

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme (Tab. 2-1), Plasmide (Tab. 2-2) und Zelllinien (Tab. 2-3) verwendet:

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> TOP 10 F'	F ⁻ , {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)}, mrcA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu), 7697, galU, galK, rpsL (Str ^R), end A1, nup G	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , thi-1, hsdS20 (r _s ⁻ , m _B ⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Str ^r), xyl-5, mtl-1	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>E. coli</i> SURE 2	e14- (McrA-), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, sup E44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r), uvrC [F' proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10 (Tet ^r) Amy, Cam ^r] ^a	Stratagene, La Jolla, USA

Tab. 2-1. Bakterienstämme und ihre genetischen Marken

2.1.2 Plasmide

Name	Resistenzmarker	Herkunft
PCR 2.1-TOPO	Amp ^r , Kan ^r	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
PCR 4Blunt-TOPO	Amp ^r , Kan ^r	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
PTRE2	Amp ^r	Clontech, Heidelberg, Deutschland
pZS2	Amp ^r	Zeg Sheng, Dallas, USA

Tab. 2-2. Verwendete Basisplasmide

2.1.3 Zelllinien

Für die Zellversuche wurden folgende permanente Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Zellkulturmedien
<ul style="list-style-type: none"> • 293HEK (humanes embryonales Nierenzellen) • HeLa (humanes Zervixkarzinom) • MeWo (humanes Melanom) • BEN (humanes Lungenkarzinom) 	DMEM (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) + 10% FKS (CCPRO, Neustadt, Deutschland) + 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma, Munich, Deutschland)
<ul style="list-style-type: none"> • H441 (humane Lungenkarzinom) 	RPMI 1640 (Gibco BRL) + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin + 2 mM Glutamine
<ul style="list-style-type: none"> • HepG2 (humanes hepatocelular karzinom) • HT-29 (humanes kolorectales Karzinom) 	RPMI 1640 + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin
<ul style="list-style-type: none"> • DMS53 (humanes Adenokarzinom der Lunge) 	Waymouths Medium (Sigma) + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin
<ul style="list-style-type: none"> • HUVEC (primäre humane Nabelschnur Endothelzellen) 	Medium 200 (DMSZ, Braunschweig, Germany)+ 1% Penicillin/Streptomycin + 2% <i>low serum growth supplement</i> (LSGS; Tebu-bio GmbH, Offenbach, Germany)
<ul style="list-style-type: none"> • NHM (normale humane Melanozyten) 	MCDB 153 (Biochrom) + 1% Penicillin/ Streptomycin + 2 mM Ca ⁺ + 5 µg/ml insulin (Sigma) + 10 µg/ml humane Transferrin (Sigma) + 0.4% <i>bovine pituitary extract</i> (Gibco) + 2 ng/ml <i>bovine basic fibroblast growth factor</i> (Boehringer Mannheim) + 1 nM cholera toxin (Calbiochem, La Jolla, CA) + 50 µM Hydrocortison (Serva, Heidelberg)

Tab. 2-3. Verwendete Zelllinien und ihre Kulturmedien

Die permanenten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, wobei der Mediumwechsel alle drei bis vier Tage erfolgte. Für die Zellkulturexperimente wurden die Zellen grundsätzlich auf 24-Well Zellkulturplatten (nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Vor der Infektion mit einem AdV bzw. RCA wurde, soweit nicht anders vermerkt, die Zellzahl pro Well bestimmt und die Infektionsdosis auf der Grundlage einzusetzender Partikel pro Zelle (P/Z) bzw. M.O.I. berechnet. Die Zelldichte lag i.d.R. für die Experimente bei 0.3 bis 1.1 x 10⁶ Z/W (s. 2.7, 2.15.2, 2.16)

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit 1x PBS (Gibco BRL) gewaschen und mit 500 µl 0.25%igem Trypsin-EDTA (Sigma) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale wurde unter einem Mikroskop kontrolliert, die Reaktion durch Zugabe von 1 ml frischem Medium gestoppt und die Zellen gezählt. Hierzu wurden 100 µl der resuspendierten Zellen mit 100 µl 1x PBS und 100 µl Tryptophanblau (Sigma) versetzt, gevortext und anschließend in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt.

2.2 Kulturmedien für Bakterienstämme

LB-Medium: 20 g Lennox L Broth Base (Invitrogene) mit A. bidest. auf 1 l auffüllen, für 15 min auf 121°C erhitzen und gießen.

LB-Agar-Platten: 32 g Lennox L Agar (Invitrogene) mit A. bidest. auf 1 l auffüllen, für 15 min auf 121°C erhitzen und gießen.

Für festes LB-Nährmedium bei selektiven Nährböden wurden in Abhängigkeit der verwendeten Plasmide Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Antibiotika	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	50
Kanamycin	30 bis 50

Tab. 2-4. Eingesetzte Antibiotika und ihre Endkonzentrationen

2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Regel orientierten sich die durchgeführten PCRs an PCR-Protokollen von Gassen et al. (1994) bzw. Newton & Graham (1994). Die Reaktionen erfolgten in 0.2 µl Reaktionsgefäßen in einem *Gene Amp Thermocycler 9700* (Applied Biosystems). Für einen Reaktionsansatz wurden die einzelnen Komponenten in folgenden Mengen eingesetzt:

Reagenzien	Endkonzentration
10x <i>Taq</i> -Puffer (Applied Biosystems)	1x
dNTPs (10mM, TIB MOLBIOL)	100-200 µM
<i>sense/antisense</i> Primer	Je 0.1-1.0 µM
Ampli <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	1-2.5 Units
DNA- <i>template</i>	0.1-0.5 µg
A. bidest.	ad. 20 µl bzw. 50 µl

Tab. 2-5. Endkonzentrationen für analytische (20 µl Reaktionsansatz) bzw. präparative (50 µl Reaktionsansatz) PCR

Die *Taq*-Polymerase zeigt matritzenunabhängig die Eigenschaft, an das 3'-Ende von PCR-Produkten einen unspezifischen Übergang der Base Adenosin (A) anzufügen, wodurch das so genannte T/A-Klonieren ermöglicht (Marchuk *et al.* 1991) wird.

In d. R. wurde nachfolgendes PCR-Programm verwendet:

initiale Denaturation	94°C, 2 min.
25-40 Zyklen:	
Denaturation	95°C, 30 sec.
Annealing	52-72°C, 30 sec.
Extension	72°C, 30-90 sec. (je nach Fragmentlänge)
finale Extension	72°C, 10 min.
Kühlung auf	4°C, ∞

Tab. 2-6. Reaktionsbedingungen der PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase

Die geeignete Annealingtemperatur (T_m) wurde näherungsweise für jeden der verwendeten Primer mit Hilfe der Formel $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ berechnet (Wallace *et al.* 1979). Die Länge der gewählten Extensionszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Es wurde davon ausgegangen, dass ca. 1000 bp/min synthetisiert werden.

Anschließend wurden zur Kontrolle der PCR 5 μ l Reaktionsgemisch in einem 1%igem Agarosegel analysiert (s. 2.5.5.1) und das PCR-Fragment in den pCR[®]2.1-TOPO (Tab. 2-2) nach der Anleitung des Herstellers kloniert.

2.4 Herstellung elektrokompenter Zellen

2 ml einer *E. coli*-Vorkultur in 250 ml LB-Medium wurden bis zu einer OD_{595nm} von 0.5 bis 0.6 bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in auf 4°C gekühlte 50 ml-Röhrchen überführt und für 10 min im Eisbad inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 3000g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert (*Centrifuge 5810R*, Eppendorf) und das Zellpellet mit 50 ml eiskalter $MgCl_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 3000g für 5 min und 0°C zentrifugiert, danach die erhaltenen Zellpellets in 50 ml 0.1M $CaCl_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert, für 20 min auf Eis gehalten und bei 3000g für 15 min bei 0°C abzentrifugiert.

Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in 5 ml 0.1M $CaCl_2$ /14%igem 4°C-kaltem Glycerinwasser resuspendiert, in 1.5 ml Eppendorfgefäßen zu je 40 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der elektrokompenten Zellen erfolgte bei -80°C.

2.5 DNA-Präparation

2.5.1 Plasmid-Präparationen aus *E. coli*

2.5.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Für die Isolation der Plasmide wurde der *E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I* (Classic-Line, peqlab Biotechnologie) verwendet. 1.5 ml der Plasmid-transformierte *E. coli*-Übernachtskultur wurde für 1 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach nochmaligem Entfernen des

restlichen LB-Mediums, wurde das Zellelet nach Angabe des Herstellers behandelt. Die Isolierung der DNA basierte auf die Bindung zu einer Silikanmembran, von der mit 50 µl A. bidest. eluiert und zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen wurde.

2.5.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidmaxipräparation mit dem *JETSTAR* von *GENOMED* (Löhne, Deutschland) basiert auf der Bindung der Plasmid-DNA an den Anionen-Austauscher Resin.

Für die Plasmidmaxipräparation wurden 300 ml LB-Agar (invitrogen) mit 300 µl Ampicillin (50 mg/ml, Sigma) versetzt und mit 10 µl der Bakterienstock-Lösung bei 37°C über Nacht bei 225 rpm inkubiert (Certomat H, Braun).

Aus 800 µl der nach 16 bis 24 h entstandener Bakteriensuspension und 200 µl Glycerin (75%) wurde ein Bakterienstock angelegt und bei -80°C gelagert. Die restliche Bakteriensuspension wurde für die Plasmidmaxipräparation genutzt.

Die Bakteriensuspension wurde auf 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und bei 6000g für 15 min bei 4°C zentrifugiert (Heraeus *Varifuge RF*). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet nach Angabe des Herstellers behandelt. Entsprechend der DNA-Menge wurde das DNA-Pellet in 250-400 µl A. bidest gelöst und 1 µl zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

2.5.2 Präparation von genomischer DNA und Adenovektor-DNA aus transduzierten Zellen

Genomische zelluläre und Adenovektor (AdV)-DNA aus transduzierten Zellen wurde mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II* (Classic Line, Peqlab Biotechnologie) anhand des Isolierungsprotokolls für eukaryotische Zellen und Gewebe nach den Angaben des Herstellers präpariert und in 400 µl Elutionspuffer eluiert. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung der DNA. Hierzu wurde diese mit 8 µl 5 M NaCl und 800 µl 100%igem Ethanol versetzt, durch Vortexen sorgfältig gemischt, für 20 min bei -20°C gefällt und darauf 15 min bei 10000 rpm in einem Eppendorf Tischzentrifuge

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 700 µl 80%igem Ethanol mittels 2-minütiger Zentrifugation bei 10000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die DNA im Anschluß 2 min luftgetrocknet und in 30 µl A. bidest. gelöst.

