

	CMV- Luc	TRE-Luc +M2; -Dox	TRE-Luc +M2; +Dox
EA.hy926	11,11	1,14	36,41
Kyse140	5,22	0,11	5,52
HT-29	0,24	0,08	34,75
OE-33	61,92	0,24	55,9

Tabelle 4.7: Vergleich zwischen CMV- und TRE-vermittelter Transgenexpression; in RLU/Zelle

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMVrtTA-M2 (M2): 5×10^3 p/c; Ad5CMV-Luc/TRE-Luc (Luc): 500 p/c; Dox 300 ng/ml

Diese Resultate belegen, dass das Tet-On-System hinsichtlich der Transgenexpression im induzierten Zustand mindestens ebenso effizient ist, wie jene Transgenexpression, die durch den CMV-Promotor vermittelt wird.

4.6.2. Das AdV-rtTA-RRCA-System

4.6.2.1. Fehlende Regulierbarkeit der Ad5-pTRE-13S-bgh-Transgenexpression

Die Entwicklung des AdV-rtTA-RRCA-Systems beabsichtigte, eine Kontrollierbarkeit der adenoviralen E1A-13S-Expression durch Dox zu erreichen und dadurch eine effiziente und dabei sichere Viroonkolyse zu ermöglichen. Zusätzlich kann durch die Koapplikation eines replikationsdefizienten AdV eine wie in Punkt 4.5.2. gezeigte deutliche Steigerung der Transgenexpression induziert werden, wobei gleichzeitig eine Regulierbarkeit des gesamten Systems durch Dox aufrecht erhalten werden sollte.

Um die Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh mittels Dox zu überprüfen, wurde dieser in unterschiedlichen Dosierungen in die den rtTA stabil exprimierende Zelllinie HeLa-Tet-On transfiziert. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem AdV Ad5CMV-Luc kotransduziert und zum einen mit Dox- und zum anderen ohne Dox-Applikation 24 h inkubiert. Der rtTA sollte hierbei bei Dox-Applikation die Expression von E1A-13S induzieren, während durch das Fortlassen von Dox keine Aktivierung des Expressionsmechanismus erfolgen sollte. Anhand der dadurch vorhandenen bzw. ausbleibenden Transkomplementierung des koapplizierten AdV (DNA-Replikation \uparrow , CMV-Promotor \uparrow) konnte somit indirekt die Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh ermittelt werden.

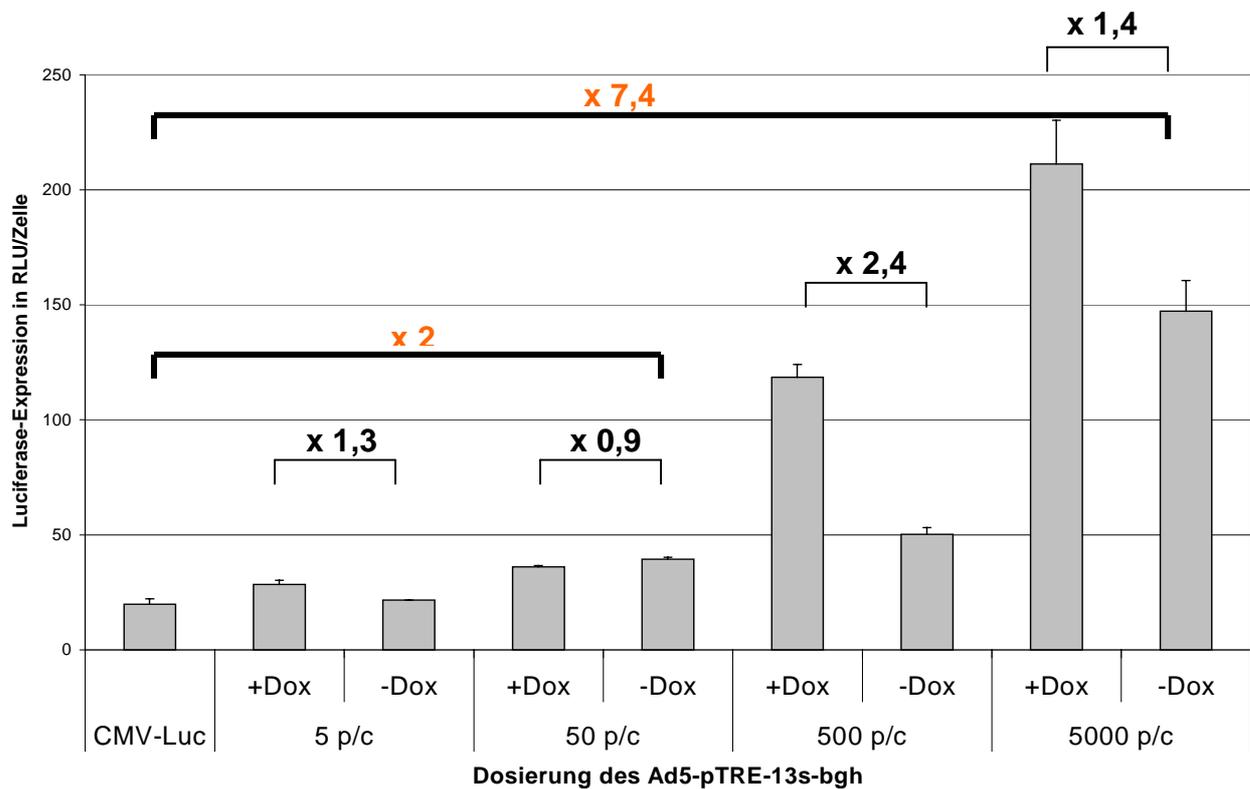


Abbildung 4.18.: Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh in HeLa-Tet-On

Eingesetzte Vektoren: Ad5-pTRE-13S-bgh: 5; 50; 500; 5×10^3 p/c; Ad5CMV-Luc: 500 p/c; Dox 100 ng/ml

Abbildung 4.18. zeigt jedoch, dass eine Regulation des Ad5-pTRE-13S-bgh durch die Administration von Dox nur geringgradig möglich ist. Bereits bei einer Konzentration des Ad5-pTRE-13S-bgh von 50 p/c erhöht sich die Transgenexpression ohne Zugabe von Dox um das Doppelte und steigert sich bei einer Konzentration von 5×10^3 p/c um das bis zu 7,4-fache. Durch Applikation von Dox kann die Transgenexpression zusätzlich signifikant gesteigert werden, wobei allerdings gleichzeitig bei einer höheren 13S-Konzentration die Differenz der Transgenexpression zwischen den mit und den ohne Dox inkubierten Zellen abnahm.

