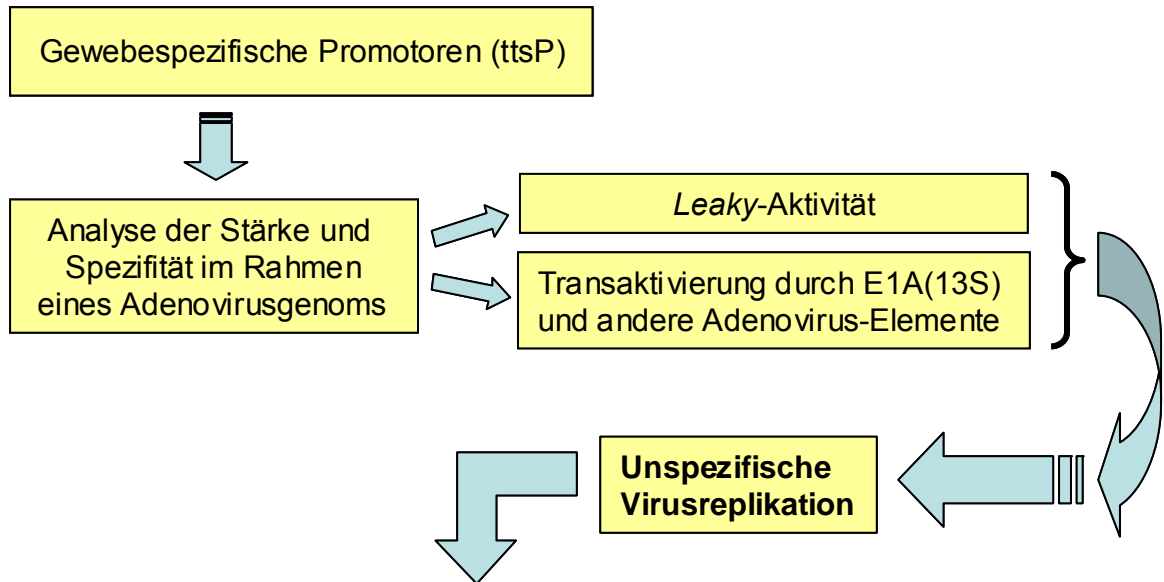


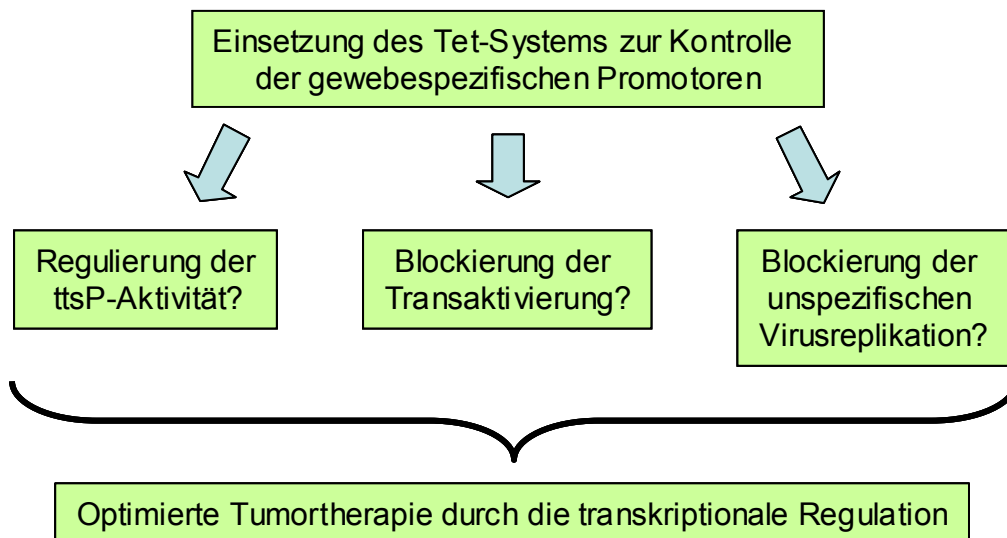
3 Ergebnisse

3.1 Übersicht über den Weg der Ergebnisfindung

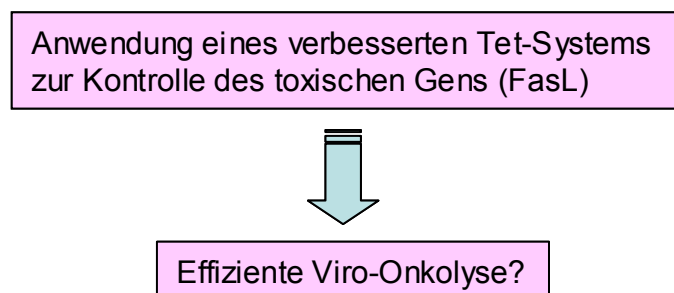
A)



B)



C)



3.2 Untersuchung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren

Zur Untersuchung des Einflusses der zellulären und viralen Faktoren bei der Aktivität der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren (ttsP) wurden folgende Promotoren verwendet: Der *carcinoembryonic* Antigen (CEA)-Promotor, der Tyrosinase (Tyr)-Promotor, der *surfactant protein-B* (SPB)-Promotor und der 0.3 Kb *alpha fetoprotein* (AFP)-Promotor.

3.2.1 Analyse der Endogen-Promotoren

Voraussetzung für das Einsetzen der zelltypspezifischen Promotoren CEA, Tyr, SPB und AFP im Adenovirusgenom war zunächst eine Differenzierung der Spezifität ihrer homologen endogenen Promotoraktivität. Dies erfolgte in den Zelllinien HeLa (Zervixkarzinomzelllinie), H441 (Lungenkarzinomzelllinie), HT-29 (Kolonrektalkarzinomzelllinie), HepG2 (Leberkarzinomzellen), MeWo (Melanomzellen) und der Primärzelllinie HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*). Um eine mögliche E1A-vermittelte Transaktivierung auf die Promotoren wurde auch gleichlaufend Zellen mit dem Adenovektor Ad5TRE-E1A(13S) transduziert und für 24 h inkubiert. Die RNA der fünf Zelllinien wurde von den Zellen extrahiert und mittels RT-PCR (s. 2.11) die cDNA hergestellt.

Transkripte	Primernamen
<i>carcinoembryonic</i> Antigen (Gene Bank accession: M59255)	CEA-2779 _s und CEA-8260 _a
tyrosinase (Gene Bank accession: AF237807.1)	Tyr-664 _s und Tyr-1158 _a
<i>surfactant protein-B</i> (Gene Bank accession: M24461)	SPB-7719 _s und SPB-10173 _a
<i>alpha fetoprotein</i> (Gene Bank accession: M16110)	AFP-16906 _s und AFP-19449 _a

Fortsetzung:

Transkripte	Primernamen
<i>β-actin</i> (Gene Bank accession: M10277)	BA-1371 _s und BA-2307 _a

Tab. 3-1: Liste der verwendeten Primer zum Nachweis der endogenen Promotoren. Für die Primersequenzen siehe Absatz 8.1

Um die vorhandenen mRNA-Transkripte von den oben genannten Promotoren in den jeweiligen Zelllinien zu detektieren, folgte die Durchführung der PCR mit Hilfe der entsprechenden Primer (Tab. 3-1) und anschließend die Gelelektrophorese (Abb. 3-1).

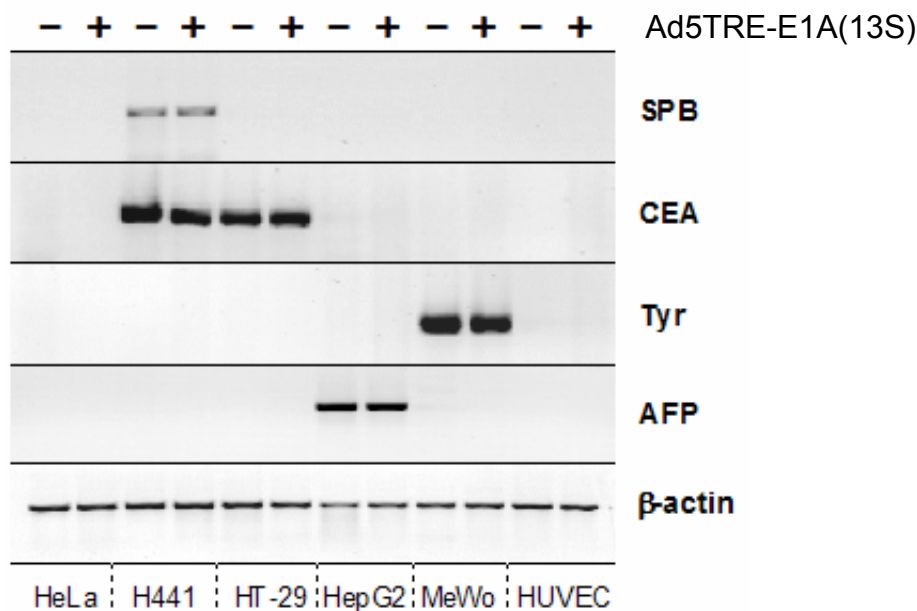


Abb. 3-1: Nachweis der endogenen Promotoraktivität in fünf verschiedenen Zelllinien. Die aus der gewonnenen mRNA durch RT-PCR hergestellte cDNA diente als *template* für die PCR-Reaktion mit den spezifischen Primern (Tab. 3-1). *β-actin* wurde zur Kontrolle verwendet. Die in der Abbildung bezeichneten (+)-Proben aus den jeweiligen Zellen sind unter Zugabe vom Adenovektor Ad5TRE-E1A(13S) inkubiert worden, um die Transaktivierung der Promotoren durch E1A(13S) zu überprüfen

Alle vier Promotoren zeigten eine spezifische Aktivität in den entsprechenden Targetzellen. Während die Aktivität des CEA-Endogen-Promotors in HT-29-Zellen und in H441-Zellen nachweisbar war, trifft dies für den SPB-Promotor nur für H441-Zellen zu. Der Tyrosinase-Promotor war in MeWo-Zellen, der AFP-Promotor in

HepG2-Zellen aktiv. Die HeLa-Zellen und HUVEC-Zellen zeigten keine Signale auf die vier untersuchten Promotoren. Der β -actin-Nachweis diente als Kontrolle für das Experiment.

Folglich gelang der Nachweis der zelltypspezifischen Aktivität der jeweiligen Promotoren und der nicht vorhandene Einfluss vom E1A(13S)-Protein auf die Aktivität der Promotoren. Deshalb bildeten sie die Grundlage der weiteren Experimente.

3.2.2 Analyse der konstruierten Adenovektoren

3.2.2.1 Nachweis der spezifischen cDNAs und der RCA-Freiheit

Auf der Basis des Plasmides Ad5TRE-Luc (Clontech) erfolgte die Klonierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren (ttsP) (s. 2.7). Die ttsP wurden an die Stelle des CMV_{min}-Promotors platziert (s. 8.3), um das Luciferase-Reportergen zu steuern. Nach der Linearisierung der adenoviralen *shuttle*-Plasmide pAd5tetO₇CEA-Luc, pAd5tetO₇hTyr2E/P-Luc, pAd5tetO₇SPB-Luc und pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc sowie deren Ligation mit dem *Xba*I-verdauten RR5-*long arm* (E1-E3-Adenovirus Mutant) wurden diese in HEK 293-Zellen transfeziert und die resultierenden ttsP-AdV amplifiziert (s. 2.15). Durch PCR-*screening* der konstruierten Adenoviren konnte man das Vorhandensein des spezifischen Transgens und die RCA-Freiheit nachweisen (s. 2.15.4). In der Tab. 3-2 sind die angewendeten transgensspezifischen Primer der neu generierten AdV (Ad5tetO₇CEA-Luc, Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc, Ad5tetO₇SPB-Luc, Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc, Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB}, und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}) erfasst:

Adenovektor	Transgensspezifische Primer
Ad5tetO ₇ CEA-Luc	E1-1-Xhols/CEA-206a
Ad5tetO ₇ hTyr2E/P-Luc	Tyr-23-KpnIs/Tyr-529a
Ad5tetO ₇ SPB-Luc	SPB-500-NotIs/SPB-500-BamHIa
Ad5tetO ₇ [HRE]AFP-Luc	E1-1-Xhols/HREAFP-914a

Fortsetzung:

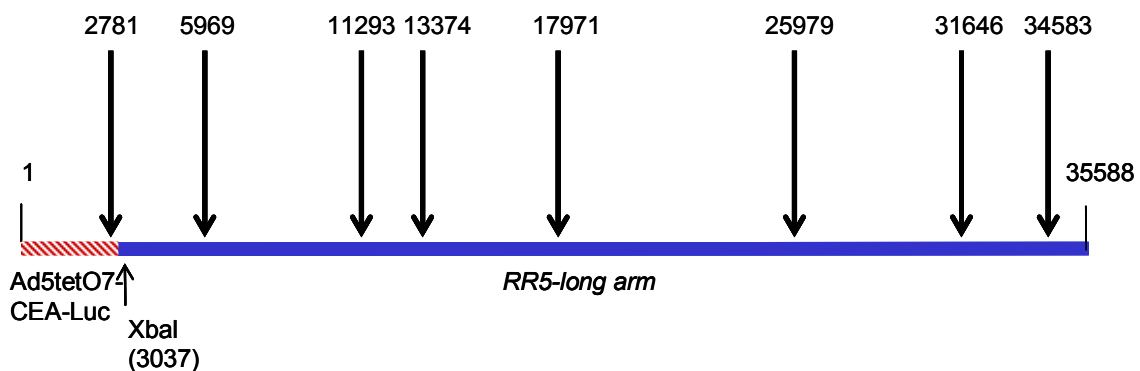
Adenovektor	Transgenspezifische Primer
Ad5tetO ₇ CEA-E1A _{ΔpRB}	CEAP-189s/ E1-342-Xhola
Ad5tetO ₇ SPB-E1A _{ΔpRB}	BglIII-324s/Ad5-4600a

Tab. 3-2. Liste der Primer zur Nachweis der Richtigkeit des spezifischen Transgens von den neu konstruierten Adenovektoren

Alle AdV wiesen die korrekte Größe des Transgens und RCA-Freiheit auf. Sämtliche weiterhin in den Untersuchungen eingesetzten AdV (Ad5CMV-Luc, Ad5TRE-Luc, Ad5CMV-GFP, Ad5CMVrtTA-M2, Ad5CMV-tTS, Ad5TRE-FasL, Ad5Tight-FasL, Ad5TightTATA-FasL) befanden sich bereits im Labor.

Des Weiteren wurde eine Restriktionsfragmentanalyse aller ttsP-AdV mittels einer *Hind*III-Verdauung durchgeführt. Die schematische Darstellung des Adenovektors Ad5tetO₇CEA-Luc (Abb. 3-2) zeigt wie das Bandenmuster durch das Restriktionsenzym *Hind*III entsteht.

Nukleotidposition:



Bandengröße:

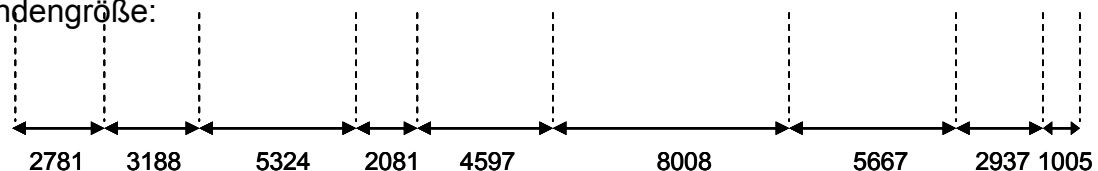
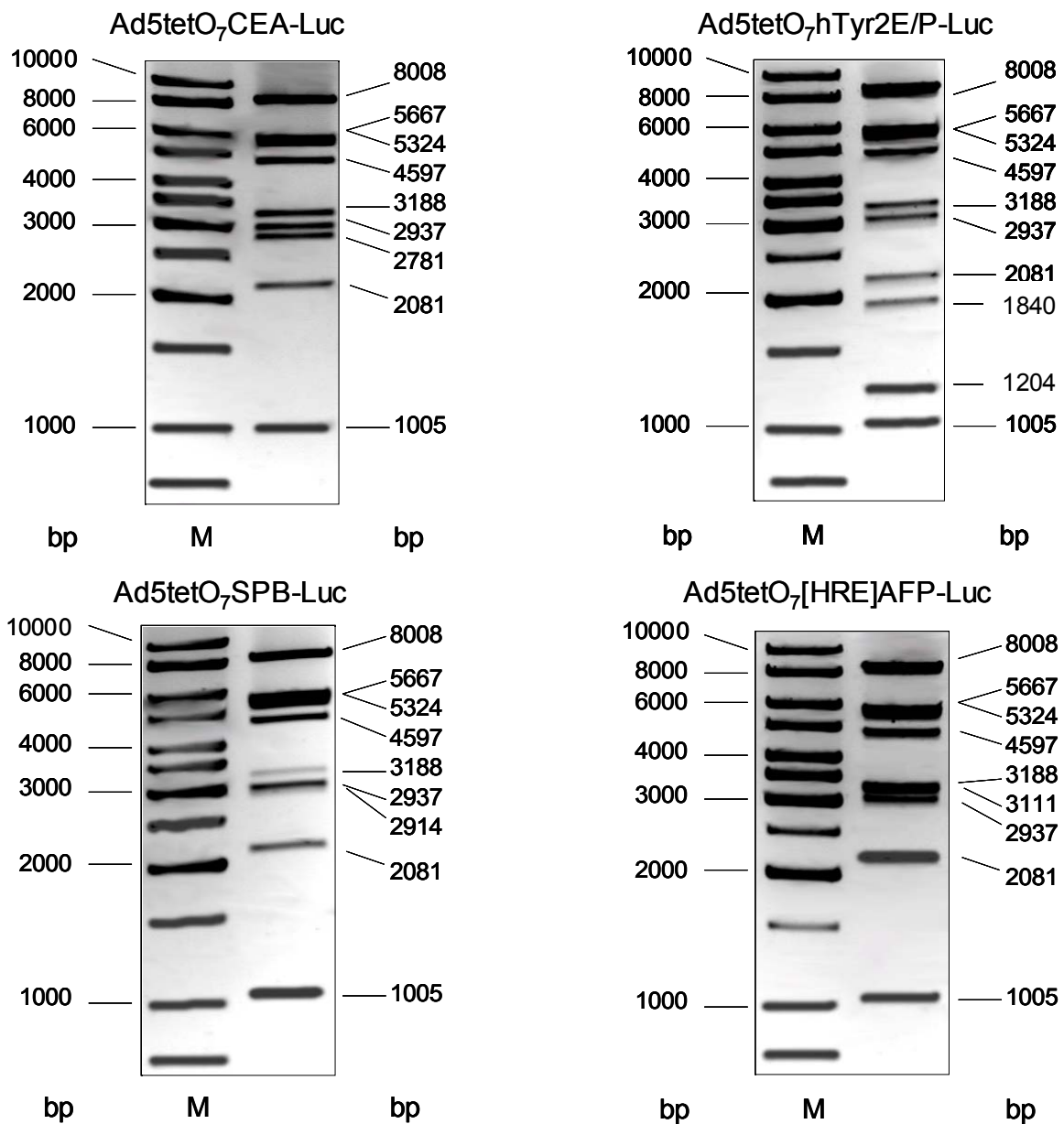


Abb. 3-2. Spaltkarte vom Ad5tetO₇CEA-Luc. Die Bande von 2781 bp und 3188 bp enthalten die Expressionskassette (Ad5 (1-342)-tetO₇-Luciferase-bgH) des Ad5tetO₇CEA-Luc, alle weiteren Banden entstehen aus spezifischen *Hind*III-Orten im RR5-long arm

Die Auftrennung der Banden in der Gelelektrophorese wies sowohl das spezifische Bandenmuster des AdV als auch die spezifischen Banden des jeweiligen Transgens auf. In der Abb. 3-3 wird die Gelelektrophorese gezeigt. Die Größe der spezifischen Banden beträgt hierbei 2781 bp für Ad5tetO₇CEA-Luc, 2914 bp für Ad5tetO₇SPB-Luc, 1204 bp und 1840 bp für Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc, 3111 bp für Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc, 1905 bp für Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und 2008 bp für Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}.