2.5.3 Präparation von Adenovektor-DNA aus Adenovektorpräparationen

Zur Überprüfung der korrekten Insertion der Transgene in die adenovirale DNA war es notwendig, AdV-DNA aus Adenovektorpräparationen zu präparieren. Dazu wurden ca. 2×10^{11} AdV-Partikel mit 26.6 µl Lysispuffer* bei 37°C für 1 h inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden 40 µl 5 M NaCl (Sigma) zugegeben und gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma). Das Gemisch wurde gevortext, bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, erneut mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und wieder zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde anschließend nach Zugabe von zwei Volumen 100%igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) bei -20°C zwei Stunden gefällt, 10 min zentrifugiert bei 14000 rpm, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wurde anschließend in 20 µl TE-Puffer** gelöst.

*Lysispuffer

3 µl Proteinase K
(10 mg/ml, Boehringer Mannheim)
17.6 µl 10% SDS (Sigma)
6 µl 0.5 M EDTA (Sigma)
mit A. bidest. auf 300 µl auffüllen

**TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8.0 (Merck)
1 mM EDTA pH 8.0 (Sigma)

2.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese

Die durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.5.5.1) unter Einsatz eines Größenmarkers charakterisierten DNA-Fragmente wurden während der Sichtbarmachung auf dem

Transilluminator *TM-15* (UVP) mit einem Skalpell ausgeschnitten und ausgewogen. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem *Quiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) anhand des *quiaquick gel extraction kit*-Protokolls unter Verwendung einer Mikrozentrifuge (Eppendorf *Centrifuge 5415R*) nach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Fragmente wurden abschließend mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.5.5 Analyse von Nukleinsäuren

2.5.5.1 Agarosegelelektrophorese

Für analytische Zwecke wurden 0.8 bis zu 1.5%ige 1x TAE^{*}-Agarosegele mit 0.005% Ethidiumbromid (Sigma) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor den Auftragen auf das Gel mit DNA-*loading*-Probenpuffer (PeqLab) vermischt. Die Trennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 7 V/cm für ca. 20-30 min in TAE^{*}-Puffer.

Die DNA konnte mit Hilfe eines UV-B-Transilluminator (UVP) visualisiert werden. Durch den Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen internen Längenstandard (1Kb, PeqLab) wurde die Fragmentgröße bestimmt.

Für präparative Zwecke erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA bei niedriger Stromstärke. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit dem UV-B-Transilluminator (UVP) identifiziert, aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend gereinigt (s. 2.5.4).

* Stammlösung 20x TAE-Puffer (pH 8.0)

0.8 M	Tris-Base (Trizma-Base; Sigma)
0.2 mM	EDTA (Sigma)
22.8 ml	Essigsäure (Carl Roth)

2.5.5.2 Restriktionsverdaue

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von *New England Biolabs* bezogen und entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Die zu spaltenden DNA-Fragmente, Plasmide und AdV-DNA wurden gemäß den vom Hersteller (*New England Biolabs*) empfohlenen Reaktionsbedingungen (Puffersysteme, Reaktionstemperatur, Mengenverhältnisse etc.) gespalten. Der Verdau von PCR-Produkten erfolgte nach der Gelreinigung der Fragmente (s. 2.5.5.1) i.d.R. mit einem Restriktionsenzymkonzentration von 1 U/ μ g für Plasmid-DNA und eine Inkubation bei der entsprechenden Temperatur von 1 bis 4 h, die DNA-Fragmente wurden von 2 bis 10 h inkubiert und die Virus-DNA über Nacht inkubiert mit einem Enzymkonzentration von 5 U/ μ g. Ein Aliquot der nach dem Verdau gewonnenen Proben wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Menge anhand der Bandintensität im Vergleich zum Marker (definierte Menge) grob quantifiziert.

2.5.5.3 Restriktionsfragment-Analyse

Die Restriktionsfragment-Analyse stellte zum einen während der Plasmidkonstruktion ein hilfreiches Element zur Prüfung des hergestellten Plasmids dar, zum anderen wurde sie zur Kontrolle der AdV-DNA nach der Viruspräparation eingesetzt. Das aus einer Plasmidminipräparation (s. 2.5.1) gewonnene Plasmid ließ sich auf das Vorhandensein des inserierten Gens überprüfen, indem spezifische Schnittorte in der Sequenz aufgesucht und die entsprechenden Restriktionsenzyme eingesetzt wurden. Im Anschluss nach dem Verdau erfolgte die Charakterisierung des spezifischen Bandenmusters mittels Agarosegelelektrophorese (s.2.5.5.1).

2.5.5.4 DNA-Sequenzierung

Alle Plasmide wurden auf ihre Richtigkeit überprüft mittels Sequenzierung. Für die Sequenzierung wurden 400 ng Plasmid-DNA bzw. 50-100 ng PCR-Fragment verwendet. 1 μ l *Big Dye*-Puffer (10x), 1 μ l 10 μ M Primer und 2 μ l *Big Dye Prämix* (Applied Biosystems) zugefügt und mit A. bidest. auf 10 μ l aufgefüllt.

Die Sequenzreaktion erfolgte erst nach Erhitzen dem Reaktionsansatz 4 min bei 98°C im *Gene Amp Thermocycler 9700* (PE Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen:

25 Zyklen mit jeweils:

96°C 10 sec

58°C 5 sec

60°C 4 min

Abkühlung auf 4°C

Im Anschluss daran konnte die DNA für die Sequenzierung aufgearbeitet werden. Hierfür erfolgte die Zufügung zum amplifizierten DNA-Produkt von 90 µl A. bidest., 10 µl 3 M Natriumazetat (pH 4.8) und 250 µl 100%iges Ethanol, anschließend wurde das Gemisch 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgenommen, dem DNA-Pellet 400 µl 70%iges Ethanol zugegeben, gevortext und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, die DNA 5 min bei 56°C in einem Thermomixer 5436 (Eppendorf) getrocknet und mit 30 µl A. bidest. resuspendiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des *Gene Analyzer ABI 310* (Applied Biosystems) unter Verwendung der *ABI DNA Sequencing Analysis Software*.

2.6 Ligation und Transformation in *E. coli*

Für die Ligationen betrug das Reaktionsvolumen in der Regel 20 µl, wobei die drei- bis fünffache Menge an Insert gegenüber dem Vektor eingesetzt wurde. Die Reaktionen erfolgten 2 h mit 0.5 U T4-DNA-Ligase (*New England Biolabs*) bei 20°C. Anschließend wurde der Ligationsansatz für die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet.

Die Transformation von chemokompetenten Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Tab. 2-1). Nach dem Hitzeschock wurden 900 µl LB-Medium (250 µl für *TOP-10 E. coli*-Zellen, invitrogen) zugefügt und die Bakterien 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert (Certomat H). Die Bakteriensuspension wurde zu je 50 µl und 200 µl auf 6 cm LB-Amp- bzw. Kn-Plastikkulturschalen ausplattiert und die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert.

Als negative Kontrolle dienten stets nicht transformierte Zellen. Die gewachsenen Klone wurden mit einem Holzzahnstocher gepickt und in 2.5 ml LB-Medium versetzt mit Ampicillin bzw. Kn (Tab. 2-4) überführt. Die Inkubation dauerte über Nacht bei 37°C und 225 rpm.

2.7 Plasmidklonierung in E.coli

2.7.1 *Carcinoembryonic* Antigen (CEA)-Promotor

Der *carcinoembryonic* Antigen (CEA)-Promotor (-299/+100) wurde vom Plasmid pCEA424/2CAT (K. Brand, Humboldt-Universität Berlin, Deutschland, (Schrewe *et al.* 1990)) mit *Bam*HI/*Hind*III gespalten und in das *Bam*HI/*Hind*III-verdaute Plasmid pAd5TRE-Luc kloniert. Von dem resultierenden Konstrukt ließ sich der CEA-Promotor mittels CEA-847s- und CEA-1342-Sacla-Primer (s. 8.1) amplifizieren, das PCR-Fragment mit *Sac*I/*Bam*HI spalten und in das mit *Sac*I/*Bam*HI aufgeschnittene pAd5TRE-Luc-Plasmid klonieren. Daraus ergab sich das Plasmid **pAd5tetO₇CEA-Luc** (s. 8.2).

Die *adenoviral terminal sequence* Ad5 ließ sich vom Plasmid pAd5-HIF1 α -tightSPB-E1A Δ pRB mittels die Restriktionsenzyme *Xho*I/*Pme*I herausspalten. Gleichzeitig wurde das Plasmid pAd5tetO₇CEA-Luc mit dem Enzym *Sac*I linearisiert, mit der T4-Polymerase die Enden aufgefüllt und durch ein *Xho*I-Verdau das linearisierte Plasmid nochmals geschnitten. Das *Xho*I/*Pme*I-Ad5-Fragment integrierte man in das aufgeschnittene *Sac*I/*Xho*I-pCEA-Luc-Plasmid. Daraus resultierte das **pAd5CEA-Luc** (s. 8.2).

Das Plasmid **pCEA-Luc** (s. 8.2) wurde nach Entfernen der Ad5- und tetO₇-Sequenz von dem Plasmid pAd5tetO₇CEA-Luc, durch den Verdau des Plasmides mit den Restriktionsenzyme *Xho*I und *Sac*I und dem folgenden Auffüllen der Enden mit T4-Polymerase sowie Religation gebildet.

Nach dem Ersetzen der Luciferase-Gen durch die mutierte E1A-cDNA (E1A Δ pRB) in den Plasmid pAd5tetO₇CEA-Luc unter Verwendung der Enzyme *Bam*HI/*Nhe*I, entstand das Plasmid **pAd5tetO₇CEA-E1A Δ pRB** (s. 8.2).

2.7.2 Tyrosinase (Tyr)-Promotor

Der Tyrosinase-Promotor mit zwei im Tandem positionierte humane Enhancer (hTyr2E/P) (D.M. Nettelbeck, Universität Nürnberg-Erlangen, Deutschland) wurde von pHTypGL3 durch *KpnI/BglII* herausgespalten und in das *KpnI/BglII*-gespaltene pAd5TRE-Luc Plasmid integriert. Daraus resultierte das Plasmid **pAd5tetO₇hTyr2E/P-Luc** (s. 8.2).

Nach Entfernung der *adenoviral terminal sequence* Ad5 (1-342) von pAd5tetO₇hTyr2E/P-Luc mittels *AatII/SacI*-Spaltung und Insertion eines aus 234 Basenpaaren bestehenden *AatII/SacI*-PCR-Fragmentes erhielt man das Plasmid **phTyr2E/P-Luc** (s. 8.2). Dieses Fragment wurde mit den Primern pD-M2-4590-AatII_s und pD-M2-4824-SacI_a (s. 8.1) von dem Plasmid pTR-UF3 (S. Weger, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) amplifiziert.

Durch die *XhoI*-Restriktion von dem Plasmid pAd5tetO₇hTyr2E/P-Luc erfolgte die Entfernung der *adenoviral terminal sequence* Ad5, der tetO₇-, und der 2hE/P-Sequenz und die darauf folgende Religation ergab das Plasmid **pTyr-Luc** (s. 8.2).

