

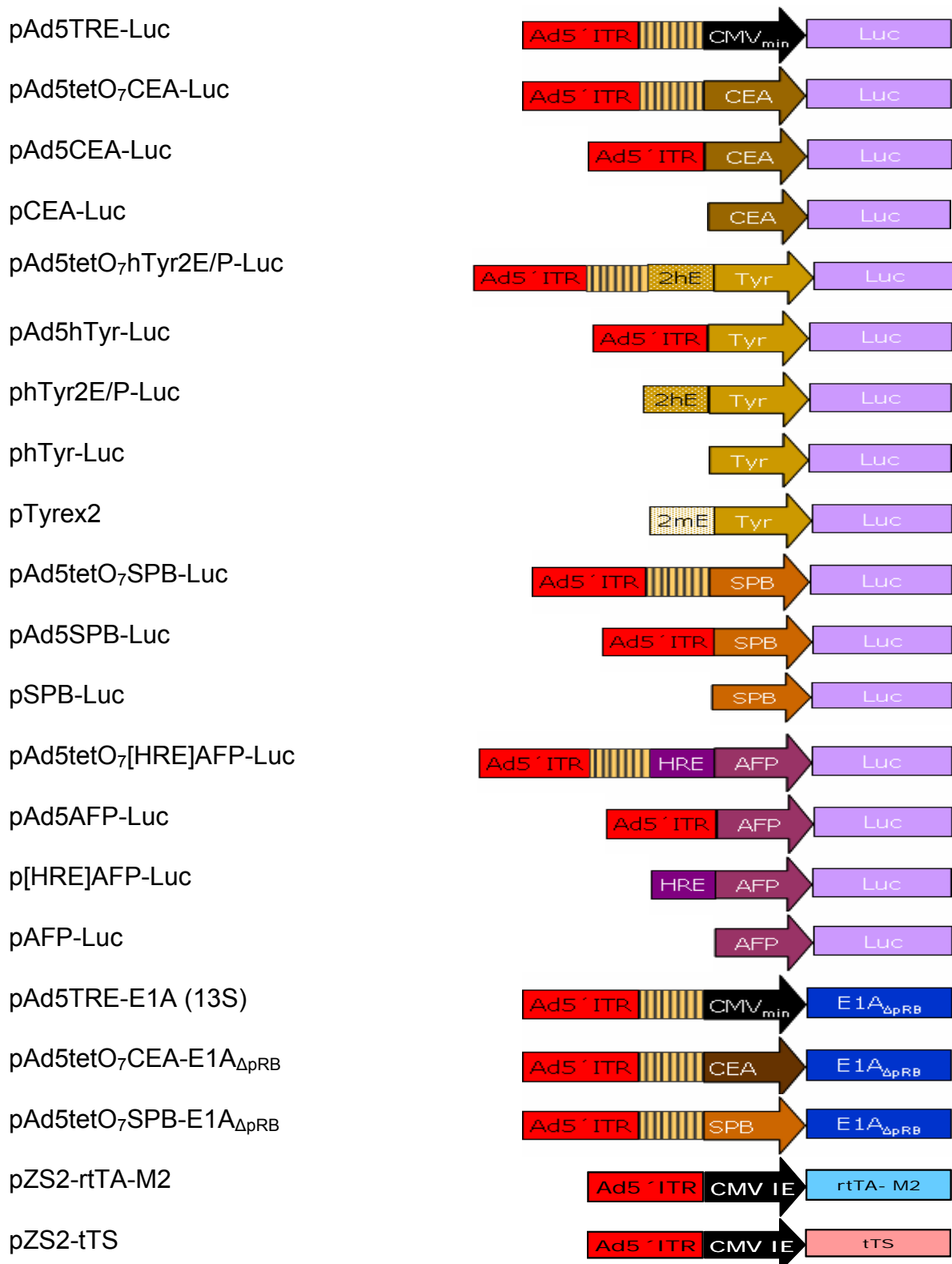
8 Anhang

8.1 Tabelle der verwendete Primer

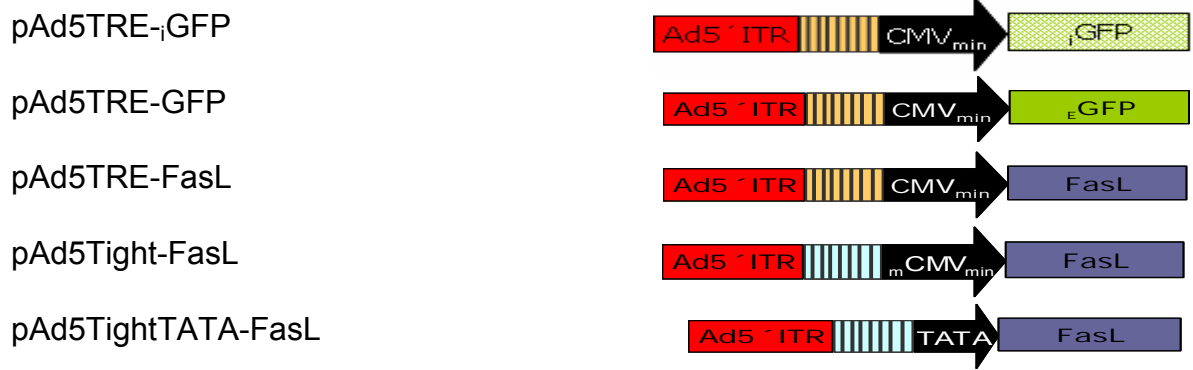
Primername	Primersequenz
Ad5-3315s	TAGCATGACCATGAAGATCT
Ad5-4600a	GAATGCATGGAAAATCTTGG
AFP-1125-BamHla	ATCGTTCGAGGATCCGCGATCCGGTGTTATTGGCAGTGG
AFP-16906s	TACATCCAGGAGAGCCAAGC
AFP-19449a	CTGAGCTTGGCACAGATCCT
AFP-4-Xhols	GATTCTCTCGAGATGGCCGCTTTGGTCGAGGCCGA
BA-1371s	AAGGATTCTATGTGGTCCG
BA-2307a	CTCCTTAATGTCACGCAGGA
CD95a	TCTGTTCTGCTGTGTCTTGGAC
CD95La	TTGTGGCTCAGGGGCAGGTGGTTG
CD95Ls	GGATTGGGCCTGGGGATGTTTCA
CD95s	CAGAACTTGGAAGGCCTGCATC
CEA-1342-Sacla	ATCAGAGCTCGCATGCCCTGGAGAGCATGGGGAGA
CEA-2779s	CCACGCCGTTCAATGTGTGCGCAGA
CEA-8260a	CACATTTGTAGCTTGCTGTGTCAT
CEA-847s	AGGTCTATATAAGCAGAGCT
CEAP-206a	TATTCAGGTGTCCTCTGT
CEAP-189s	ACAGAGGACACCTGAATA
E1-1-Xhols	GAGCTCGAGCATCATCAATAATATACC
E1-342-Xhola	ACA <u>CTCGAGT</u> ATTACGCGCTATAGGTAACA
E1A-119a-F	F-GGTTCAAAATGGCTAGGAG
