach wie vor jedoch die zusätzliche Toxizität dieser Mittel, so wurde beispielsweise eine Studie mit dem Inhibitor PC833 bei AML vorzeitig abgebrochen [110]. Außerdem kann der Inhibitor immer nur ein spezifisches Protein hemmen, da *MDR* und *MRP* Proteine nur eine geringe Homologie in ihrer Struktur aufweisen [206, 207].

Einzelne Tumorarten haben jedoch meistens auch unterschiedliche molekulare Grundlagen für ihre Vielfachresistenz [35, 62, 94], so dass kaum ein allgemein wirksames Medikament gegen Vielfachresistenz gefunden werden kann. Daher scheint es viel versprechend zu sein, sich auf die Promotoren beider Gene zu konzentrieren, die ihrerseits immerhin eine Gemeinsamkeit aufweisen können: sie werden alle über Y-Boxen gesteuert [112, 148, 151].

Hierbei boten sich insbesondere die Prostatakarzinom DU145 und PC3 Zellen an, die eine Überexpression von *MRP 1* aufweisen [32], sowie die 257 RDB Zellen, bei denen die Vielfachresistenz auf *MDR* Expression zurückzuführen ist [35]. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass Xvir03 in diesen Zellen erfolgreich replizierte, zeigte sich im Northern Blot eine Abschwächung des *MRP* bzw. *MDR* Signals in Xvir03 infizierten DU145, PC3 und 257RDB Zellen (Abb. 33-35). Die Abschwächung des *MRP* Signals auf Northern Blot Ebene betrug bis zu 70% (Abb. 33,34). Durch die nachfolgende Hybridisierung mit GAPDH konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um eine generelle Herunterregulierung des Wirtszellstoffwechsels durch den Virus handelte, da dieses Signal unbeeinträchtigt war.

Obwohl schon verschiedenste Systeme mit *MDR/MDR* Inhibitoren [146, 194] und Ribozymen [102, 127, 153] untersucht wurden, kam es bisher noch zu keinem entscheidenden Erfolg gegenüber vielfachresistenten Tumorzellen bzw. es blieb das Problem bestehen, dass diese Stoffe jeweils nur eine Form der Vielfachresistenz bezwingen konnten. Durch die hier gezeigten Ergebnisse eröffnet sich vielleicht die Möglichkeit über gezielten Angriff an den Promotoren beide Gene der Vielfachresistenz ausschalten zu können. So könnte sich der gezeigte Effekt durch den über E1B55K und E4orf6 erfolgenden Transport von YB-1 in den Kern und der dortigen Verwendung für die Aktivierung des E2 late Promotors und damit für die adenovirale Replikation erklären lassen, da dieses danach für die Aktivierung der *MDR/MDR* Gene nicht mehr zur Verfügung steht. Ein direkter Beweis dieser Abhängigkeit steht noch aus, jedoch konnte mittlerweile bereits gezeigt werden, dass die Reduktion der *MDR/MDR* Gene auch auf Proteinebene stattfindet [121]. Somit ist die Weiterentwicklung dieses Ansatzes bis hin zu klinischen Studien vielversprechend.

5.6 Kombinationstherapie

5.6.1 Kombination von adenoviralen Vektoren mit Zytostatika

Bald nach den ersten Erfolgen in der adenoviralen Gentherapie begann man adenovirale Vektoren mit den gängigen Therapieschemata der Krebsbehandlung zu kombinieren [48, 145, 208]. Es zeigte sich ein additiver bis supraadditiver Effekt für die meisten Kombinationen [59, 226]. Selbst eine Kombination aus Bestrahlung, Chemotherapie und adenoviraler Gentherapie konnte deutliche Erfolge ohne übermäßige Steigerung der Toxizität erzielen [47].

Die Ursachen des additiven Effekts der Kombinationstherapie sind nicht ganz klar: es wird diskutiert, dass Bestrahlung oder Chemotherapie zusätzlich Apoptose induzieren können oder generell ein begünstigendes Umfeld für die virale Replikation schaffen [74, 226, 228]. Beide Therapien führen zu einer verstärkten Expression von YB-1 und zu dessen Kernlokalisierung [16]. Es konnte aber für $\Delta 24$ auch eine direkte Erhöhung der Topoisomerase I Aktivität und konsekutiv eine verbesserte Irinotecan Wirkung nachgewiesen werden [59].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde Xvir03 in dieser Arbeit in Kombination mit in der Klinik gebräuchlichen Chemotherapeutika kombiniert und in vitro getestet.

5.6.2 Xvir03 und Docetaxel in PC3 Zellen

Docetaxel, dessen direkter Einfluss auf den Zellzyklus über Cyclin bereits nachgewiesen wurde [44, 133], gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Therapie des nicht androgen abhängigen Prostatakarzinoms [189].

Folglich wurde Docetaxel zusammen mit Xvir03 in einer Kombinationstherapie getestet. Der im Vergleich zu DU145 niedrigere IC_{50} Wert von 3,1 nM ließ eine Kombination mit PC3 Zellen besonders vorteilhaft erscheinen. Die vergleichsweise hohen 10, 20 und 30 pfu Zahlen wurden mit Konzentrationen deutlich unterhalb der ermittelten IC_{50} Werte kombiniert, wobei es sich als

günstiger erwies, Docetaxel erst 24 h nach der Infektion zuzugeben (Ergebnisse nicht gezeigt), was nicht im Widerspruch zu bisherigen Erkenntnissen steht [226], [36, 114]. Im Gegensatz zu Ad312 konnte für Xvir03 in Kombination mit Docetaxel ein additiver bis supraadditiver Effekt in PC3 Zellen nachgewiesen werden. Schon bei 10 pfu Xvir03 reduzierte sich die Zellüberlebensrate um weitere 35% verglichen mit Ad312 oder Docetaxel alleine. Überraschend war, dass bereits ab 0,1 nM, also ab einem Zehntel der höchsten hier eingesetzten Konzentration, eine verminderte Anfärbung im Kristallviolettversuch nachweisbar war. Diese ließ sich in solch ausgeprägter Form nicht in den lichtmikroskopischen Aufnahmen verifizieren. Möglicherweise handelte es sich hierbei um eine Varianz der PC3 Zellen in ihrer Anfärbung durch Kristallviolett, die in diesem Fall nicht eins zu eins die realen lichtmikroskopischen Verhältnisse wiedergibt. Zudem weist die Beobachtung, dass PC3 Zellen trotz erfolgter Lyse oft noch ein wenig adhären sind und erst durch mehrmalige Spülung sich vollständig ablösen lassen, auf eine mögliche eingeschränkte Aussagekraft der Kristallviolett-färbung für diese Zelllinie hin.

Yu et. al. konnten schon 2001 zeigen, dass eine Kombination aus CV708, ein mit einem prostataspezifischen Promotor versehener adenoviraler Vektor, und Docetaxel sowohl in vitro als auch in vivo einen synergistischen Erfolg zeigte und gleichzeitig die p53 Expression steigerte ohne die Toxizität zu erhöhen [226]. Die dort verwendeten Konzentrationen sind mit 3,12 nM für Docetaxel den hier erhobenen Daten vergleichbar. Ähnliche Ergebnisse liegen mittlerweile auch für CG7870 vor [36, 180]. Die Kombination aus Xvir03 und Docetaxel wurde mittlerweile in der Arbeitsgruppe Holm auch im in vivo Tumormodell mit Nacktmäusen erfolgreich getestet [121].

5.6.3 Xvir03 und Irinotecan in PC3 Zellen

In Kombination mit dem Topoisomerase I Hemmer Irinotecan wurden die pfu Zahlen auf 1, 5 und 10 festgelegt, die Konzentrationen jedoch zum Teil bis über den ermittelten IC_{50} Wert gesteigert, da in vergleichbar niedrigen Konzentrationen wie bei Docetaxel kein Effekt zu erzielen war (Ergebnisse nicht gezeigt).

In Kombination mit der höchsten MOI zeigte sich erst bei einer Konzentration über dem IC_{50} Wert ein deutlicher additiver Effekt. Man konnte folglich bei der Kombination beider Substanzen durch sorgfältiges Titrieren unterhalb jeder einzelnen Toxizitätsgrenze bleiben und dennoch einen additiven Effekt erreichen. In diesem Fall war die MOI von Xvir03 deutlich erniedrigt worden, während Irinotecan über den IC_{50} Wert gesteigert wurde. Desweiteren ergab sich bei einer Inkubationszeit von 48 h ein verstärkter Effekt mit einer zusätzlichen Reduktion überlebender Zellen um bis zu 60% (Abb. 38, 39). Unter Berücksichtigung des Sulfrhodamintests überraschte dies eher, da sich hierbei unabhängig vom Zytostatikum die PC3 Zellen relativ unbeeinflusst von der verlängerten Inkubationszeit zeigten. In Kombination mit Xvir03 spielte aber gerade dies eine signifikante Rolle beim Erreichen des additiven Effekts. Es kann sich bei den Ergebnissen der IC_{50} Werte natürlich auch um einen statistischen Fehler handeln, da dieser auch bei drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen nicht vollständig auszuschließen ist. Logischer erscheint jedoch, dass gerade hier der additive Effekt durch Angriff an zwei Punkten zum Tragen kommt: Irinotecan vermag seine toxische Wirkung auch bei längerer Inkubation nicht weiter zu steigern, in Kombination mit Xvir03 zeigt sich jedoch eine Verstärkung, vermutlich bedingt durch die Replikation des Virus, die mit zunehmender Inkubationszeit mehr Zellen erreicht.