Das Plasmid **pAd5Tyr-Luc** (s. 8.2) entstand mittels Klonierung eines PCR-Fragmentes durch die *XhoI*-Schnittstelle in den Plasmid pTyr-Luc. Dabei wurde zunächst die *adenoviral terminal sequence* Ad5 von pAd5tetO₇hTyr2E/P-Luc mit den Primern E1-1-*XhoI*_s und E1-342-*XhoI*_a (s. 8.1) amplifiziert und gleichzeitig zwei *XhoI*-Restriktionsstellen an die 5'- und 3'-Flanken der Sequenz kloniert.

Das Plasmid **pTyrex-2** (s. 8.2) wurde von D. Bartlett (*Nacional Center Institute*, Bethesda, USA) (McCart *et al.* 2002) erhalten. Dieses enthält das Reporterluciferase-Gen, welches durch den humane Tyrosinase-Promotor und zwei im Tandem positionierte Tyrosinase-Enhancer (2mE-Tyr) aus Maus gesteuert wird.

2.7.3 Surfactant protein-B (SPB)-Promotor

Der *surfactant protein-B* (SPB)-Promotor (-500/+15) ließ sich von den Zellen HT-29 mit den Primern SPB-500-SacI_s und SPB-500-BamHI_a (s. 8.1) amplifizieren und mittels *SacI/BamHI* in das Plasmid pAd5TRE-Luc klonieren. Hieraus ergab sich das Plasmid **pAd5tetO₇SPB-Luc** (s. 8.2).

Die Plasmide **pAd5SPB-Luc** und **pSPB-Luc** (s. 8.2) wurden nach den gleichen Protokollen konstruiert wie bei pAd5CEA-Luc und pCEA-Luc.

Das Plasmid **pAd5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}** (s. 8.2) wurde durch Ersetzung im Plasmid pAd5tetO₇SPB-Luc des Luciferase-Gens durch das mutierte E1A-cDNA (E1A_{ΔpRB}) über *BamHI/NheI* entwickelt.

2.7.4 *Alfa fetoprotein (AFP)-Promotor*

Das 0.4 Kb-Fragment von der *humane vascular endothelial growth faktor* 5'-flankierenden Sequenz, welches ein *hypoxi responsive element* (HRE) enthält, war bereits mit einem 0.3 Kb *alpha fetoprotein* (AFP)-Promotor fusioniert und wurde von dem Plasmid pLNAF0.3TK (A. Ido, Miyazaki Medical College, Kiyotake, Japan) mit den Primern AFP-4-XhoI_s und AFP-1125-BamHI_a (s. 8.1) amplifiziert sowie in das pCR4Blunt-TOPO kloniert. Das [HRE]AFP-Promotorfragment wurde mittels *XhoI/BamHI* in das Plasmid pAd5TRE-Luc kloniert. Im Ergebnis erhielt man das Plasmid **p[HRE]AFP-Luc** (s. 8.2).

Ein DNA-Fragment, welches die *adenoviral terminal sequence* Ad5, die tetO₇-Sequenz und den CMV_{min}-Promotor enthält, wurde von dem Plasmid pAd5TRE-Luc mit den Primern E1-1-XhoI_s und Luc-Seq-XhoI_a (s. 8.1) amplifiziert sowie mittels *XhoI* in das Plasmid p[HRE]AFP-Luc eingefügt. Anschließend wurde der CMV_{min}-Promotor mit dem Restriktionsenzym *KpnI* herausgespalten. Hieraus entstand das Plasmid **pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc** (s. 8.2).

Das Plasmid **pAFP-Luc** (s. 8.2) entstand durch *AatII/SacI*-Spaltung von pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc und nachfolgende Integration des amplifizierten PCR-Fragmentes aus pTR-UF3 mit den Primern pD-M2-4590-AatII_s und pD-M2-4824-SacI_a (s. 8.1).

Die Konstruktion des Plasmides **pAd5AFP-Luc** (s. 8.2) erfolgte durch *XhoI/SacI*-Restriktion von pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc, womit die *adenoviral terminal sequence* Ad5, die tetO₇-, und die HRE-Sequenz herausgespalten wurden und die Einfügung einer *adenoviral terminal sequence* Ad5-PCR-Fragment, welche von pAd5TRE-Luc durch die Primer TRE2-3596_s und E1A-342-SacI_a (s. 8.1) amplifiziert wurde.

2.8 Plasmidtransfektion in Zelllinien

Für die Plasmidtransfektion wurden die Zellen in der Regel auf 12-Well Zellkulturplatten ausgesät und mit Hilfe des *MBS Mammalian Transfection Kit* (Stratagene) transfiziert, sobald sie 50% konfluent waren. Der Transfektionsansatz wurde gemäß den Protokollangaben des Herstellers wie folgt vorbereitet:

Reagenz	Volumen
Solution 1*	6.25 µl
Plasmid-DNA	2 µg
A. bidest.	ad. 125 µl
Solution 2*	62.5 µl

Tab. 2-7. Reaktionsansatz für Plasmidtransfektion

Der Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die zu transfizierenden Zellen in der Zwischenzeit zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml zelleigenem Medium überschichtet. Hierauf wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Medium gegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und im zelleigenen Medium bis zur Auswertung unter der üblichen Atmosphäre inkubiert.

* Solution 1	2.5 M	CaCl ₂
Solution 2	2x	BBS pH 6.95

2.9 RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen mit *RNAclean* beruht auf einer Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionmethode der RNA. Die Zellen wurden mit 1 ml *RNAclean* (WAK-Chemie Medical) direkt auf der Zellkulturplatte lysiert und die RNA anschließend nach dem *RNAclean*-Präparationsprotokoll für adhärenzte Zellen des Herstellers auf Eis präpariert.

Abschließend wurde das RNA-Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser, *USB Corporation*) gelöst, für 10 min bei 60°C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

weitere benötigte Reagenzien:

Chloroform (Sigma)

Isopropanol (Sigma)

70% Ethanol (Mallinckrodt Baker)

2.10 RNA- und DNA-Quantifizierung und Reinheit

Die Konzentrationsbestimmung der RNA und der DNA erfolgte fotometrisch mit dem UV-Spektrometer *Genesys 6 (ThermoSpectronic)*. Dabei wurden die RNA-Proben in Abhängigkeit von der erwarteten Konzentration 1:35 bis 1:70, die DNA-Proben im allgemeinen 1:70 mit A. bidest. verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) bestimmt (eine A_{260} -Einheit entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bzw. 50 µg DNA/ml). Der Quotient A_{260}/A_{280} erlaubte in Abhängigkeit vom pH-Wert der Verdünnungslösung eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA bzw. DNA. Die RNA bzw. DNA hatte bei einem pH-Wert von 7.5 einen A_{260}/A_{280} -Quotienten von 1.6 bis 2.1.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

RNA Konzentration der Probe in µg/µl = $(A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 \text{ µg/ml})/1000$.

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

DNA Konzentration der Probe in µg/µl = $(A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 \text{ µg/ml})/1000$.

2.11 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Reverse-Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, synthetisiert einen zu einer RNA-Matrize komplementären DNA-Strang (cDNA). So entstand unter Verwendung eines Hexamere-Primers durch Randomamplifikation, ein RNA-DNA-

Hybrid, dessen DNA-Anteil als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diene.

Ein 20 µl Reaktionsvolumen wurde für 200 ng Gesamt-RNA angesetzt:

Reaktionsansatz:

200 ng	Gesamt-RNA
0.5 µl	Random-Primer (0.09 U/µl, Gibco BRL)
ad. 12 µl	A. bidest.

Der Ansatz wurde für 10 min auf 70°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und nach dem Abzentrifugieren des Kondenswassers in einem Tischzentrifuge bei maximalen Umdrehungen mit 4 µl 5x *First Strand*-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3 bei RT; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Gibco), 2 µl 0.1 M DTT (Gibco), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (PeqLab) und 1 µl *Superscript II RNaseH*-Reverse-Transkriptase (200 U/µl, Gibco) versetzt.

Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen im *Trio Thermoblock V2.23* (Biometra):

25°C	10 min
42°C	50 min
70°C	15 min
Abkühlung auf 4°C	

Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt, bei einer späteren Verwendung bei -20°C gelagert oder sofort in der PCR eingesetzt (s. 2.3).

2.12 Quantitative kompetitive PCR

2.12.1 Konstruktion eines verkürzten DNA-Längenstandards

Die verkürzten DNA-Längenstandards wurden für die Quantifizierung der Virus-DNA durch die Luciferase- bzw. E1A-Messung mittels kompetitiver quantitativer PCR benötigt (Haack *et al.* 1999). Diese entsprechen in der Gensequenz dem jeweiligen

Gen (hier der Luciferase bzw. E1A und des zellinternen Standards GAPDH), sind allerdings um eine bestimmte Basenpaareanzahl verkürzt, um sie nach der PCR von dem spezifisch nachzuweisenden nativen DNA-Fragment unterscheiden zu können.

Verwendete Primer:

E1A-1s	bp 1-bp 20
E1A-vLS-120a	bp 69-bp 120; Deletion von Nukleotidposition 89 bis 100

Tab. 2-8. Verwendete Primer zur Herstellung des verkürzten Längenstandards

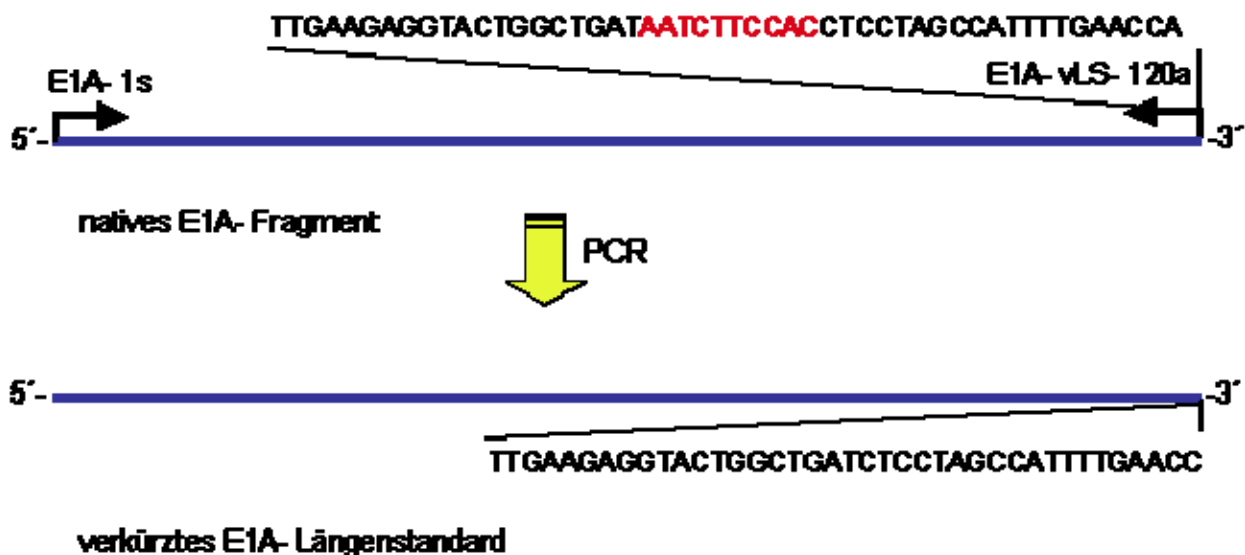


Abb. 2-1. Graphische Darstellung zur Konstruktion des verkürzten Längenstandards. Die rot markierten Nukleotide sind im Primer E1A-vLS-120a deletiert. Für Primersequenzen siehe Absatz 8.1

Die hier eingesetzten Längenstandards beinhalten eine 10 (GAPDH-Standard), 12 (Luciferase-Standard) und 10 (E1A-Standard) Basenpaare (bp) umfassende Deletion. Der verkürzte DNA-Längenstandard für GAPDH und Luciferase war bereits im Labor vorhanden (Fechner *et al.* 1999; Fechner *et al.* 2003a).