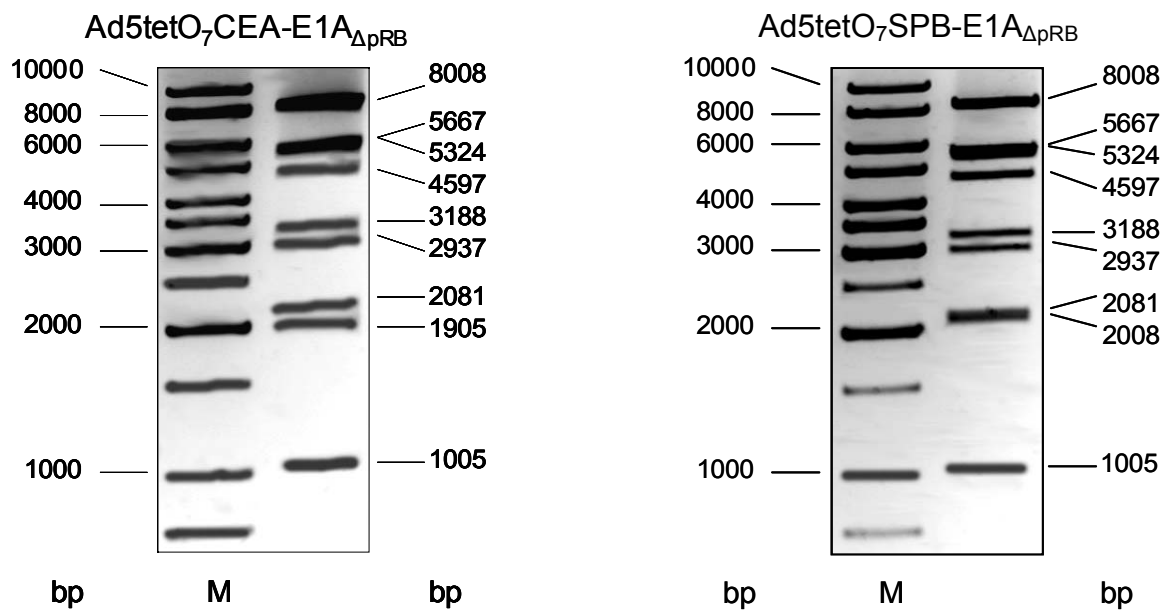
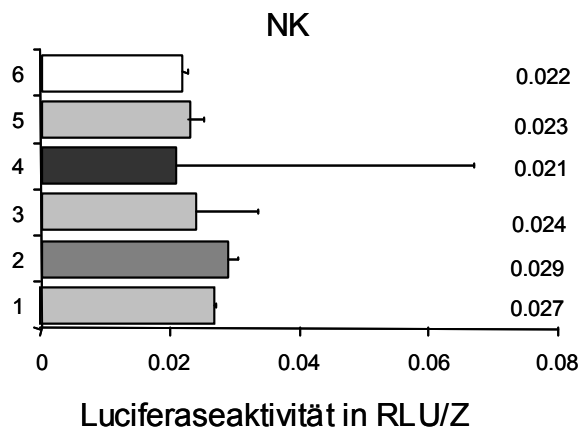
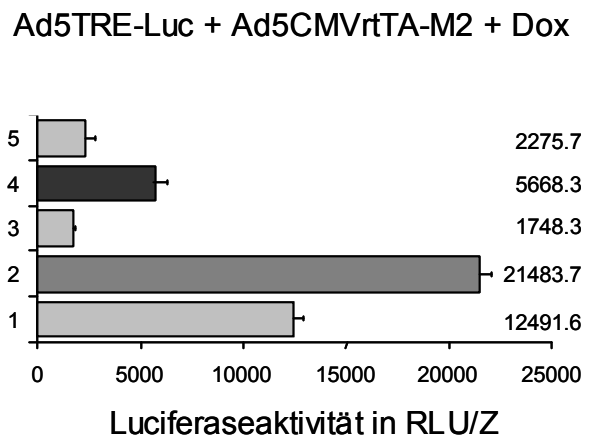
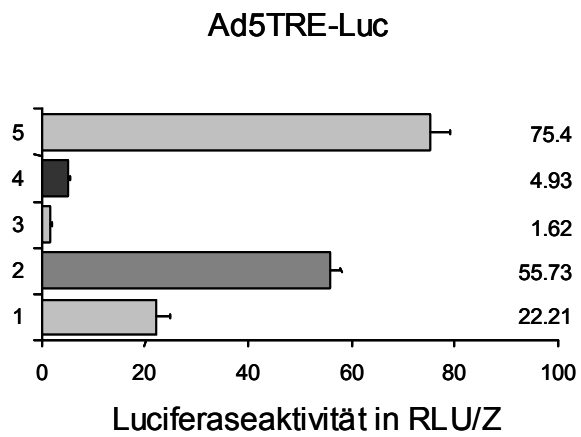
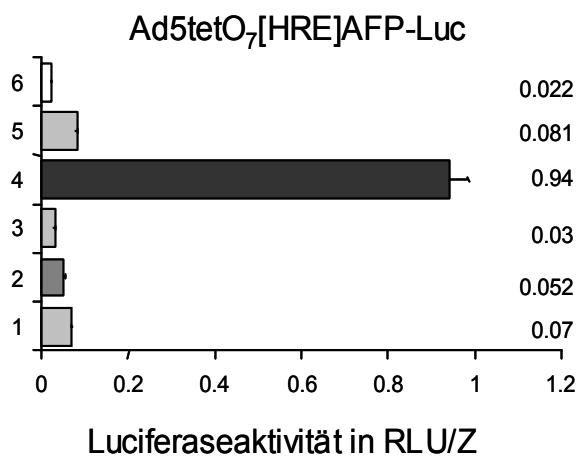
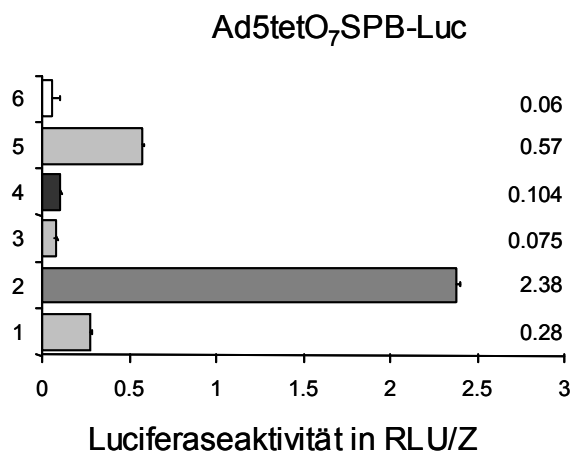
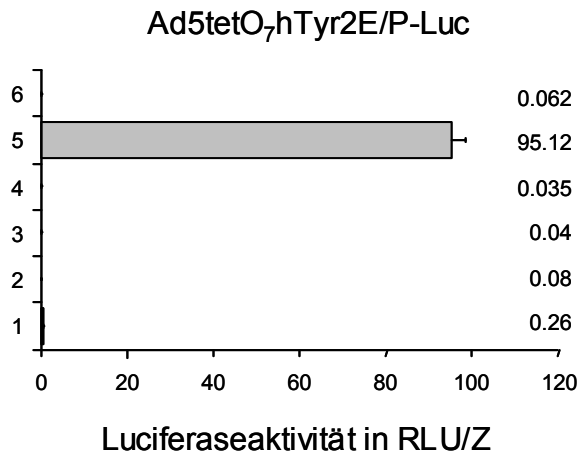
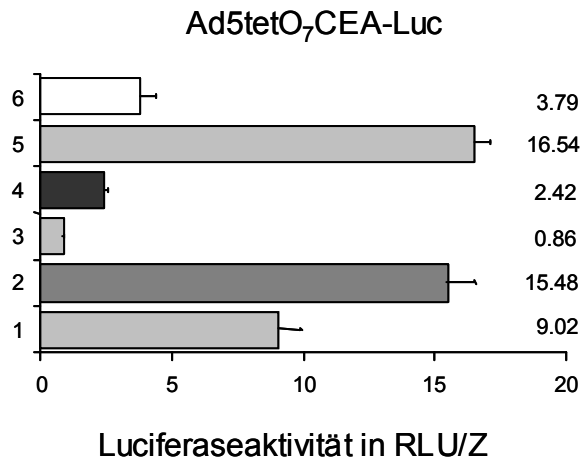


Abb. 3-3. *Hind*III-Restriktionsfragmentanalyse der Adenovektoren Ad5tetO₇CEA-Luc, Ad5tetO₇SPB-Luc, Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc, Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc, Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}. Folgende Bande mit den jeweiligen Größen stellen das spezifische Transgen dar: 1905 bp für Ad5tetO₇CEA-Luc, 2914 bp für Ad5tetO₇SPB-Luc, 1204 bp und 1840 bp für Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc, 3111 bp für Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc, 1905 bp für Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und 2008 bp für Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}

3.2.3 Aktivität der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren im Adenovirusgenom

Auf der Grundlage der endogenen Promotoraktivität erfolgte die Untersuchung der Spezifität und Stärke der vier tumor- und gewebespezifischen Promotoren (CEA, hTyr2E/P, SPB, und [HRE]AFP) in einem replikationsdefizienten Adenovirus (ttsP-AdV) mittels Expression des Luciferase-Reportergens.

Fünf Tumorzelllinien (HeLa, H441, HT-29, HepG2 und MeWo) und eine Primärzelllinie (HUVEC) wurden mit 2.5×10^3 P/Z ttsP-AdV transduziert. Zum Vergleich der Stärke und Spezifität der Promotoraktivität diente der von einem minimalen CMV-Promotor (CMV_{min}) luciferaseexprimierenden Adenovektor Ad5TRE-Luc. Die Luciferaseaktivität wurde 24 h nach der Transduktion gemessen (s. 2.18.2, Abb. 3-4).



- 6 HUVEC
- 5 MeWo
- 4 HepG2
- 3 HT-29
- 2 H441
- 1 HeLa

Abb. 3-4. Spezifität und Stärke der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit 2.5×10^3 P/Z des ttsP-rdAdV und des Kontrollvirus Ad5TRE-Luc. Für das Tet-On-System wurden die Zellen außerdem mit dem Vektor Ad5CMVrtTA-M2 kotransduziert und die Luciferase-Expression bei Zugabe von Dox ($1\mu\text{g/ml}$) induziert. Die Luciferase-Reportergenaktivität ist nach 24 h gemessen worden. NK: unbehandelte Zellen

3.2.3.1 Spezifität der ttsP

Alle tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren mit Ausnahme des CEA-Promotors zeigten zellspezifische Aktivität. Der Adenovirus Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc, der den Tyrosinase-Promotor enthält, wies den größten Unterschied in der Promotoraktivität zwischen Target- und Nicht-Targetzellen auf. Die Messung der Luciferase-Expression in MeWo-Zellen ergab 366-, 1189-, 2378-, und 2718-fach höhere Werte als jeweils in HeLa-, H441-, HT-29-, HepG2-, und HUVEC-Zellen. Die höchste SPB-Promotoraktivität ließ sich in H441-Zellen nachweisen. Die Luciferase-Expression ist in H441-Zellen jeweils 8.5-, 31.7-, 22.9-, 4.2-, und 39.7-fach höher gewesen als in HeLa-, HT-29-, HepG2-, MeWo-, und HUVEC-Zellen. Gleiches gilt für die [HRE]AFP-Promotoraktivität, die um 13.4-, 18.1-, 31.3-, 11.6-, und 42.7-fach höhere Werte in HepG2-Zellen als jeweils in HeLa-, H441-, HT-29-, MeWo- und HUVEC-Zellen aufwies.

Trotz der Verwendung einer höheren Vektordosis war die Aktivität des hTyr2E/P-Promotors und des [HRE]AFP-Promotors in Nicht-Targetzellen kaum messbar. Die Luciferaseaktivität beim Einsatz des hTyr2E/P- und [HRE]AFP-Promotors führte jeweils nur bis zum 9.6- und 3.5-fach höheren Ergebnis in transduzierten Zellen im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (Negativkontrolle). Der SPB-Promotor zeigte eine höhere Aktivität im Vergleich mit der Negativekontrolle in Nicht-Targetzellen als der hTyr2E/P- und [HRE]AFP-Promotor (bis zu 24.7-fach). Im Gegensatz dazu ließ sich die CEA-Promotoraktivität in Target- sowie Nicht-Targetzellen im gleichen Luciferase-Wertbereich feststellen. Die Messung der CEA-Promotoraktivität in der Nicht-Targetzelllinie MeWo ergab dabei höhere Werte als in den Targetzelllinien H441 und HT-29. Im Ergebnis deuten die Daten darauf hin, dass der CEA-Promotor unspezifisch reagiert.

Diese Daten belegen, dass drei (hTyr2E/P, [HRE]AFP und SPB, jeweils geordnet nach der Spezifität) der vier untersuchten Promotoren grundsätzlich zelltypspezifisch aktiv sind und ihre Aktivität in Nicht-Targetzellen trotz der höheren Vektordosis nur ein geringes Niveau aufweist.

3.2.3.2 Stärke der ttsP

Jede Zelllinie wurde zudem mit dem Adenovektor Ad5TRE-Luc transduziert. Dieser Adv enthält das Luciferase-Gen, welches durch den CMV_{min}-Promotor, einen gut charakterisierten ubiquitären Promotor gesteuert wird. Die Stärke der ttsP in den jeweiligen Targetzellen wurden mit diesem Ad5TRE-Luc verglichen. Ad5TRE-Luc exprimiert lediglich eine minimale Menge von Luciferase, im Gegensatz zu dessen höherer Expression bei Anwesenheit des Transaktivators rtTA-M2 und Dox (Fechner *et al.* 2003a). Ausschließlich die Aktivität des hTyr2E/P-Promotors in der spezifischen Melanomzelllinie MeWo erreichte ähnliche Luciferasewerte wie bei der Verwendung des CMV_{min}-Promotors (1.26-fach). Andererseits erwies sich die Aktivität des CMV_{min}-Promotors um 3.6- und 2.6-fach höher als die des CEA-Promotors in seinen spezifischen Zelllinien H441 und HT-29, 23.4-fach höher als die des SPB-Promotors in H441-Zellen sowie 5.2-fach höher als die Aktivität des [HRE]AFP-Promotors in HepG2-Zellen. Im Allgemeinen kann man schlussfolgern, dass die ttsP deutlich schwächere Expression hervorrufen als der CMV_{min}-Promotor. Das Dox-induzierten Zustand befindliche Tet-On System (erreicht durch den Einsatz von Ad5TRE-Luc, Ad5CMVrtTA-M2 und Dox, (Fechner *et al.* 2003a) zeigte im Vergleich zu ttsP eine 1387- und 2032-fach stärkere Aktivität als die zellspezifische Aktivität des CEA-Promotors jeweils in den H441- und HT-29-Zellen, 24-fach stärker als der hTyr2E/P-Promotor in MeWo-Zellen, 9027-fach stärker als der SPB-Promotor in H441-Zellen und 6030-fach stärker als der [HRE]AFP-Promotor in HepG2-Zellen.

Das Ergebnis der vier untersuchten ttsP ergab eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich mit dem Tet-On-Genexpressionssystem. Lediglich die Aktivität der Tyrosinase-Promotor in ihren Targetzellen erreichte die Werte des nicht induzierten CMV_{min}-Promotors. Die Luciferase-Expression der ttsP in der Primärzelllinie HUVEC war im Bereich der Nachweisgrenze. Ausnahme bildete der CEA-Promotor, der eine höhere *leaky*-Aktivität bei allen Zelllinien zeigte.

3.2.4 Einfluss der transkriptionalen Elemente auf die ttsP-Aktivität

Um den Einfluss der transkriptionalen Elemente auf die ttsP-Aktivität zu untersuchen, wurden Plasmide mit verschiedenen transkriptionalen Elementen hergestellt (s. 8.2). Ob die adenovirale terminal 5'-Sequenz (Nukleotide 1-342, die den E1A-Enhancer enthält), der 2mE-Tyr-Enhancer von Mäusen, der humane 2hE-Tyr-Enhancer und die HRE-Sequenz jeweils die Aktivität der ttsP beeinflussen, war in der Folge herauszufinden.

Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den ttsP-Plasmiden transfiziert (s. 2.16.2) und die Luciferase-Expression 48 h später gemessen. Auf dem Diagramm (Abb. 3-5) wird die relative Luciferaseaktivität für jedes Konstrukt und dessen Steigerung im Vergleich mit der Luciferaseaktivität von den ttsP-Plasmiden ohne transkriptionale Elemente dargestellt. Die Luciferaseaktivität der ttsP-Plasmide ohne transkriptionale Elemente wurde auf 1 normalisiert.