Der mit Irinotecan erzielte zytopathische Effekt war den vorhergehenden vergleichbar, wenn man die veränderten Konzentrationen und pfu Zahlen berücksichtigte, so dass sich dieser auch mit Zytostatika anderer Wirkstoffklassen reproduzieren lassen sollte [59].

5.6.4 Xvir03 und Daunorubicin in DU145 Zellen

Für das interkalierende Zytostatikum Daunorubicin wurden die Konzentrationen wiederum deutlich unterhalb der IC_{50} Werte gewählt und nach Reduktion der pfu Zahlen (Ergebnisse nicht gezeigt) ließ sich bereits bei 1 pfu ein deutlicher Effekt nachweisen. Dieser verstärkte sich weiter bei einer verlängerten Inkubationszeit von 48 h, zeigte jedoch keinen zusätzlichen signifikanten Anstieg bei Erhöhung der MOI. Lediglich bei 10 pfu Xvir03 und 48 h Inkubation konnte eine leichte

Auflockerung des Zellrasens bei 9 nM Daunorubicin nachgewiesen werden. Daunorubicin hat in bisherigen Versuchen bei einer Konzentration von 10 ng/ml deutliche Effekte gezeigt [114]. Im gleichen Bereich liegen die in dieser Arbeit ermittelten additiven Effekte mit 18 nM als Optimum für die Kombination mit 10 pfu Xvir03. Es bleibt abzuwarten, ob Daunorubicin eventuell auch im Mausversuch erfolgreich sein könnte.

5.7 Ausblick

Zukünftig werden Krebserkrankungen durch das steigende Lebensalter und die besser werdende Diagnostik immer häufiger und früher entdeckt werden. Neben effektiven Therapien, die die Mortalität senken, muss langfristig auch die Lebensqualität der überlebenden Patienten verbessert werden. So geht man zunehmend zu multimodalen Therapieschemata über, die den Tumor gleichzeitig an mehreren Stellen durch unterschiedliche Mechanismen angreifen.

Hierbei können Adenoviren einen wichtigen Beitrag leisten. Momentan ist die adenovirale Vektorentherapie aber noch limitiert durch mangelnde Effizienz der Infektion, unzureichende Zelllyse und mangelnde Erreichbarkeit des Tumors [171]. Insbesondere ein besseres Verständnis der adenoviralen Replikation in normalen Zellen und der hierzu erforderlichen Gene ist für die Weiterentwicklung adenoviraler Gene unabdingbar.

Nachdem 1996 der erste E1B55K deletierte Adenovirus zur Tumorthherapie entwickelt wurde [17], folgten bald klinische Studien im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte [25, 95, 139] sowie die Wiederentdeckung bekannter Adenoviren als effektive Vektoren zur Tumorthherapie [51, 73, 226]. Diese wurden nach kurzer Zeit ebenfalls in Kombinationstherapien getestet [59, 106]. Obwohl mittlerweile auch Zweifel an der ausschliesslichen p53 Selektivität dieses Vektors aufgekommen sind [23, 41], wie unter 1.4.4 auszugsweise aufgeführt, hat er doch erfolgreich eine Phase III klinische Studie absolviert und in China 2006 die Zulassung erhalten. Einen weiteren Ansatz zur adenoviralen Gentherapie von Tumorzellen bieten YB1-abhängige Vektoren.

Der hier getestete Vektor zeigte nicht nur deutliche zytopathische Effekte (Abb. 27, 28), er konnte auch kein E1A Gen exprimieren (Abb. 24) und trieb YB-1 in den Kern (Abb. 32). Gleichzeitig führte er jedoch nicht zum Auslösen der S-Phase in normalen Zellen, folglich fand in diesen auch keine Replikation statt (Abb. 29). Auch in Kombination mit Chemotherapeutika ließ sich trotz deutlicher Reduktion der pfu Zahl ein zytopathischer Effekt nachweisen.

Mittlerweile konnte die im Northern Blot gezeigte Herunterregulation der *MDR/MRP* Genexpression im Western Blot auf Proteinebene bestätigt werden. Zusätzlich konnte mit einer ribosomalen 18S Probe das gleiche Ergebnis wie zuvor mit GAPDH im Northern Blot erzielt werden, wobei 18S jedoch unabhängiger von der allgemeinen Herunterregulation der Zellsynthese nach Infektion durch einen Virus ist und somit spezifischer für eine selektive Regulation von *MDR/MRP* durch YB-1.

Desweiteren wurden in einem in vivo Versuch immundefiziente Nacktmäuse in einem subkutanem DU145 Tumorzellmodell mit zweimaligen Injektionen von Xvir03 in Kombination mit Docetaxel behandelt und eine deutliche Tumorreduktion im Vergleich zur PBS Kontrolle erzielt [121].

Die Rolle von YB-1 muss jedoch noch weiter beleuchtet werden und die Interaktion mit E1B55K und E4orf6 noch auf andere Weise nachgewiesen werden. So sollte eine Hemmung von YB-1 konsekutiv zu einer Hemmung der Replikation des Xvir03 Virus führen. Mittlerweile gelang es eben diesen Sachverhalt mittels siRNA in der Zellkultur nachzuweisen (Holm, P.S., persönliche Mitteilung).

Neben der Weiterentwicklung des Vektors Xvir03, vor allem im Hinblick auf seine oben genannten Schwächen, wird auch eine Überprüfung im Mausmodell mit einem Leervektor im Vergleich sowie eine Testung in immunkompetenten Mäusen notwendig sein, bevor mit einer klinischen Studie begonnen werden kann.

Das erklärte Ziel ist, im Rahmen einer Kombination mit herkömmlichen Therapien den neuen, verbesserten YB-1 assoziierten Vektor zu testen und eine erhöhte Überlebensrate von Krebspatienten zu ermöglichen.

Wu et. al. haben kürzlich gezeigt, dass die Überexpression von YB-1 in Brustkrebszellen zu einer erhöhten EGFR und HER-2 Rezeptor Expression führt. Diese sind zu großen Teil mitverantwortlich für aggressives Wachstum und Metastasierung dieser Tumorzellen. Wird YB-1 durch siRNA ausgeschaltet, erfolgt auch eine Suppression der EGFR und HER-2 Expression [222]. Auch in diesem Bereich könnte ein Vektor, der YB-1 für seine Replikation benötigt und dieses damit der Zelle entzieht, bei der EGFR und HER-2 Expression ähnliche Effekte hervorrufen wie die in dieser Arbeit für *MDR/MDR* gezeigten.

5.8 Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, ausgehend von ersten Beobachtungen mit drei adenoviralen Vektoren namens Ad312, dl520 und $\Delta 24$ in infizierten Tumorzellen, einen lediglich E1B55K und E4orf6 exprimierenden und damit E1A unabhängigen Vektor Xvir03 in verschiedenen Tumorzellen auf seine onkolytische Potenz hin zu überprüfen.

Zunächst konnte gezeigt werden, daß der E2 late Promotor in der adenoviralen Replikation eine bisher unterschätzte Rolle spielt und daß auch über ihn eine ausreichende Replikation stattfinden kann.

Es konnte für Xvir03 eine erfolgreiche Replikation und Zelllyse in Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass Xvir03 keine S-Phase in normalen infizierten Zellen zu induzieren vermochte, deutete zudem auf eine E1A unabhängige tumorselektive Replikation hin. Nach erfolgreicher Infektion von Xvir03 wurde YB-1 immunhistochemisch im Kern sichtbar. Dies legte die Möglichkeit nahe, dass die durch Xvir03 exprimierten E1B55K und E4orf6 Proteine eine zusätzliche Translokation von YB-1 in den Kern bewirkten. Weiterhin konnten wir feststellen, dass insbesondere in Tumorzelllinien mit vielfachresistentem Phänotyp die hierfür verantwortlichen Resistenzgene durch Xvir03 herunterreguliert werden konnten. Eine mögliche Erklärung könnte die gleichzeitige Verwendung von YB-1 als Transkriptionsfaktor für die E2 late abhängige adenovirale Replikation und als Steuerelement der für den *MDR/MDR* Phänotyp verantwortlichen Y-box sein. Auch in Kombination mit

Chemotherapie konnte Xvir03 Zellen effektiv bei abtöten. Dabei ließ sich die benötigte infektiöse Partikelzahl deutlich erniedrigen.