Der Primer E1A-vLS-120a (Tab. 2-8, s. 8.1) besitzt eine Deletion von 10 bp, die am Sequenzabschnitt der E1A-cDNA lokalisiert ist (bp 69-bp 120). Mit Hilfe der Primern E1A-1s und E1A-vLS-120a (s. 8.1) amplifizierte man den verkürzte DNA-Längenstandard (Abb. 2-1).

2.12.2 Kompetitive PCR

Die kompetitive PCR (DNA-Probe gegen verkürzten Längenstandard-DNA) wurde unter Verwendung der *Taq*-Polymerase (Applied Biosystems) durchgeführt. Sie erfolgte für GAPDH, Luciferase oder E1A in separaten Reaktionsansätzen zu jeweils 20 µl, wobei unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Primer verwendet wurden, die eine spätere Analyse der Amplifikate im *Genetic Analyzer ABI 310* ermöglichten (Primerpaare für GAPDH: GAPDH-682s-T/GAPDH-826a, für Luciferase: Luc-334s/Luc-426a-F, für E1A: E1A-1s/ E1A-119a-F, s. 8.1). Der fluoreszierende Farbstoff (FAM [F] bzw. TAMRA [T]) war an das 5'-Ende des Primers gekoppelt.

Reagenzien	Volumen (µl)
10x PCR-Reaktionspuffer	2
dNTP-Mix 10 mM	0.5
<i>Taq</i> -Polymerase	0.2
PCR-Primer 10 µM; <i>sense/antisense</i>	je 1
verkürzter DNA-Längenstandard	variabel
DNA-Template (30 ng)	variabel
A. bidest.	ad 20

Tab. 2-9. Reaktionsansatz für die kompetitive PCR

2.12.3 Nachweis der Produkte mittels *GeneScan*-Analyse

Die fluoreszenzmarkierten Amplifikationsprodukte konnten, nachdem je 2 µl Luciferase- bzw. E1A- und GAPDH-PCR-Produkt in 15 µl *template supression reagent* (TSR; PE Applied Biosystems) im Trio-Thermoblock (Biometra) für 2 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt wurden, durch Kapillarelektrophorese unter Verwendung des Polymers POP4 (PE Applied Biosystems) im *Genetic Analyzer ABI 310* (Applied Biosystems) nachgewiesen werden. Dabei zeigt die *ABI 310 collection software* einen Ausschlag in Form eines Peaks für jedes Signal, der in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Farben besitzt (Abb. 3-8).

Die Analyse im *Genetic Analyzer ABI 310* (Abb. 3-8) ergab eine deutliche Auftrennung des nativen und des verkürzten Fragments sowohl für Luciferase und E1A als auch des bereits im Labor etablierten GAPDH-Standards und ermöglichte die durch Berechnung des Flächeninhalts der *Peaks* unter Verwendung der *GeneScan*-Software eine quantitative Analyse der amplifizierten Fragmente.

Das Verhältnis zwischen nativem E1A-PCR-Produkt und Standard-E1A-PCR-Produkt wurde zur Berechnung der Virus-DNA-Menge von E1A enthaltene onkolytische Adenovektoren in den Zellen genutzt. Unterschiede bei den in der PCR eingesetzten DNA-Mengen wurden durch Berücksichtigung des Verhältnisses zwischen nativem E1A-PCR-Produkt und Standard-GAPDH-PCR-Produkt korrigiert. Die folgende Formel wurde zur Berechnung genutzt:

$$\frac{\frac{\text{E1A}}{\text{E1A-Stand.}} \times \text{Konzentration E1A-Standard}}{\frac{\text{GAPDH}}{\text{GAPDH-Stand.}} \times \text{Konzentration GAPDH-Standard}} = \text{relative E1A-DNA}$$

2.12.3.1 Ermittlung der in der quantitativen PCR einzusetzenden Menge an Luciferase- und GAPDH-Standard

Die Ermittlung der einzusetzenden Menge der jeweiligen Standards erfolgte durch Stichproben, von denen anzunehmen war, dass sie im mittleren Wertebereich der Versuchsreihe lagen. Es wurden hierzu 30 ng Gesamt-DNA der entsprechenden Probe zusammen mit jeweils 1 µl der unterschiedlichen Verdünnungsstufen (K1 bis K3) des Luciferase- bzw. GAPDH-Standards für die gemeinsame PCR eingesetzt.

Verwendete Verdünnungsstufen:

K1	10 ⁻²
K2	10 ⁻³
K3	10 ⁻⁴

Nach PCR und *GeneScan*-Analyse wurde diejenige Verdünnungsstufe ausgewählt und für die Untersuchung der weiteren Proben eingesetzt, bei der die *peak*-Flächen von nativem und Standard-PCR-Produkt annähernd gleich groß waren, d.h. der Quotient aus nativem und Standard-PCR-Produkt im Idealfall 1 ergab (Abb. 3-8). Gegebenenfalls musste das einzusetzende Volumen der ausgewählten Verdünnungsstufe in einem zweiten Versuch genauer bestimmt werden, um dem optimalen Quotienten möglichst nahe zu kommen.

2.12.3.2 Ermittlung der optimalen Zykluszahl für die quantitative PCR

Die Auswahl der optimalen Zykluszahl der PCR erfolgte nach zwei Kriterien. Zum einen sollte sich die PCR möglichst im exponentiellen Bereich befinden, da in diesem Bereich die kompetitiven Mechanismen störungsfreier zum Tragen kommen und eine genauere Quantifizierung gestatten. Zum anderen müssen ausreichend PCR-Amplifikate vorliegen, um auswertbare *Peaks* (am günstigsten 1000 bis 10000 Einheiten) in der Fragmentanalyse zu erreichen. Die Überprüfung des exponentiellen Bereiches erfolgte durch die Doppelbestimmung der Amplifikatmenge mittels Fragmentanalyse nach 22, 24, 26, 28, 30 und 32 PCR-Zyklen, wobei überprüft wurde, bis zu welchem Bereich sich die Menge an PCR-Amplifikaten (entspricht der *Peakfläche*) annähernd exponentiell vermehrt. Nach dieser Optimierung wurden alle Proben mit entsprechenden optimierter Zykluszahl und Menge an Längenstandard untersucht.

2.13 Transfertechniken

2.13.1 Northern-Blot

Zur Herstellung des 1%igen Agarosegels wurde die Agarose (Seakem LE Agarose; FMC Bio-Products) in autoklaviertem 1x MOPS-Puffer*¹ gelöst, nach dem Abkühlen auf 60°C Formaldehyd (37%; Sigma) zur einen Endkonzentration von 6% zugegeben und das Gel in die zuvor mit 1%igem SDS gründlich gereinigte und mit A. bidest. gespülte Kammer gegossen. 10 bis 25 µg Gesamt-RNA wurden auf Eis mit 5 µl

Ladepuffer*² und 0.01 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml; Sigma) versetzt und mit RNase-freiem Wasser (Amersham) auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert, um entstandenes Kondenswasser zu entfernen, und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der aufgetragenen Proben erfolgte in 1x MOPS-Puffer*¹ bei 100-120 V. Nach Kontrolle der 18S- und 28S-rRNA Banden mit dem Transilluminator (UVP) wurde das Gel zwei mal 30 min in A. bidest. gewässert.

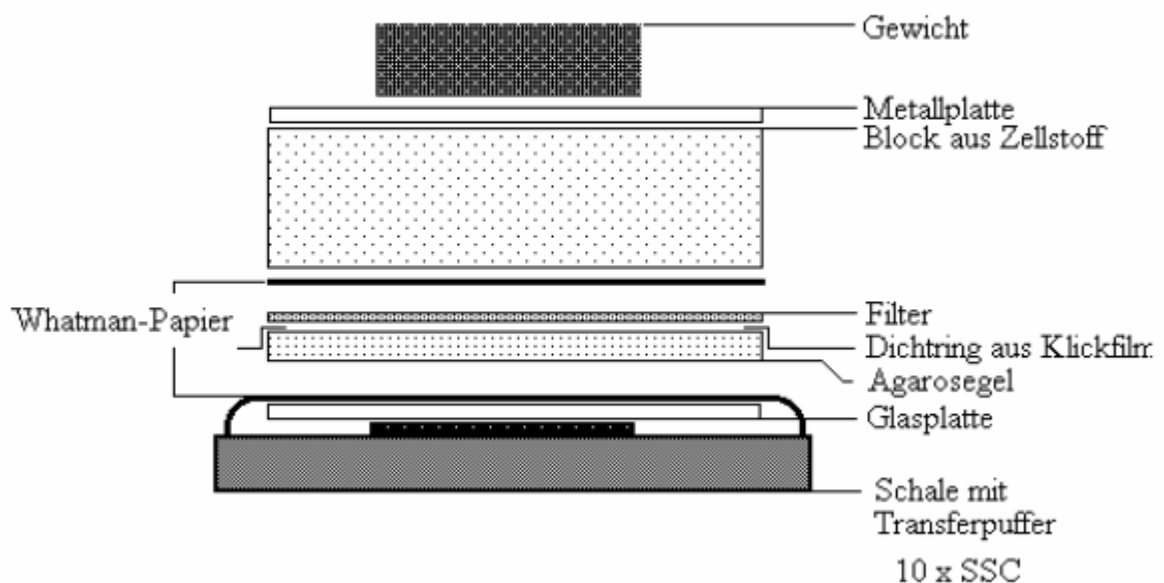


Abb. 2-2. Schematische Darstellung zum Aufbau des Northern-Blot-Transfers (modifiziert nach Sambrook et al. 1989)

Der Aufbau der Bloteinrichtung erfolgte anhand der Abb. 2-2, wobei das Gel mit den Geltaschen nach unten auf 3MM Chromatographiepapier (Whatman International Ltd.) lag. Als Transferpuffer diente 10x SSC-Puffer*³. Der RNA-Transfer auf die Transfermembran (*HybondTM N-hybridization membrane*; Amersham) erfolgte in 12 bis 16 h. Vollständige Transfer der RNA wurde durch eine Überprüfung des Gels unter dem Transilluminator kontrolliert. Die Position der 18S- und 28S-rRNA-Bande wurde auf der Transfermembran markiert, die Membran anschließend 30 min an der Luft getrocknet und die RNA durch zweimaliges *Cross-linken* unter UV-Licht (*UV-Stratalinker 1800*; Stratagene) an die Membran fixiert. Die Aufbewahrung der

Membran konnte in einer Klarschichttüte bei 4°C bis zur Verwendung gelagert werden.