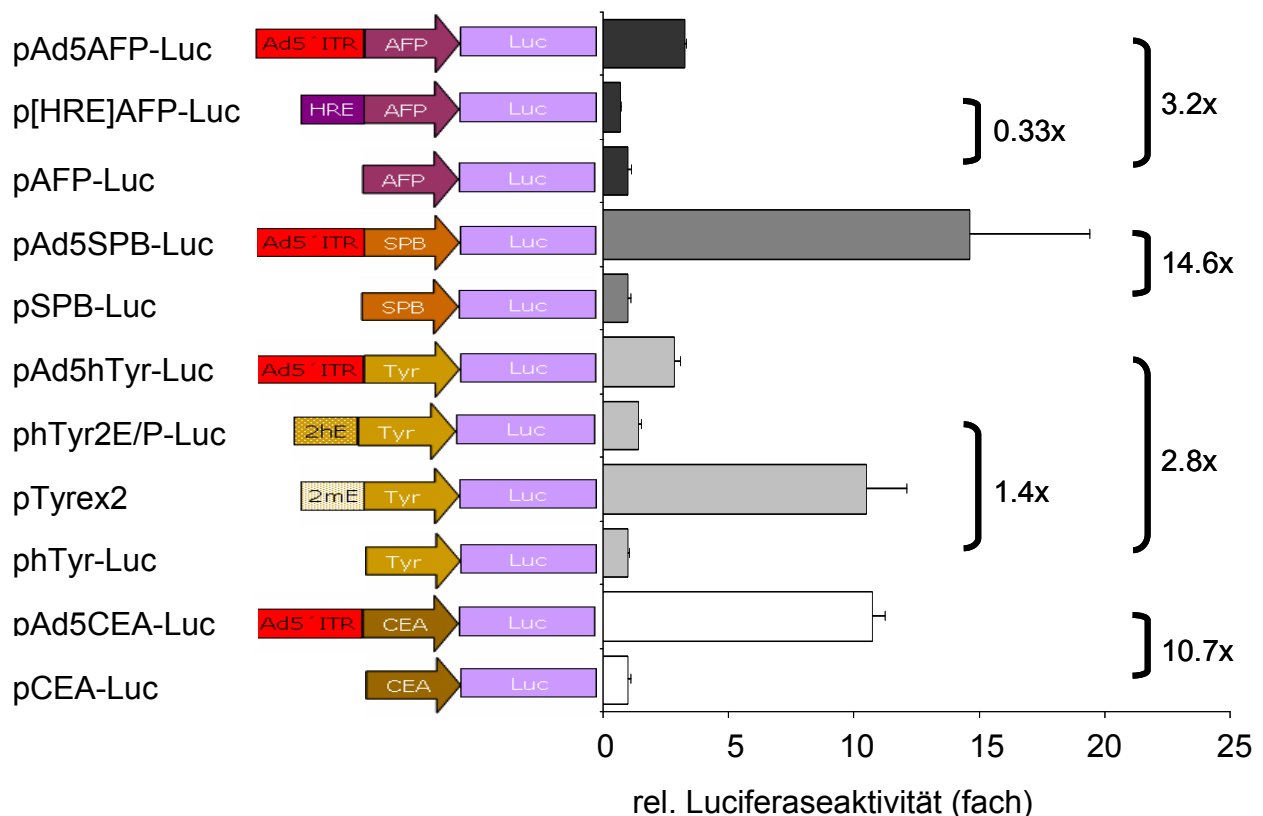


Abb. 3-5. Einfluss der Enhancer-Elemente auf die Luciferase-Expression. Verschiedene Konstrukte (das Luciferase-Reportergen enthaltend) unter Kontrolle des CEA-, Tyr-, SPB- und AFP-Promotors wurden in HeLa-Zellen transfiziert und 48 h später die Luciferase

gemessen. Auf dem Diagramm wird die relative Luciferaseaktivität für jedes Konstrukt und die Steigerung der Luciferaseaktivität im Vergleich mit den Luciferasewerten der *ttsP*-Plasmide ohne Enhancer-Elemente (auf 1 normalisiert) dargestellt

3.2.4.1 Linksseitige Adenovirussequenz

Die linksseitige Adenovirussequenz (Ad5 ITR) im Adenovirusgenom erstreckt sich von der Nukleotidposition 1 bis hin zu Position 342. Es enthält adenovirale Enhancer-Elemente, die die Promotoren möglicherweise transaktivieren könnten. Bei allen vier *ttsP* wurde die *leaky*-Aktivität, durch die Einsetzung der linksseitige Adenovirussequenz, aufwärts von den *ttsP*, erhöht. Im Einzelnen ergaben sich folgende Ergebnisse im Vergleich zu der jeweiligen *ttsP*-Aktivität ohne Ad5-Signal: Beim AFP-Promotor eine 3.2-fache Aktivität, beim Tyr-Promotor eine 2.8-fache Aktivität, beim CEA-Promotor eine 10.7-fache Aktivität und beim SPB-Promotor eine 14.6-fach gestiegene Aktivität. Diese Daten bestätigen, dass die linksseitige Adenovirussequenz alle vier *ttsP* transaktiviert.

3.2.4.2 *ttsP* fusionierte transkriptionale Elemente

Verschiedene Enhancersequenzen sind stromaufwärts vom AFP-Promotor und vom Tyr-Promotor eingesetzt worden, um dessen Einfluss auf die Promotoren zu untersuchen. Zwei humane Enhancer (2hE-Tyr), die vor dem Tyr-Promotor positioniert wurden, erhöhten seine Aktivität nur gering (1.4-fach), während zwei Enhancer von Mäusen (2mE-Tyr) die Aktivität des Tyr-Promotors deutlich erhöhte. Die transkriptionale Regulatorsequenz (HRE-*Hypox*y response element) senkte im Gegensatz zu den anderen Elementen die AFP-Promotoraktivität um ein Drittel.

Aus diesen Ergebnissen folgert, dass jedes Enhancer-Element die Promotoraktivität unterschiedlich beeinflusst.

3.2.5 E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der *ttsP* auf Plasmidebene

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses vom E1A(13S) auf die *ttsP* wurden HeLa-Zellen mit den *ttsP*-Plasmiden, die das Luciferase-Reportergen enthalten und mit dem Plasmid pAd5TRE-E1A(13S) (E1A(13S) befindet sich unter der Kontrolle des CMVmin-Promotors) kotransfiziert. Gleichzeitig ist eine Transfektion der *ttsP*-Plasmide ohne das Plasmid pAd5TRE-E1A(13S) durchgeführt worden. Die Messung der Luciferase erfolgte 48 h nach der Transfektion. Auf dem Diagramm (

Abb. 3-6) wurde die Steigerung der relativen Luciferaseaktivität (fach) dargestellt.

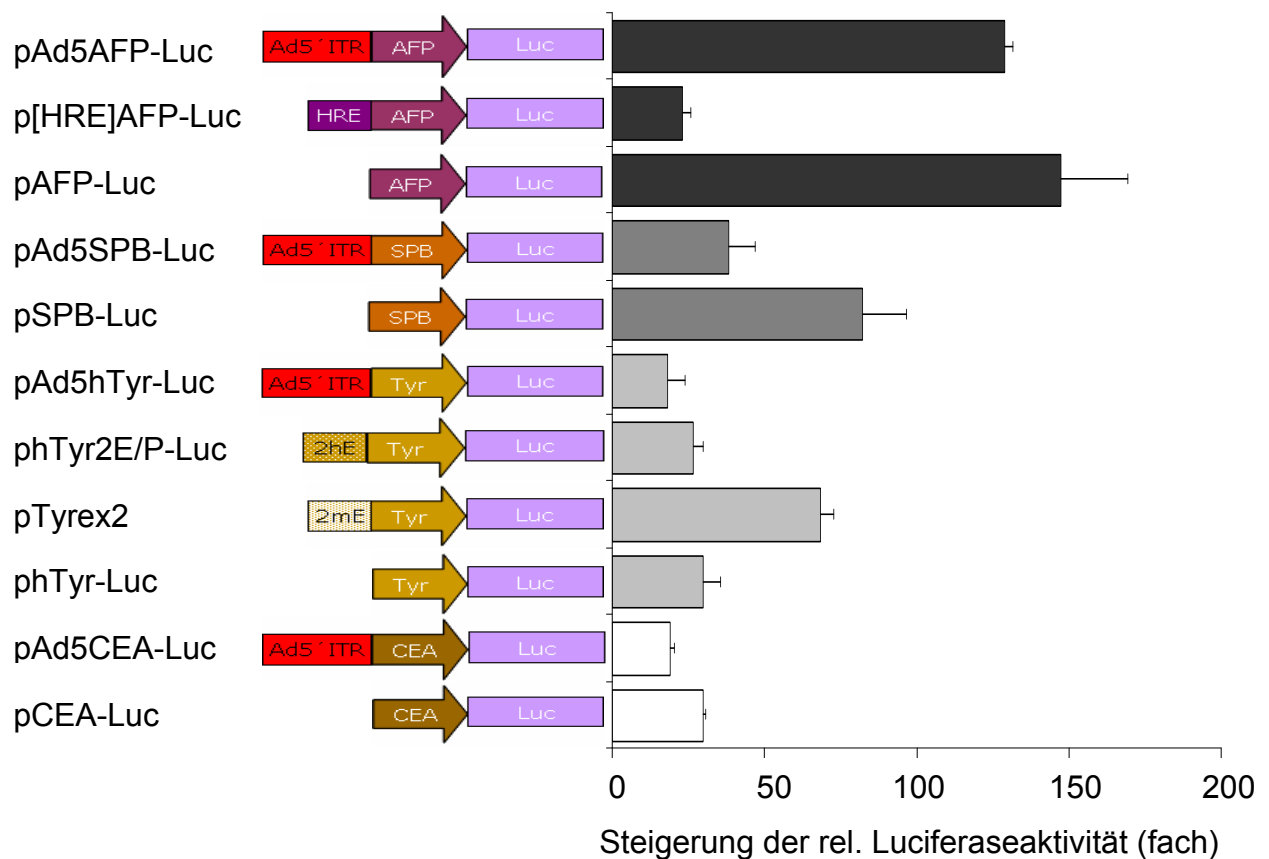


Abb. 3-6. Einfluss von E1A(13S) auf die unspezifische *ttsP*-Aktivität in HeLa-Zellen. Die Transaktivierung der *ttsP* durch E1A(13S) ist als Ergebnis der *ttsP*-Luciferaseaktivität in Anwesenheit von E1A(13S) im Verhältnis zur Abwesenheit dargestellt

Von den Luciferasewerten der transfizierten Zellen mit *ttsP*-Plasmiden und mit pAd5TRE-E1A(13S) wurden die Luciferasewerte der nur mit *ttsP*-Plasmiden

transfizierten Zellen subtrahiert. Alle getesteten ttsP wurden durch E1A(13S) in HeLa-Zellen transaktiviert. Die höchsten Transaktivierungswerte errechneten sich beim Plasmid pAFP-Luc mit einer Steigerung von 147-fach. Der Tyr- und CEA-Promotor zeigte jeweils geringere Steigerungen in der Aktivität mit 26.7-fach und 30-fach und der SPB-Promotor wurde 82-fach transaktiviert. Der 2mE-Tyr-Enhancer erhöhte die Transaktivierung des Tyr-Promotors um das 2.3-fache, während der 2hE-Tyr-Enhancer nicht die Transaktivierung des Promotors beeinflusste. Im Gegensatz dazu inhibierte die [HRE]-Sequenz die Transaktivierung des AFP-Promotors durch E1A(13S) um 80%.

3.2.5.1 Einfluss der Tyrosinase-Enhancer-Elemente auf die E1A (13S)-vermittelte Transaktivierung

Nach der Feststellung, dass der Tyrosinase-Promotor in Abhängigkeit von den Enhancer-Elementen unterschiedliche E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung aufweist, wurden zwei Tyrosinase-Promotoren eingehender untersucht. Das Plasmid phTyrpGL3, das zwei humane Enhancersequenzen und das Plasmid pTyrrex-2, das zwei murine Enhancersequenzen enthält, ist jeweils mit dem Plasmid pAd5TRE-E1A(13S) in HeLa-Zellen transfiziert worden (s. 2.8). Die relative Luciferaseaktivität wurde 48 h nach der Transfektion gemessen (Abb. 3-7).

Die unspezifische Luciferaseaktivität des Plasmids phTyrpGL3 (mit zwei humanen Enhancersequenzen) war unabhängig von der Zugabe von E1A(13S) sehr gering. Eine E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung des Tyrosinase-Promotors konnte nicht festgestellt werden. Das Plasmid pTyrrex-2 (mit zwei murine Enhancersequenzen) zeigte eine 12.4-fach höherer unspezifische Promotoraktivität in Abwesenheit von E1A(13S) als phTyrpGL3 und wurde 2.8-fach transaktiviert.

Diese Ergebnisse belegen, dass der Tyrosinase-Promotor mit den zwei humanen Enhancer-Elementen ein interessanter Kandidat für die Tumorthherapie ist, weil die unspezifische Promotoraktivität auf der Basalebene sich befand und er sich nicht durch E1A(13S) transaktivieren ließ.

Dieses Experiment zeigt ausserdem auf, dass die Enhancer-Elemente eine entscheidende Rolle für die Promotoraktivität spielen. Ein Promotor konnte je nach

Enhancer-Elementen einerseits sehr spezifisch, andererseits auch unspezifisch sein und sollte in jedem konkreten Fall untersucht werden.

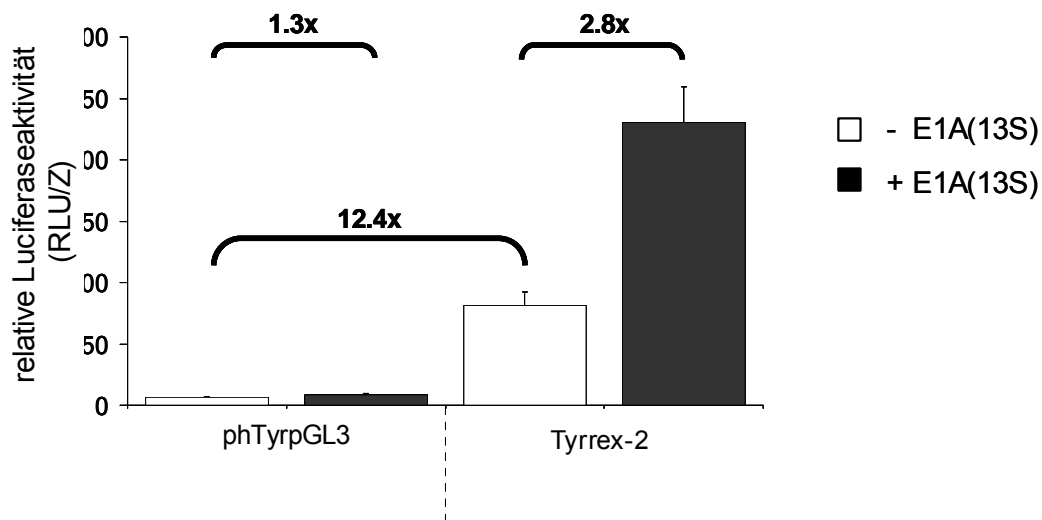


Abb. 3-7. Einfluss der Enhancer-Elemente auf die Tyrosinase-Promotoraktivität und auf die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung in HeLa-Zellen. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 48 h nach der Transfektion mit den Plasmiden phTyprGL3, Tyrrex-2 und pAd5TRE-E1A(13S)

3.2.6 E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren auf Virusebene

Es gelang bereits der Nachweis, dass die tumorzell- und gewebespezifische Promotoren (ttsP) auf Plasmidebene durch E1A(13S) transaktiviert werden (s. 3.2.5). Anschließend war die Frage zu beantworten, ob die ttsP im Adenovirusgenom durch das E1A(13S)-Protein beeinflussbar sind. Hierzu wurden zunächst Tumorzellen mit den ttsP-AdV, die das Luciferase-Reportergen enthalten, transduziert und mit dem Plasmid pAd5TRE-E1A(13S) transfiziert. Die replikationsdefizienten Adenovektoren erwiesen sich bei der Applikation von dem Plasmid pAd5TRE-E1A(13S) als replikationsfähig (unter Absatz 3.2.7 ist die Abhängigkeit der Adenovirusreplikation von der E1A-Menge aufgezeigt worden). Im Einzelnen erhöhte sich die Adenovirus-DNA-Menge und in der Folge stieg die Luciferase-Expression. Um diesen Effekt zu vermeiden, denn das Ziel war, nur die E1A-Transaktivierung auf die ttsP zu bestimmen, wurde die Steigerung der Luciferase-Expression durch die Erhöhung der

Adenovirus-DNA-Menge geteilt. So konnte die tatsächliche E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung auf die *ttsP* festgestellt werden.

Die Bestimmung der DNA-Menge erfolgte mittels Kompetitive-PCR (s. 2.12). Die nachfolgende Analyse der Proben im *GeneScan* ergab eine deutliche Auftrennung des nativen und des verkürzten Fragments sowohl der E1A-Gen als auch des bereits im Labor etablierten GAPDH-Standards und ermöglichte so durch die Berechnung des Flächeninhalts der *Peaks* eine quantitative Analyse der amplifizierten Fragmente (Abb. 3-8).

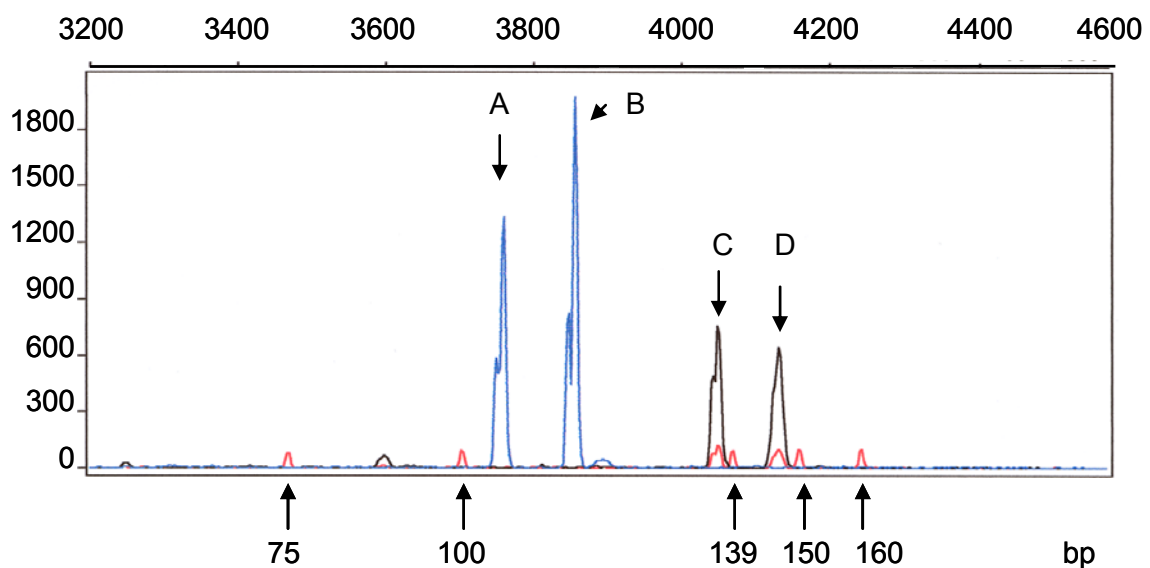


Abb. 3-8. Elektropherogramm der *GeneScan*-Analyse zur Bestimmung der onkolytischen Vektor-DNA (das E1A-Gen enthaltend), der internen GAPDH und dem jeweiligen Standard. A) E1A-verkürzter Längenstandard (109 bp); B) native E1A (120 bp); C) GAPDH-Standard (134 bp); D) natives GAPDH (144 bp); Größenmarker GS-350-Rox als rote Linie sichtbar

Fünf Tumorzelllinien und eine Primärzelllinie wurden mit den *ttsP*-AdV und dem Adenovektor Ad5TRE-iGFP zur Kontrolle transduziert und mit dem Adenovektor Ad5TRE-E1A(13S) infiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität und die Bestimmung der DNA-Menge erfolgte 24 h später (Tab. 3-3).