Auf diese Weise konnte der E1A deletierte Vektor nicht nur spezifisch in Tumorzellen replizieren und diese lysieren, er konnte durch Verwendung von YB-1 als Aktivator des E2 late Promotors für seine Replikation auch selektiv vielfachresistente Tumorzellen in ihrer *MDR/MRP* Expression herunterregulieren und die Empfindlichkeit gegenüber einer Chemotherapie erhöhen. Folglich wird auch ein weiterentwickelter YB-1 assoziierter Vektor, wie er nun von Holm et. al. basierend auf den durch Xvir03 gewonnenen Erkenntnissen entwickelt wird, in der Klinik den Weg der multimodalen Therapie in einer Kombination aus Chemo- oder Radiotherapie gehen, eventuell wird diese sogar aus allen drei Therapieansätzen bestehen. Es bleibt abzuwarten, ob ein multimodaler Ansatz es vermag, nicht nur die Überlebensrate sondern auch die Lebensqualität der an Krebs erkrankten Patienten langfristig zu verbessern. Doch vieles spricht dafür, dass, bei konsequenter Fortentwicklung, onkolytische Adenoviren in der Zukunft zum festen Bestandteil der antitumoralen Therapie werden können.

6 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher für die Übernahme dieser Doktorarbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut und die Unterstützung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P.S. Holm für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung in sämtlichen wissenschaftlichen Fragestellungen und den immer spürbaren wissenschaftlichen Enthusiasmus.

Der gesamten Arbeitsgruppe Holm möchte ich für gute Zusammenarbeit danken, insbesondere Herrn Klaus Mantwill für die Konstruktion und Überlassung des Vektors Xvir03 sowie die praktische und ideelle Unterstützung, Frau Tanja Dravits für die Durchführung der FACS Analyse und Frau Alexandra Bernshausen für die gelegentlich notwendige freundschaftliche Aufheiterung.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung für die gute Arbeitsatmosphäre und anregende Zusammenarbeit.

Meiner Mutter, die mir das Studium ermöglicht hat, und Christian Zähringer, der mich in jeder Hinsicht über viele Jahre geliebt und unterstützt hat und ohne den diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre, gilt mein größter Dank.

Auszüge dieser Doktorarbeit wurden in ***Cancer Research***, Vol. 66 (2006), p 7195-202 unter **Mantwill, K., Kohler-Vargas, N., Bernshausen, A., Bieler, A., Lage, H., Kaszubiak, A., Surowiak, P., Dravits, T., Treiber, U., Hartung, R., Gansbacher, B., Holm, P. S.: *Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic adenovirus: implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents* am 15.07.2006 veröffentlicht.**

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\Delta 24$	delta24
°C	Grad Celsius
³² P	Phosphor 32 (radioaktives Element)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
Ad.	Additivum
ADP	Adenoviral Death Protein
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
Bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovine serum albumin
ca.	circa
CAR	Coxsackie Adenovirus Rezeptor
CPE	Cytopathic effect
CR	conserved region
CSD	Cold shock domain (Kälteschock Domäne)
CTP	Cytosintriphosphat
D, Dauno	Daunorubicin
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DBP	DNA bindendes Protein
ddH ₂ O	Aqua bidestillatum
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doce	Docetaxel
DU145	Zelllinie, humanes Prostatakarzinom
E. coli	Escherichia coli
E2F	zellulärer Transkriptionsfaktor
EBV	Ebstein Barr Virus

EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EJ28	Zelllinie, humanes Blasenkarzinom, metastasiert
EPG85-257RDB	Zelllinie, humanes Magenkarzinom
EPP85-181RDB	Zelllinie, humanes Pankreaskarzinom
et.al.	et altera
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflußzytometrie
g / mg / µg / ng	Gramm / Milli- / Mikro- / Nanogramm
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
H	Stunden
HBV	Hepatitis B Virus
HEK293	Zelllinie, embryonale Niere, E1A Transformation
HeLa	Zelllinie, humanes Cervixkarzinom
HPV	Humanes Papillomavirus
Irino	Irinotecan
ITR	Inverted terminal repeats
K	Kontrolle
kb	kilobase
l / ml / µl	Liter / Milliliter / Mikroliter
M / mM	molar / millimolar
MLP	Major Late Promotor
MOCK	nicht infizierte Zellen
MOPS	4-Morpholinpropansulfansäure
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
orf	open reading frame
p.i.	post infectionem
p53	Tumorsuppressorprotein
PBS	Phosphate buffered saline

PC3	Zelllinie, humanes Prostatakarzinom
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Pfu	particle forming unit
Pfu	plaque forming units
Pol	adenovirale DNA Polymerase
PSA	Prostata spezifisches Antigen
Rb / pRB	Retinoblastom Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Saline sodium citrate
TBE	Tris-Borat EDTA Puffer
TE	Tris EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
Tm	Annealing Temperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TP / pTP	Terminales Protein / präterminales Protein
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
U / min	Umdrehungen pro Minute
U	unit
U2OS	Zelllinie, humanes Osteosarkom
U373-MG	Zelllinie, humanes Glioblastom
U87-MG	Zelllinie, humanes Glioblastom
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT-Ad5	Wildtyp des humanen Adenovirus Typ 5
x	fach
YB-1	Y-Box bindendes Protein 1
z. B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: MECHANISMEN DER VIELFACHRESISTENZ	11
ABB. 2: AUFBAU DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS YB-1	12
ABB. 3: PLEIOTROPISCHE FUNKTIONEN VON YB-1	15
ABB. 4: AUFBAU EINES ADENOVIRUS	16
ABB. 5: SCHEMATISCHER AUFBAU DER TRANSKRIPTIONSREGULATION VON AD5	19
ABB. 6: SCHEMA DER E1A BINDUNGSSTELLEN	20
ABB. 7: REGULATION DER E2 GENE	22
ABB. 8: CHARAKTERISTISCHE MUTATIONEN DER VERWENDETEN DL520 UND Δ24 VIREN IM E1A GEN	26
ABB. 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERWENDETEN PADEASY VEKTORS ...	46
ABB. 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES NEU KONSTRUIERTEN XVIR03 SHUTTLE VEKTORS	47
ABB. 11: INFEKTION VON HELA ZELLEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN PFU ZAHLEN	55
ABB. 12: INFEKTION VON DU145 ZELLEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN PFU ZAHLEN	56
ABB. 13: INFEKTION VON U2OS ZELLEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN PFU ZAHLEN	58
ABB.14: INFEKTION VON U2OS ZELLEN MIT ANGEGEBENEN VIREN IN VERSCHIEDENEN PFU ZAHLEN	59
ABB.15: ÜBERPRÜFUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE PRIMER DURCH PCR MIT WT AD5 DNA	60
ABB. 16: LOKALISATION DER E2 EARLY UND LATE SONDE IM E2 GEN	61
ABB. 17: E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN Δ24 INFIZIERTEN HELA ZELLEN ...	61
ABB. 18: E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN Δ24 INFIZIERTEN U2OS ZELLEN ...	63
ABB. 19: E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN Δ24 INFIZIERTEN U87 ZELLEN	64
ABB. 20: E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN U2OS ZELLEN NACH ADWT INFEKTION	66
ABB. 21: HERSTELLUNG DER E1B55K UND E4ORF6 SONDE	67
ABB. 22: E1B55K EXPRESSION IM VERGLEICH VON 5 UND 50 PFU DL520	68
ABB. 23: E4ORF6 EXPRESSION IM VERGLEICH VON 5 UND 50 PFU DL520	69
ABB. 24: ÜBERPRÜFUNG DER E1A DELETION VON XVIR03, WILDTYP ALS KONTROLLE	72
ABB. 25: NACHWEIS DES IRES ELEMENTS	72
ABB. 26: NACHWEIS DER REPLIKATION IM SOUTHERN BLOT MIT DER E2 LATE SONDE	73
ABB. 27: KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG VON DU145, PC3, U87, U373, EJ28, HELA UND U2OS ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03	74

ABB. 28: INFEKTION VON PC3 ZELLEN MIT AD312, DL520 UND XVIR03	81
ABB. 29: FACS ANALYSE VON NICHT INFIZIERTEN, MIT WILDTYP INFIZIERTEN UND XVIR03 INFIZIERTEN HELA ZELLEN	83
ABB. 30: E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN XVIR03 INFIZIERTEN DU145 ZELLEN	84
ABB. 31: E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN Δ24 INFIZIERTEN U2OS ZELLEN ...	85
ABB. 32: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	87
ABB. 33: <i>MRP</i> EXPRESSION IN DU145 ZELLEN	88
ABB. 34: <i>MRP</i> EXPRESSION IN PC3 ZELLEN	89
ABB. 35: <i>MDR</i> EXPRESSION IN 257RDB ZELLEN	90
ABB. 36: KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG DER PC3 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312 ODER XVIR03 IN KOMBINATION MIT DOCETAXEL	97
ABB. 37: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER PC3 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312 ODER XVIR03 UND INKUBATION MIT DOCETAXEL	100
ABB. 38: KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG DER MIT XVIR03 UND IRINOTECAN INKUBIERTEN PC3 ZELLEN	102
ABB. 39: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER PC3 ZELLEN NACH INFEKTION MIT XVIR03 UND INKUBATION MIT IRINOTECAN IN UNTERSCHIEDLICHEN KOMBINATIONEN	106
ABB. 40: KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG VON DU145 ZELLEN NACH INFEKTION MIT XVIR03 UND DAUNORUBICIN IN UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN.....	108