*¹ Stammlösung 10x MOPS-Puffer (autoklavieren, abgedunkelt lagern)

0.2 M	MOPS (6 Morpholinpropansulfonsäure, Sigma)
0.05 M	Na-Acetat (Sigma)
0.01 M	EDTA (pH 7,0)

*² Ladepuffer pro 1.5 ml

720 µl	deionisiertes Formamid (Amresco)
260 µl	Formaldehyd 37% (Sigma)
160 µl	10x MOPS-Puffer
80 µl	gesättigtes Bromphenolblau (Sigma)
180 µl	RNase-freies Wasser (Amersham)

*³ Stammlösung 20x SSC-Puffer

3 M	NaCl (Sigma)
0.3 M	Na-Citrat (Sigma)

2.13.2 Southern-Blot

10 µg *Hind*III-verdaute genomische DNA wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde anhand des mitgeführten Markers 1 Kb (PeqLab) der Ort der Markerbanden markiert. Die Markerbahn wurde i.d.R. entfernt und das Gel drei mal mit Puffer I^{*4} 1 h unter leichtem Schütteln (Certomat H, Braun) denaturiert. Anschließend wurde 1 h mit dem Puffer II^{*5} unter leichtem Schütteln neutralisiert, wobei der Puffer II einmal gewechselt wurde. Der Southern-Blot-Transfer erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie der Northern- Blot-Transfer.

*⁴Puffer I

0.5 M NaCl
0.5 M NaOH

*⁵Puffer II

1.5 M NaCl
1 M Tris-HCl, pH 8.0

2.14 Hybridisierung

Die Transfermembranen wurden in den zuvor mit 1%igem SDS und A. bidest. gereinigten Hybridisierungsröhren (Biometra), mit 5-10 ml/100 cm² Membran der auf 68°C erwärmten *ExpressHyb Hybridization Solution* (Clontech) für 30 min bei 68°C unter kontinuierlichem Schwenken im Hybridisierungssofen (Biometra), prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und die Filter mit 5 ml/100 cm² Membran der auf 68°C erwärmten *ExpressHyb Hybridization Solution* unter Zugabe von 100-400 µl der entsprechenden Einzelstrang-*antisense*-Sonde (s. 2.14.1) für 1 h bei 68°C unter ständigem Schwenken hybridisiert. Nach Verwerfen der Hybridisierungslösung wurden die Filter zweimal mit je 10-20 ml Waschlösung I^{*6} für 20 min bei Raumtemperatur zweimal mit je 10-20 ml der Waschlösung II^{*7} für 20 min bei 50°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran entnommen und noch feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen.

^{*6} Waschlösung I

2x SSC
0.05 % SDS

^{*7} Waschlösung II

0.1x SSC
0.1 % SDS

Die Rehybridisierung der Membran geschah wie folgt:

Die Sonde wurde von der Membran mit Hilfe eines Wasserbades bei 95- 98°C durch 10-minütiges Schwenken in 0.5%igem SDS vom Filter gelöst (*strippen*). Die Filter konnten anschließend für eine weitere Hybridisierung genutzt werden oder wurden in Klarsichtfolie eingeschlagen und bei -20°C gelagert.

2.14.1 Herstellung von DNA-Sonden mittels PCR-*like*-Markierung

Der hergestellte mit ³²P-dCTP radioaktiv markiertem Einzelstrang DNA, welche unter Verwendung des entsprechenden *antisense*-Primers mittels PCR gewonnen wurde, diente als Sonde für die Northern-Blot-Hybridisierung, wobei für Southern-Blot Hybridisierung ein zweites mit *sense*-Primer amplifiziertem DNA-Fragment als zweite Sonde eingesetzt wurde.

Dazu setzten sich die Reagenzien nach folgendem Protokoll zusammen:

Reagenzien	Volumen (μl)
10x PCR-Reaktions-Puffer	2.5
dNTP ohne dCTP (1 mM)	0.5
Taq-Polymerase	0.25
^{32}P -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	3-5
Primer (100 μM)	0.25
DNA-Matrize (100 ng)	variabel
A. bidest.	ad 25
Mineralöl zur Überschichtung	30

Tab. 2-10. Reaktionsansatz für die Herstellung von Einzelstrang-DNA Sonden

Herstellung der FasL-Sonde

Um die [^{32}P]-dCTP markierte *antisense* Einzelstrang-FasL-Sonde herzustellen, wurde die FasL-cDNA von pAd5TRE-FasL gespalten und als *template* für die Markierung der DNA-Sonde durch eine PCR-like Reaktion verwendet. Als *antisense*-Primer diente CD95La (s. 8.1).

Herstellung der Fas-Sonde

Um die mittels [^{32}P]-dCTP markierte *antisense* Einzelstrang-Fas-Sonde herzustellen, wurde die Fas-cDNA aus H441-Zellen mit den Primern CD95s und CD95a (s. 8.1) amplifiziert sowie als *template* für die Markierung der DNA-Sonde durch die PCR-like Reaktion verwendet. Als *antisense*-Primer diente CD95a (s. 8.1).

Herstellung der β -actin-Sonde

Zur Kontrolle der RNA-Menge wurden die Membrane mit β -actin rehybridisiert. Durch ein PCR mit den Primern BA-1371s und BA-2307a (s. 8.1) ist ein β -actin-Fragment mit genomischer DNA aus HeLa-Zellen amplifiziert worden. Die Markierung der Proben erfolgte durch eine PCR-like Reaktion mit dem Primer BA-2307a (s. 8.1).

2.14.2 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

Die hybridisierte Membran wurde in eine Kassette eingelegt und die Platte (BAS-1500, Fuji Film) bei Raumtemperatur exponiert. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde mittels *Phosphoimaging* unter Verwendung der Software *BASReader 2.21* bestimmt. Alternativ wurde die Membran in eine Röntgenkassette eingelegt und ein Film (BioMax MR, MR-1, Kodak) bei -80°C entsprechen das Signal 1 bis zu 24 h exponiert. Die Auswertung erfolgte hierbei visuell.

2.15 Viruskonstruktion und Präparation

2.15.1 *In vitro*-Ligationssystem

Bei dieser Herstellungsart erfolgte die Integration von Fremd-DNA in das Adenovirusgenom durch Ligation eines linearisierten adenoviralen Shuttleplasmides mit dem rechten Arm des adenoviralen Virusgenoms (*long arm* des RR5-Vektors; 3315-36000 bp). Das Shuttleplasmid enthält eine Expressionskassette, welche aus der adenoviralen Ad5-ITR-Sequenz (1-342 bp), der tetO₇-Sequenz vom Tetrazyklin-System, einem Fremdgen unter i.d.R. ein gewebespezifische Promotor gesteuert und einem PolyA-Signal (bgH-3'-UTR) besteht. Das Shuttleplasmid besitzt eine singuläre *Xba*I-Schnittstelle direkt stromabwärts des Poly A-Signals (s. 8.3).

Der RR5-Vektor ist das adenovirale Genom eines Ad-dl309-Derivats mit einer Deletion der E1-Region (von der Nukleotidposition 445 bis 3333 bp), wodurch er replikationsdefizient wird. Dabei sind weite Teile der E3-Region im Genom des Adenovirus Typ 5 belassen worden, mit Ausnahme der E3-Proteine 14.7 kDa und RID (bp 30005 bis bp 30750). RR5 besitzt eine singuläre *Xba*I-Schnittstelle in der Nukleotidposition 3333 (Poller *et al.* 1996).

Folgender Ansatz diente als Grundlage für die Ligation des adenoviralen Shuttleplasmides mit dem RR5-*long arm*:

Reagenzien	Volumen (μl)
RR5- <i>long arm</i> (1 μg)	variabel
Plasmid (500 ng)	variabel
10x Ligationspuffer (Stratagene)	4
rATP (Stratagene)	4
T4-DNA-Ligase (Stratagene)	2
A. bidest.	ad 40 μl

Tab. 2-11. Reaktionsansatz für die Ligation des Plasmides mit dem RR5-*long arm*

Vor der Ligation wurden das fremdgetragene Schuttelplasmid und der RR5-*long arm* mit *Xba*I über Nacht verdaut. Der *Xba*I-Restriktionsansatz von dem RR5-*long arm* wurde 5 min bei 60°C inkubiert, um das Enzym zu inhibieren, nachdem darauffolgende 5 U CIP (Alkaline Phosphatase; New England Biolabs)-Zugabe erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma). Das Gemisch wurde gevortext, bei 3000 rpm für 5 min in einem Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, erneut mit 200 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Sigma) versetzt und wieder zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde nach Zugabe von zwei Volumen 100%igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) bei -20°C 2 h gefällt, 10 min zentrifugiert bei 14000 rpm, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wurde anschließend in 20 μl TE-Puffer (s. 2.5.3) gelöst. Nach der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Aufreinigung wurde das Pellet in TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationen des RR5-*long arm* und des linearisierten Plasmids wurden photospektrometrisch bestimmt (s. 2.10).

Der Ligationsansatz erfolgte bei 4°C über Nacht und 5 μl davon wurden zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Ein Beispiel hierfür ist die schematische Darstellung der *in vitro*-Ligation des Plasmides pAd5tetO₇CEA-Luc mit dem RR5-*long arm* (Abb. 2-3).