Ein vergleichbares Experiment wurde an weiteren Zelllinien durchgeführt, wobei der Transaktivator durch die Kotransduktion des Ad5CMVrtTA-M2 substituiert wurde. Untersucht werden sollte, ob ein Unterschied in der Regulierbarkeit des AdV-rtTA-RRCA-Systems besteht, wenn der Transaktivator AdV-vermittelt exprimiert wird, anstatt stabil in das Genom der Zellen integriert zu sein. Zudem besitzt der in HeLa Zellen exprimierte rtTA nicht die fortschrittlichen Modifikationen des rtTA-M2. Um

eine reelle Steigerung der Transgenexpression zu erzielen, wurde der Ad5-pTRE-13S-bgh in einer Dosierung von 1×10^4 p/c mit dem Ad5CMV-Luc koinfiziert. Hierbei wurde deutlich, dass die Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh in Konzentrationen, in denen eine effektive Expressionssteigerung zu erwarten ist, nahezu aufgehoben wird (Tab. 4.8.).

	EA.hy926	Kyse140	HT-29	OE-33	HepG2
- Dox	302,93	77,6	97,3	291,2	62,02
+ Dox	177,49	82,43	78,65	204,25	68,79

Tabelle 4.8.: fehlende Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh in verschiedenen Zelllinien

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc: 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5pTRE-13S-bgh: 1×10^4 p/c; Dox 300 ng/ml

Um zu untersuchen, ob die fehlende Regulierbarkeit abhängig von der E1A-13S-Dosierung ist, wurden EA.hy926 Zellen mit dem Ad5CMV-Luc, Ad5CMVrtTA-M2 und unterschiedlichen Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh koinfiziert.

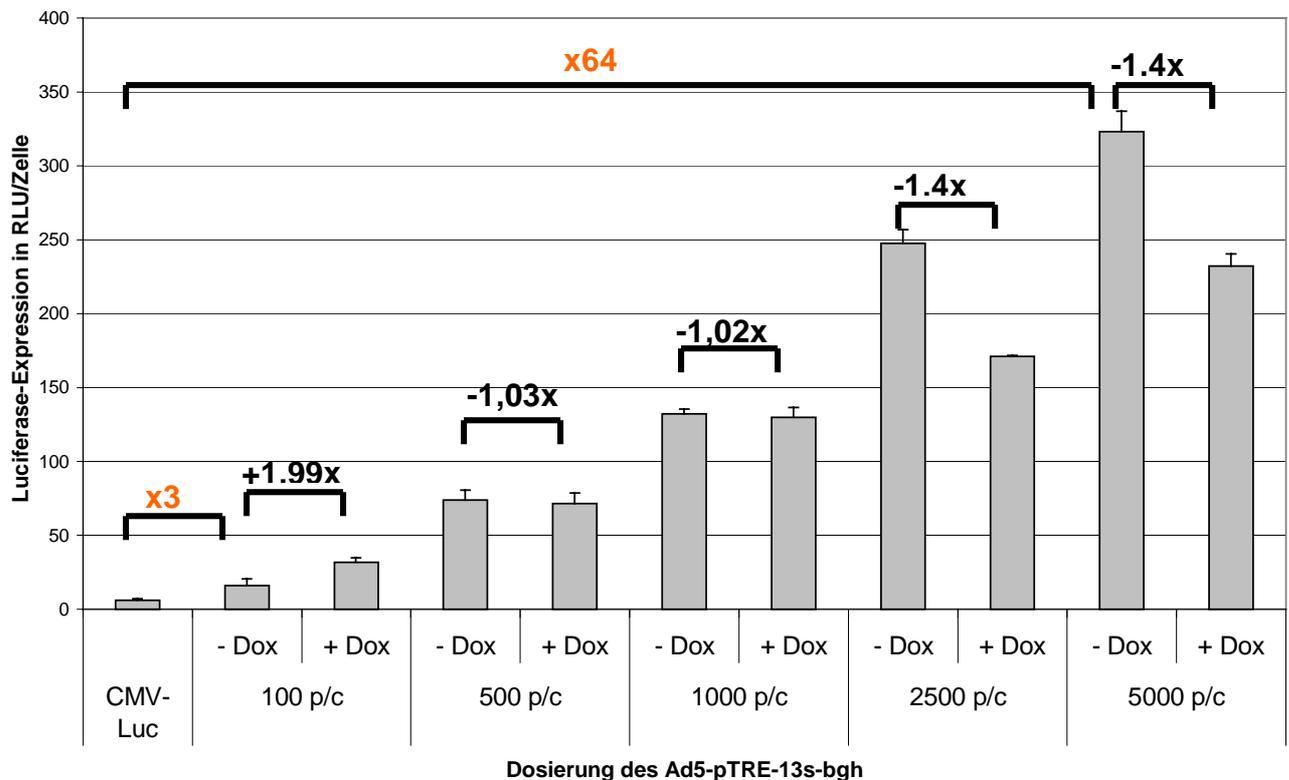


Abbildung 4.19.: fehlende Regulierbarkeit des AdV-rtTA-RRCA-Systems; EA.hy926

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc: 500 p/c; Ad5CMV-rtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 100, 500, 1×10^3 , $2,5 \times 10^3$ und 5×10^3 p/c; Dox 100 ng/ml

Aus Abbildung 4.19. wird deutlich, dass durch steigende Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh die Regulation des Systems durch Applikation oder Fortlassen von Dox stark beeinflusst wird. Bereits bei einer Dosierung von lediglich 100 p/c Ad5-pTRE-13S-bgh verdreifacht sich in Abwesenheit von Dox die Transgenexpression des koapplizierten AdV im Vergleich zur Basalexpression und vermehrt sich um das bis zu 64-fache bei einer Dosierung des Ad5pTRE-13S-bgh von 5×10^3 p/c.

Zugleich zeigte sich in diesem Versuch mit steigender Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh eine Umkehr der zu erwartenden Expressionswerte während der Applikation bzw. dem Fortlassen von Dox. Der erwartete Effekt durch Applikation von Dox (Systeminduktion) trat lediglich bei einer Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh von 100 p/c in Erscheinung und relativierte sich bei den Dosierungen von 500 und 1×10^3 p/c des 13S-Vektors auf annähernd gleiche Werte in An- und Abwesenheit von Dox. Bei weiterer Erhöhung der E1A-13S-Konzentration kehrte sich die Wirkung von Dox letztendlich um, und es wurde in den Zellen, deren Medium nicht mit Dox versetzt wurde, eine höhere Luciferase-Aktivität gemessen als in Zellen, die mit Dox inkubiert wurden. Gleiches Phänomen zeigte sich bereits in dem vorangegangenen Versuch zur fehlenden Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh (Tab. 4.8.), in welchem eine Konzentration von 1×10^4 p/c des 13S-Vektors zur Anwendung kam, und die Abwesenheit von Dox in den Zelllinien EA.hy926, Kyse140 und OE-33 ebenfalls eine höhere Aktivität der Luciferase induzierte als die Applikation von Dox.