9 Tabellenverzeichnis

TAB. 1: ÜBERLEBENSRATE VON HELA ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND $\Delta 24$	56
TAB. 2: ÜBERLEBENSRATE VON DU145 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND $\Delta 24$	57
TAB. 3: ÜBERLEBENSRATE VON U2OS ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND $\Delta 24$	58
TAB. 4: QUANTIFIZIERUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN HELA ZELLEN.....	62
TAB. 5: QUANTIFIZIERUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION MIT U2OS ZELLEN.....	63
TAB. 6: QUANTIFIZIERUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN U87 ZELLEN.....	65
TAB. 7: QUANTIFIZIERUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN U2OS ZELLEN NACH INFEKTION MIT ADENOVIRUS WILD TYP.....	66
TAB. 8: VERGLEICH DER E1B55K EXPRESSION IN U2OS ZELLEN INFIZIERT MIT 5 UND 50 PFU DL520 UND $\Delta 24$	68
TAB. 9: VERGLEICH DER E4ORF6 EXPRESSION IN U2OS ZELLEN INFIZIERT MIT 5 UND 50 PFU DL520 UND $\Delta 24$	70
TAB. 10: VERGLEICH DER MIT 5 UND 50 PFU DL520 UND $\Delta 24$ INFIZIERTEN U2OS ZELLEN IM PLAQUE ASSAY, STANDARDABWEICHUNG ANGEGEBEN.....	71
TAB. 11: ÜBERLEBENSRATE DER DU145 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03.....	75
TAB. 12: ÜBERLEBENSRATE VON PC3 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03.....	76
TAB. 13: ÜBERLEBENSRATE VON EJ28 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03.....	77
TAB. 14: ÜBERLEBENSRATE VON U87 ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03.....	78
TAB. 15: ÜBERLEBENSRATE VON HELA ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03.....	79
TAB. 16: ÜBERLEBENSRATE VON U2OS ZELLEN NACH INFEKTION MIT AD312, DL520 UND XVIR03.....	80
TAB. 17: QUANTIFIZIERUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN DU145 ZELLEN.....	84

TAB. 18: QUANTIFIZIERUNG DER E2 EARLY UND E2 LATE EXPRESSION IN U2OS ZELLEN	86
TAB. 19: QUANTIFIZIERUNG DER <i>MRP</i> EXPRESSION IN DU145 ZELLEN	88
TAB. 20: QUANTIFIZIERUNG DER <i>MRP</i> EXPRESSION IN PC3 ZELLEN	89
TAB. 21: QUANTIFIZIERUNG DER <i>MDR</i> EXPRESSION IN 257RDB ZELLEN	91
TAB. 22: IC₅₀ WERTE NACH INKUBATION VON DU145 ZELLEN MIT DAUNORUBICIN FÜR 24, 48 UND 72 H	92
TAB. 23: IC₅₀ WERTE NACH INKUBATION VON DU145 ZELLEN MIT DOCETAXEL FÜR 24, 48 UND 72 H	92
TAB. 24: IC₅₀ WERTE NACH INKUBATION VON DU145 ZELLEN MIT IRINOTECAN FÜR 24, 48 UND 72 H	93
TAB. 25: IC₅₀ WERTE NACH INKUBATION VON PC3 ZELLEN MIT DAUNORUBICIN FÜR 24, 48 UND 72 H	94
TAB. 26: IC₅₀ WERTE NACH INKUBATION VON PC3 ZELLEN MIT DOCETAXEL FÜR 24, 48 UND 72 H	95
TAB. 27: IC₅₀ WERTE NACH INKUBATION VON PC3 ZELLEN MIT IRINOTECAN FÜR 24, 48 UND 72 H	96
TAB. 28: QUANTIFIZIERUNG DER ÜBERLEBENSRATE VON PC3 ZELLEN NACH INFEKTION MIT XVIR03 UND AD312 IN KOMBINATION MIT DOCETAXEL	98
TAB. 29: QUANTIFIZIERUNG DER ÜBERLEBENSRATE VON PC3 ZELLEN NACH INFEKTION MIT XVIR03 IN KOMBINATION MIT IRINOTECAN	104
TAB. 30: QUANTIFIZIERUNG DER ÜBERLEBENSRATE VON DU145 ZELLEN NACH INFEKTION MIT XVIR03 IN KOMBINATION MIT DAUNORUBICIN	109

10 Literaturverzeichnis

1. Alemany, R., Balague, C. und Curiel, D. T., *Replicative adenoviruses for cancer therapy*, Nat Biotechnol **18** (2000): 723-7
2. Amalfitano, A., Hauser, M. A., Hu, H., Serra, D., Begy, C. R. und Chamberlain, J. S., *Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted*, J Virol **72** (1998): 926-33
3. Anderson, C. W., Young, M. E. und Flint, S. J., *Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu*, Virology **172** (1989): 506-12
4. Babiss, L. E., Ginsberg, H. S. und Darnell, J. E., Jr., *Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport*, Mol Cell Biol **5** (1985): 2552-8
5. Bannister, A. J. und Kouzarides, T., *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*, Nature **384** (1996): 641-3
6. Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dorken, B. und Royer, H. D., *Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression*, Nat Med **3** (1997): 447-50
7. Basaki, Y., Hosoi, F., Oda, Y., Fotovati, A., Maruyama, Y., Oie, S., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Sakai, K., Shimoyama, T., Nishio, K. und Kuwano, M., *Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells*, Oncogene (2006):
8. Bautista, D. S., Hitt, M., McGrory, J. und Graham, F. L., *Isolation and characterization of insertion mutants in E1A of adenovirus type 5*, Virology **182** (1991): 578-96
9. Bennett, E. M., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. und Brodsky, F. M., *Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression*, J Immunol **162** (1999): 5049-52
10. Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. und Finberg, R. W., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*, Science **275** (1997): 1320-3
11. Berk, A. J. und Sharp, P. A., *Structure of the adenovirus 2 early mRNAs*, Cell **14** (1978): 695-711
12. Bernt, K. M., Steinwaerder, D. S., Ni, S., Li, Z. Y., Roffler, S. R. und Lieber, A., *Enzyme-activated Prodrug Therapy Enhances Tumor-specific Replication of Adenovirus Vectors*, Cancer Res **62** (2002): 6089-98
13. Berquin, I. M., Pang, B., Dziubinski, M. L., Scott, L. M., Chen, Y. Q., Nolan, G. P. und Ethier, S. P., *Y-box-binding protein 1 confers EGF independence to human mammary epithelial cells*, Oncogene **24** (2005): 3177-86

14. Bhat, G., SivaRaman, L., Murthy, S., Domer, P. und Thimmappaya, B., *In vivo identification of multiple promoter domains of adenovirus E1A-late promoter*, *Embo J* **6** (1987): 2045-52
15. Biedler, J. L. und Riehm, H., *Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies*, *Cancer Res* **30** (1970): 1174-84
16. Bieler, A., Mantwill, K., Dravits, T., Bernshausen, A., Glockzin, G., Kohler-Vargas, N., Lage, H., Gansbacher, B. und Holm, P. S., *Novel three-pronged strategy to enhance cancer cell killing in glioblastoma cell lines: histone deacetylase inhibitor, chemotherapy, and oncolytic adenovirus dl520*, *Hum Gene Ther* **17** (2006): 55-70
17. Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. und McCormick, F., *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*, *Science* **274** (1996): 373-6
18. Black, R. J., Bray, F., Ferlay, J. und Parkin, D. M., *Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990*, *Eur J Cancer* **33** (1997): 1075-107
19. Boulanger, P. A. und Blair, G. E., *Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins*, *Biochem J* **275 (Pt 2)** (1991): 281-99
20. Burchenal, J. H., Robinson, E. und et al., *The induction of resistance to 4-amino-N10-methylpteroylglutamic acid in a strain of transmitted mouse leukemia*, *Science* **111** (1950): 116
21. Canil, C. M. und Tannock, I. F., *Is there a role for chemotherapy in prostate cancer?*, *Br J Cancer* **91** (2004): 1005-11
22. 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, D. B., Henderson, D. R. und Yu, D. C., *CV706, a prostate cancer-specific adenovirus variant, in combination with radiotherapy produces synergistic antitumor efficacy without increasing toxicity*, *Cancer Res* **61** (2001): 5453-60
23. Cherubini, G., Petouchoff, T., Grossi, M., Piersanti, S., Cundari, E. und Saggio, I., *E1B55K-Deleted Adenovirus (ONYX-015) Overrides G(1)/S and G(2)/M Checkpoints and Causes Mitotic Catastrophe and Endoreduplication in p53-Proficient Normal Cells*, *Cell Cycle* **5** (2006):
24. Chiocca, E. A., *Oncolytic viruses*, *Nat Rev Cancer* **2** (2002): 938-50
25. Chiocca, E. A., Abbed, K. M., Tatter, S., Louis, D. N., Hochberg, F. H., Barker, F., Kracher, J., Grossman, S. A., Fisher, J. D., Carson, K., Rosenblum, M., Mikkelsen, T., Olson, J., Markert, J., Rosenfeld, S., Nabors, L. B., Brem, S., Phuphanich, S., Freeman, S., Kaplan, R. und Zwiebel, J., *A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting*, *Mol Ther* **10** (2004): 958-66
26. Chow, L. T., Broker, T. R. und Lewis, J. B., *Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2*, *J Mol Biol* **134** (1979): 265-303