Die Expression der E1A(13S) führte zu einer wesentlichen Steigerung der Luciferase-Expression (bis zu 944-fach) in den Tumorzelllinien und in HUVEC-Zellen. Diese Steigerung fiel sehr unterschiedlich aus, jeweils in Abhängigkeit von den entsprechenden *ttsP* und Zelllinien. Die DNA-Menge der *ttsP*-AdV wies in allen Tumorzelllinien durch die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung deutliche höhere

Werte auf (bis zu 60-fach), während sie in HUVEC-Zellen unverändert blieb. Hierbei ergaben sich lediglich geringe Unterschiede in der DNA-Replikation zwischen den vier ttsP-AdV. Das bestätigt, die Unabhängigkeit der Replikation von dem verwendeten spezifischen Promotor.

		Ad5tetO ₇ CEA-Luc	Ad5tetO ₇ hTyr2E/P- Luc	Ad5tetO ₇ SPB-Luc	Ad5tetO ₇ [HRE]AFP- Luc
HeLa	ΔLuc	236.5 ± 4.8	409.5 ± 74.1	34.7 ± 10.5	842 ± 98.9
	ΔDNA	54.1 ± 26.9	59.5 ± 14.6	28.9 ± 2.9	58.3 ± 26.7
	ΔLuc/ΔDNA	4.4	6.9	1.2	14.4
H441	ΔLuc	69.5 ± 4.3	72.8 ± 5.7	7.1 ± 1.1	72.5 ± 3.1
	ΔDNA	21.2 ± 7.7	17.4 ± 1.8	22.7 ± 7.7	21.9 ± 9.2
	ΔLuc/ΔDNA	3.3	4.2	0.3	3.3
HT-29	ΔLuc	491.4 ± 17.4	190.5 ± 6.5	36.8 ± 6.4	944.3 ± 14
	ΔDNA	11.1 ± 1.1	5.6 ± 2.6	7.5 ± 1.7	10.7 ± 3.4
	ΔLuc/ΔDNA	44.3	34	4.9	88.2
HepG2	ΔLuc	59.2 ± 5.1	38.5 ± 2.3	6.9 ± 1	112 ± 17.8
	ΔDNA	11.3 ± 2.6	16.2 ± 1.2	11.3 ± 1.3	15.2 ± 1.5
	ΔLuc/ΔDNA	5.2	2.4	0.6	7.4
MeWo	ΔLuc	4.2 ± 0.3	2.2 ± 0.5	1.6 ± 0.1	16.3 ± 1.3
	ΔDNA	6.2 ± 5.1	6.8 ± 0.8	4.3 ± 1.9	2.7 ± 0.3
	ΔLuc/ΔDNA	0.7	0.3	0.4	6
HUVEC	ΔLuc	18.5 ± 5.4	33.8 ± 7.2	6.8 ± 1.2	3.6 ± 0.7
	ΔDNA	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.6
	ΔLuc/ΔDNA	23.1	30.1	5.7	2.8

Tab. 3-3. E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung der ttsP im Adenovirusgenom. HeLa-, H441-, HT-29-, HepG2-, MeWo- und HUVEC-Zellen wurden mit 2500 P/Z ttsP-AdV oder mit der Kontrolle Ad5TRE-iGFP transduziert und mit 500 P/Z Ad5TRE-E1A(13S) infiziert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen abtrypsinisiert und in 1 ml Medium resuspendiert. Zur Messung der Luciferase-Expression folgte das Ansetzen von 500 µl der Suspension (s. 2.18.2). Zur Bestimmung der DNA-Menge folgte die Präparation der DNA der anderen 500 µl (s. 2.5.2) und die Durchführung der kompetitiven PCR (s. 2.12). In der Tabelle ist die Steigerung der

relativen Luciferase, der DNA-Menge und die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung ($\Delta\text{Luc}/\Delta\text{DNA}$) auf die *ttsP* für jede Zelllinie und *ttsP*-AdV dargestellt

Die höchste relative Transaktivierung der *ttsP* ist bei HT-29-Zellen (bis zu 88-fach) festgestellt worden. Die Transaktivierung des [HRE]AFP-Promotors bestand in allen Zelllinien, beschränkte sich jedoch hinsichtlich des hTyr2E/P- und des CEA-Promotors auf fünf und bezüglich des SPB-Promotors auf nur zwei der sechs Zelllinien (Tab. 3-3). Zusammenfassend ist festzustellen, dass die E1A(13S)-vermittelte Transaktivierung keine eindeutige Korrelation zwischen *ttsP* und ihren Targetzelllinien aufzeigte. Die Berechnung der relativen E1A(13S)-vermittelten Transaktivierung ergab für einige *ttsP* in H441-, HepG2-, und MeWo-Zellen Faktorwerte von unter 1. Grund dafür könnte die Verpackung der adenoviralen DNA und die nicht mehr equimolare Relation zwischen der Transgenexpression und der adenoviralen DNA-Menge sein.

3.2.7 *ttsP*-RRCA-Replikation als Folge unspezifischer Promotoraktivität

Die Untersuchung des CEA- und SPB-Promotor beim Einsatz in den AdV zeigte, dass der CEA-Promotor eine 32-fach höhere Aktivität als der SPB-Promotor in der Nicht-Targetzelllinie HeLa (Abb. 3-4) aufwies. Als nächstes war zu analysieren, ob der Unterschied in der Promotoraktivität auch die unspezifische Virusreplikation der *ttsP*-AdV verursachte. Hierfür wurde das E1A Δ pRB-Gen (E1A-Gen mit einer Deletion in der pRB-bindenden Region) vom AdV unter Kontrolle des CEA- und des SPB-Promotors konstruiert. Es folgte der Einsatz der resultierenden Vektoren Ad5tetO₇CEA-E1A Δ pRB und Ad5tetO₇SPB-E1A Δ pRB in den Zelllinien HeLa und H441 und die Bestimmung der Virusreplikation (Abb. 3-9, Abb. 3-10) sowie der Zytotoxizität (Abb. 3-11) der konstruierten AdV.

3.2.7.1 Bestimmung der Virusreplikation

Durch die Berechnung der Adenovirus-DNA-Menge kann man auf eine indirekte Weise Information über die Virusreplikation erhalten. Eine Steigerung der AdV-DNA-Menge würde darauf hinweisen, dass das Virus sich vermehrt hätte. Hierfür wurden

zwei verschiedene Methoden angewendet, um die jeweils andere Methode zu bestätigen. Eine Technik basiert auf der kompetitiven PCR mit nachfolgender *GeneScan*-Analyse (s. 2.12.3), die andere auf der Durchführung eines Southern-Blots (s. 2.13.2) und nachfolgender Hybridisierung (s. 2.14) mit den spezifischen Sonden.

Nach der Infektion von HeLa-Zellen mit den Vektoren Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} mit jeweils zwei unterschiedlichen Dosen (2000 P/Z und 4000 P/Z), folgte 24 h danach die Ernte der Zellen (Abb. 3-9). Die DNA wurde extrahiert (s. 2.5.2) und die adenovirale DNA durch das E1A-Gen mittels *GeneScan* quantifiziert (s. 2.12).

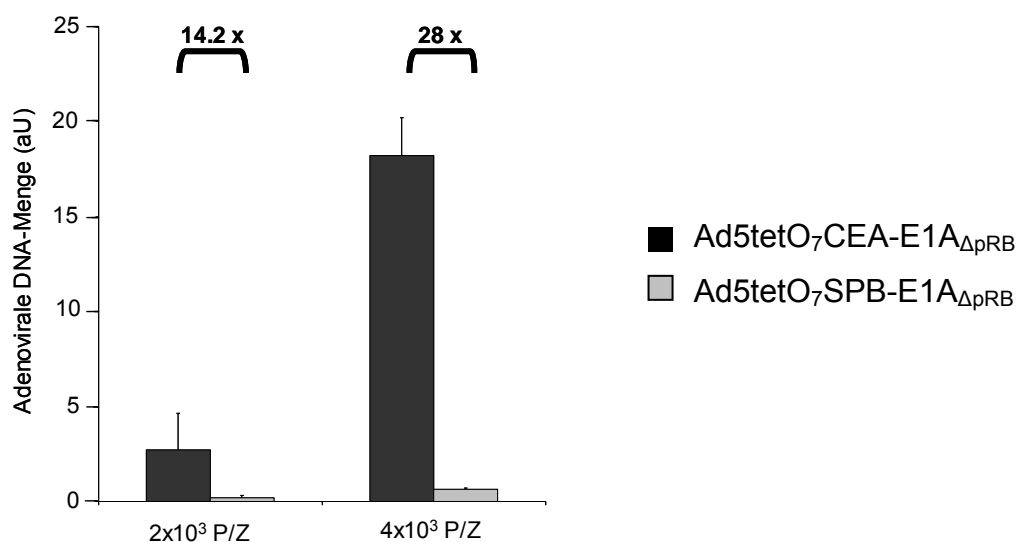


Abb. 3-9. Bestimmung der adenoviralen DNA-Replikation in den Nicht-Targetzellen HeLa. Die Zellen wurden mit 2000 und 4000 P/Z von Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infiziert. Die adenovirale DNA konnte durch kompetitive-PCR nach 24 h bestimmt werden

Bei der Infektion mit 2000 P/Z ergab sich ein 14.2-facher Unterschied der E1A_{ΔpRB}-DNA-Menge zwischen Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}; bei der Infektion mit 4000 P/Z war der Unterschied 28-fach. Dieser Unterschied in der DNA-Menge korreliert mit der Differenz in der Promotoraktivität (s. 3.2.3) und bestätigt den direkten Zusammenhang der Promotoraktivität und der DNA-Replikation.

Um die Ergebnisse der kompetitiven-PCR zu bekräftigen ist ein Southern-Blot durchgeführt worden (Abb. 3-10). HeLa- und H441-Zellen sind mit 2000 P/Z und 4000

P/Z Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infiziert worden. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die DNA extrahiert und 10 μg von jeder Probe mit *HindIII* über Nacht gespalten. Die DNA wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, ein Southern-Blot (s. 2.13.2) durchgeführt und anschließend die Proben mit den E1A-Sonden (s. 8.1) hybridisiert (s. 2.14).

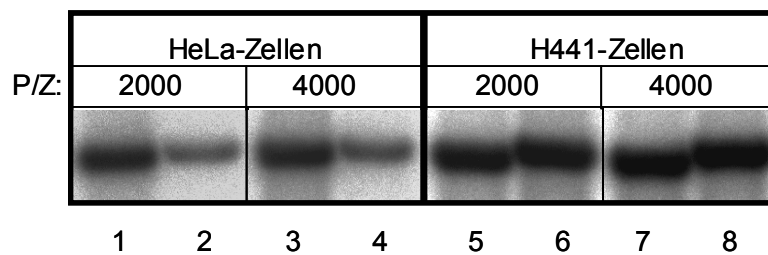


Abb. 3-10. Southern-Blot Analyse der Adenovektor-DNA in HeLa- und H441-Zellen. Bahn 1, 3, 5, 7: Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB}; Bahn 2, 4, 6, 8: Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}

Hinsichtlich der Bandenintensität bei infizierten HeLa-Zellen war der Unterschied zwischen mit Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} infizierten Zellen und mit Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infizierten Zellen vergleichbar mit den Werten der *GeneScan*-Analyse (Abb. 3-10). In H441-Zellen (Targetzelllinie des SPB-Promotors) ließ sich nachweisen, dass der SPB-Promotor aktiver war als in den HeLa-Zellen. Von Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} ist in H441-Zellen eine wesentlich höhere DNA-Menge als in HeLa-Zellen detektiert worden (Abb. 3-10), dies entsprach den Werten der SPB-Promotoraktivität (Abb. 3-4).

Diese Experimente belegen, dass die *ttsP*-DNA-Replikation als direkte Folge der *ttsP*-Aktivität auftritt.

3.2.7.2 Bestimmung der Zytotoxizität

Um die möglicherweise durch Infektion verursachte Zytotoxizität in HeLa- und H441-Zellen zu untersuchen, wurden sie mit verschiedenen Dosierungen von Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infiziert und die Ergebnisse bewertet. Das Virus Ad5TRE-iGFP diente als Kontrolle. Nach 3 Tagen erfolgte das *cell killing assay* (s. 2.18.3).

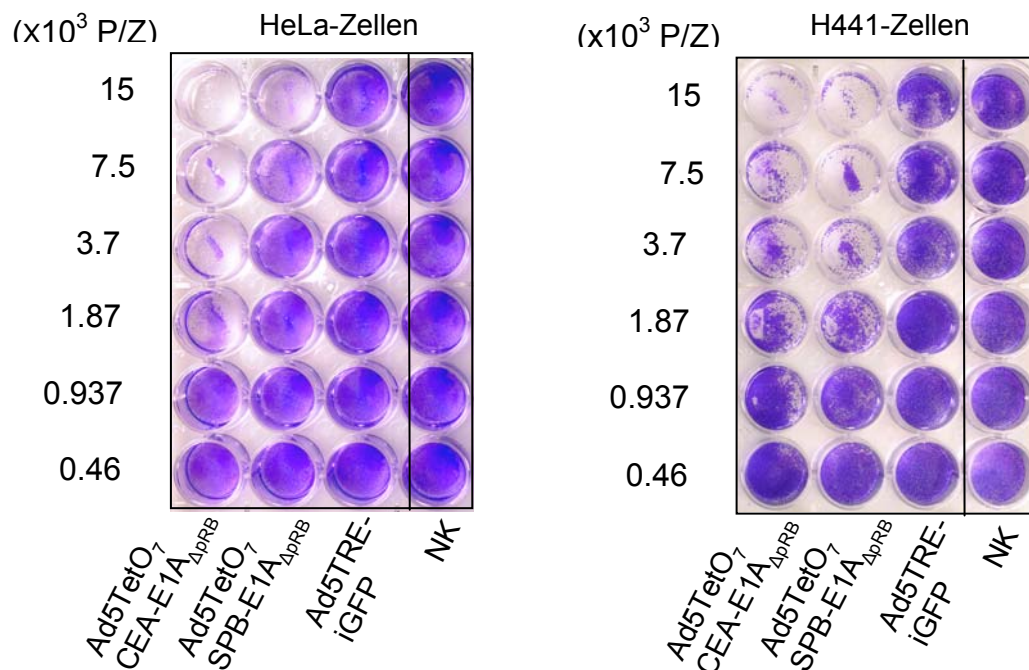


Abb. 3-11. Nachweis der Zytotoxizität in HeLa- und H441-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosierungen von Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infiziert und mit dem Adenovektor Ad5TRE-iGFP als Kontrolle transduziert. Die Zellen wurden 3 Tage nach der Infektion mit *crystal violet* gefärbt. NK: unbehandelte Zellen

Die mittels Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} induzierte Zytotoxizität in HeLa-Zellen war augenscheinlich ca. 8-fach höher geschätzt worden als die von Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}. In H441-Zellen bestand kein nachweisbarer Unterschied. Dieser Unterschied korreliert mit den Ergebnissen der Promotoraktivität (s. 3.2.3) und der nachgewiesenen DNA-Replikation (s. 3.2.7.1).

Die Ergebnisse dieses Tests geben einen Hinweis darauf, dass der Unterschied in der *leaky*-Aktivität der *ttsP* eine entscheidende Bedeutung für die unspezifische *ttsP*-RRCA Replikation ist.

3.3 Das Tet-regulierbare adenovirale Genexpressions-System

3.3.1 rtTA-M2-Transaktivierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren

Im Tet-On-System bindet sich der *reverse* Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (rtTA) durch den Einsatz von Doxyzyklin (Dox) an das Tet-Operon und vermittelt durch die Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren die Expression eines Transgens, das stromabwärts des Tet-Operon und des Promotors positioniert ist. Um zu überprüfen, ob und inwieweit die *ttsP* durch rtTA-M2 transaktiviert werden sind 5 verschiedene Tumorzelllinien mit 1000 P/Z des *ttsP*-AdV und des Kontrollvirus Ad5TRE-Luc und mit 2500 P/Z Ad5CMVrtTA-M2 transduziert worden. Das Doxyzyklin wurde mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml dem Medium gegeben. Die Messung der Luciferaseaktivität ist 24 h nach der Transduktion erfolgt (s. 2.18.2). Die Abb. 3-12 stellt die Transaktivierung der *ttsP*-Promotoren dar.