Um die Regulierbarkeit der mRNA-Expression des Ad5-pTRE-13S-bgh zu untersuchen, wurden EA.hy926 Zellen mit den AdV Ad5CMVrtTA-M2 und Ad5-pTRE-13S-bgh kotransduziert und mit 300 ng/ml Dox für 24 h bzw. 48 h inkubiert.

Wie der Nachweis der E1A-13S-mRNA in Abbildung 4.20. und die Auswertung mittels der BasReader Software (Abb. 4.21.) zeigt, konnte nach 24 h im AdV-rtTA-RRCA-System eine Induktion der E1A-13S-mRNA-Expression durch Dox um das 1,58-fache im Vergleich zur Monoinfektion erzielt werden. Allerdings stieg die Expression bereits durch die Transfektion des rtTA-M2 in Abwesenheit von Dox um das 1,12-fache an. Nach 48 h zeigte sich kein Unterschied in der 13S-mRNA-Expression zwischen den monoinfizierten Zellen und denjenigen Zellen, die mit dem rtTA-M2 und Ad5-pTRE-13S-bgh kotransduziert und mit Dox inkubiert wurden. Das Fortlassen von Dox bewirkte hier lediglich eine Reduzierung der Expression auf 85%.

Zugleich konnte nach 48 h deutlich die aus alternativen Splicevorgängen resultierende 12S-mRNA nachgewiesen werden. Die etwas schwächere Expression der E1A-13S-mRNA, die nach 48 h im nicht-induzierten Zustand nachgewiesen werden konnte (85%), trat bei der 12S-mRNA nicht in Erscheinung.

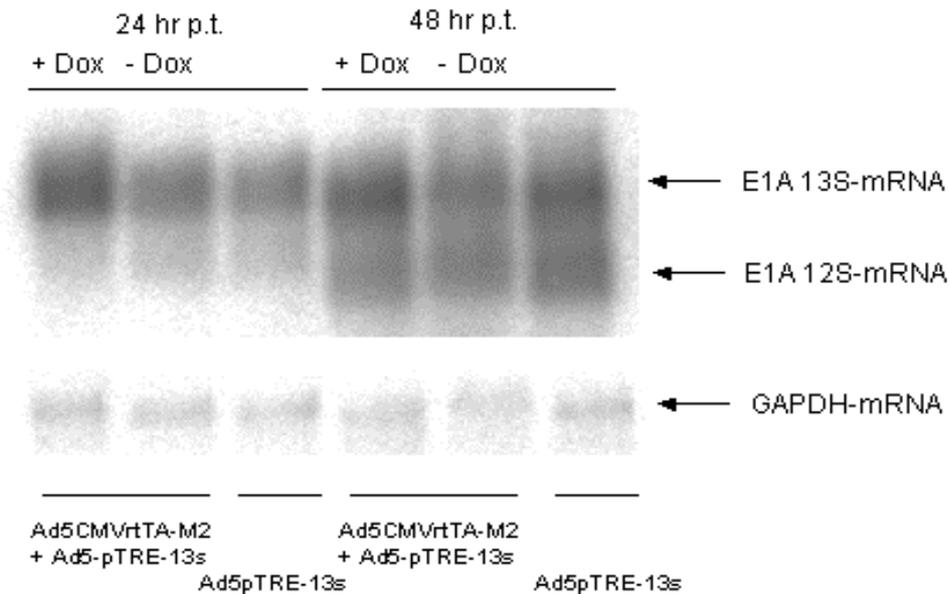


Abbildung 4.20.: Nachweis der fehlenden Regulierbarkeit der E1A-13S-mRNA-Expression des Ad5-pTRE-13S-bgh im Northern-Blot

Eingesetzte Vektoren: Ad5-pTRE-13S-bgh $2,5 \times 10^3$: p/c; Ad5CMVrtTA-M2 (M2) $2,5 \times 10^3$: p/c; Dox 300 ng/ml; p. t.: post transfectionem

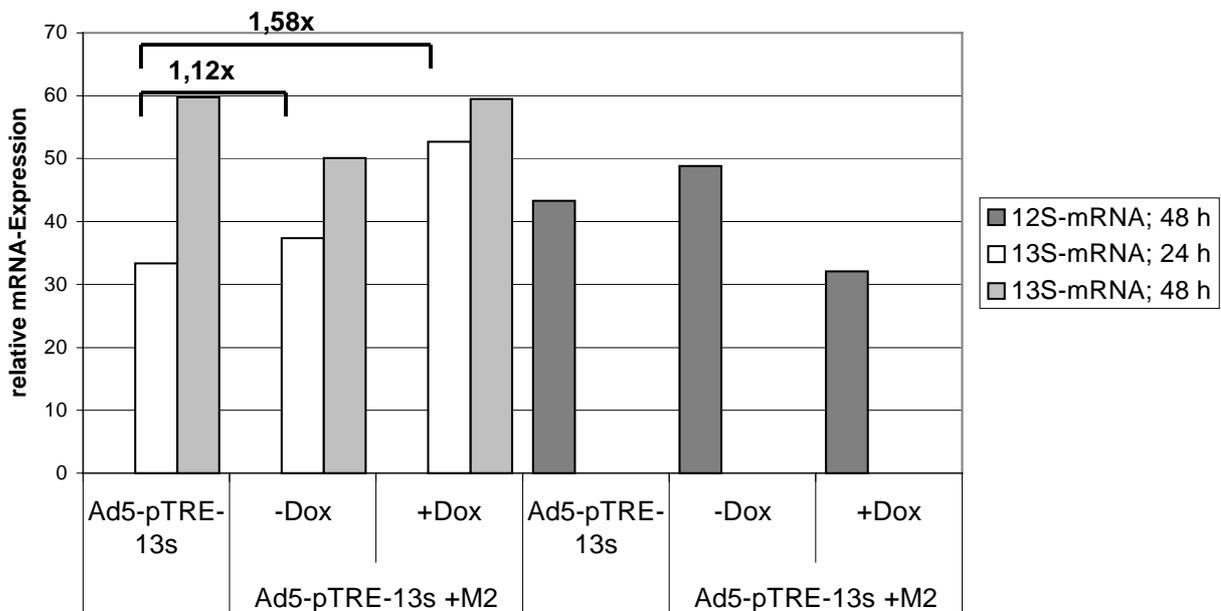


Abbildung 4.21.: Semiquantitative Analyse der 12S- und 13S-mRNA-Expression des Ad5-pTRE-13S-bgh; Werte aus Abb. 4.20.