27. Cohen, C. J., Gaetz, J., Ohman, T. und Bergelson, J. M., *Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting*, J Biol Chem **276** (2001): 25392-8
28. Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. und Bergelson, J. M., *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction*, Proc Natl Acad Sci U S A **98** (2001): 15191-6
29. Cole, S. P. und Deeley, R. G., *Multidrug resistance-associated protein: sequence correction*, Science **260** (1993): 879
30. Collins, V. P., *Genetic alterations in gliomas*, J Neurooncol **24** (1995): 37-8
31. Dano, K., *Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells*, Biochim Biophys Acta **323** (1973): 466-83
32. David-Beabes, G. L., Overman, M. J., Petrofski, J. A., Campbell, P. A., de Marzo, A. M. und Nelson, W. G., *Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU 145, PC-3, PPC-1, and TSU-PR1: characterization of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity*, Int J Oncol **17** (2000): 1077-86
33. Debbas, M. und White, E., *Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B*, Genes Dev **7** (1993): 546-54
34. Didier, D. K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M. und Schwartz, B. D., *Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box*, Proc Natl Acad Sci U S A **85** (1988): 7322-6
35. Dietel, M., Arps, H., Lage, H. und Niendorf, A., *Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric carcinoma cell line EPG85-257*, Cancer Res **50** (1990): 6100-6
36. Dilley, J., Reddy, S., Ko, D., Nguyen, N., Rojas, G., Working, P. und Yu, D. C., *Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity*, Cancer Gene Ther **12** (2005): 715-22
37. Dix, B. R., Edwards, S. J. und Braithwaite, A. W., *Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway?*, J Virol **75** (2001): 5443-7
38. Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S. und Shenk, T., *Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor*, Science **272** (1996): 1470-3
39. Dooley, S., Said, H. M., Gressner, A. M., Floege, J., En-Nia, A. und Mertens, P. R., *Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects*, J Biol Chem **281** (2006): 1784-95
40. Eck, S. L., Alavi, J. B., Alavi, A., Davis, A., Hackney, D., Judy, K., Mollman, J., Phillips, P. C., Wheeldon, E. B. und Wilson, J. M., *Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial*, Hum Gene Ther **7** (1996): 1465-82
41. Edwards, S. J., Dix, B. R., Myers, C. J., Dobson-Le, D., Huschtscha, L., Hibma, M., Royds, J. und Braithwaite, A. W., *Evidence that replication of*

- the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14(ARF) tumor suppressor genes*, J Virol **76** (2002): 12483-90
42. Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L. P. und Sonenberg, N., *The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer*, Embo J **20** (2001): 5491-502
43. Farson, D., Tao, L., Ko, D., Li, Q., Brignetti, D., Segawa, K., Mittelstaedt, D., Harding, T., Yu, D. C. und Li, Y., *Development of novel E1-complementary cells for adenoviral production free of replication-competent adenovirus*, Mol Ther **14** (2006): 305-11
44. Fizazi, K., Sikes, C. R., Kim, J., Yang, J., Martinez, L. A., Olive, M. C., Logothetis, C. J. und Navone, N. M., *High efficacy of docetaxel with and without androgen deprivation and estramustine in preclinical models of advanced prostate cancer*, Anticancer Res **24** (2004): 2897-903
45. Flint, J. und Shenk, T., *Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator*, Annu Rev Genet **23** (1989): 141-61
46. Flint, J. und Shenk, T., *Viral transactivating proteins*, Annu Rev Genet **31** (1997): 177-212
47. Freytag, S. O., Rogulski, K. R., Paielli, D. L., Gilbert, J. D. und Kim, J. H., *A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy*, Hum Gene Ther **9** (1998): 1323-33
48. Freytag, S. O., Stricker, H., Pegg, J., Paielli, D., Pradhan, D. G., Peabody, J., DePeralta-Venturina, M., Xia, X., Brown, S., Lu, M. und Kim, J. H., *Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer*, Cancer Res **63** (2003): 7497-506
49. Friedman, H. S., Keir, S. T. und Houghton, P. J., *The emerging role of irinotecan (CPT-11) in the treatment of malignant glioma in brain tumors*, Cancer **97** (2003): 2359-62
50. Fueyo, J., Alemany, R., Gomez-Manzano, C., Fuller, G. N., Khan, A., Conrad, C. A., Liu, T. J., Jiang, H., Lemoine, M. G., Suzuki, K., Sawaya, R., Curiel, D. T., Yung, W. K. und Lang, F. F., *Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway*, J Natl Cancer Inst **95** (2003): 652-60
51. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K. und Kyritsis, A. P., *A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo*, Oncogene **19** (2000): 2-12
52. Garber, K., *China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment*, J Natl Cancer Inst **98** (2006): 298-300
53. 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 **32** (2004): 316-27

54. Gilbert, M. R., Supko, J. G., Batchelor, T., Lesser, G., Fisher, J. D., Piantadosi, S. und Grossman, S., *Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan in adults with recurrent malignant glioma*, Clin Cancer Res **9** (2003): 2940-9
55. Gimenez-Bonafe, P., Fedoruk, M. N., Whitmore, T. G., Akbari, M., Ralph, J. L., Ettinger, S., Gleave, M. E. und Nelson, C. C., *YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity*, Prostate **59** (2004): 337-49
56. Glockzin, G., Mantwill, K., Jurchott, K., Bernshausen, A., Ladhoff, A., Royer, H. D., Gansbacher, B. und Holm, P. S., *Characterization of the recombinant adenovirus vector AdYB-1: implications for oncolytic vector development*, J Virol **80** (2006): 3904-11
57. Goldenberg, C. J. und Raskas, H. J., *In vitro processing of intervening sequences in the precursors of messenger ribonucleic acid for adenovirus 2 deoxyribonucleic acid binding protein*, Biochemistry **19** (1980): 2719-23
58. Goldenberg, C. J., Rosenthal, R., Bhaduri, S. und Raskas, H., *Coordinate regulation of two cytoplasmic RNA species transcribed from early region 2 of the adenovirus 2 genome*, J Virol **38** (1981): 932-9
59. Gomez-Manzano, C., Alonso, M. M., Yung, W. K., McCormick, F., Curiel, D. T., Lang, F. F., Jiang, H., Bekele, B. N., Zhou, X., Alemany, R. und Fueyo, J., *Delta-24 increases the expression and activity of topoisomerase I and enhances the antiglioma effect of irinotecan*, Clin Cancer Res **12** (2006): 556-62
60. Goodrum, F. D. und Ornelles, D. A., *p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection*, J Virol **72** (1998): 9479-90
61. Gottesman, M. M. und Ambudkar, S. V., *Overview: ABC transporters and human disease*, J Bioenerg Biomembr **33** (2001): 453-8
62. Gottesman, M. M. und Pastan, I., *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*, Annu Rev Biochem **62** (1993): 385-427
63. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*, J Gen Virol **36** (1977): 59-74
64. Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W. und Helenius, A., *The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry*, Embo J **16** (1997): 5998-6007
65. Greber, U. F., Webster, P., Weber, J. und Helenius, A., *The role of the adenovirus protease on virus entry into cells*, Embo J **15** (1996): 1766-77
66. Halbert, D. N., Cutt, J. R. und Shenk, T., *Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff*, J Virol **56** (1985): 250-7
67. Haley, K. P., Overhauser, J., Babiss, L. E., Ginsberg, H. S. und Jones, N. C., *Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products*, Proc Natl Acad Sci U S A **81** (1984): 5734-8