E1A-1s	ATGAGACATATTATCTGCCA
E1A-342-Sacla	TCGAGCTCGCTATTACGCGCTATGAGTA
GAPDH-682s-T	T-CAAGCCTGTGGGCAAGGT
GAPDH-826a°	CACCACCTTCTTGATGTCATCA
HREAFP-914a	GGGCTAGCACGCGTAAGAGCT
Fortsetzung :	

Primername	Primersequenz
Luc-334s	CCGGCGCCATTCTATCC
Luc-426°-F	F-AGCAATTGTTCCAGGAACCA
Luc-Seq-Xhola	CGCACTCGAGTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
pD-M2-4590-AatIIs	CCTGACGCTCTAAGAAACCATTATTA
pD-M2-4824-Sacla	CGGAGCTCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAG
SPB-10173a	GCAATAGCTCTCAAGCAGCA
SPB-500-BamHIa	ATCGGATCCTGGCACCTCTGCAGCCTGGGT
SPB-500-NotIIs	ATCGCGGCCGCAGAAGATTTTTCCAGGGGAA
SPB-500-SacIs	ATCGAGCTCAGAAGATTTTTCCAGGGGAA
SPB-7719s	GTCCAGCCCTCTCCAGTGTA
TRE2-3596s	GGTTATTGTCTCATGAGCGCATACA
Tyr-1158a	GGAAGATAGGATCGTTGGCA
Tyr-664s	TCCAGAAGCTGACAGGAGATG
Tyr-529a	GTGCCAGAACATTTCTCTATCGA
Tyr-23-KpnIs	AGATGGATCCAAGCTTACTTAGATCGCAGATCT
vLS-E1A-120a	TGGTTCAAATGGCTAGGAGATCAGCCAGTACCTCTTC AA