Das Ergebnis stand somit in deutlichem Kontrast zu den Ergebnissen zur Dox-abhängigen Induktion der Transgenexpression im AdV-rtTA-System (siehe 4.6.1.) und ließ eine „Autoinduktion“ des AdV-rtTA-RRCA-Systems durch E1A-13S vermuten.

4.6.2.2. Untersuchungen zur E1A-13S-Autoaktivierung des Systems

In einem Experiment zur Autoinduktion durch E1A-13S wurden EA.hy926 Zellen mit dem RCA, Ad5-pTRE-13S-bgh oder Ad5CMV-TTP als Kontrolle transduziert und 48 h später zum einen mit dem AdV Ad5CMV-Luc zum anderen mit Ad5TRE-Luc transfiziert. Die Aktivität der Luciferase wurde bereits 6,5 h darauf bestimmt, wodurch eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die virale Replikation vermieden werden konnte.

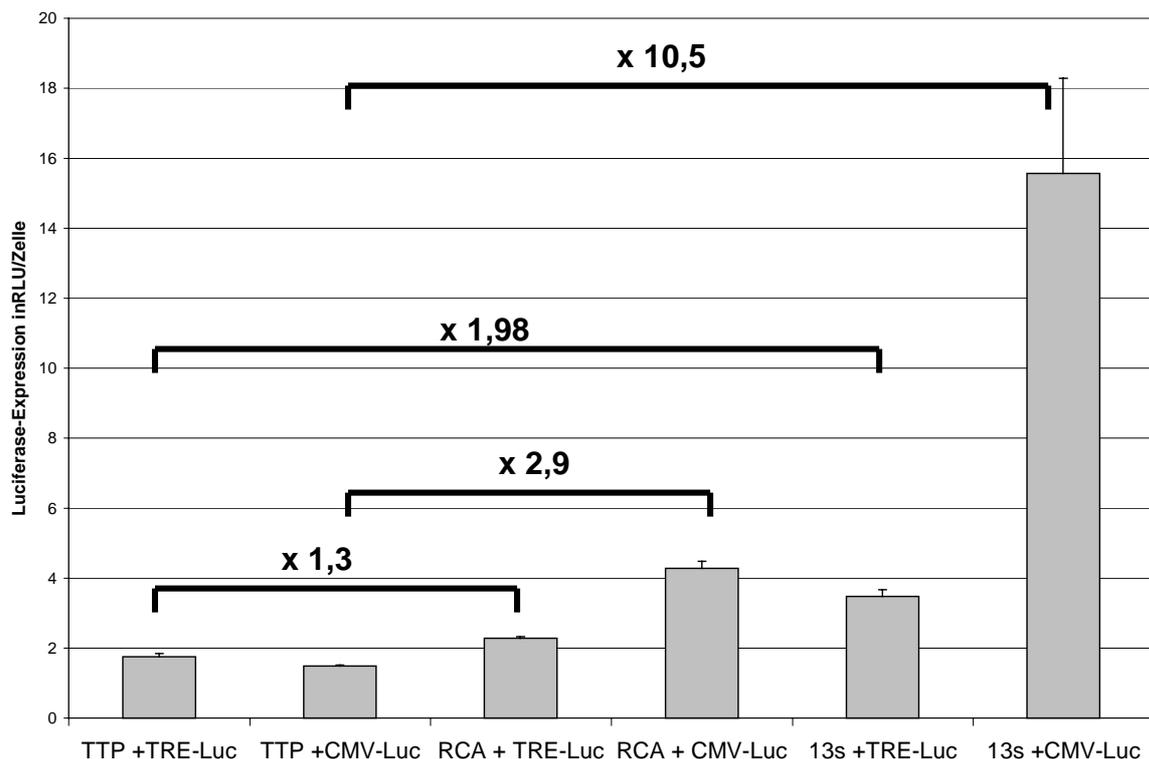


Abbildung 4.22.: Autoaktivierung des CMV- und des CMV_{min}-Promotors durch einen RCA/E1A-13S; EA.hy926

Eingesetzte Vektoren: RCA: 250 p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMV-Luc: 500 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 1×10^4 p/c; Ad5CMV-TTP (TTP): 1×10^4 p/c (als Dosisausgleich)

Aus Abbildung 4.22. wird ersichtlich, dass durch die Koinfektion mit dem RCA die CMV-Promotor-kontrollierte Luciferase-Expression um das 2,9-fache, die CMV_{min}-Promotor-kontrollierte um das 1,3-fache ansteigt. Verglichen mit der jeweiligen Basalexpression induziert der Ad5-pTRE-13S-bgh eine Aktivitätssteigerung des CMV-Promotors um das 10,5-fache, die Steigerung des CMV_{min}-Promotors beträgt das 1,98-fache.

Somit zeigt das Ergebnis die Induktion sowohl des CMV- als auch des CMV_{min}-Promotors durch den RCA und durch den Ad5-pTRE-13S-bgh, so dass eine Involvierung von E1A-13S in die Transaktivierung beider Promotoren anzunehmen ist.

4.6.2.3. Bedeutung der adenoviralen CR3-Domäne hinsichtlich der Aktivierung heterologer Promotoren

Wie bereits in der Literaturübersicht unter 2.2.2. beschrieben, resultiert das E1A-12S-Protein aus Splice-Vorgängen der E1A-13S-mRNA. Es weist somit die gleiche Sequenz der Aminosäuren auf, die jedoch verglichen mit E1A-13S um 46 Segmente verkürzt ist. Dem E1A-12S-Protein fehlt somit im Gegensatz zum E1A-13S die CR3-Domäne, wodurch die Bindung und Aktivierung bestimmter zellulärer Transkriptionsfaktoren (z. B. TATA-Box-Binding-Protein, TBP) aufgehoben wird (Shenk T., 1996).

In folgendem Experiment wird die Bedeutsamkeit der CR3-Domäne für das hier eingesetzte Tet-On-System demonstriert, indem das Plasmid der TRE-Luc zum einen mit dem die E1A-12S-Region exprimierenden Plasmid pTRE-12S und zum anderen mit dem die E1A-13S-Region kodierenden Plasmid pTRE-13S kotransfiziert wurde.

Die Plasmid-Transfektion der EA.hy926 Zellen wurde mit jeweils 1 µg/well pTRE-12S, pTRE-13S und pTRE-Luc durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h darauf gemessen.