68. Hallenbeck, P. L., Chang, Y. N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S. und Chiang, Y. L., *A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma*, Hum Gene Ther **10** (1999): 1721-33
69. Handa, H., Kingston, R. E. und Sharp, P. A., *Inhibition of adenovirus early region IV transcription in vitro by a purified viral DNA binding protein*, Nature **302** (1983): 545-7
70. Hansen, H. H., Eisenhauer, E. A., Hansen, M., Neijt, J. P., Piccart, M. J., Sessa, C. und Thigpen, J. T., *New cytostatic drugs in ovarian cancer*, Ann Oncol **4 Suppl 4** (1993): 63-70
71. Hardy, S., Engel, D. A. 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 **3** (1989): 1062-74
72. Harris, C. C., *p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment*, Science **262** (1993): 1980-1
73. 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 **6** (2000): 1134-9
74. Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D. D. und Kirn, D. H., *ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents*, Nat Med **3** (1997): 639-45
75. Hobom, U. und Dobbelstein, M., *E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection*, J Virol **78** (2004): 7685-97
76. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Harris, C. C., *p53 mutations in human cancers*, Science **253** (1991): 49-53
77. Holm, P. S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, H., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D. T., Dobbelstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B. und Royer, H. D., *YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter*, J Biol Chem **277** (2002): 10427-34
78. Holm, P. S., Lage, H., Bergmann, S., Jurchott, K., Glockzin, G., Bernshausen, A., Mantwill, K., Ladhoff, A., Wichert, A., Mymryk, J. S., Ritter, T., Dietel, M., Gansbacher, B. und Royer, H. D., *Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy*, Cancer Res **64** (2004): 322-8
79. Howe, J. A., Mymryk, J. S., Egan, C., Branton, P. E. und Bayley, S. T., *Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis*, Proc Natl Acad Sci U S A **87** (1990): 5883-7
80. 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 **93** (2004): 287-91

81. Hudes, G. R., Kosierowski, R., Greenberg, R., Ramsey, H. E., Fox, S. C., Ozols, R. F., McAleer, C. A. und Giantonio, B. J., *Phase II study of topotecan in metastatic hormone-refractory prostate cancer*, Invest New Drugs **13** (1995): 235-40
82. Hudes, G. R., Nathan, F. E., Khater, C., Greenberg, R., Gomella, L., Stern, C. und McAleer, C., *Paclitaxel plus estramustine in metastatic hormone-refractory prostate cancer*, Semin Oncol **22** (1995): 41-5
83. Hudes, G. R., Obasaju, C., Chapman, A., Gallo, J., McAleer, C. und Greenberg, R., *Phase I study of paclitaxel and estramustine: preliminary activity in hormone-refractory prostate cancer*, Semin Oncol **22** (1995): 6-11
84. 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 **59** (1999): 342-6
85. 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 **29** (2001): 1200-7
86. Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M. und Royer, H. D., *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 **97** (2002): 278-82
87. Jelsma, T. N., Howe, J. A., Mymryk, J. S., Eveleigh, C. M., Cunniff, N. F. und Bayley, S. T., *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 **171** (1989): 120-30
88. Jemal, A., Ward, E., Wu, X., Martin, H. J., McLaughlin, C. C. und Thun, M. J., *Geographic patterns of prostate cancer mortality and variations in access to medical care in the United States*, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14** (2005): 590-5
89. Jones, N., *Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene*, Curr Top Microbiol Immunol **199 (Pt 3)** (1995): 59-80
90. Jones, N., Shenk T., *An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes*, Proc Natl Acad Sci U S A **76** (1979): 3665-3669
91. Jones, N. und Shenk, T., *An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes*, Proc Natl Acad Sci U S A **76** (1979): 3665-9
92. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M. und Royer, H. D., *YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression*, J Biol Chem **278** (2003): 27988-96

93. Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., Mitsumoto, M., Kohno, K., Kuwano, M. und Nakano, H., *Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma?*, *Cancer* **85** (1999): 2450-4
94. Kartner, N., Riordan, J. R. und Ling, V., *Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines*, *Science* **221** (1983): 1285-8
95. Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R. H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A. M., Brusco, P., Kaye, S. B., Hong, W. K. und Kirn, D. H., *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* **6** (2000): 879-85
96. Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M. und Kuwano, M., *The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1*, *Bioessays* **25** (2003): 691-8
97. 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* **417** (1997): 390-4
98. Kollmannsberger, C., Rick, O., Klaproth, H., Kubin, T., Sayer, H. G., 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* **87** (2002): 729-32
99. Kovesdi, I., Reichel, R. und Nevins, J. R., *Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (1987): 2180-4
100. Kovesdi, I., Reichel, R. und Nevins, J. R., *Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation*, *Cell* **45** (1986): 219-28
101. Kovesdi, I., Reichel, R. und Nevins, J. R., *E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences*, *Science* **231** (1986): 719-22
102. Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G. L. und Lage, H., *Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2*, *Cancer Gene Ther* **9** (2002): 579-86
103. Kraft, V. und Tischer, I., *Cell cycle-dependent multiplication of avian adenoviruses in chicken embryo fibroblasts*, *Arch Virol* **57** (1978): 243-54
104. Ladomery, M. und Sommerville, J., *A role for Y-box proteins in cell proliferation*, *Bioessays* **17** (1995): 9-11
105. Lage, H. und Dietel, M., *Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance*, *J Cancer Res Clin Oncol* **125** (1999): 156-65
106. Lamfers, M. L., Grill, J., Dirven, C. M., Van Beusechem, V. W., Geogerger, B., Van Den Berg, J., Alemany, R., Fueyo, J., Curiel, D. T., Vassal, G., Pinedo, H. M., Vandertop, W. P. und Gerritsen, W. R., *Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in*

- the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy*, *Cancer Res* **62** (2002): 5736-42
107. Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R. und Watson, J., *Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors*, *Gene* **252** (2000): 1-13
108. Lasham, A., Moloney, S., Hale, T., Homer, C., Zhang, Y. F., Murison, J. G., Braithwaite, A. W. und Watson, J., *The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor*, *J Biol Chem* **278** (2003): 35516-23
109. Lee, W. R., Giantonio, B. und Hanks, G. E., *Prostate cancer*, *Curr Probl Cancer* **18** (1994): 295-357
110. Leonard, G. D., Polgar, O. und Bates, S. E., *ABC transporters and inhibitors: new targets, new agents*, *Curr Opin Investig Drugs* **3** (2002): 1652-9
111. Leppard, K. N. und Shenk, T., *The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism*, *Embo J* **8** (1989): 2329-36
112. Levenson, V. V., Davidovich, I. A. und Roninson, I. B., *Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response*, *Cancer Res* **60** (2000): 5027-30
113. Li, L., Lu, Q., Shen, Y. und Hu, X., *Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells*, *Biochem Pharmacol* **71** (2006): 584-95
114. Li, Y., Yu, D. C., Chen, Y., Amin, P., Zhang, H., Nguyen, N. und Henderson, D. R., *A hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin*, *Cancer Res* **61** (2001): 6428-36
115. Lillie, J. W. und Green, M. R., *Transcription activation by the adenovirus E1a protein*, *Nature* **338** (1989): 39-44
116. Lillie, J. W. und Green, M. R., *Gene transcription: activator's target in sight*, *Nature* **341** (1989): 279-80
117. Lillie, J. W., Hai, T., Coukos, W. J., Lee, K. A., Martin, K. J. und Green, M. R., *Transcriptional activation of adenoviral early genes*, *Curr Top Microbiol Immunol* **144** (1989): 191-5
118. Lillie, J. W., Loewenstein, P. M., Green, M. R. und Green, M., *Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins*, *Cell* **50** (1987): 1091-100
119. Lin, J., Wu, X., Chen, J., Chang, A. und Levine, A. J., *Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression*, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59** (1994): 215-23
120. Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. und Bates, S. E., *From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance*, *Cell Mol Life Sci* **58** (2001): 931-59
121. Mantwill, K., Kohler-Vargas, N., Bernshausen, A., Bieler, A., Lage, H., Kaszubiak, A., Surowiak, P., Dravits, T., Treiber, U., Hartung, R., Gansbacher, B. und Holm, P. S., *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* **66** (2006): 7195-202
122. Marcellus, R. C., Chan, H., Paquette, D., Thirlwell, S., Boivin, D. und Branton, P. E., *Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Balpha subunit of protein phosphatase 2A*, *J Virol* **74** (2000): 7869-77
123. Marcellus, R. C., Lavoie, J. N., Boivin, D., Shore, G. C., Ketner, G. und Branton, P. E., *The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis*, *J Virol* **72** (1998): 7144-53
124. Marcellus, R. C., Teodoro, J. G., Wu, T., Brough, D. E., Ketner, G., Shore, G. C. und Branton, P. E., *Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis*, *J Virol* **70** (1996): 6207-15
125. Martin, M. E. und Berk, A. J., *Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription*, *Mol Cell Biol* **19** (1999): 3403-14
126. Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L. und Coen, D. M., *Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant*, *Science* **252** (1991): 854-6
127. Materna, V., Holm, P. S., Dietel, M. und Lage, H., *Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC transporter cMOAT/MRP2/ABCC2*, *Cancer Gene Ther* **8** (2001): 176-84
128. Matsumoto, K., Abiko, S. und Ariga, H., *Transcription regulatory complex including YB-1 controls expression of mouse matrix metalloproteinase-2 gene in NIH3T3 cells*, *Biol Pharm Bull* **28** (2005): 1500-4
129. Matsumoto, K. und Wolffe, A. P., *Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation*, *Trends Cell Biol* **8** (1998): 318-23
130. Matthews, D. A. und Russell, W. C., *Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli*, *J Gen Virol* **79 (Pt 7)** (1998): 1671-5
131. Mautner, V., Mackay, N. und Steinhorsdottir, V., *Complementation of enteric adenovirus type 40 for lytic growth in tissue culture by E1B 55K function of adenovirus types 5 and 12*, *Virology* **171** (1989): 619-22
132. Mertens, P. R., Harendza, S., Pollock, A. S. und Lovett, D. H., *Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1*, *J Biol Chem* **272** (1997): 22905-12
133. Moos, P. J. und Fitzpatrick, F. A., *Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits*, *Cell Growth Differ* **9** (1998): 687-97
134. Mossink, M. H., van Zon, A., Scheper, R. J., Sonneveld, P. und Wiemer, E. A., *Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance?*, *Oncogene* **22** (2003): 7458-67