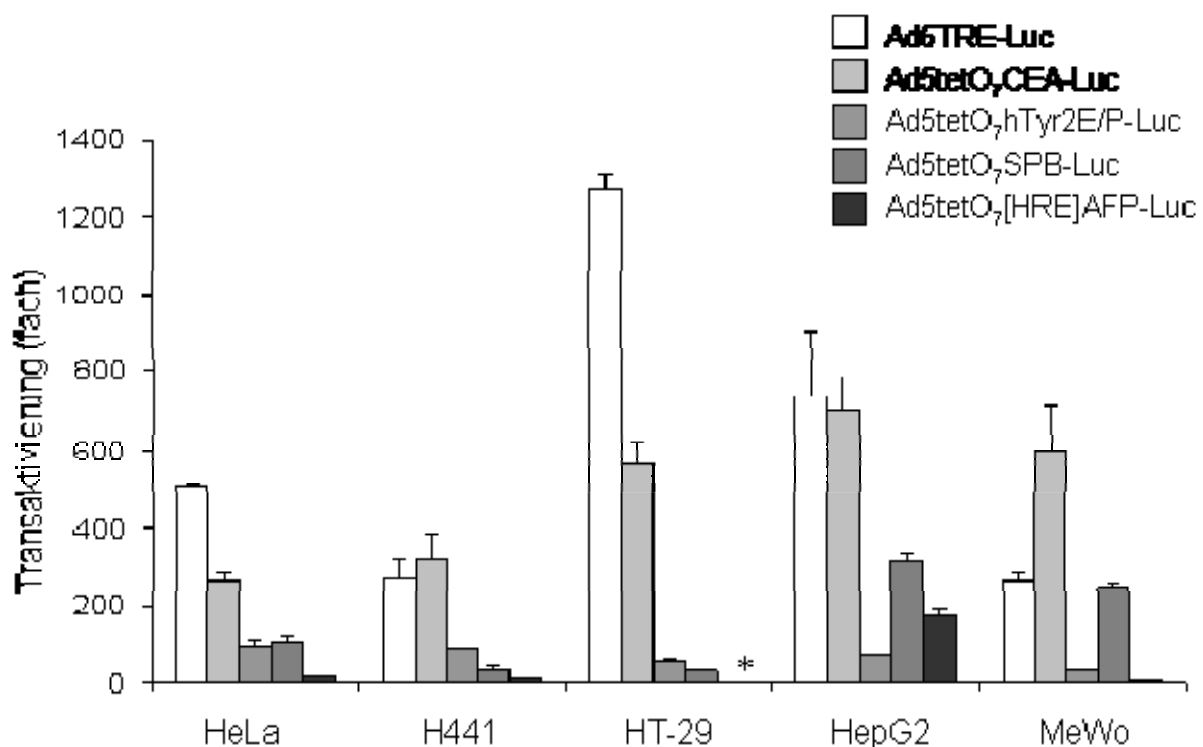


Abb. 3-12. Dox-abhängige Transaktivierung der *ttsP*-Aktivität. Luciferaseaktivität wurde 24 h nach der Transduktion gemessen und als Aktivitätsratio in An- vs Abwesenheit von Dox (1 µg/ml) dargestellt. (*) Eine Transaktivierung der *ttsP*-Aktivität konnte nicht festgestellt werden, weil die Luciferasewerte sich unter der nachweisbaren Grenze befanden

Die Messwerte lassen die Folgerung zu, dass die *ttsP* im Rahmen eines Adenovirusgenoms im Allgemeinen durch *rtTA-M2* transaktiviert werden. Es zeigte sich je nach Zelllinie eine unterschiedliche Transaktivierung bei den *ttsP*-AdV wie beim Kontrollvirus *Ad5TRE-Luc*. Ursächlich hierfür könnten die verschiedenen Transkriptionfaktoren der jeweiligen Zelllinien sein. Die Ergebnisse lassen keine eindeutige Aussage über die Transaktivierungsintensität der *ttsP* in den entsprechenden Targetzelllinien zu. Die *rtTA-M2*-Transaktivierung des *CEA*-Promotors überreichte in *MeWo*- und *H441*-Zellen die Transaktivierungswerte des *CMV_{min}*-Promotors. Der *[HRE]AFP*-Promotor wies die höchsten Transaktivierungsraten in seine Targetzelllinie *HepG2* auf, der *hTyr2E/P*-Promotor rief in den fünf Zelllinien eine vergleichbare Transaktivierung hervor. Der *[HRE]AFP*-Promotor war der einzige, der eine zelltypspezifische Transaktivierung zeigte. Das Experiment zeigte auf, dass die Basalexpression der *ttsP*-rdAdV bei ausschließlicher Koapplikation des *rtTA-M2*-Transaktivators keine signifikante Erhöhung der Promotoraktivität begründet (Daten nicht gezeigt). Erst nach Zugabe von *Dox* fand eine Transaktivierung statt.

3.3.2 tTS-Inhibierung der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren

Vorangegangene Experimente in der Arbeitsgruppe Poller/Fechner zeigten, dass der tet-kontrollierte transkriptionale Silencer (*tTS*) in der Lage ist, *Dox*-abhängig die *RRCA*-Replikation zu hemmen (Fechner *et al.* 2003a). Um diese Blockierung zu erzielen, musste der Vektor eine *tetO*-Sequenz stromabwärts von dem *CMV_{min}*-Promotor enthalten, mit der die *E1A*-Expression reguliert wurde. Der *tTS* anders als *rtTA-M2* bindet sich bei Abwesenheit von *Dox* an das Tet-Operon und blockiert die Aktivität des Promotors sowie die Transgenexpression. Bei Verwendung von *Dox* wird die Bindung zwischen *tTS* und Tet-Operon gelöst und das *E1A*-Gen als Folge der Promotoraktivität exprimiert.

Weiterhin sollte die Wirkung der *tTS* auf die *ttsP* innerhalb des Adenovektorgenoms analysiert werden. Das Luciferase-Reporter-gen diente dabei als Messsystem. Folgende enthaltende *ttsP*-AdV wurden in fünf Tumorzelllinien und in humanen Melanozyten angesetzt: *Ad5tetO₇CEA-Luc*, *Ad5tetO₇SPB-Luc*, *Ad5tetO₇hTyr2E/P-Luc* und *Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc*. 2500 P/Z der *ttsP*-AdV sind mit 2500 P/Z des

Vektors Ad5CMV-tTS kotransduziert, 24 h unter Ab- als auch unter Anwesenheit von Dox inkubiert und im Anschluss die Luciferase-Expression gemessen worden (Abb. 3-13). Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Kotransduktion der ttsP-AdV mit dem Ad5CMV-tTS eine deutliche Hemmung der Transgenexpression des koapplizierten ttsP-AdV hervorrief. Dessen Stärke war je nach Promotor und Zelllinie sehr unterschiedlich (von 18-fach für den CEA-Promotor in MeWo-Zellen bis zu 1.7-fach für den [HRE]AFP-Promotor in H441-Zellen). Die Senkung der Luciferaseaktivität durch tTS in der Zelllinie HT-29 war nur sehr gering. Eine Korrelation zwischen ttsP und die spezifische Zelllinien konnte nicht festgestellt werden.

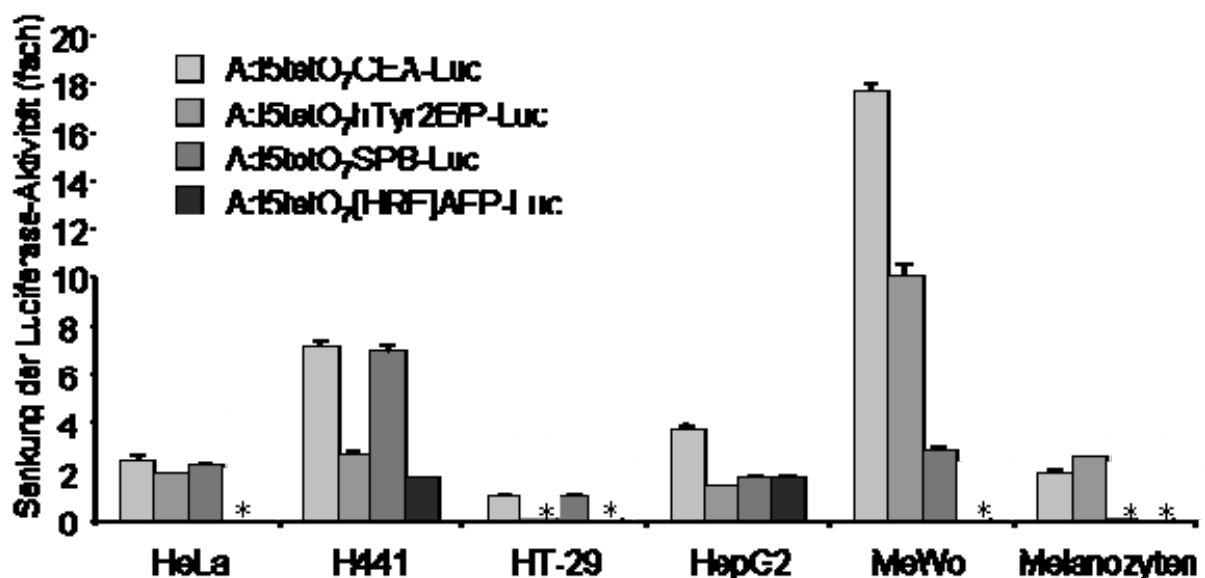


Abb. 3-13: Dox-abhängige Blockierung der ttsP-Aktivität. Die sinkende Luciferasewerte wurde 24 h nach der Transduktion gemessen und in Ab- vs Anwesenheit von Dox (1 µg/ml) dargestellt. (*) Blockierung der ttsP-Aktivität konnte nicht festgestellt werden, die Luciferasewerte in Anwesenheit von Dox befanden sich in nicht nachweisbaren Bereich

3.3.3 Regulierbarkeit der tumorzell- und gewebespezifischen Promotoren durch das tet-regulierbare adenovirale Genexpressionssystem

Im Weiteren wurde untersucht, ob der rtTA-M2-Transaktivator und der tTS-Silencer gleichzeitig auf die tumor- und gewebespezifischen Promotoren (ttsP) einwirken bzw. ob und inwieweit sie sich gegenseitig beeinflussen. Um dies herauszufinden sind

1000 P/Z des luciferaseexprimierenden Adenovektors mit 2500 P/Z des Transaktivators (Ad5CMV-rtTA-M2) und 2500 P/Z des Silencer (Ad5CMV-tTS) gleichzeitig auf die Tumorzelllinien HeLa, H441, HT-29, HepG2 und MeWo zugegeben worden. Zur Vergleich wurden die Zellen in einem parallelen Experiment lediglich mit den ttsP-AdV und dem Ad5CMV-rtTA-M2 transduziert. Die Messung der Luciferase erfolgte nach 24 h Inkubation in Ab- und Anwesenheit von Dox. Die Ergebnisse der Regulierbarkeit errechneten sich durch Division des relativen Luciferasewertes der Zellen mit Dox durch den Wert der Zellen ohne Dox (Abb. 3-14).

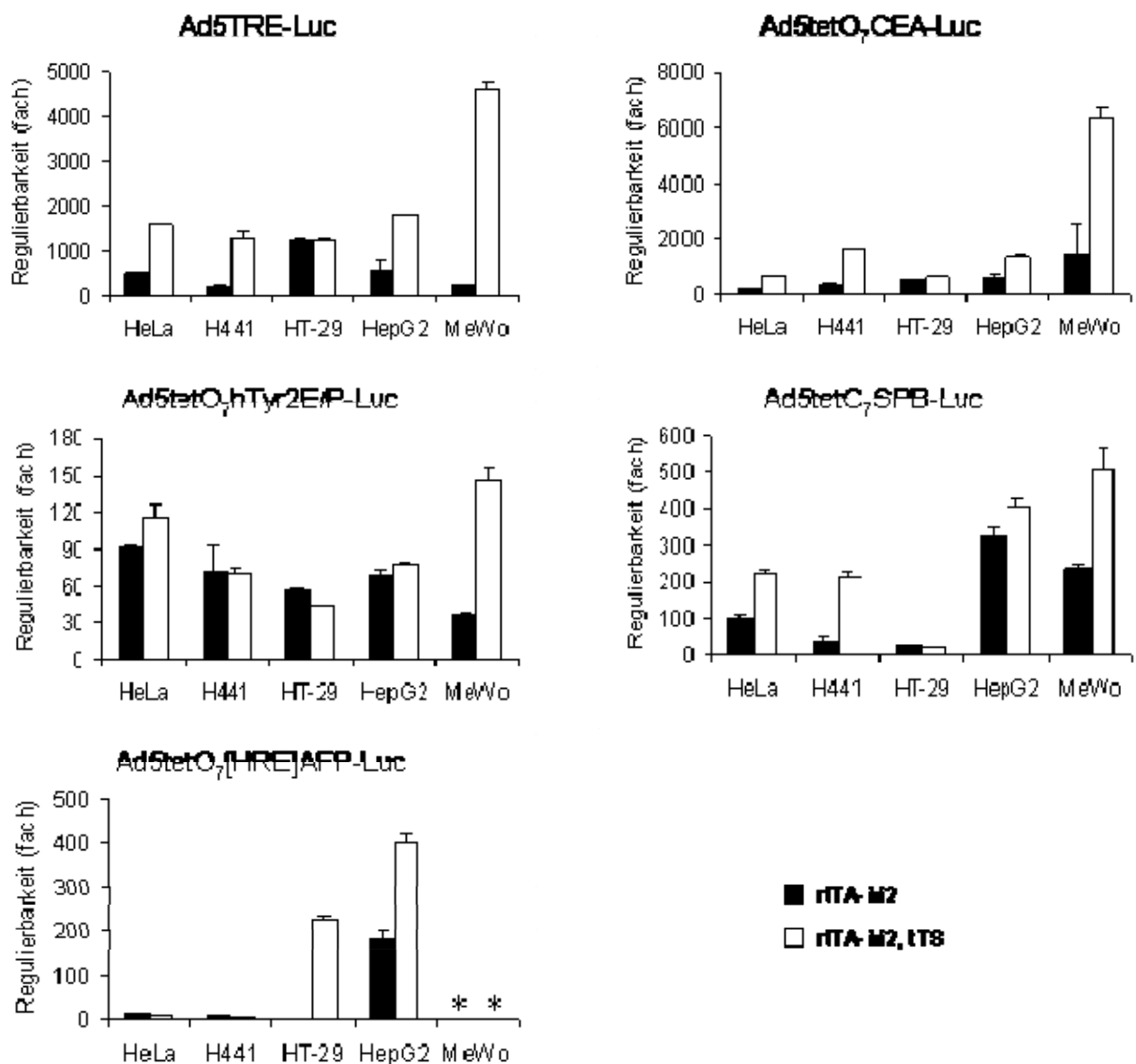


Abb. 3-14. Dox-abhängige Regulierbarkeit der ttsP-Aktivität. Fünf Zelllinien wurden mit 1000 P/Z ttsP-AdV, 2500 P/Z Ad5CMV-rtTA-M2 und mit oder ohne 2500 P/Z Ad5CMV-tTS transduziert, 24 h in Ab- und Anwesenheit von Dox inkubiert und anschließend die

Luciferaseaktivität gemessen. Auf dem Diagramm wird die Regulierbarkeit (fach) dargestellt. Die mit * bezeichneten Werte befinden sich auf nicht nachweisbarem Niveau

Die Versuche zeigten eine durch die Verwendung von rtTA-M2 und tTS unterschiedliche Regulierbarkeit der ttsP-AdV je nach Promotor und Zelllinie. Wurde rtTA-M2 und tTS angesetzt, war die Regulierbarkeit der ttsP-AdV höher als bei ausschließlicher Verwendung von rtTA-M2. In MeWo-Zellen zeigten sich die höchsten Werte der ttsP-Transaktivierung. Die Ausnahme war der Adenovirus Ad5tetO₇[HRE]AFP-Luc, dieser Vektor besaß die höchste Spezifität, ließ sich in Nicht-Targetzellen kaum transaktivieren und in MeWo-Zellen lagen sogar die Werte im nicht nachweisbaren Bereich. Hiermit gelang der Nachweis, dass der Transaktivator und der Silencer in dem Promotorbereich, in dem sie binden, sich nicht gegenseitig blockierten sondern die Effekte sich addierten. Eine Korrelation hinsichtlich der Regulierbarkeit zwischen Targetzellen und spezifischen Promotoren konnte nicht festgestellt werden.

3.3.4 Hemmung der E1A-vermittelte Transaktivierung der ttsP

Nach der Analyse der Blockierung der ttsP-AdV in den verschiedenen Zelllinien soll im Folgenden der Einfluss des Silencer tTS auf die ttsP-Transaktivierung durch E1A auf Plasmidebene untersucht werden.

Zur Durchführung des Experiments in HeLa-Zellen wurde der [HRE]AFP-Promotor genutzt. Grundlage hierfür ist das hohe Transaktivierungspotential dieses Promotors in HeLa-Zellen (Tab. 3-3). Die Transfektion erfolgte mit 1.3 µg des Plasmides pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc. 24 h danach wurden die Zellen mit 2500 P/Z Ad5CMV-tTS transduziert und mit 500 P/Z eines replikationskompetenten Adenovirus (RCA) infiziert oder mit dem Vektor Ad5TRE-iGFP als Ausgleich transduziert. Die Luciferase-Expression konnte 48 h nach der Transfektion gemessen werden (Abb. 3-15).

Die Luciferase-Expression bei mit pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc transfezierten HeLa-Zellen war vergleichbar mit dem Wert von zusätzlich mit den Vektoren Ad5CMV-tTS und Ad5TRE-iGFP transduzierten HeLa-Zellen unter Verwendung von Dox. In Abwesenheit von Dox dagegen senkte sich die Luciferase-Expression durch die

Bindung von tTS an das Tet-Operon um das 1.6-fache. Beim Einsatz von RCA statt des Vektors Ad5TRE-iGFP stieg die Luciferase-Expression unter Zugabe von Dox als Folge der E1A-Transaktivierung, ohne die Verwendung von Dox senkte sich die Luciferaseaktivität. Die tTS-Hemmung war bei infizierten HeLa-Zellen mit RCA deutlich höher (3.4-fach) als bei HeLa-Zellen ohne RCA (1.6-fach). Zu folgern ist daraus, dass der tTS-Silencer nicht nur eine Hemmung des [HRE]AFP-Promotors verursacht, sondern auch die E1A-vermittelte Transaktivierung vermindert.