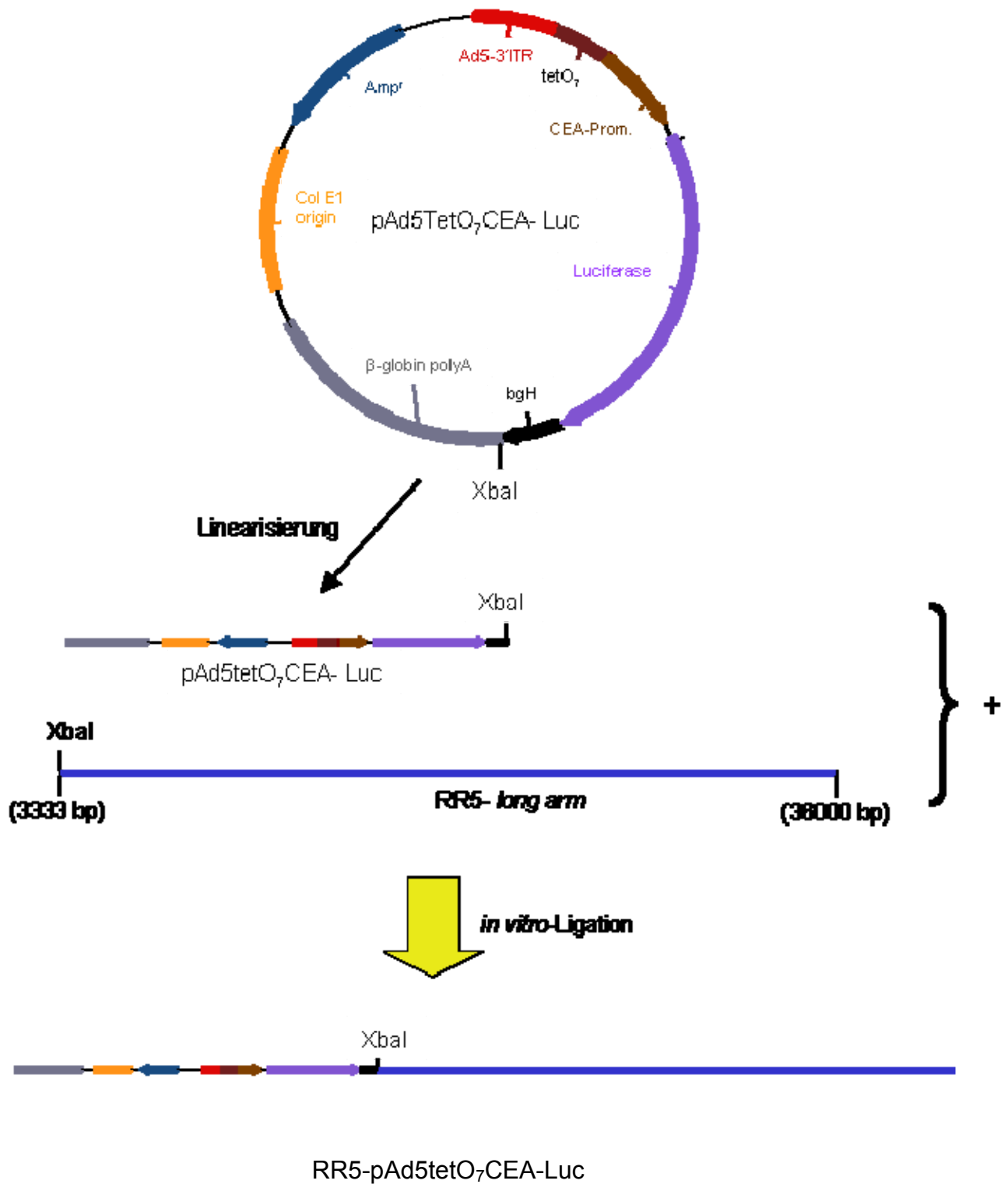


Abb. 2-3. Schematische Darstellung des *in vitro*-Ligationssystems

2.15.2 Transfektion von HEK293-Zellen und Propagation von Adenovirus

Die Transfektion von HEK293-Zellen mit dem rekombinanten AdV wurde nach der *in situ*-Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode (Okayama *et al.* 1991) durchgeführt.

HEK293-Zellen stellen eine permanente Zelllinie dar, die aus der Transformation von primären humanen embryonalen Nierenzellen mit humaner Adenovirus Typ 5-DNA, hervorgegangen ist (Graham *et al.* 1977). Das Genom von HEK293-Zellen enthält die adenovirale Sequenz von der Nukleotidposition 1 bis 4137 bp, dies entspricht die E1A-Region (499-1632 bp) und die E1B-Region (1702-4070 bp, Louis *et al.* 1997). Diese Zellen eignen sich als Empfänger für Plasmid-DNA und entwickeln rasch und effizient adenovirale Plaques nach Transfektion adenoviraler E1-deletierter DNA durch Transkomplementierung der E1-Region.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die HEK293-Zellen mit 2 ml 0.25%iger Trypsin-EDTA in 20 ml Zellkulturflaschen trypsinisiert und bei 37°C für 2-3 min inkubiert. Sobald die Zellen vollständig abtrypsinisiert waren, wurde die Reaktion mit Zellmedium gestoppt und durch Auf- und Abziehen mit der Pipette gemischt. Die Zellen wurden 1:10 mit DMEM-*high*-Medium (DMEM (Gibco)+10% FKS + 1% P/S) verdünnt, und in eine neue Zellkulturflasche (20 ml) für die weitere Passagierung gegeben.

Die restlichen HEK293-Zellen wurden in DMEM-*high*-Medium (GIBCO + 10% FKS + 1% P/S) verdünnt, so dass sie eine Dichte von ca. 25% aufwiesen, damit sie 24 h später eine Konfluenz von 50-70% aufweisen und auf eine 60 mm Zellkulturschale gegeben. Hiernach wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Der Transfektionsmix wurde in 15 ml *Falcon tubes* aus Polypropylen hergestellt. Die Reagenzien wurden folgendermaßen zusammengemischt und die Suspension anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Zum Zeitpunkt der Transfektion betrug die Konfluenz 50-70%.

Es wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der die Zellen ohne Zusatz von Plasmid-DNA transfiziert wurden. Als Positivkontrolle diente eine aufgereinigte adenovirale Vektor-DNA, die eine GFP-Expressionskassette enthielt. Die Zellen wurden danach bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. 24 h nach der Transfektion der HEK293-Zellen mit dem Ligationsprodukt wurde die Transfektionseffizienz durch den visuellen Nachweis der grünen GFP-Fluoreszenz

überprüft. Das Medium wurde anschließend entfernt, und die Zellen einmal mit 3 ml PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} w/o NaHCO_3 gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und durch 5 ml 1.25% *low-melting*-Agarose Type VII (Sigma)/ DMEM-*low*-Medium (GIBCO; + 5% FKS, +1% P/S) ersetzt.

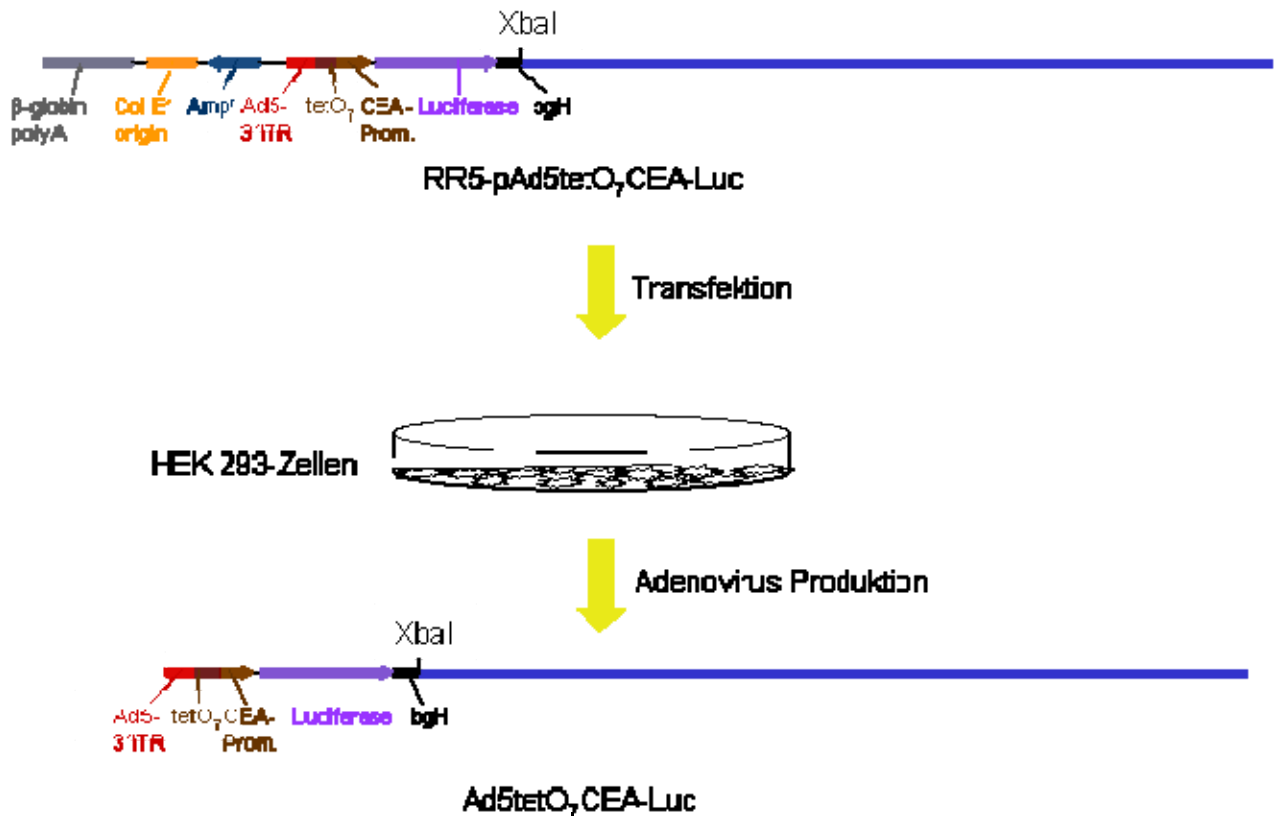


Abb. 2-4. Transfektion und Propagation des Ad5tetO₇CEA-Luc in HEK293-Zellen

Die Zellen wurden hierauf bei 37°C inkubiert und täglich auf Plaquebildung überprüft. Die Plaques bilden mit bloßem Auge sichtbare, kometenschweifartige Lysehöfe, d.h. Stellen auf dem Zellrasen, die einen zytopathischen Effekt (CPE) aufweisen (Abb. 2-5). Die typischerweise 10 bis 14 Tage nach der Transfektion aufgetretene Plaque wurden mit einer Pipettenspitze aus der Agarose ausgestochen und in 1000 μ l DMEM-*low*-Medium (Gibco + 2% FKS + 1% P/S) resuspendiert.

Reagenzien	Volumen (μl)
Ligationsprodukt	35
A. bidest. (steril filtriert)	190
Solution II (2x BBS; Stratagene)	250
Solution I (2,5 M CaCl_2 ; Stratagene)	25
20 min bei RT inkubieren	

Tab. 2-12. Ansatz für die Transfektion von HEK293-Zellen

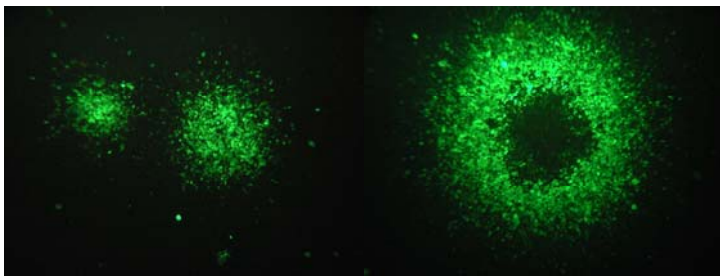


Abb. 2-5. Plaques Entstehung durch Ad5CMVGFP-Vektor-DNA in HEK293-Zellen (10x Vergrößerung)

Die Zellen wurden durch dreimal Einfrieren in Stickstoff und wieder Auftauen aufgeschlossen, die Debris abzentrifugiert für 5 min bei 900 rpm (5810R, Eppendorf) und der Überstand auf frischen HEK293-Zellen versetzt. Das Medium wurde nicht mehr gewechselt und die Inkubation solange fortgesetzt bis der zytopatische Effekt (Abb. 2-6) auf dem gesamten Zellrasen verteilt war (Primärlysate). Waren die Zellen vollständig lysiert, erschienen sie rund und ein Großteil schwamm losgelöst im Medium.