8.2 Liste der verwendete Plasmide und Darstellung der darin enthaltenen Kassetten



Fortsetzung:



8.3 Plasmidkarte zur Konstruktion der Adenovektoren

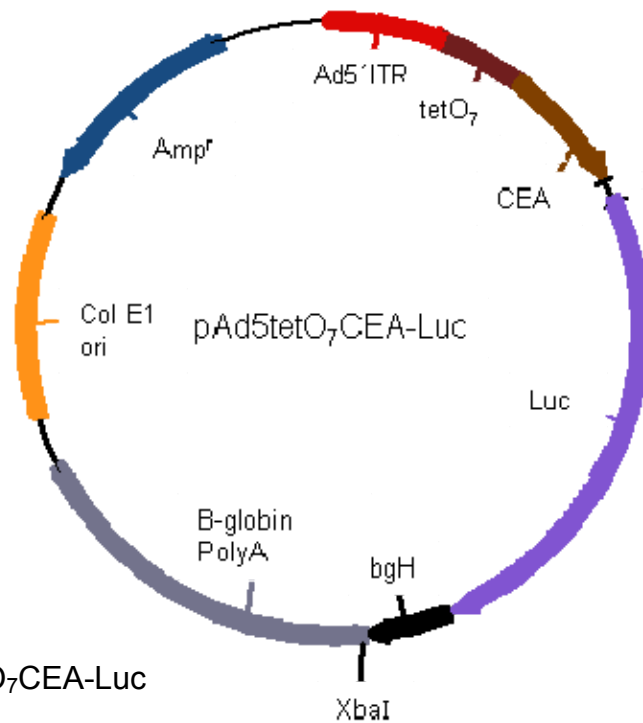


Abb. A: pAd5tetO7CEA-Luc

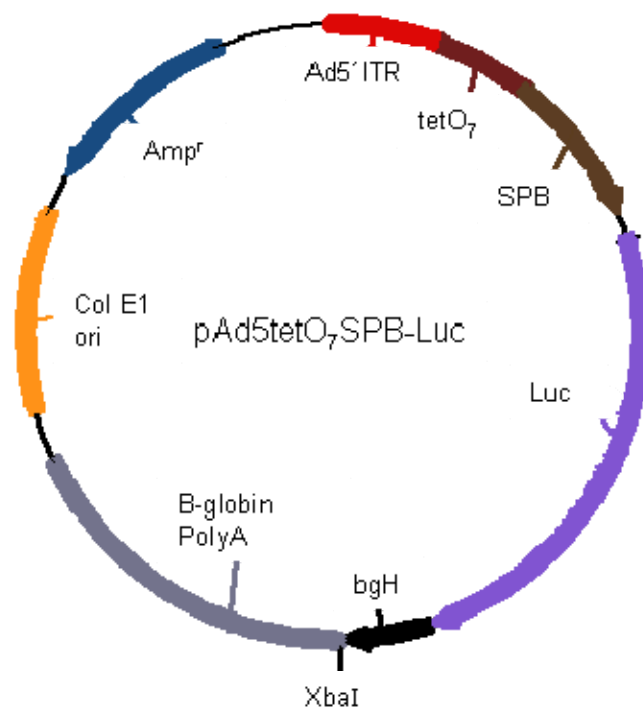


Abb. B: pAd5tetO7SPB-Luc

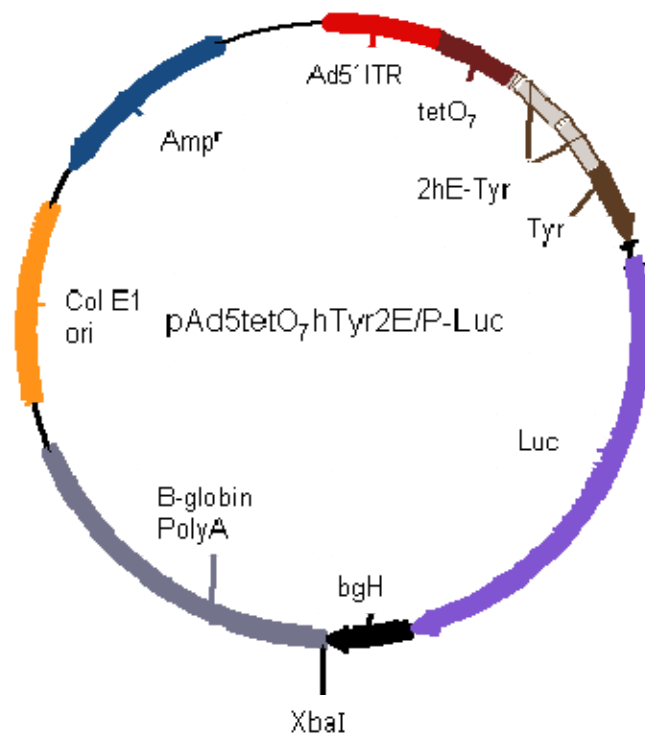


Abb. C: pAd5tetO7hTyr2E/P-Luc

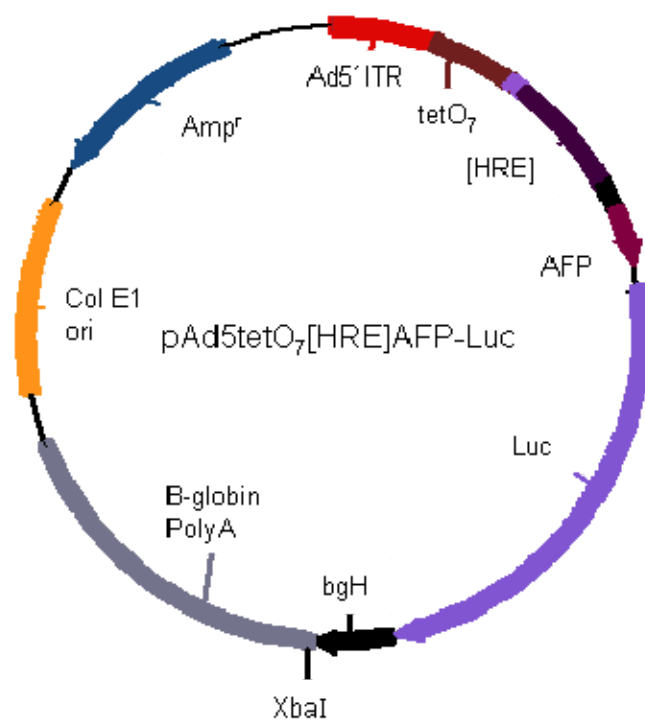


Abb. D: pAd5tetO7[HRE]AFP-Luc

8.4 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A. bidest.	Aqua bidestilata
a.U.	arbitrari Units
AAV	Adeno-assoziierte Virus
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AdV	Adenovektor
AFP	<i>alpha fetoprotein</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy (komplementäre) DNA
CEA	carcynoembryonic Antigen
CMV	Promotor des Cytomegalievirus
C-terminal	Carboxy-Terminal
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonukleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h.	Stunde
[HRE]	Hypoxi response element
i.d.R.	in der Regeln
ITRs	<i>inverted terminal repeats</i>
Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton

Kn	Kanamycin
M	Molar
mg	Milligram
µg	Mikrogramm
min	Minuten
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>Messenger (Boten)-RNA</i>