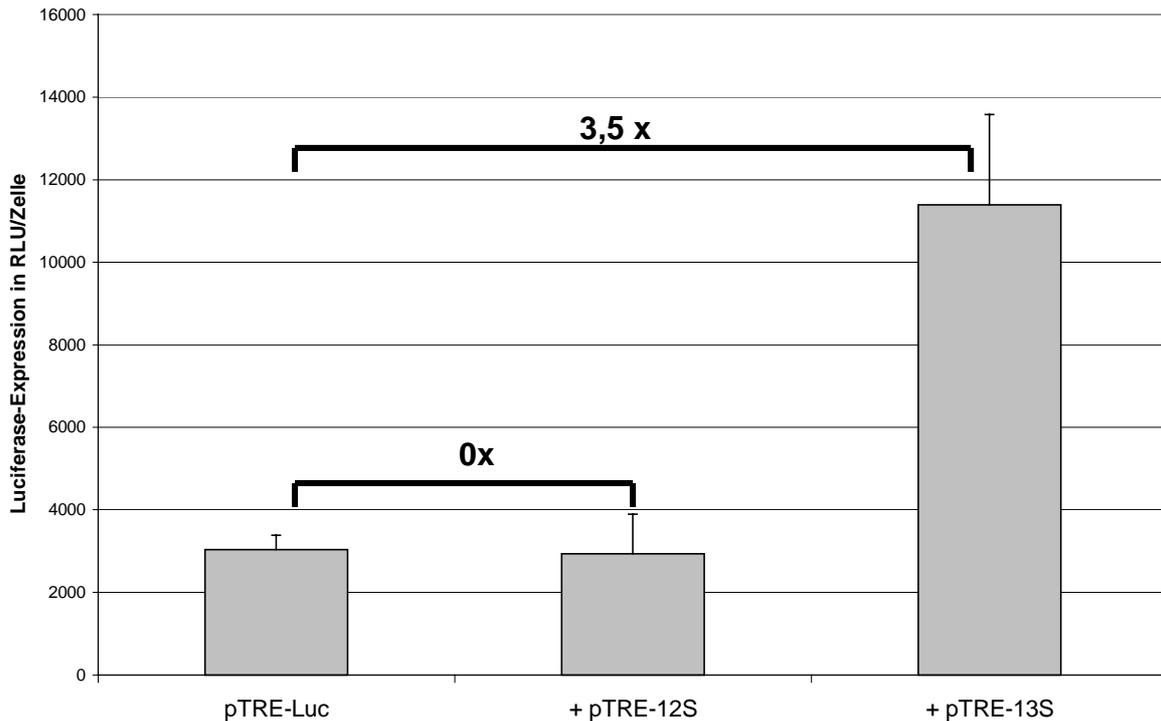


Abbildung 4.23.: Bedeutung der CR3-Domäne hinsichtlich der Aktivierung heterologer Promotoren

Eingesetzte Plasmide: pTRE-Luc, pTRE-12S, pTRE-13S je 1 µg/well

Abbildung 4.23. demonstriert die Expressionssteigerung der Luciferase durch pTRE-13S um das 3,5-fache, während die Kotransfektion mit pTRE-12S keine Erhöhung der Luciferase-Aktivität induzierte. Dieses Ergebnis belegt hiermit, dass die adenovirale E1A-13S-CR3-Domäne den CMV_{min}-Promotor aktiviert und somit die Autoaktivierung des AdV-rtTA-RRCA-Systems verursacht.

4.6.3. Das AdV-rtTA-tTS-RRCA-System

4.6.3.1. Suppression der Basalexpression im AdV-rtTA-System

Um die Basalexpression im AdV-rtTA-RRCA-System zu unterdrücken, wurde der AdV Ad5CMV-tTS zusätzlich in das System involviert und seine Funktionalität zunächst im AdV-rtTA-System überprüft. EA.hy926 Zellen wurden hierfür entweder mit Ad5CMV-TTP als Kontrolle oder mit Ad5CMV-tTS transduziert und 22 h darauf mit den AdV Ad5TRE-Luc und Ad5CMV-rtTA-M2 kotransduziert.

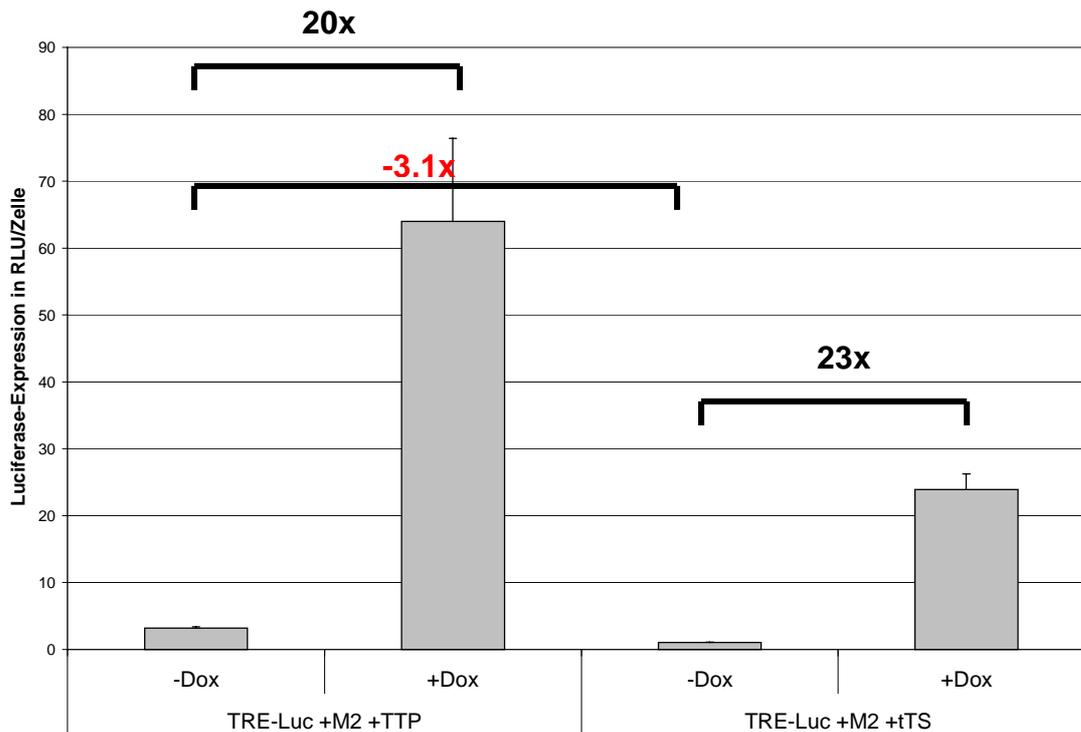


Abbildung 4.24.: Reduzierung der Basalexpression durch Ad5CMV-tTS in EA.hy926

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: 5×10^3 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMV-TTP: 5×10^3 p/c (als Dosisausgleich); Dox 300 ng/ml

Die Basalexpression der Luciferase reduzierte sich in den tTS-transduzierten Zellen auf 32%. Die maximale Expression im induzierten Zustand reduzierte sich um das 2,6-fache, wobei sich allerdings die Induktionsrate von 20 (Kontrolle) auf 23 in den tTS-transduzierten Zellen erhöhte (Abb. 4.24.).