500 μl des Primärlysats, suspendiert in 5 ml frischem DMEM-*low*-Medium, wurden in zwei 60 mm Gewebekulturschalen überführt, die konfluente HEK293-Zellen ($\geq 90\%$ konfluent) enthielten. Diese Zellen mußten 3-4 Tage vorher in DMEM-*high*-Medium vorbereitet werden.

Die Inkubation der Zellen wurde ohne Mediumwechsel bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ fortgeführt, bis der Zellrasen vollständige Lyse (ca. 5-7 Tage) aufwies (Sekundärlysate). Vom Sekundär-Lysat wurden 100 μl in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß für ein PCR-*screening* überführt, um das Vorhandensein von Transgen und RCAs im Sekundärlysate zu überprüfen.

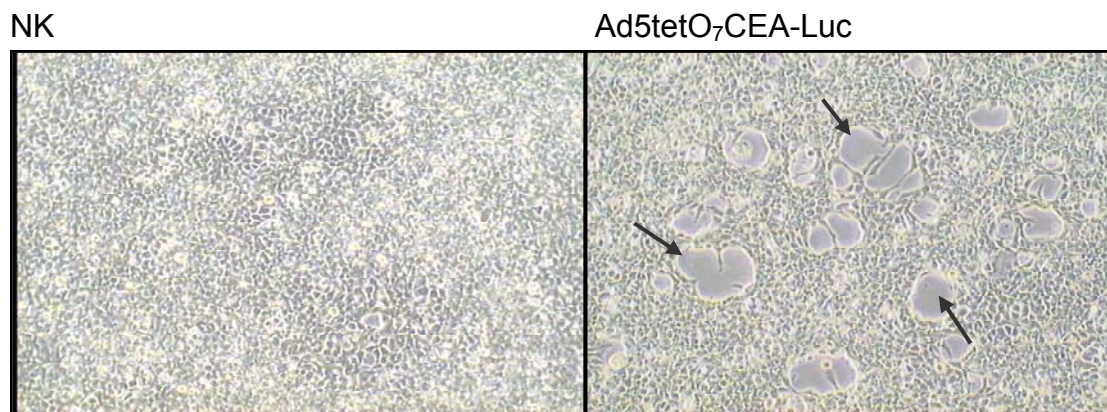


Abb. 2-6. Zytopathische Effekt durch die Viruspropagation

1.5 ml des Lysats wurde auf drei 60 mm Gewebekulturschalen, die HEK293-Zellen enthielten, überführt. Die Gewebekulturschalen wurden bis zur vollständigen Lyse des Zellrasens bei 37°C (i. d. R. 4-5 Tage) inkubiert (Viruslösung). Der Inhalt der drei Schalen wurde in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und in einer sterilen 250 ml-Flasche mit 170 ml DMEM-*low*-Medium gemischt.

Zehn 145 mm Gewebekulturschalen mit konfluenten HEK293-Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und durch 20 ml der Viruslösung/DMEM-*low*-Mediummischung ersetzt. Eine Schale diente als Negativkontrolle. Nach weiterer Inkubation bei 37°C für 4-5 Tage wurde das entstandene Viruslysats der 9 Schalen in einem 250 ml Erlenmeyerkolben gefüllt. Zehn mal 1.5 ml wurden in Cryotubes überführt und bei -80°C (Virusprep-Starter) gelagert.

Zur restlichen Viruslösung wurde Nonidet-P40 (Fluka) bis zu einer Endkonzentration von 0.5% hinzugegeben (1 ml in 200 ml Viruslösung), gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde bei 13000 rpm (20500g) für 10 min bei 4°C (Beckman Zentrifugenröhrchen und GSA-Rotor, Avanti J-25, Beckman) zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde in sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben gesammelt und 0.5 Volumen PEG/NaCl-Puffer (20% PEG, Sigma; 2.5 mM NaCl) wurden hinzugefügt und gemischt. Um die Viruspartikel zu präzipitieren, wurde die Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert und bei 13000 rpm (20500g) für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml TBS in einem 15 ml-Falconröhrchen gelöst und bei 3000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (5810R, Eppendorf). Der Überstand (4 ml)

wurde mit CsCl (Sigma) gemischt, so dass die Lösung eine Dichte von 1.34 g/ml (ca. 2 g) aufwies. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 60 min. Der Debris wurde bei 3000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Mit Pasteur-Pipetten wurde der Überstand in zwei Beckman Zentrifugenröhrchen (2 ml/Tube) überführt. Das Volumen der beiden Röhrchen wurde nochmals durch 1.34 g/ml CsCl-TBS-Lösung ausgeglichen und die Röhrchen mittels eines *tube toppler heaters* versiegelt. Nach der Zentrifugation bei 90000 rpm für 3 h bei 20°C (TLA-120 Rotor, Optima TLX Ultracentrifuge, Beckman) wurden die rekombinanten viralen Partikel als weißer, opaleszierender Ring sichtbar. Mit einer sterilen Insulinspritze wurde der Virusring aspiriert und in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Viruslösung wurde auf eine mit 25 ml TBS äquilibrierte Sephadex-G25-Säule (Pharmacia) gegeben und mit weiterem 2.5 ml TBS-Puffer aufgefüllt. Die Säule wurde nochmals mit 6 ml TBS-Puffer gewaschen und das Filtrat in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße (ca. 500 µl/Eppi) in 20 Fraktionen aufgefangen. 10 µl jeder Fraktion wurden mit 90 µl TBS-Puffer gemischt und die Absorption bei 260 nm im UV-Spektrometer gemessen (s. 2.10). Die Fraktionen, mit den höchsten Konzentrationen, wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und die Konzentration erneut bestimmt. Um das Virus gegenüber dem Gefriervorgang zu stabilisieren, wurde *Bovines Serum Albumin* (BSA) bis zu einer Endkonzentration von 1.0 mg/ml hinzugegeben. Anschließend wurde die Viruslösung aliquotiert (200 µl, 100 µl, 50 µl und 20 µl Aliquote) und bei -80°C gelagert.

2.15.3 Isolation der viralen DNA mittels Sorianolyse

Um die Vektor-DNA auf Vorhandensein des Transgens bzw. auf Kontamination durch RCA (Fechner *et al.* 2000) zu überprüfen, wurden 100 µl des Primär-, Sekundär-, Plaque- oder Viruslysats für die Isolation der viralen DNA durch Sorianolyse in ein 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Nach dreimaligem Einfrieren mit Stickstoff und Auftauen bei 37°C und Zugabe von 100 µl Sorianolysis-Puffer* wurde mit 50 µg/ml Proteinase K (10 mg/ml) die Lösung bei 37°C für 30 min inkubiert (Soriano *et al.* 1991). Nach weitere 10 min bei 85°C (Proteinase K wurde denaturiert) schließt sich die DNA-Isolierung an: Dazu wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1; Sigma) zusammen mit dem Zelldebris

für 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Die DNA enthaltende obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA mit 25 µl 5 M NaCl und 2 Volumen 100% Ethanol bei -80°C für mindestens 30 min gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm wurde das DNA-Pellet in 1 ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

<u>* Sorianalysis-Puffer</u>		<u>10x Gitschier-Puffer</u>	
5 ml	10x Gitschierpuffer (Sigma)	166 mM	Ammonium-Sulfat
2.5 µl	SDS 1% (Sigma)	670 mM	Tris pH 8.8 (Sigma)
250 µl	ProteinaseK	67 mM	MgCl ₂ (Sigma)
(10 mg/ml, Roche)		50 mM	BME (Mr 78.13, Sigma)
ad 50 ml	A. bidest.	67 µM	EDTA (Sigma)

2.15.4 PCR-screening der Vektor-DNA

Mittels des PCR-screenings wurde die Virus-DNA während und nach der Vektorpropagation auf das Vorhandensein des Transgens sowie auf RCAs und auf RR5-Kontaminationen hin überprüft. Für die PCR wurde die virale DNA sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit den transgenspezifischen Primern und den Ad5-Primern (Ad-3315s/Ad-4600a, s. 8.1) angesetzt.

2.15.5 Vektorscreening mittels Restriktionsanalyse

Als weitere Kontrollmethode für die Richtigkeit von den konstruierten Vektoren wurde die Restriktionsfragmentanalyse eingesetzt. Die gewonnene Vektor-DNA wurde mit *Hind*III verdaut, wonach sich bei korrekter Klonierung des Transgens eine spezifische Bandenkartierung zeigte (s. 3.2.2.1). Zur Restriktion der AdV-DNA wurde 1 µg DNA mit 20 U *Hind*III über Nacht bei 37°C in einem 50 µl Reaktionsansatz unter Verwendung des entsprechenden Reaktionspuffers gespalten. Die Größe der sichtbaren Banden wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (s. 2.5.5.1).