135. Mullis, K. B., *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*, Ann Biol Clin (Paris) **48** (1990): 579-82
136. Murakami, P., Pungor, E., Files, J., Do, L., van Rijnsoever, R., Vogels, R., Bout, A. und McCaman, M., *A single short stretch of homology between adenoviral vector and packaging cell line can give rise to cytopathic effect-inducing, helper-dependent E1-positive particles*, Hum Gene Ther **13** (2002): 909-20
137. Mymryk, J. S. und Bayley, S. T., *Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5*, Virus Res **33** (1994): 89-97
138. Mymryk, J. S., Shire, K. und Bayley, S. T., *Induction of apoptosis by adenovirus type 5 E1A in rat cells requires a proliferation block*, Oncogene **9** (1994): 1187-93
139. Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., Reid, T., Kaye, S. und Kirn, D., *Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial*, Cancer Res **60** (2000): 6359-66
140. Nettelbeck, D. M., Rivera, A. A., Balague, C., Alemany, R. und Curiel, D. T., *Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific viral replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter*, Cancer Res **62** (2002): 4663-70
141. Nevins, J. R., *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*, Science **258** (1992): 424-9
142. Nevins, J. R., *Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product*, Cell **26** (1981): 213-20
143. Nevins, J. R., *Transcriptional activation by viral regulatory proteins*, Trends Biochem Sci **16** (1991): 435-9
144. Nevins, J. R., Blanchard, J. M. und Darnell, J. E., Jr., *Transcription units of adenovirus type 2. Termination of transcription beyond the poly(A) addition site in early regions 2 and 4*, J Mol Biol **144** (1980): 377-86
145. Nielsen, L. L., Lipari, P., Dell, J., Gurnani, M. und Hajian, G., *Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer*, Clin Cancer Res **4** (1998): 835-46
146. O'Connor, R., O'Leary, M., Ballot, J., Collins, C. D., Kinsella, P., Mager, D. E., Arnold, R. D., O'Driscoll, L., Larkin, A., Kennedy, S., Fennelly, D., Clynes, M. und Crown, J., *A phase I clinical and pharmacokinetic study of the multi-drug resistance protein-1 (MRP-1) inhibitor sulindac, in combination with epirubicin in patients with advanced cancer*, Cancer Chemother Pharmacol (2006):
147. 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 **199** (2003): 251-8

148. Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M. und Iwamoto, Y., *Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma*, Clin Cancer Res **4** (1998): 2273-7
149. Oh, J., Colberg, J. W., Ornstein, D. K., Johnson, E. T., Chan, D., Virgo, K. S. und Johnson, F. E., *Current followup strategies after radical prostatectomy: a survey of American Urological Association urologists*, J Urol **161** (1999): 520-3
150. 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 **56** (1996): 4224-8
151. 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 **273** (1998): 5997-6000
152. 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 **19** (2000): 6194-202
153. Osada, H., Tokunaga, T., Abe, Y., Asai, S., Miyachi, H., Hatanaka, H., Tsugu, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Shima, K., Ueyama, Y., Osamura, Y. und Nakamura, M., *Reversal of drug resistance mediated by hammerhead ribozyme against multidrug resistance-associated protein 1 in a human glioma cell line*, Int J Oncol **22** (2003): 823-7
154. Osterman, J. V., Waddell, A. und Aposhian, H. V., *DNA and gene therapy: uncoating of polyoma pseudovirus in mouse embryo cells*, Proc Natl Acad Sci U S A **67** (1970): 37-40
155. Pegg, A. E., *Properties of mammalian O6-alkylguanine-DNA transferases*, Mutat Res **233** (1990): 165-75
156. Pegg, A. E., *Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents*, Cancer Res **50** (1990): 6119-29
157. Perricaudet, M., Akusjarvi, G., Virtanen, A. und Pettersson, U., *Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses*, Nature **281** (1979): 694-6
158. Pienta, K. J., Redman, B. G., Bandekar, R., Strawderman, M., Cease, K., Esper, P. S., Naik, H. und Smith, D. C., *A phase II trial of oral estramustine and oral etoposide in hormone refractory prostate cancer*, Urology **50** (1997): 401-6; discussion 406-7
159. Pienta, K. J. und Smith, D. C., *Paclitaxel, estramustine, and etoposide in the treatment of hormone-refractory prostate cancer*, Semin Oncol **24** (1997): S15-72-S15-77
160. Ponten, J., *Spontaneous lymphoblastoid transformation of long-term cell cultures from human malignant lymphoma*, Int J Cancer **2** (1967): 311-25
161. Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W. G., Conaway, R. C., Conaway, J. W. und Branton, P. E., *Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs*

- via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex*, Genes Dev **15** (2001): 3104-17
162. Querido, E., Chu-Pham-Dang, H. und Branton, P. E., *Identification and elimination of an aberrant splice product from cDNAs encoding the human adenovirus type 5 E4orf6 protein*, Virology **275** (2000): 263-6
163. Querido, E., Morrison, M. R., Chu-Pham-Dang, H., Thirlwell, S. W., Boivin, D. und Branton, P. E., *Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex*, J Virol **75** (2001): 699-709
164. Rana, A., Chisholm, G. D., Rashwan, H. M., Salim, A., Merrick, M. V. und Elton, R. A., *Symptomatology of metastatic prostate cancer: prognostic significance*, Br J Urol **73** (1994): 683-6
165. Reichel, R., Neill, S. D., Kovessi, I., Simon, M. C., Raychaudhuri, P. und Nevins, J. R., *The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for trans-activation of E2 transcription and for E2F activation*, J Virol **63** (1989): 3643-50
166. Rekosh, D. M., Russell, W. C., Bellet, A. J. und Robinson, A. J., *Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA*, Cell **11** (1977): 283-95
167. Riede, UN., Walch, A., Wiestler, O.D., *"Tumorpathologie"* in Allgemeine und spezielle Pathologie, Riede, UN., Werner, M., Schäfer HE. (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, (2003), 5. Auflage, 338-384
168. Rodriguez, R., Schuur, E. R., Lim, H. Y., Henderson, G. A., Simons, J. W. und Henderson, D. R., *Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells*, Cancer Res **57** (1997): 2559-63
169. Rogulski, K. R., Freytag, S. O., Zhang, K., Gilbert, J. D., Paielli, D. L., Kim, J. H., Heise, C. C. und Kirn, D. H., *In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy*, Cancer Res **60** (2000): 1193-6
170. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. und Ward, T. G., *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*, Proc Soc Exp Biol Med **84** (1953): 570-3
171. Russell, W. C., *Update on adenovirus and its vectors*, J Gen Virol **81** (2000): 2573-604
172. Sanson, M., Napolitano, M., Yaya, R., Keime-Guibert, F., Broet, P., Hoang-Xuan, K. und Delattre, J. Y., *Second line chemotherapy with docetaxel in patients with recurrent malignant glioma: a phase II study*, J Neurooncol **50** (2000): 245-9
173. Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J. und Levine, A. J., *Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells*, Cell **28** (1982): 387-94
174. Schuetz, E. G., Beck, W. T. und Schuetz, J. D., *Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells*, Mol Pharmacol **49** (1996): 311-8