Der Einsatz des Ad5CMV-tTS in HepG2-Zellen (Abb. 4.25.) zeigte, dass bei Erhöhung der tTS-Konzentration die Basalexpression des Ad5TRE-Luc auf 26,5% gesenkt werden konnte, und damit die Dox-vermittelte Induktion während des Einsatzes des Ad5CMV-tTS um das 4,1-fache höher lag als ohne den tTS (vgl. 1,15-fach in EA.hy926, Abb. 4.24.). Die absolute Luciferase-Expression wurde hier durch den tTS nicht beeinträchtigt.

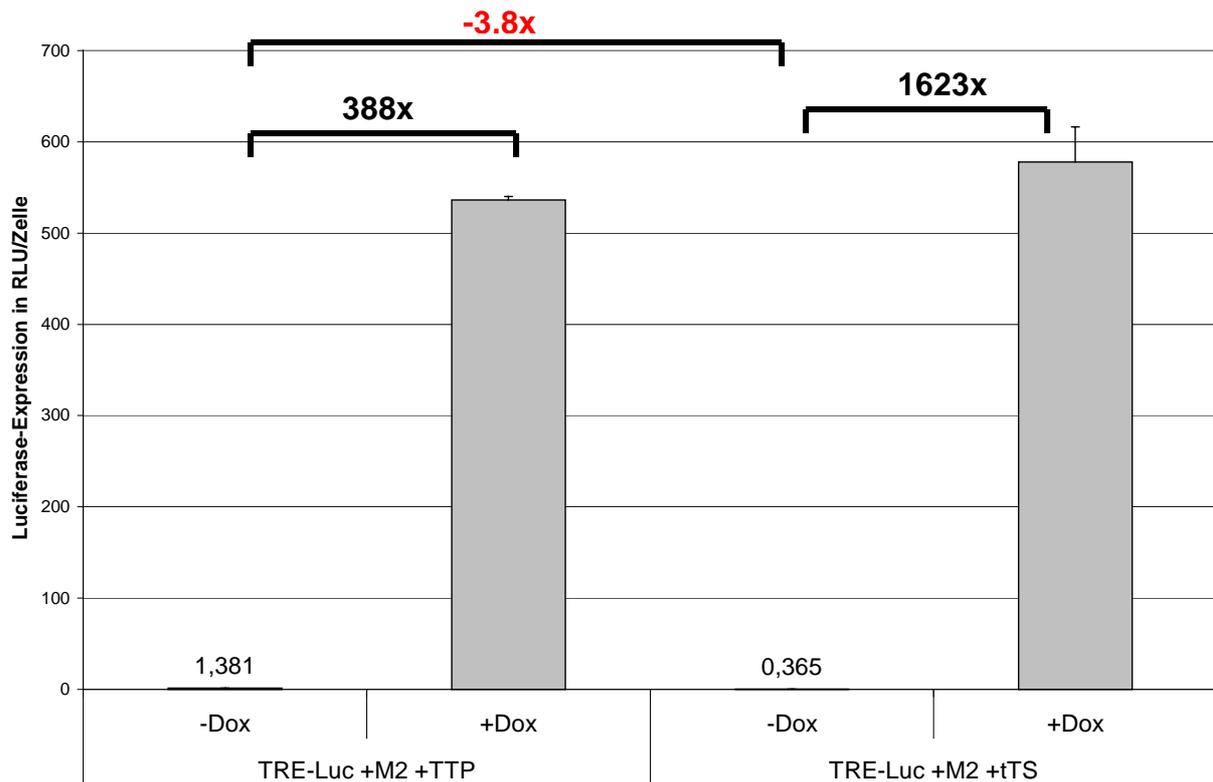


Abbildung 4.25.: Reduzierung der Basalexpression durch Ad5CMV-tTS in HepG2

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS (tTS): 1×10^4 p/c; Ad5CMV-TTP (TTP): 1×10^4 p/c (als Dosisausgleich); Ad5CMVrtTA-M2 (M2): $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Dox 300 ng/ml

4.6.3.2. Suppression der Basalexpression im AdV-rtTA-RRCA-System

Um die Funktionalität des tTS auch im AdV-rtTA-RRCA-System zu überprüfen, wurden in einem weiteren Versuch EA.hy926 Zellen, die 24 h vorher entweder mit Ad5CMV-TTP (Kontrolle) oder Ad5CMV-tTS transduziert worden waren, zusätzlich zu Ad5TRE-Luc und rtTA-M2 mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh infiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass in dieser Zelllinie die relativ hohe Basalexpression des Ad5TRE-Luc bei gleichzeitiger Infektion mit Ad5CMVrtTA-M2 und Ad5-pTRE-13S-bgh ($2,5 \times 10^3$ p/c) durch Ad5CMV-tTS um das 26-fache gesenkt und hierdurch die Induktionsrate von 9,95 auf 105 erhöht werden konnte. Das Ergebnis zeigt außerdem, dass durch eine Erhöhung der 13S-Konzentration ($7,5 \times 10^3$ p/c) die Induktionsrate bei gleichbleibender Basalexpression auf das 182-fache gesteigert werden konnte (Abb. 4.26.).