2.16 Adenovirale Transduktion von Zellen

2.16.1 Adenovirale Vektoren

Folgende AdV bzw. RRCAs wurden während der Untersuchungen eingesetzt:

Bezeichnung des AdV	Exprimiertes Transgen	Konzentration der Viruspräparation (P/ μ l)
Ad5CMV-Luc	Luciferase (<i>P. pyralis</i>) unter Kontrolle des CMV-Promotors	1.43×10^9
Ad5TRE-Luc	Luciferase (<i>P. pyralis</i>) unter Kontrolle des Tet-Operons und CMV _{min} -Promotor	6×10^8
Ad5tetO ₇ CEA-Luc	Luciferase (<i>P. pyralis</i>) unter Kontrolle des Tet-Operons und CEA-Promotor	6.7×10^8
Ad5tetO ₇ hTyr2E/P-Luc	Luciferase (<i>P. pyralis</i>) unter Kontrolle des Tet-Operons und Tyrosinase-Promotor	8.2×10^8
Ad5tetO ₇ SPB-Luc	Luciferase (<i>P. pyralis</i>) unter Kontrolle des Tet-Operons und SPB-Promotor	9×10^8
Ad5tetO ₇ [HRE]AFP-Luc	Luciferase (<i>P. pyralis</i>) unter Kontrolle des Tet-Operons und AFP-Promotor	1×10^9
Ad5tetO ₇ CEA-E1A _{ΔpRB}	adenovirales E1A mit Deletion in der pRB-Bindung unter Kontrolle des Tet-Operons und CEA-Promotor	1×10^9
Ad5tetO ₇ SPB-E1A _{ΔpRB}	adenovirales E1A mit Deletion in der pRB-Bindung unter Kontrolle des Tet-Operons und SPB-Promotor	7.8×10^8
Ad5TRE-13S	adenovirales E1A-13S-Protein unter Kontrolle des TetOperons und CMV _{min} -Promotor	8.8×10^8

Fortsetzung:

Bezeichnung des AdV	Exprimiertes Transgen	Konzentration der Viruspräparation (P/ μ l)
Ad5CMVrtTA-M2	Reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator M2	7.4×10^8
Ad5CMV-tTS	Tetrazyklin-kontrollierter transkriptional Silencer unter Kontrolle des CMV-Promotors	2.6×10^9
Ad5CMV-GFP	<i>Green-Fluorescent-Protein</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors	8.5×10^8
Ad5TRE-FasL	humanes FasL unter Kontrolle des Tet-Operons und CMV _{min} -Promotor	5×10^8
Ad5tight-FasL	humanes FasL unter Kontrolle des modifizierten Tet-Operons und CMV _{min} -Promotor	3.2×10^8
Ad5tightTATA-FasL	humanes FasL unter Kontrolle des modifizierten Tet-Operons und TATA-Box	7×10^8
Ad5TRE-iGFP	Nicht funktionierende siRNA gegen GFP unter Kontrolle des Tet-Operons und CMV _{min} -Promotor	1×10^9

Tab. 2-13. Verwendete adenovirale Vektoren

2.16.2 Transduktion

Die in der Regel auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesäten Zellen wurden mit 1 ml 1x PBS (Gibco BRL) gewaschen (s. 2.1.3). Anschließend erfolgte die Zugabe der AdV direkt zum Kulturmedium. Die Vektordosierung erfolgte in AdV-Partikeln pro Zelle (P/Z) oder M.O.I. (p.f.u./Zelle). Die Zellen wurden in der Regel nach 24 h geerntet und nach dem entsprechenden Protokoll behandelt. Grundsätzlich wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.17 Plaque Essay

Zum Feststellen der *plaques forming units* (p.f.u.) pro ml von einer Viruspräparation wurde ein Plaque-Essay durchgeführt.

HEK293-Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät (1×10^6 Zellen/Well) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine dekadische Verdünnungsreihe des Virusstocks in 1 ml DMEM-Medium (2% FKS) hergestellt, auf die HEK293-Zellen gegeben und bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 3 ml 1.25% *low melting* Agarose-DMEM-*low*-Medium (5% FKS) übersichtet.

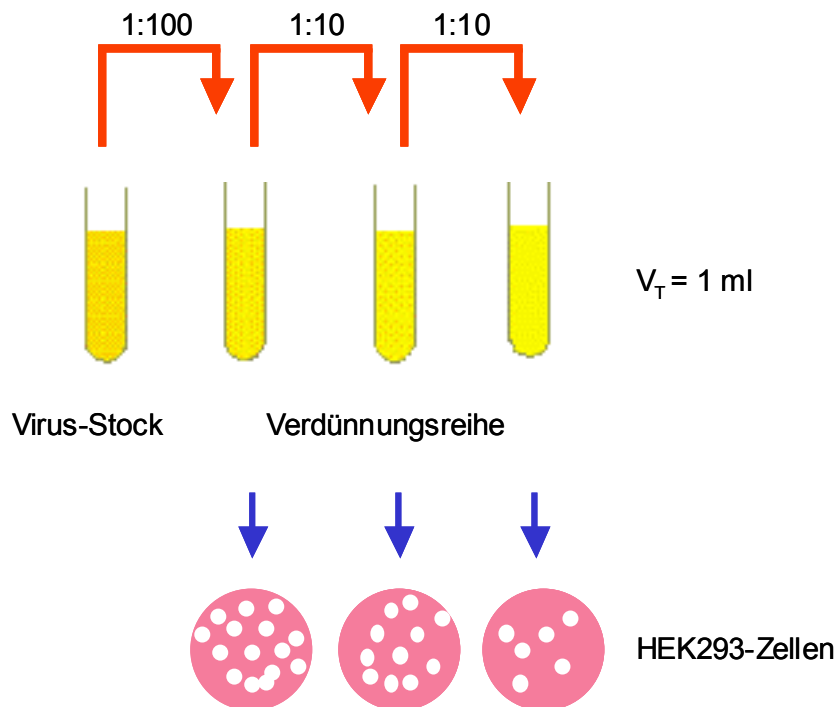


Abb. 2-7. Schematische Darstellung des Plaque-Essays (V_T = Gesamtvolumen)

Nach 7-10 Tagen traten die ersten Plaques auf. Die Plaques wurden unter dem Mikroskop überprüft. Sobald sich genügend Plaques gebildet hatten, wurden diese gezählt und die pfu/ml bestimmt.

2.18 Transgenexpressionsnachweis

2.18.1 Nachweis der GFP-Expression

Für den Nachweis der GFP-Expression wurden die Zellen mit dem Adenovektor Ad5CMV-GFP (1×10^3 P/Z) für 24 h transduziert und die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop (HBO 50, ZEISS) nachgewiesen.

2.18.2 Nachweis der Luciferase-Expression

Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Abgabe eines Photons. Der Nachweis der Luciferase-Expression erfolgte mit dem *Luciferase detection kit* (Roche). Nach Abnehmen des Mediums und Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden die Zellen direkt mit 250 μ l Lysispuffer (im Kit enthalten) überschichtet. Nach einer Inkubation von 15 min bei 20°C wurden die abgelösten Zellen in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend 15 sec bei 14000 rpm zentrifugiert. 10 μ l des Überstandes wurden mit 50 μ l Luciferasesubstrat gemischt und die Luciferaseaktivität über ein Meßintervall von 20 sec im Luminometer *Lumat LB 9501* (Berthold, München) bestimmt.

2.18.3 Cell killing assay

Für die Visualisierung der Zellrasendestruktion wurde ein *cell killing assay* durchgeführt. Dazu wurden jeweils zwei Wells mit gleichmäßige ausgesäte Zellen mit der gleichen Vektordosierung und übereinstimmender AdV-Konstellation transfiziert /infiziert. Die Transduktion/Infektion erfolgte nach Waschen der Zellen mit 1x PBS direkt in 1 ml zellspezifischem Medium. Bei der Zell-Transduktion/Infektion wurde auf eine Dosisgleichheit der insgesamt eingesetzten AdV geachtet und, wenn nötig, mit dem inerten Ad5CMV-iGFP ausgeglichen. Wenn die Zellrasendestruktion stattfand (ungefähr nach 4-5 tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂), wurden die Zellen mit PBS gewaschen, zur Fixation mit 500 μ l 4 %igem Formaldehyd für 45 min überschichtet, nochmals gewaschen und mit 400 μ l Kristallviolett (Sigma)/Ethanol

100% (1:800) für 15 min angefärbt. Nach Absaugen des überschüssigen Farbstoffs und zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurde die Zellkulturplatte ausgewertet.

2.18.4 Nachweis der Apoptose (DNA-Fragmentierung)

Zur Darstellung eines späten Apoptosestadiums wurden DNA-Fragmentierungsstudien durchgeführt. Der *Cell death detection ELISA* (Roche) basiert auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassayprinzip (Abb. 2-8) unter Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern gegen DNA (Anti-DNA-POD), (peroxidasekonjugierter Maus-Antikörper) und Histon (Anti-Histon; Maus-Antikörper). Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in zytoplasmatischen Lysaten von Zelllysaten.

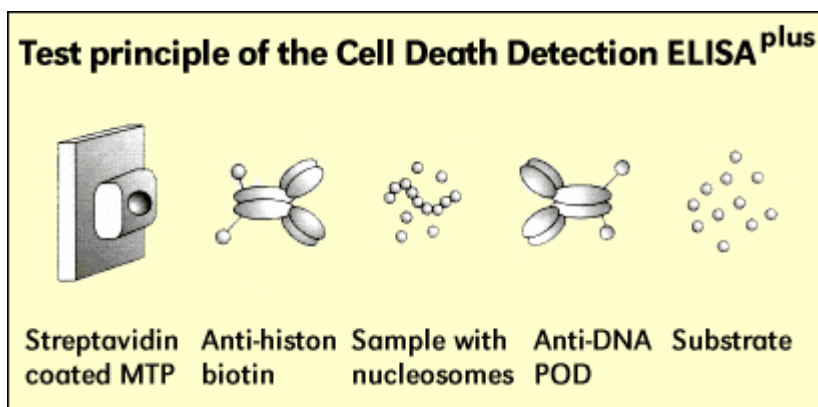


Abb. 2-8. Darstellung des Sandwich-ELISA-Prinzips (aus Roche-Protokollheft)

Im ersten Inkubationsschritt wird Anti-Histon adsorptiv an die Oberfläche einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte fixiert, und anschließend werden unspezifische Bindungen auf der Oberfläche mit Inkubationspuffer abgesättigt.

Im zweiten Inkubationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Nukleosome über ihren Histonanteil von dem an der Mikrotiterplattenoberfläche immobilisierten Anti-Histon gebunden.

Im dritten Inkubationsschritt bindet sich der zweite Antikörper, Anti-DNA-POD, an den DNA-Anteil der Nukleosome. Nach Auswaschen der nicht-gebundenen Peroxidasekonjugates wird der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase mit

ABTS (2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)), das eine grüne Farbreaktion verursacht, als Substrat photometrisch bestimmt. Je mehr Fragmente im Zelllysate vorhanden sind, desto stärker ist die gemessene Farbreaktion.

2.18.4.1 DAPI-Färbung

Die DAPI (4',6-Diaminido-2-phenylindole, dilactate)-Färbungstechnik ermöglicht die Identifikation von DNA-Fragmentierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet. Die DAPI-Färbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden die auf 40 mm-Glasschälchen adhären Zellen mit PBS gewaschen und anschließend fixiert (10 min mit 1 ml Lösung A* und darauf folgend dreimal mit TBS-Puffer* gewaschen). Die fixierten Zellen wurden danach mit 100 µl DAPI (Sigma, 0,5 µg/ml) für 10 min inkubiert, wobei der Zellkern sich blau färbte, die Zellen erneut gewaschen und in *Fluoromount-G* (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, USA) eingebettet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte an einem *Olympus CK40* Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss). Als Negativkontrollen dienten Ansätze unter Verwendung unbehandelter Zellen.

*Lösung A

4 %	Formaldehyd (Sigma)
1 mM	MgCl ₂ (Sigma)
0.5%	Triton X (Sigma)
in PBS-Puffer gelöst	

*TBS-Puffer

2 mM	CaCl ₂ (Sigma)
2 mM	MgCl ₂ (Sigma)
150 mM	NaCl (Sigma)
Tris-Puffer pH 8.0	

2.19 Doxyzyklin-Anwendung

Doxyzyklin wurde i. d. R. zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml angesetzt.