175. Shapiro, W. R., *Chemotherapy of malignant gliomas: studies of the BTCCG*, Rev Neurol (Paris) **148** (1992): 428-34
176. Shapiro, W. R., Green, S. B., Burger, P. C., Mahaley, M. S., Jr., Selker, R. G., VanGilder, J. C., Robertson, J. T., Ransohoff, J., Mealey, J., Jr., Strike, T. A. und et al., *Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001*, J Neurosurg **71** (1989): 1-9
177. Shenk, T. und Flint, J., *Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins*, Adv Cancer Res **57** (1991): 47-85
178. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K. und Kuwano, M., *Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer*, Clin Cancer Res **7** (2001): 3151-5
179. 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 **83** (1999): 732-7
180. Small, E. J., Carducci, M. A., Burke, J. M., Rodriguez, R., Fong, L., van Ummersen, L., Yu, D. C., Aimi, J., Ando, D., Working, P., Kirn, D. und Wilding, G., *A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer*, Mol Ther **14** (2006): 107-17
181. Sommerville, J., *Activities of cold-shock domain proteins in translation control*, Bioessays **21** (1999): 319-25
182. Sorokin, A. V., Selyutina, A. A., Skabkin, M. A., Guryanov, S. G., Nazimov, I. V., Richard, C., Th'ng, J., Yau, J., Sorensen, P. H., Ovchinnikov, L. P. und Evdokimova, V., *Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response*, Embo J **24** (2005): 3602-12
183. Southern, E. M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*, J Mol Biol **98** (1975): 503-17
184. Stein, U., Bergmann, S., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Royer, H. D., Schlag, P. M. und Walther, W., *YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene*, Oncogene (2005):
185. Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P. M. und Royer, H. D., *Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters*, J Biol Chem **276** (2001): 28562-9
186. Steinwaerder, D. S., Carlson, C. A. und Lieber, A., *DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells*, Hum Gene Ther **11** (2000): 1933-48
187. Stenina, O. I., Poptic, E. J. und DiCorleto, P. E., *Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells*, J Clin Invest **106** (2000): 579-87

188. Stenzl, *Prostatakarzinom*, Schriftenreihe Therapiempfehlungen, ITZ Tübingen (2004):
189. Stenzl, A., "*Prostatakarzinom*" Schriftenreihe Therapiempfehlungen, ITZ Tübingen (2004):
190. Stewart, P. L., Fuller, S. D. und Burnett, R. M., *Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy*, *Embo J* **12** (1993): 2589-99
191. Stickeler, E., Fraser, S. D., Honig, A., Chen, A. L., Berget, S. M. und Cooper, T. A., *The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4*, *Embo J* **20** (2001): 3821-30
192. Stolberg, S. G., *The biotech death of Jesse Gelsinger*, *N Y Times Mag* (1999): 136-140, 149-150
193. Stupp, R., Hegi, M. E., van den Bent, M. J., Mason, W. P., Weller, M., Mirimanoff, R. O. und Cairncross, J. G., *Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma*, *Oncologist* **11** (2006): 165-80
194. Sun, M., Xu, X., Lu, Q., Pan, Q. und Hu, X., *Schisandrin B: A dual inhibitor of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1*, *Cancer Lett* (2006):
195. Sutherland, B. W., Kucab, J., Wu, J., Lee, C., Cheang, M. C., Yorida, E., Turbin, D., Dedhar, S., Nelson, C., Pollak, M., Leighton Grimes, H., Miller, K., Badve, S., Huntsman, D., Blake-Gilks, C., Chen, M., Pallen, C. J. und Dunn, S. E., *Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells*, *Oncogene* (2005):
196. Swaminathan, S. und Thimmapaya, B., *Regulation of adenovirus E2 transcription unit*, *Curr Top Microbiol Immunol* **199 (Pt 3)** (1995): 177-94
197. Swamynathan, S. K., Nambiar, A. und Guntaka, R. V., *Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes*, *Faseb J* **12** (1998): 515-22
198. Swamynathan, S. K., Varma, B. R., Weber, K. T. und Guntaka, R. V., *Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, Chk-YB-1b, in DT40 cells results in major defects in cell cycle*, *Biochem Biophys Res Commun* **296** (2002): 451-7
199. Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. und Gottesman, M. M., *Targeting multidrug resistance in cancer*, *Nat Rev Drug Discov* **5** (2006): 219-34
200. Tanaka, M. und Grossman, H. B., *In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin*, *Gene Ther* **10** (2003): 1636-42
201. Tannock, I. F., Osoba, D., Stockler, M. R., Ernst, D. S., Neville, A. J., Moore, M. J., Armitage, G. R., Wilson, J. J., Venner, P. M., Coppin, C. M. und Murphy, K. C., *Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points*, *J Clin Oncol* **14** (1996): 1756-64

202. ten Bokkel Huinink, W. W., Prove, A. M., Piccart, M., Steward, W., Tursz, T., Wanders, J., Franklin, H., Clavel, M., Verweij, J., Alakl, M. und et al., *A phase II trial with docetaxel (Taxotere) in second line treatment with chemotherapy for advanced breast cancer. A study of the EORTC Early Clinical Trials Group*, *Ann Oncol* **5** (1994): 527-32
203. Tollefson, A. E., Ryerse, J. S., Scaria, A., Hermiston, T. W. und Wold, W. S., *The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants*, *Virology* **220** (1996): 152-62
204. Toth, K., Tarakanova, V., Doronin, K., Ward, P., Kuppuswamy, M., Locke, J. E., Dawson, J. E., Kim, H. J. und Wold, W. S., *Radiation increases the activity of oncolytic adenovirus cancer gene therapy vectors that overexpress the ADP (E3-11.6K) protein*, *Cancer Gene Ther* **10** (2003): 193-200
205. 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* **4** (1993): 147-57
206. Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M. 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* **84** (1987): 3004-8
207. Ueda, K., Pastan, I. und Gottesman, M. M., *Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene*, *J Biol Chem* **262** (1987): 17432-6
208. Ueno, N. T., Yu, D. und Hung, M. C., *Chemosensitization of HER-2/neu-overexpressing human breast cancer cells to paclitaxel (Taxol) by adenovirus type 5 E1A*, *Oncogene* **15** (1997): 953-60
209. 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* **277** (2002): 31694-702
210. Verma, R. P. und Hansch, C., *Chemical Toxicity on HeLa Cells*, *Curr Med Chem* **13** (2006): 423-48
211. Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A. und Nemerow, G., *Adenovirus internalization and infection require dynamin*, *J Virol* **72** (1998): 3455-8
212. Wang, X. und Bergelson, J. M., *Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection*, *J Virol* **73** (1999): 2559-62
213. Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. und Bar-Sagi, D., *Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53*, *Nat Cell Biol* **1** (1999): 20-6
214. Weinberg, D. H. und Ketner, G., *Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression*, *J Virol* **57** (1986): 833-8
215. Weltgesundheitsorganisation, *WHO Report 2002*, Genf 2002

216. Whyte, P., Ruley, H. E. und Harlow, E., *Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation*, J Virol **62** (1988): 257-65
217. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A. und Nemerow, G. R., *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*, Cell **73** (1993): 309-19
218. Wienzek, S., Roth, J. und Dobbelstein, M., *E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53*, J Virol **74** (2000): 193-202
219. Wolffe, A. P., *Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins*, Bioessays **16** (1994): 245-51
220. Wolffe, A. P., 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 **4** (1992): 290-8
221. Wong, H. K. und Ziff, E. B., *Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters*, J Virol **68** (1994): 4910-20
222. Wu, J., Lee, C., Yokom, D., Jiang, H., Cheang, M. C., Yorida, E., Turbin, D., Berquin, I. M., Mertens, P. R., Iftner, T., Gilks, C. B. und Dunn, S. E., *Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2*, Cancer Res **66** (2006): 4872-9
223. Xia, Z. J., Chang, J. H., Zhang, L., Jiang, W. Q., Guan, Z. Z., Liu, J. W., Zhang, Y., Hu, X. H., Wu, G. H., Wang, H. Q., Chen, Z. C., Chen, J. C., Zhou, Q. H., Lu, J. W., Fan, Q. X., Huang, J. J. und Zheng, X., *[Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus.]*, Ai Zheng **23** (2004): 1666-70
224. 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 **128** (2002): 621-6
225. Yew, P. R. und Berk, A. J., *Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein*, Nature **357** (1992): 82-5
226. Yu, D. C., Chen, Y., Dille, J., Li, Y., Embry, M., Zhang, H., Nguyen, N., Amin, P., Oh, J. und Henderson, D. R., *Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel*, Cancer Res **61** (2001): 517-25
227. Zajchowski, D. A., Boeuf, H. und Kedinger, C., *E1a inducibility of the adenoviral early E2a promoter is determined by specific combinations of sequence elements*, Gene **58** (1987): 243-56
228. Zeng, M., Cerniglia, G. J., Eck, S. L. und Stevens, C. W., *High-efficiency stable gene transfer of adenovirus into mammalian cells using ionizing radiation*, Hum Gene Ther **8** (1997): 1025-32

229. Zerfass, K., Spitkovsky, D., Schulze, A., Joswig, S., Henglein, B. und Jansen-Durr, P., *Adenovirus E1A activates cyclin A gene transcription in the absence of growth factors through interaction with p107*, J Virol **70** (1996): 2637-42
230. Zerler, B., Roberts, R. J., Mathews, M. B. und Moran, E., *Different functional domains of the adenovirus E1A gene are involved in regulation of host cell cycle products*, Mol Cell Biol **7** (1987): 821-9