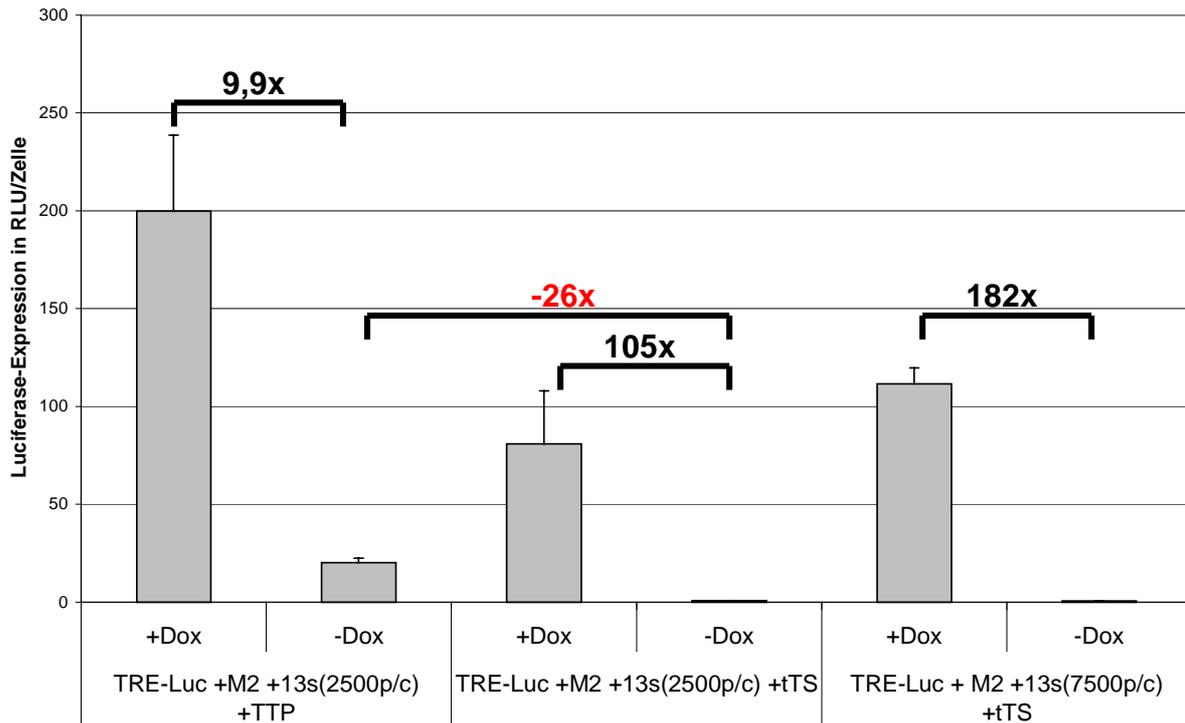


Abbildung 4.26.: tTS-vermittelte Suppression der Basalexpression in EA.hy926 (+Ad5pTRE-13S-bgh)

Eingesetzte Vektoren: Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2 (M2): $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5CMV-tTS (tTS): 1×10^4 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): $2,5/7,5 \times 10^3$ p/c; Ad5CMV-TTP (TTP): 1×10^4 p/c (als Dosisausgleich); Dox 300 ng/ml

Verglichen mit dem AdV-rtTA-System wies in HT-29 Zellen die weitere Erhöhung der Ad5-pTRE-13S-bgh Konzentration auf $1,5 \times 10^4$ p/c allerdings eine Verringerung der Induktionsrate trotz des Einsatzes des Ad5CMV-tTS auf (+/- Dox 208,9x \Rightarrow +/- Dox 72,9x) (Tab. 4.9.).

Die Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh von lediglich 500 p/c zeigte dagegen, dass sich die Regulierbarkeit durch Dox bereits ohne den Ad5CMV-tTS deutlich verbesserte, allerdings im Vergleich zum AdV-rtTA-System eine geringere Differenz +/-Dox aufwies. Die zusätzliche Transduktion der Zellen mit dem Ad5CMV-tTS resultierte bei einer 28,4-fachen Reduktion der Basalexpression (TRE-Luc + rtTA-M2 + 13S; Abb. 4.27.) in eine signifikante Steigerung der Induktionsrate (487,5x; Tab. 4.9.). Die absolute Expression verringerte sich hierbei um das 2,2-fache (Abb. 4.27.).

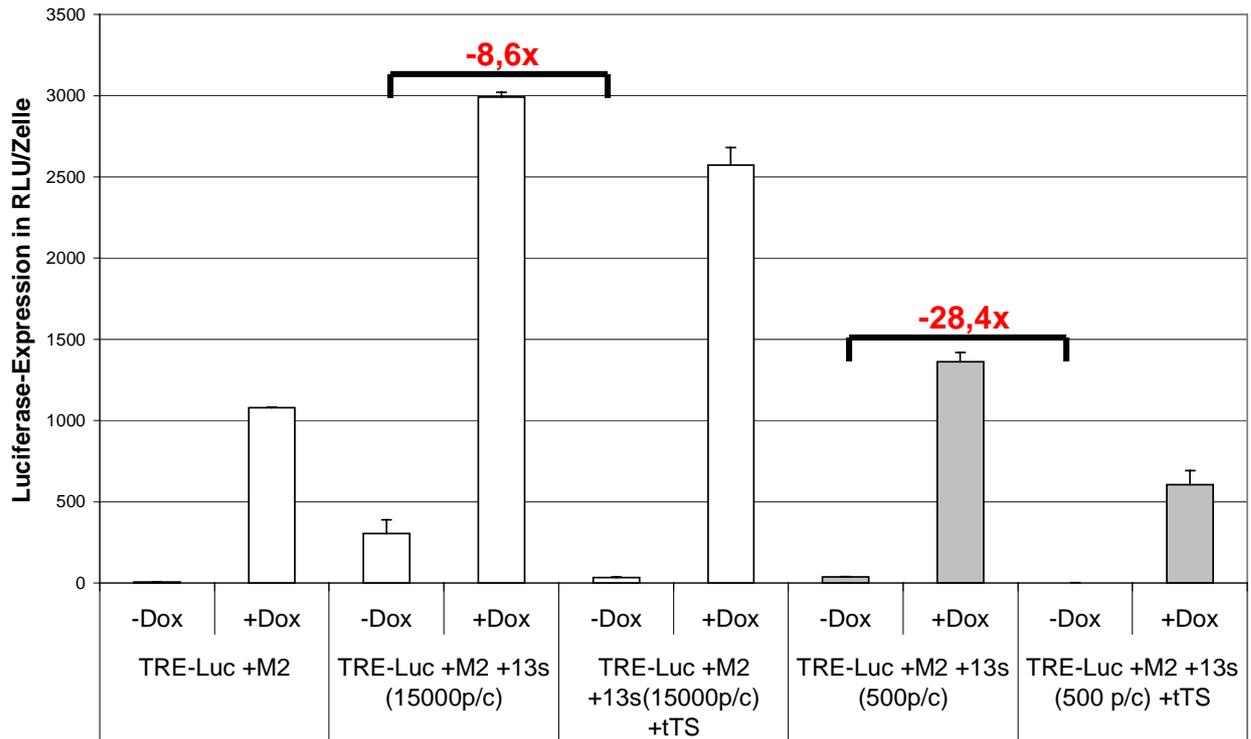


Abbildung 4.27.: Suppression der Basalexpression durch den tTS bei unterschiedlichen Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh; HT-29

Die weißen Balken kennzeichnen eine Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh von $1,5 \times 10^4$ p/c, die grauen Balken eine Dosierung von 500 p/c.