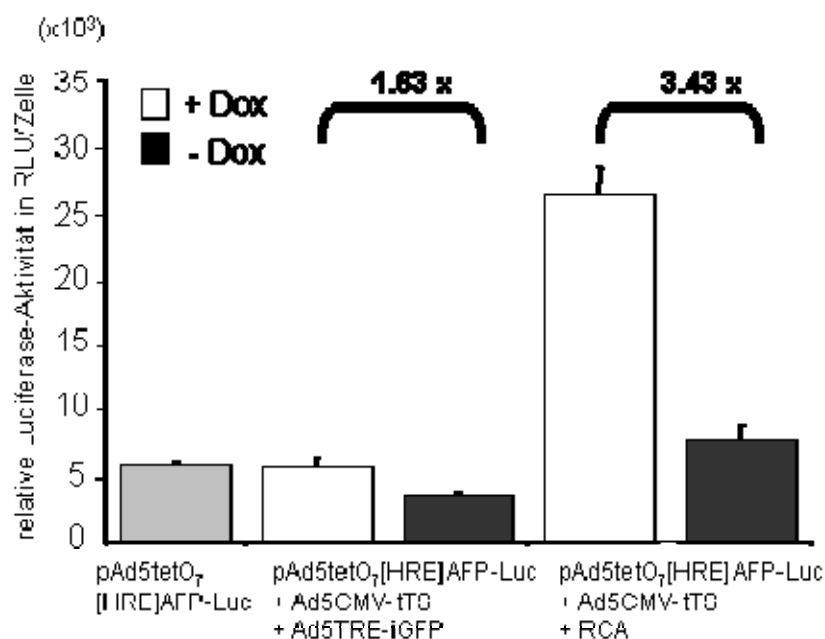


Abb. 3-15. tTS inhibiert die E1A-vermittelte Transaktivierung auf die ttsP. HeLa-Zellen wurden mit 1.3 µg/Well pAd5tetO₇[HRE]AFP-Luc transfeziert und 24 h später mit 500 P/Z von RCA (E1A mit nativem E1A-Promotor) infiziert oder mit dem Kontrollvektor Ad5-TRE-iGFP transduziert. 1µg Dox/ml Medium wurde, wo angezeigt, zugegeben und die Luciferaseaktivität 24 h nach der Infektion gemessen

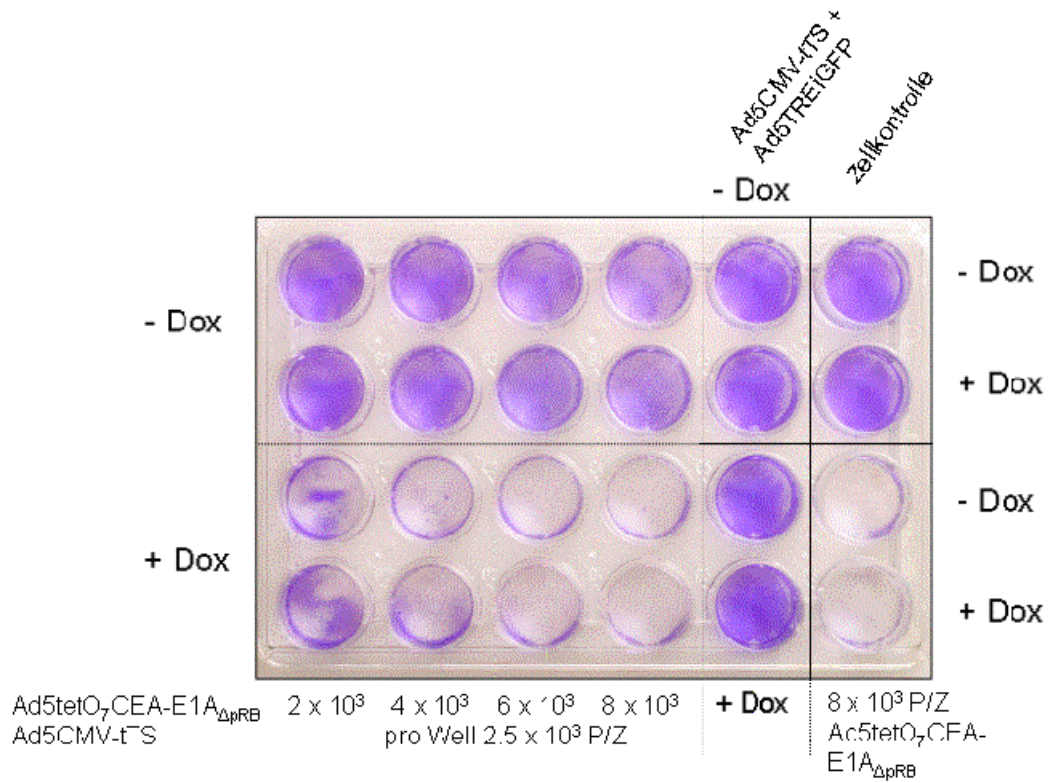
3.3.5 tTS-Blockierung der unspezifischen ttsP-RRCA-Replikation

Es wurde bisher nachgewiesen, dass der Dox-abhängige tTS-Silencer die Eigenschaft besitzt die ttsP-Aktivität im Adenovirusgenom und die E1A-vermittelte Transaktivierung auf Plasmidebene zu unterdrücken.

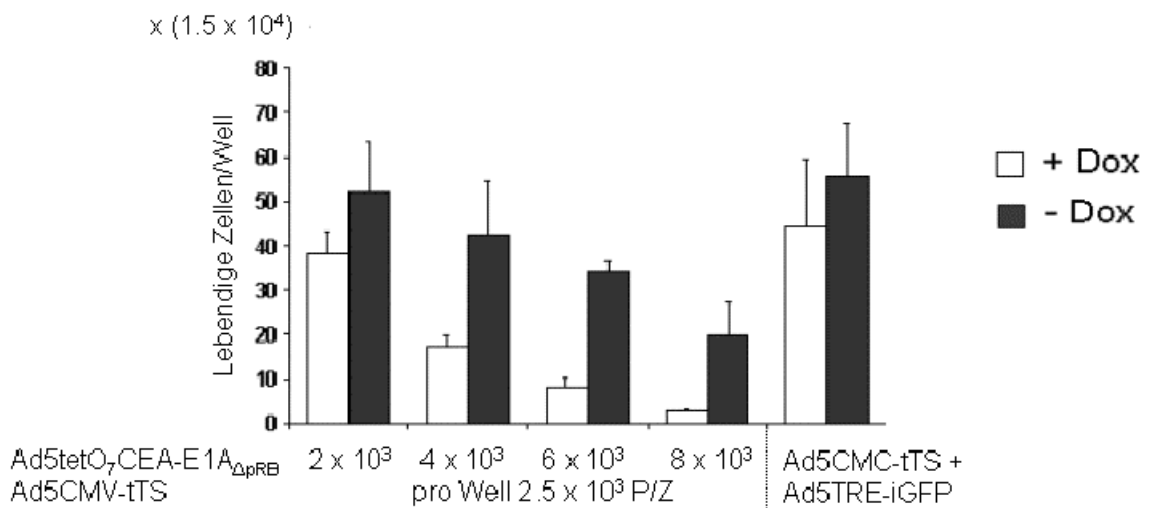
Um zu untersuchen, ob die ttsP-RRCA-Replikation in gleichem Maße durch tTS inhibiert werden kann, sind zellzytotoxische Essays (s. 2.18.3) mit folgenden ttsP-

RRCA in HeLa-Zellen durchgeführt worden: Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} (Abb. 3-16). Parallel dazu fand ein gleiches Experiment als Vitalitätstest statt.

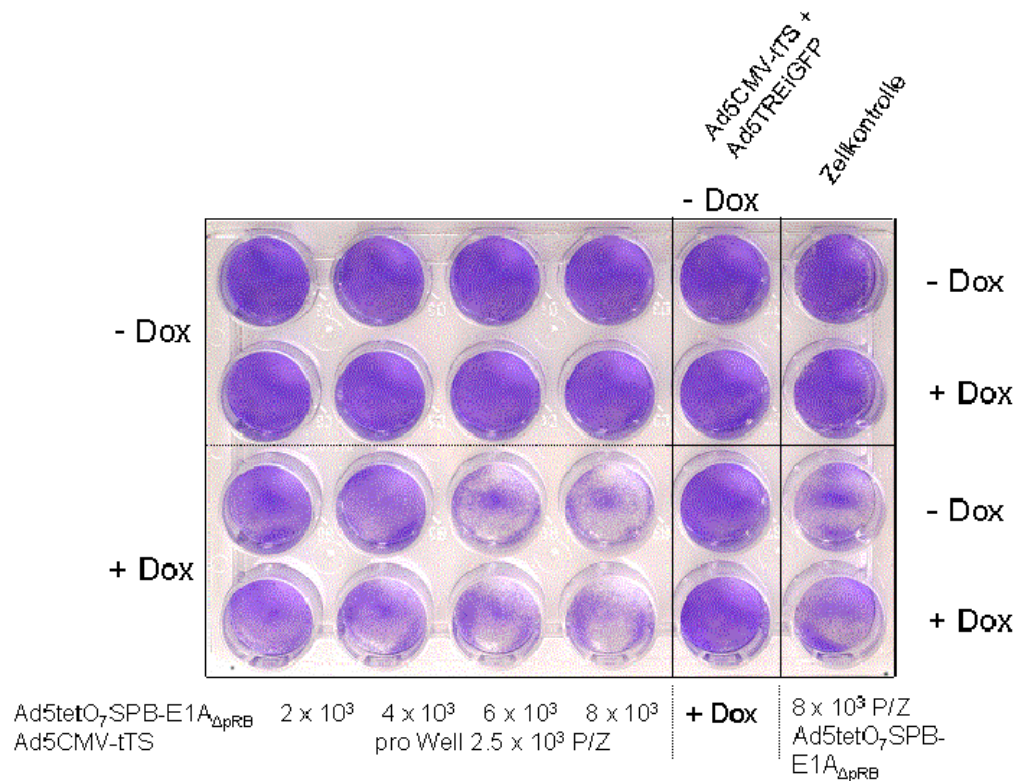
A)



B)



C)



D)

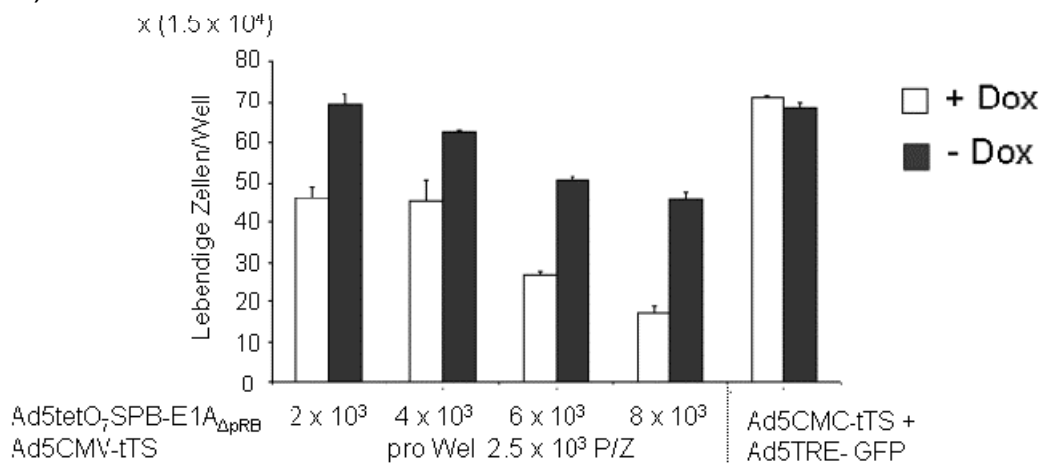


Abb. 3-16. Inhibierung der Zytotoxizität von Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} durch tTS. HeLa-Zellen wurden mit 2500 P/Z Ad5CMV-tTS transduziert und mit 2, 4, 6 und 8 × 10³ P/Z Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infiziert. Die Bindung des tTS an das Tet-Operon wurde durch die Zugabe von Dox (1.5 μg/ml) blockiert. Die Färbung der Zellen mit *crystal violet* erfolgte einmal nach 4 Tagen (A) und einmal nach 3 Tagen (C). Paralell dazu wurden die Zellen nach 4 Tagen (B) sowie nach 3 Tagen (D) trypsiniert und die überlebenden Zellen gezählt

Die Auswertung des *cell killing assay* zeigte bei beiden Adenovektoren Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}, dass sich bei Nichtverwendung von Dox der tTS-Silencer an das Tet-Operon bindet und damit die E1A-Expression verringern konnte. Nach der Applikation von Dox war die Bindung des tTS an die tetO₇-Sequenz nicht mehr möglich. Das E1A-Gen wurde exprimiert und die Zellen lysiert. Der Einsatz einer höheren Zahl von Partikeln je Zelle zog jeweils eine größere Expression von E1A nach sich, die Zellen wurden gleichzeitig schneller lysiert. Die erkennbar unterschiedliche Virusstärke hatte zur Folge, dass bei Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} nach 3 Tagen fast alle Zellen lysiert waren, bei Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} erst nach 4 Tagen die Lyse deutlich wurde. Diese Daten entsprechen der festgestellten Stärke der Promotorenaktivität beim Einsatz in HeLa-Zellen (s. 3.2.3). Diese Ergebnisse bestätigen auch den Vitalitätstest: Beim Vektor mit SPB-Promotor konnten mehr überlebende Zellen als beim Vektor mit CEA-Promotor gezählt werden.

Zur Kontrolle für den *cell killing assay* dienten: unbehandelte Zellen, infizierte Zellen mit 8×10^3 P/C Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} oder Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} und transfezierte Zellen mit 2.5×10^3 P/Z Ad5CMV-tTS und 8×10^3 P/Z Ad5TRE-iGFP. Durch die Kontrollen erwies sich, dass ein direkter Einfluss von Dox allein auf die Zellen und auf die Vektoren nicht festzustellen war. Die Kontrolle von 8×10^3 P/Z Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} oder Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} zeigte, dass das Virus Ad5CMV-tTS beim Einsatz von Dox keinen Einfluß auf die jeweilige Virusstärke ausübte.

Zum Nachweis, ob diese Zytotoxizität als Folge der unterschiedlichen ttsP-RRCA-Replikation auftritt und nicht auf die Überexpression vom E1A-Gen, wurde die adenovirale DNA-Menge, die in den infizierten Zellen vorhanden war, gemessen. Durch kompetitive PCR und nachfolgende *GeneScan*-Analyse (s. 2.12) konnte eine mögliche Vermehrung der DNA-Menge festgestellt werden. HeLa-Zellen sind mit Ad5CMV-tTS transduziert und mit jeweils Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} oder Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} koinfiziert worden. Es folgte je einmal mit und einmal ohne Dox eine 24 h-Inkubation mit anschließender Bestimmung der adenoviralen DNA-Menge (Abb. 3-17).

Die Ergebnisse belegen, dass die Unterschiede des *cell killing assay* bezüglich dessen Zytotoxizität auf eine unterschiedliche adenovirale DNA-Menge zurückzuführen sind. Bei Verzicht auf Dox konnte weniger adenovirale DNA-Menge

als bei Verwendung von Dox nachgewiesen werden (1.9-fach weniger für Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} und 2.1-fach für Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}). Hiermit gelang der Nachweis, dass der tTS-Silencer nicht nur die E1A-Transaktivierung der Promotoren hemmt, sondern auch die adenovirale DNA-Replikation verhindert.

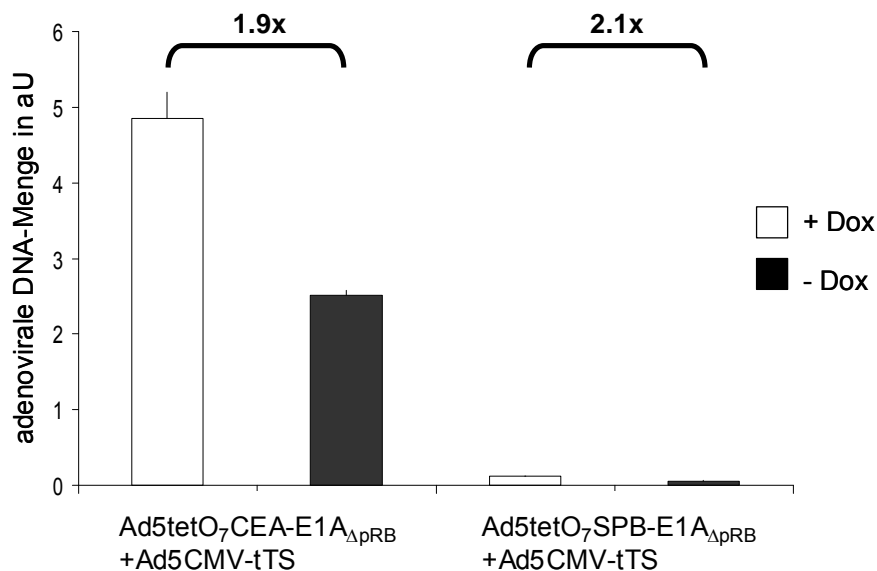


Abb. 3-17. tTS-Inhibierung der Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB}- und Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}-DNA-Replikation. HeLa-Zellen transduziert mit 2000 P/Z Ad5CMV-tTS und mit 4000 P/Z Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} oder Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} wurden 24 h mit und ohne Dox (1 µg/ml) inkubiert, im Anschluss die DNA von den Zellen extrahiert und der DNA-Menge mit Hilfe der kompetitiven PCR und der nachfolgenden *GeneScan*-Analyse bestimmt. Darstellung der adenoviralen DNA-Menge in a.U.

Zur Untersuchung, ob die adenovirale DNA-Vermehrung gleichzeitig die Bildung weiterer infektiöser Partikel entspricht, wurde ein *plaque assay* durchgeführt (s. 2.17). HeLa-Zellen sind mit Ad5CMV-tTS transduziert und einen Tag später mit Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} oder Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} infiziert worden. Nach 2 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen gewaschen, um die Viruspartikel, die sich im Medium befanden auszuspülen. In der Folge sind die Zellen in Ab- und Anwesenheit von Dox weiter inkubiert worden, bis bei den Zellen mit Dox ein zytopathischer Effekt sichtbar war. Der Überstand wurde zur Durchführung eines *plaque assay* in HEK293-Zellen genutzt (Abb. 3-18).

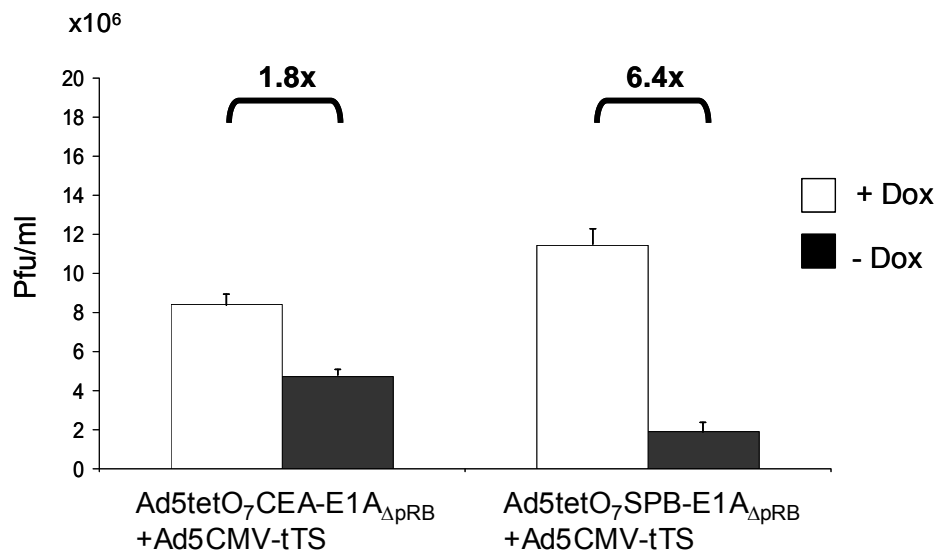


Abb. 3-18. tTS-Blockierung der ttsP-RRCA-Replikation. Nach der Transduktion von HeLa-Zellen mit 2500 P/Z Ad5CMV-tTS und Infektion mit 2500 P/Z Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB} oder Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB} erfolgte 2 h später das Waschen der Zellen und weitere Inkubation, einmal unter Zugabe (tägliche Zugabe von 100 ng/ml auf das Medium), einmal unter Verzicht von Dox, bis bei den HeLa-Zellen mit Dox ein zytopatischer Effekt sichtbar wurde (2 Tage bei Ad5tetO₇CEA-E1A_{ΔpRB}, 3 Tage bei Ad5tetO₇SPB-E1A_{ΔpRB}). Der Überstand aus den geernteten und zentrifugierten Zellen mit dem Medium bildete den Ausgangspunkt für die Durchführung des plaque assay

Durch dieses Experiment gelang der Nachweis, dass eine Virusreplikation erfolgte. Die neu entstandenen Partikel besaßen die Eigenschaft, neue Zellen zu infizieren. Der tTS-Silencer konnte durch die Hemmung der E1A-Expression die Virusreplikation verringern. Diese Ergebnisse korrelieren mit der gemessenen adenoviralen DNA-Menge (Abb. 3-17) und bestätigen, dass die unterschiedlichen Werte der Viro-Onkolyse (Abb. 3-16) als Folge der unterschiedlichen ttsP-RRCA-Replikation auftreten.