n.d.	Keine Daten
ng	Nanogramm
NK	Negative Kontrolle
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-Terminal
oAdV	Onkolytischer Adenovirus
p.f.u.	<i>Plaque forming units</i>
P/S	Penicillin/ Streptomycin
P/Z	Partikel pro Zelle
PBS	<i>phosphat buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RCA	Replikationskompetenter Adenovirus
rdAdV	Replikationsdefizientes Adenovirus
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRCA	bedingt replikationskompetenter Adenovirus
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
rtTA-M2	reverse tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde

sog.	sogenannte
SPB	<i>surfactant protein-B</i>
Stk	Stock
Tab.	Tabelle
TAMRA	N, N, N, N-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
Tet	Tetrazyklin
TetO	Tet-Operator-DNA-Sequenz
TP	Terminal-Protein
TRE	<i>Tet responsive element promotor</i>
tTS	Tetrazyklin-kontrollierte transkriptionale Silencer
ttsP	tumorzell- und gewebespezifische Promotoren
ttsP-AdV	Luciferase-exprimerender Adenovektor mit ttsP
ttsP-RRCA	bedingt replikationskompetenter Adenovektor mit ttsP
Tyr	Tyrosinase
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umstände
v.a.	vor allem
vs	versus
z.B.	zum Beispiel
Z/W	Zellen pro Well