3.4 Tet-regulierbare adenovirale Genexpressionssystem für die Kontrolle von FasL-induzierter Apoptose

In den bisherigen Untersuchungen gelang der Nachweis, dass das Tet-System im Adenovirusgenom in der Lage ist, die Expression heterologer Gene zu steuern. Die Expression vom heterologen FasL-Gen unter Steuerung des Tet-Systems im Adenovirusgenom konnte dabei durch Dox induziert und damit die Apoptose in den Tumorzellen verursacht werden.

Um das FasL-Gen in Adenovirusgenom für die Nutzung in der Tumorthherapie anzusetzen, ist eine geringe Basalaktivität und eine höhere Genexpressionsregulation vorauszusetzen, da das FasL-Protein toxisch ist. So könnte man unerwünschte Nebenwirkungen vermeiden. Nach diesen Kriterien wurden folgende Konstrukte untersucht: Ad5TRE-FasL, Ad5Tight-FasL und Ad5TightTATA-FasL (s. 8.2). Das TRE enthält die tetO₇-Sequenz und den CMV_{min}-Promotor, Tight enthält eine modifizierte tetO₇-Sequenz und einen modifizierten CMV_{min}-Promotor, TightTATA enthält die tetO₇-Sequenz und als Promotor ausschließlich die TATA-Box.

3.4.1 Dox-abhängige Zytotoxizität durch rekombinanten FasL-Regulation in HeLa-Zellen

Zur Analyse der Dox-abhängigen Regulation der Zytotoxizität sind HeLa-Zellen mit den Adenovektoren Ad5TRE-FasL, Ad5Tight-FasL und Ad5TightTATA-FasL jeweils mit Konzentrationen zwischen 0.1 und 20 MOI sowie mit 6 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 transduziert worden. Die Inkubation der Zellen erfolgte einmal mit und einmal ohne Verwendung von Dox. Drei Tage nach der Transduktion wurde ein *cell killing assay* durchgeführt (Abb. 3-19). Bei Verwendung von Dox trat der Zelltod schon bei 0.1 MOI für Ad5TRE-FasL und Ad5Tight-FasL ein, während transduzierte HeLa-Zellen mit Ad5TightTATA-FasL eine deutlich geringere Zellzytotoxizität aufwiesen. Erst bei 20 MOI war eine Zytotoxizität feststellbar. Wurde Dox nicht eingesetzt konnte keine Zytotoxizität bei den transduzierten HeLa-Zellen mit Ad5Tight-FasL und mit Ad5TightTATA-FasL nachgewiesen werden. Bei mit Ad5TRE-FasL transduzierten Zellen trat der Zelltod bereits bei 5 MOI ein. Eine Folgerung aus den erzielten

Ergebnissen ist, dass der Adenovektor Ad5Tight-FasL eine optimale FasL-Expression aufzeigt. Die unspezifische Aktivität erwies sich als gering und ließ sich mit Dox in der gleichen Form induzieren wie beim Ad5TRE-FasL.

Die mit dem replikationsdefizienten Adenovektor Ad5TRE-iGFP transduzierten Zellen blieben unverändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zytotoxizität sich als Folge der exprimierten FasL-Protein-Menge und nicht der höher eingesetzten Adenovektormenge erwies.

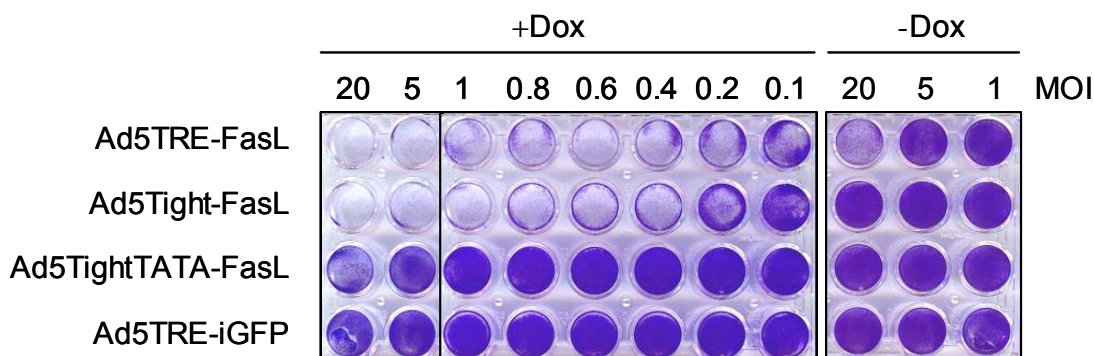


Abb. 3-19. Regulation der Zytotoxizität durch Dox. HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Dosierungen (0.1 bis 20 MOI) der bezeichneten Adenovektoren und 6 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert. Die Zellen wurden mit (1 µg/ml pro Tag) und ohne Dox inkubiert sowie drei Tage nach der Transduktion mit *crystal violet* gefärbt. Das replikationsdefiziente Adenovirus Ad5TRE-iGFP diente als Kontrolle

3.4.2 Dox-abhängige FasL-mRNA-Expression in HeLa-Zellen

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Unterschiede in der Zytotoxizität als Folge der FasL-mRNA-Expression auftreten. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit 4 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 und mit 50 sowie 0.2 MOI Ad5TRE-FasL, Ad5Tight-FasL oder Ad5TightTATA-FasL kotransduziert und mit und ohne Einsatz von Dox 21 h inkubiert. Nach der Extrahierung der RNA folgte die Durchführung eines Northern-Blots. Der Blot ist mit einer FasL-Sonde hybridisiert und zur Kontrolle der RNA-Menge mit β -actin rehybridisiert worden (Abb. 3-20).

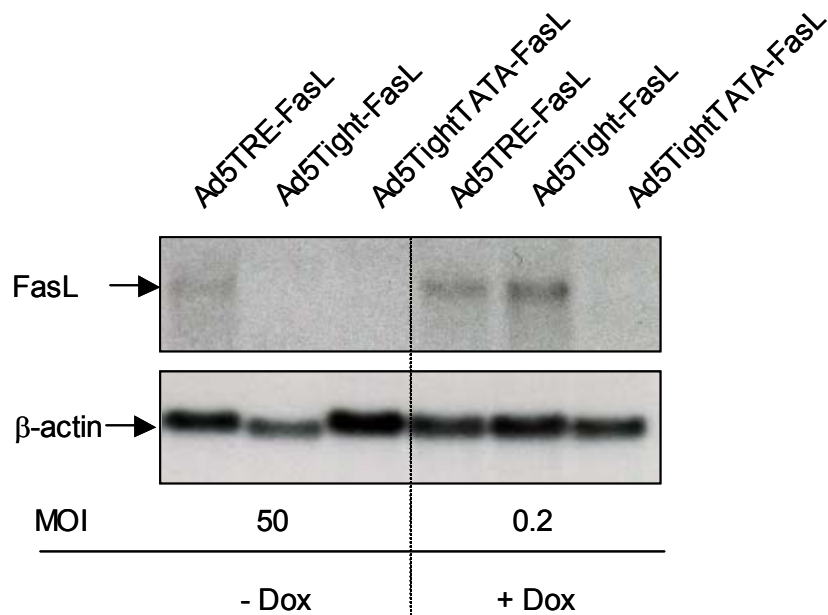


Abb. 3-20. Dox-abhängige FasL-mRNA-Expression. HeLa-Zellen wurden mit 4 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 und mit 50 sowie 0.2 MOI von den bezeichneten Adenovektoren kotransduziert und mit und ohne Dox 21 h inkubiert. Die RNA ist von den Zellen extrahiert, ein Northern-Blot durchgeführt und die Membran gegen FasL und β -actin hybridisiert worden

Die Expression der rekombinanten FasL-mRNA in nicht induziertem Zustand konnte in den ausschließlich mit Ad5TRE-FasL transduzierten HeLa-Zellen durch Northern-Blot nachgewiesen werden. Hierbei trat keine mRNA-Expression der mit Ad5Tight-FasL und mit Ad5TightTATA-FasL transduzierten HeLa-Zellen auf. Die rekombinante FasL-mRNA-Expression bei Dox-induziertem Zustand zeigte bei Ad5TRE-FasL und Ad5Tight-FasL vergleichbare Ergebnisse. Der Vektor Ad5TRE-FasL ließ sich durch Dox induzieren, zeigte aber daneben eine deutliche Eigenaktivität. In gleichem Maße war der Vektor Ad5Tight-FasL durch Dox induzierbar, eine FasL-mRNA-Expression ohne Zugabe von Dox war nicht nachweisbar. Beim Vektor Ad5TightTATA-FasL konnte man unabhängig von der Verwendung von Dox keine mRNA-Expression nachweisen.

3.4.3 Proapoptotische Aktivität durch Ad5TRE-FasL und Ad5Tight-FasL in HeLa-Zellen

Die Erfassung der Apoptose durch Bestimmung der DNA-Fragmentierung ist eine aussagekräftige Methode, da es sich um einen irreversiblen Schritt im apoptotischen Programm handelt.

Der nachgewiesene Zelltod bei transduzierten HeLa-Zellen mit den FasL-exprimierenden Adenovektor ist vermutlich eine Folge des proapoptotischen Effektes des FasL-Proteins. Um diese These zu bestätigen, ist einerseits das *cell death detection assay ELISA* (s. 2.18.4) und andererseits die DNA-DAPI-Färbung (s. 2.18.4.1) durchgeführt worden.

HeLa-Zellen wurden jeweils mit Ad5TRE-FasL, Ad5Tight-FasL und Ad5TRE-iGFP sowie alle Zellen anschließend mit Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert, für 16 h mit und ohne Zugabe von Dox inkubiert und anschließend ein *cell death detection assay ELISA* durchgeführt (Abb. 3-21).

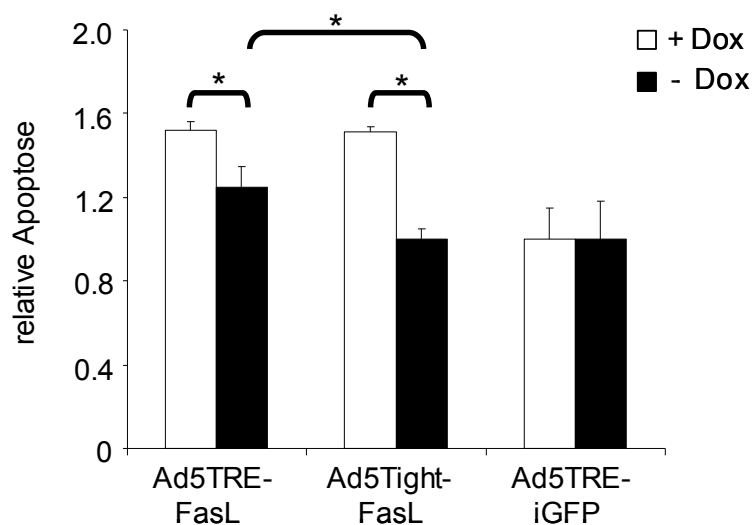


Abb. 3-21. Selektive Induktion von Apoptose. HeLa-Zellen wurden mit 1 MOI von Ad5TRE-FasL, Ad5Tight-FasL und Ad5CMV-iGFP und jeweils mit 4 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 transduziert, ohne und unter Verwendung von Dox inkubiert, 16 h nach der Transduktion folgte die Durchführung des *cell death detection assay ELISA*. Werte werden als relative Apoptose dargestellt. (*) Statistisch signifikant ($P < 0.05$)

Die Apoptose-Werte in dem mit Ad5Tight-FasL transduzierten HeLa-Zellen ohne Zugabe von Dox zeigten einen vergleichbaren Wert wie bei der Kontrolle Ad5TRE-iGFP. Bei mit Ad5TRE-FasL transduzierten HeLa-Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen Apoptose. Nach der Dox-Induktion wurde auch bei mit Ad5TRE-FasL und Ad5Tight-FasL transduzierten HeLa-Zellen eine Steigerung der relativen Apoptose ersichtlich. Jedoch war auf Grund der relativ höheren Basalapoptose in den Ad5TRE-FasL-transduzierten Zellen die Apoptoseinduktion durch Dox geringer als erwartet (Abb. 3-21). Der Adenovektor Ad5TRE-iGFP zeigte unabhängig von der Verwendung von Dox den gleichen relativen Apoptosewert.

Eine Methode zur Visualisierung der DNA-Fragmentierung ist die Färbung der genomischen DNA mit DAPI (s. 2.18.4.1). Parallel zu dem oben beschriebenen Experiment wurden HeLa-Zellen mit Ad5TRE-FasL oder Ad5Tight-FasL und mit Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert. 24 Stunden nach der Dox-Induktion zeigten die transduzierten Zellen Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Diese Eigenschaften erwiesen sich auch in Abwesenheit von Dox bei Ad5TRE-FasL- aber nicht jedoch bei Ad5Tight-FasL-transduzierten HeLa-Zellen (Abb. 3-22).

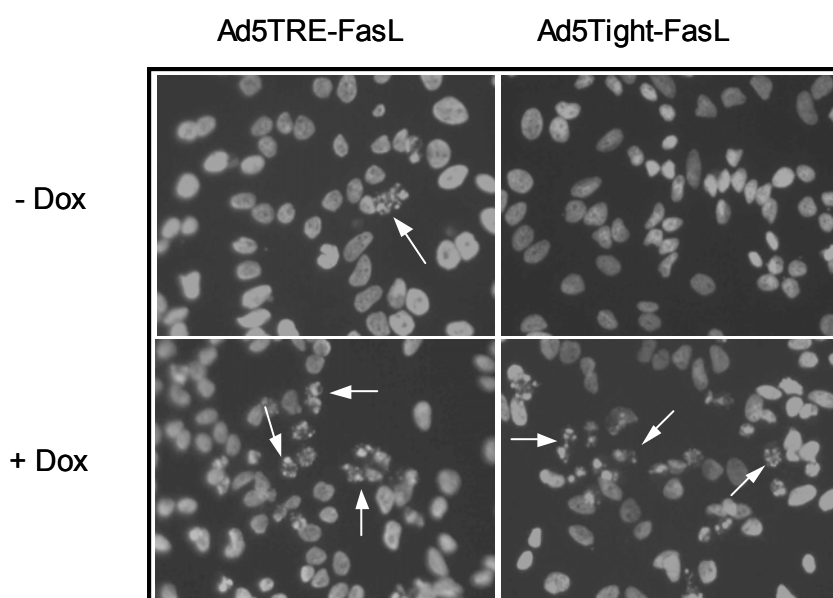


Abb. 3-22. DAPI-Färbung. HeLa-Zellen wurden mit 1 MOI Ad5TRE-FasL oder Ad5Tight-FasL und mit 4 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert, Dox wurde, wo angezeigt (1 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben. Nach der DAPI-Färbung der Zellen 24 h später, war die Visualisierung der Zellkerne mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops möglich. Kondensation und Degradation des Zellkerns sind mit Pfeilen gekennzeichnet

Diese Ergebnisse entsprechen mit denen der vorherigen Experimenten. Der Adenovektor Ad5Tight-FasL zeigte die höchste Regulation und Effizienz der FasL-Expression in HeLa-Zellen. Folglich wurde dieser Adenovektor für die weiteren Untersuchungen in Lungenkarzinomzellen eingesetzt.

3.4.4 Proapoptotische Aktivität durch Ad5Tight-FasL in Lungenkarzinomzellen

Bisher konnte aufgezeigt werden, dass die FasL-exprimierenden Adenovektoren Apoptose in HeLa-Zellen hervorrufen können. Jeder Adenovektor löst dabei, abhängig von dem Promotor, der das FasL-Gen steuert, eine unterschiedliche Apoptoseintensität aus. Der Ad5TRE-FasL zeigte in HeLa-Zellen eine höhere Apoptosebasalaktivität, der Ad5TightTATA-FasL unabhängig von der Verwendung von Dox eine sehr geringe FasL-Expression. Der Ad5Tight-FasL exprimierte das FasL-Protein in nicht induzierten Zustand unter dem nachweisbaren Bereich, hingegen trat bei Dox-Induktion eine deutliche Steigerung auf. Der Ad5Tight-FasL erwies sich von den drei untersuchten Adenovektoren als der bestgeeignete für die Tumorthherapie. Die Basalaktivität befand sich auf nicht detektierbarem Niveau, die Apoptoseraten bei induziertem Zustand erreichten vergleichbare Werte wie bei AdTRE-FasL. Für weitere Untersuchungen in den Lungenkarzinom-Zelllinien H441, BEN und DMS53 wurde daher der FasL-exprimierende Adenovektor Ad5Tight-FasL verwendet.

3.4.4.1 Expression der Endogen-Fas-mRNA in Lungenkarzinomzellen

FasL ist ein proapoptotisches Effektorprotein, das beim Binden an das Fas-Protein (Rezeptor von FasL) die Zellapoptose auslöst. Voraussetzung für eine effektive Apoptose in den Lungenkarzinomzellen durch den Adenovektor Ad5Tight-FasL war das Vorhandensein des Fas-Proteins. Daher erfolgte im ersten Schritt der Test der Lungenkarzinomzellen H441, BEN und DMS53 auf Fas-mRNA. Hierfür wurde die RNA präpariert (s. 2.9), ein Northern-Blot durchgeführt (s. 2.13.1) und anschließend die Proben mit den Sonden Fas und β -actin (s. 3.4.2) hybridisiert (Abb. 3-23).

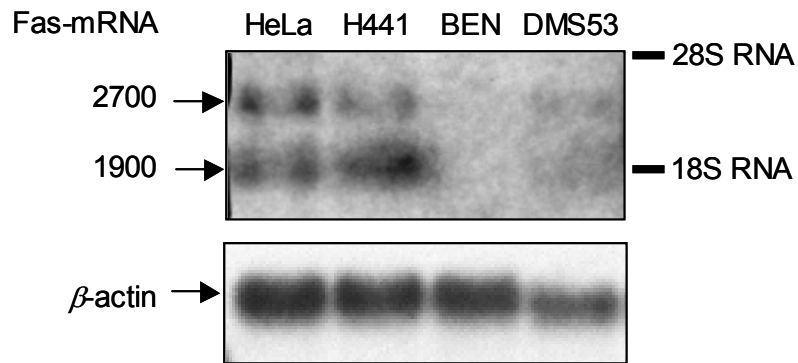


Abb. 3-23. Expression der Fas-mRNA in Lungenkarzinomzellen. Expression von Fas-mRNA aus HeLa-, H441-, BEN- und DMS53-Zellen wurde mittels Northern-Blot und nachfolgender Hybridisierung unter Anwendung der spezifischen Fas-Sonde (s. 2.14.1) analysiert. Zur Kontrolle diente die β -actin-Sonde

Bei den H441- und DMS53-Zellen konnte Fas-mRNA detektiert, bei BEN-Zellen hingegen konnte kein Fas-mRNA nachgewiesen werden. Da der Nachweis von Fas-mRNA in BEN-Zellen mittels Northern-Blot nicht möglich war, erfolgte hierfür die Anwendung einer sensitiveren Methode. Die RNA von Lungenkarzinomzellen wurde durch RT-PCR zu cDNA umgewandelt und ein PCR mit den Primern CD95s und CD95a (s. 8.1) durchgeführt (Abb. 3-24).

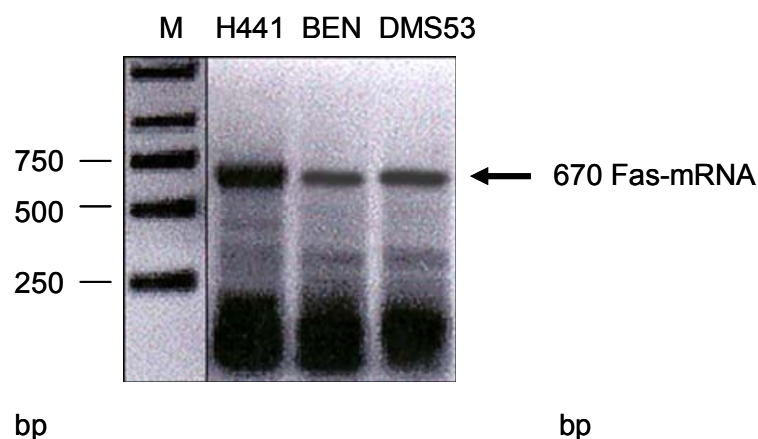


Abb. 3-24. Expression der Fas-mRNA in Lungenkarzinomzellen. Herstellung der cDNA von Fas-mRNA aus H441-, BEN- und DMS53-Zellen mittels RT-PCR. Anschließend wurde eine PCR der cDNA mit den Primern CD95s und CD95a und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt

Mit Hilfe der RT-PCR konnte Fas-mRNA auch in BEN-Zellen nachgewiesen werden. Die H441-Zellen zeigten die höchste Expression von Fas-mRNA. Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen mit denen des Northern-Blot.

3.4.4.2 Nachweis der FasL-mRNA in transduzierten Lungenkarzinomzellen

Nach der Fas-mRNA-Analyse in Lungekarzinomzellen folgte die Überprüfung, ob ein FasL-exprimierender Adenovektor Apoptose in Lungenkarzinomzellen auslösen konnte. Hierzu wurden Zellen mit Ad5Tight-FasL und mit dem Kontrollvektor Ad5TRE-iGFP sowie mit dem Vektor Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert. 24 Stunden später sind die Zellen geerntet, die RNA extrahiert (s. 2.9) und ein Northern-Blot durchgeführt worden (s. 2.13.1). Die Hybridisierung des Blots erfolgte mittels FasL-Sonde. Zur Kontrolle verwendete man eine β -actin-Sonde (Abb. 3-25).

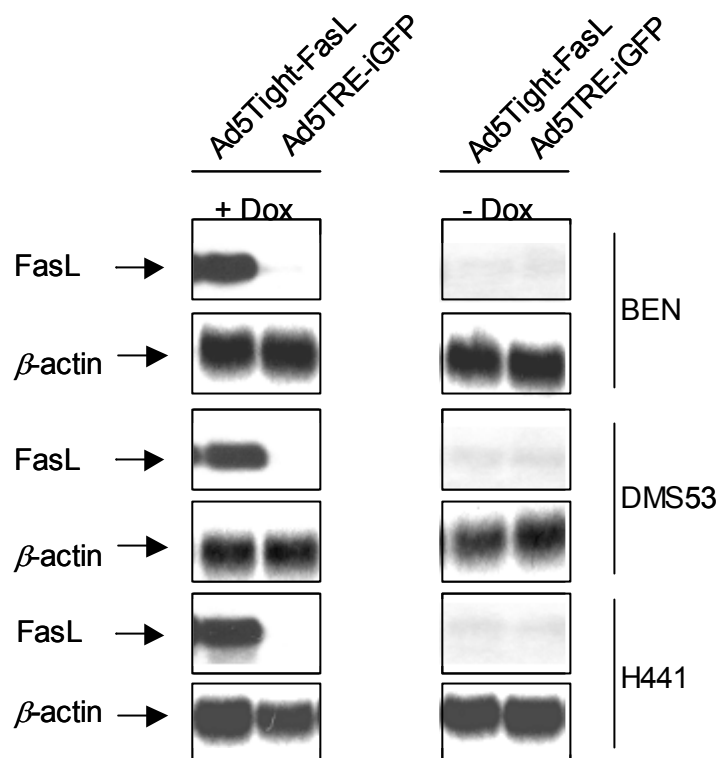


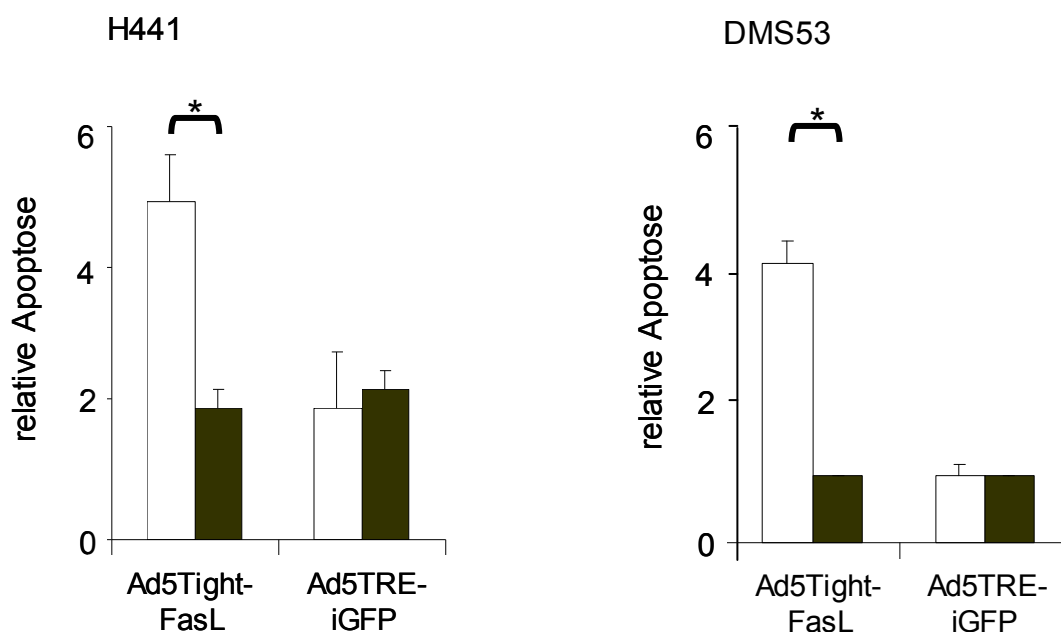
Abb. 3-25. Expression von rekombinanter und endogener FasL-mRNA. H441-, DMS53- und BEN-Zellen wurden mit 4 MOI von Ad5Tight-FasL und Ad5TRE-iGFP sowie jeweils 4 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert. Wo gezeigt wurde Dox zugegeben (1 μ g/ml). Nach 24 h ist RNA extrahiert und rekombinante oder endogene FasL-mRNA mittels Northern-Blot und nachfolgender Hybridisierung detektiert worden. Der Blot mit den Proben ohne Zugabe von

Dox wurde länger exponiert, um die endogene-mRNA-FasL nachweisen zu können. Zur Kontrolle erfolgte die Rehybridisierung mit einer β -actin-Sonde

Die Expression von endogener FasL-mRNA zeigte bei den drei Zelllinien H441, BEN und DMS53 jeweils vergleichbar geringe Werte. Der Blot mit den Proben ohne Verwendung von Dox musste länger exponiert werden, um die mRNA-Expression detektieren zu können als der Blot mit den Proben unter Verwendung von Dox. Nach der Dox-Induktion erfolgte unabhängig von der Zelllinie eine deutlich höhere FasL-mRNA-Expression. Das rekombinante FasL-mRNA-Fragment wies die gleiche Größe wie das endogene FasL-mRNA-Fragment auf (ca. 1.8-1.9 Kb).

3.4.4.3 Funktionsanalyse des rekombinanten FasL-Proteins

Um die Funktionsfähigkeit des rekombinanten FasL zu untersuchen, ist die relative Apoptose sowie die Überlebensrate in den Lungenkarzinomzellen bestimmt worden. H441-, BEN- und DMS53-Zellen wurden mit Ad5Tight-FasL und Ad5TRE-iGFP sowie jeweils mit Ad5TRE-rtTA-M2 kotransduziert. Anschließend folgte die Durchführung des *cell death detection assay* (Abb. 3-26).



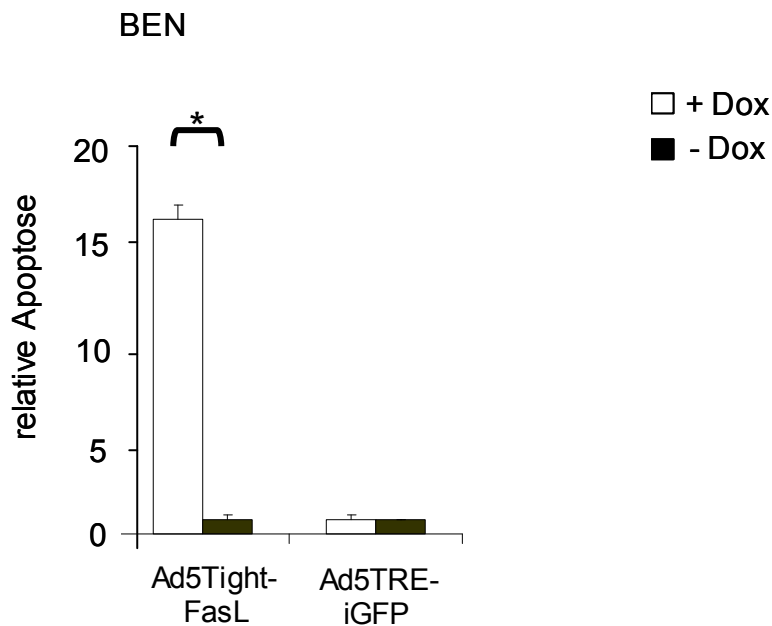


Abb. 3-26. Quantifizierung der apoptotischen Aktivität von Ad5Tight-FasL in Lungenkarzinomzellen. Zunächst sind die Zellen mit einer Zelldichte von 3×10^5 Z/W für H441- und BEN-Zellen sowie 2×10^5 Z/W für DMS53-Zellen ausgesät worden. Am nächsten Tag folgte die Transduktion der H441-Zellen mit 1 MOI, der DMS53-Zellen mit 20 MOI und der BEN-Zellen mit 5 MOI von Ad5Tight-FasL und Ad5TRE-iGFP. Alle Proben wurden mit 6 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert und 24 h mit und ohne Einsatz von Dox inkubiert. Die Ermittlung der Apoptose erfolgte mittels *cell death detection assay*. (*) Statistisch signifikante Unterschiede ($P < 0.01$)

Die Ergebnisse der relativen Apoptose bei transduzierten Zellen mit Ad5Tight-FasL ohne Verwendung von Dox ergaben ein nahezu gleiches Niveau wie bei den transduzierten Zellen mit dem Kontrollvirus Ad5TRE-iGFP. Bei Dox-Induktion konnte sich der rtTA-M2-Transaktivator an die tetO₇-Sequenzen binden und den CMV_{min}-Promotor transaktivieren. Während der Induktion der FasL-Expression stieg der relative Apoptosewert. Die Apoptoseinduktion durch Dox erwies sich bei allen getesteten Zelllinien als statistisch signifikant ($P < 0.01$). Die DMS53-Zellen zeigten die geringsten Apoptoseraten, sowohl in Abwesenheit von Dox als auch in induziertem Zustand. Die höchste Apoptoseinduktion war in BEN-Zellen messbar.

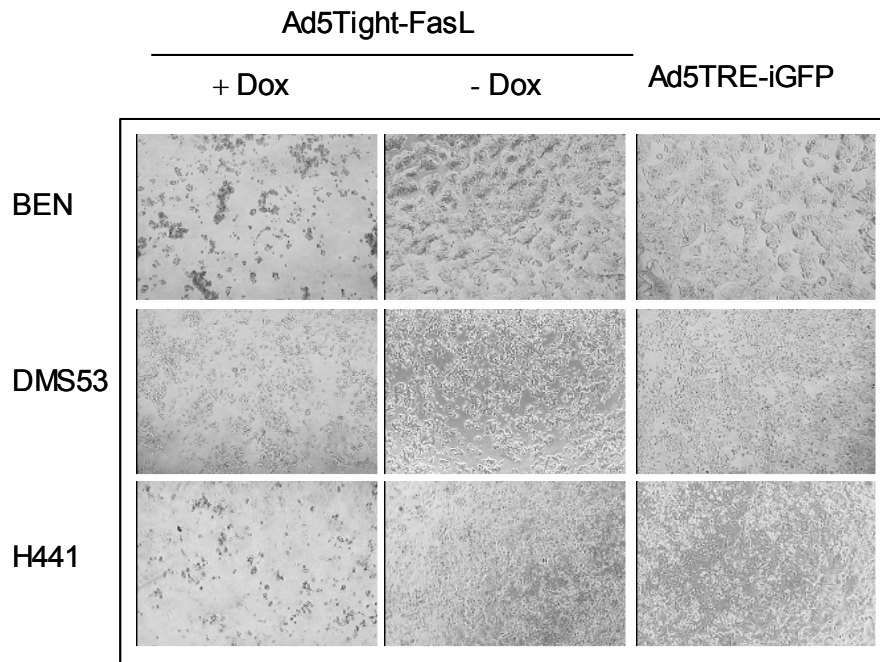
Durch Dox-Zugabe auf die Zellen mit dem Kontrollvirus folgte keine Apoptosewertveränderung. Die unterschiedliche Adenovirusmenge wurde eingesetzt, um möglichst optimale Apoptosewerte von jeder Zelllinie zu erhalten.

3.4.4.4 Dox-abhängige Ad5Tight-FasL-Zytotoxizität in Lungenkarzinomzellen

Die Dox-Zugabe verursachte bei den mit Ad5Tight-FasL und Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduzierten Lungenkarzinomzellen eine Apoptoseinduktion. Als Folge der Apoptose lösten sich die Zellen aus der Zellkulturplatte ab. Nach der Transduktion der Zellen mit Ad5CMV-rtTA-M2 und Ad5Tight-FasL sowie der Dox-Induktion konnte 24 h später die Zytotoxizität beobachtet werden (Abb. 3-27A). Anschließend wurden die lebendige Zellen quantifiziert (Abb. 3-27B).

Alle transduzierten Zellen mit den Vektoren Ad5Tight-FasL und Ad5CMV-rtTA-M2 zeigten unter Zugabe von Dox einen eindeutigen zytopatischen Effekt. Die transduzierten Zellen mit den Vektoren Ad5TRE-iGFP und Ad5CMV-rtTA-M2 hingegen konnten dies nicht nachweisen. Bei den BEN-Zellen war das Ablösen der Zellen am stärksten zu beobachten. Die Überlebensrate war im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor Ad5TRE-iGFP transduzierten Zellen nur 25%, 40% und 38% jeweils für BEN-, DMS53- und H441-Zellen. Bei den mit Ad5Tight-FasL und Ad5CMV-rtTA-M2 transduzierten Zellen ohne Dox war kein Absterben der Zellen zu bemerken, dies zeigte sich vergleichbar in den Kontrollzellen. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Messungen der relativen Apoptose (Abb. 3-26).

A)



B)

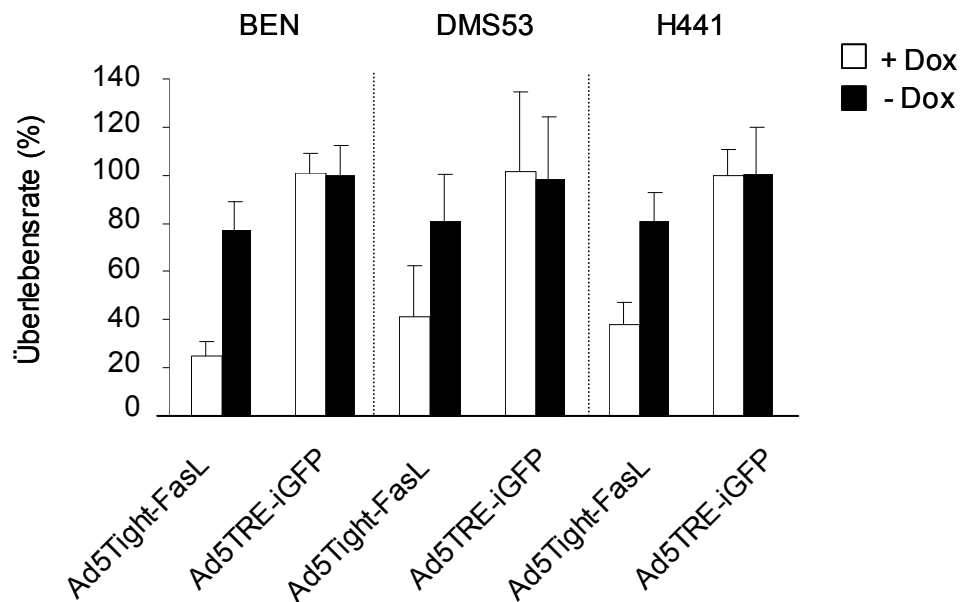


Abb. 3-27. Visualisierung und Quantifizierung der Zellzytotoxizität. Die Zellen wurden jeweils mit 6 MOI Ad5CMV-rtTA-M2 und mit Ad5Tight-FasL oder Ad5TRE-iGFP (25 MOI) kotransduziert. Nach 24 h Inkubation mit und ohne Dox folgte A) die Visualisierung der Zellen unter dem Mikroskop und B) die Bestimmung der Überlebensrate