8.5 Verwendete Geräte

Elektrophoresekammern: Agargel Maxi, 20x20 cm (Biometra)

GNA100 (Pharmacia Biotech)

Hoefer HE33 (Pharmacia Biotech)

Fluoreszenzmikroskop HBO 50 (Zeiss)

Genetic *Analyzer* ABI 310 (Applied Biosystems)

Hybridisierungsöfen Compact Line OV4 (Biometra)

Immunfluoreszenzmikroskop Olympus CK40 (Zeiss)

Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold München)

Phosphoimager BAS-1500 (Fuji Photo Film Co. Ltd.); Software BAS Reader 2.21

Schüttler: Certomat H (Braun)

Spannungsquelle für Elektrophorese: Power Pack PP3000 (Biometra)

Thermomixer 5436v(Eppendorf)

Thermozykler: Gene Amp Thermocycler 9700 (PE Applied Biosystems)

Tischzentrifuge 5415R (Eppendorf)

Transilluminator TM-15 (UVP)

Trio Thermoblock V2.23 (Biometra)

Ultrazentrifuge Optima TLX (Beckman)

UV-Spektrometer Genesys 6 (Thermo-Spectronic)

UV-Stratalinker 1800 (Stratagene)

Zentrifuge 5810R (Eppendorf), Varifuge RF (Heraeus)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Volker A. Erdmann und Herrn Prof. Dr. Poller danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft, besonders Herrn Prof. Dr. Poller für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas innerhalb seiner Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Benjamin Franklin des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Henry Fechner für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die fachliche Betreuung meiner Arbeit sowie Frau Xiaomin Wang für die enge Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinem Mann, für die mir gegenüber erwiesene Geduld, zahlreiche am Computer verbrachte Abende und die beständige Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Liste der eingereichten Veröffentlichungen

- F.T. Landgraf, C. Forreiter, **A. Hurtado Picó**, T. Lamparter and J. Hughes: „Recombinant holophytochrom in *Escherichia Coli*“. FEBS Lett. 2001; Nov 23; 508(3): 459-62
- T. Wartmann, E. Böer, **A. Hurtado Picó**, H. Sieber, O. Bartelsen, G. Gellissen and G. Kunze: „High-level production and secretion of recombinant proteins by the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*“. FEMS Yeast Research 2002; 2 (3): 363-369
- Y. Terentiev, **A. Hurtado Picó**, E. Böer , T. Wartmann, J. Klabunde , U. Breuer, W. Babel , M. Suckow, G. Gellissen, G. Kunze: „A wide-range integrative yeast expression vector system based on *Arxula adenivorans*-derived elements“. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2004; 31: 223-28
- A. Hurtado Picó**, X. Wang, I. Sipo, U. Siemetzki, J. Eberle, W. Poller, H. Fechner: „Viral and non viral factors causing nonspecific replication of tumor- and tissue-specific promotor dependent oncolytic adenoviruses“. Molecular Therapy 2005;11 (4): 563-77
- I. Sipo[#], **A. Hurtado Picó**[#], X. Wang, J. Eberle, I. Petersen, S. Weger, W. Poller, H. Fechner, „An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy“. Journal of Molecular Medicine 2006; 84(3): 215-225
- [#] **Gleichberechtigte Autoren**
- I. Sipo, X. Wang, **A. Hurtado Picó**, L. Suckau, S. Weger, W. Poller, H. Fechner: „Tamoxifen-regulated adenoviral E1A chimeras for the control of tumor selective oncolytic adenovirus replication in vitro and in vivo“. Gene Therapy 2006; 13 (2): 173-86
- H. Fechner, X. Wang, **A. Hurtado Pico**, J. Wildner, L. Suckau, S. Pinkert, I. Sipo, S. Weger, W. Poller: „A bidirectional Tet-dependent promotor construct regulating the expression of E1A for tight control of oncolytic adenovirus replication“. J. Biotechnology 2007; 127 (4): 560-74