Eingesetzte Vektoren: Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2 (M2): $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5CMV-tTS (tTS): 1×10^4 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): $1,5 \times 10^4/500$ p/c; Dox 300 ng/ml

	- 13S - tTS	+ 13S - tTS	+ 13S + tTS
Differenz +/- Dox 15000 p/c 13S	208,9	9,8	72,9
Differenz +/- Dox 500 p/c 13S		38,5	487,5

Tabelle 4.9.: Differenz +/-Dox (Induktionsrate) im Vergleich zwischen AdV-rtTA-, AdV-rtTA-RRCA- und AdV-rtTA-tTS-RRCA-System mit unterschiedlichen Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh (500/1,5 $\times 10^4$ p/c)

Die Werte wurden aus Abbildung 4.27. berechnet.

4.6.3.3. Regulation der E1A-13S-mRNA-Expression nach Koapplikation des Ad5CMV-tTS

Um die verbesserte Regulation des Ad5-pTRE-13S-bgh durch den zusätzlichen Einsatz des tTS auch auf der Ebene der RNA-Expression zu untersuchen, wurden EA.hy926 Zellen mit dem AdV Ad5CMV-tTS oder als Kontrolle mit Ad5CMV-TTP transduziert. 22 h darauf wurden die Zellen mit Ad5-pTRE-13S-bgh und Ad5CMVrtTA-M2 kotransduziert und mit Dox bzw. ohne Dox für 26 h inkubiert. Die Northernblot-Hybridisierung mittels 13S-, tTS-, rtTA-M2- und GAPDH-spezifischer Sonden zeigte eine reelle Kontrolle der 13S-mRNA-Expression im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System (Abb. 4.28.).

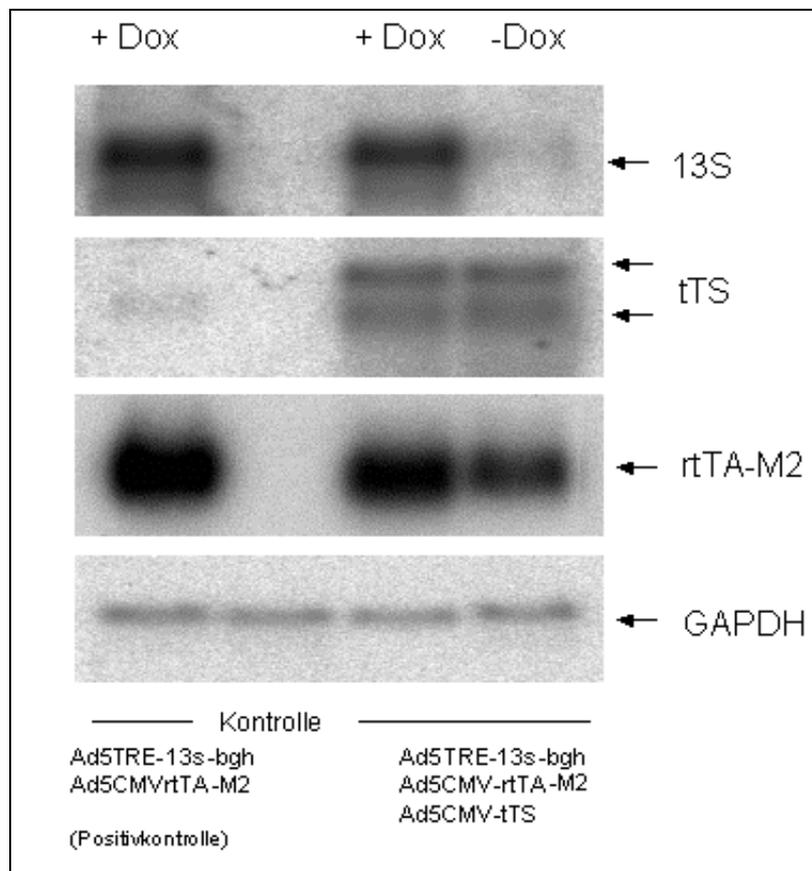


Abbildung 4.28.: Regulierbare 13S-mRNA-Expression durch Einsatz des Ad5CMV-tTS (Northern Blot)

Die Doppelbande beim Nachweis der tTS-mRNA resultiert aus einem Splicevorgang, wobei die obere Bande die native mRNA des tTS darstellt.

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: 1×10^4 p/c; Ad5CMV-TTP: 1×10^4 p/c (als Dosisausgleich); Ad5-pTRE-13S-bgh: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5CMVrtTA-M2: 5×10^3 p/c; Dox 300 ng/ml

Die semiquantitative Analyse ergab, dass im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System eine Induktion der E1A-13S-mRNA-Expression durch Dox um das 14,8-fache erreicht wurde. Die Basalexpression der E1A-13S-mRNA (+ rtTA-M2, +Dox, ohne tTS) konnte durch den tTS in Abwesenheit von Dox um das 17,1-fache reduziert werden, wobei sich im induzierten Zustand des Systems die absolute Expression um lediglich 13% verringerte.

4.6.3.4. Effekte des Ad5CMV-tTS auf die adenovirale DNA-Replikation

Für den Nachweis der Regulierbarkeit der AdV-Replikation im AdV-rtTA-tTS-RRCA-System wurden HT-29 Zellen mit Ad5CMV-tTS und Ad5CMVrtTA-M2 24 h vor der Transduktion mit Ad5TRE-Luc, Ad5CMV-GFP und Ad5-pTRE-13S-bgh inkubiert. Ad5-pTRE-13S-bgh kam hierbei in unterschiedlichen Dosierungen (20; 100; 500; $2,5 \times 10^3$ p/c) zur Anwendung und auftretende Dosisunterschiede wurden mit Ad5CMV-TTP ausgeglichen. 300 ng/ml Dox wurden täglich ins Medium gegeben. Die DNA-Replikation wurde 48 h nach der Transduktion der Indikator-AdV und des RRCAs mit Hilfe der kompetitiven PCR zum Nachweis der Luciferase-DNA ermittelt.

Abbildung 4.29. zeigt, dass die Regulierbarkeit der AdV-DNA-Replikation über einen weiten Bereich der Ad5-pTRE-13S-bgh Dosierung aufrecht erhalten, und in Abhängigkeit von der 13S-Dosierung die relative AdV-DNA-Menge auf das bis zu 183-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnte.

In Tabelle 4.10. wird die Differenz +/-Dox aus Abbildung 4.29. wiedergegeben. Die Induktionsrate fiel bei den Dosierungen von 100 p/c und 500 p/c am größten aus (7,03x bzw. 7,94x). Bei $2,5 \times 10^3$ p/c wird die Differenz zwischen +Dox und -Dox geringer (5,44x), und eine exponentielle Steigerung der basalen Replikation bei einer weiteren Erhöhung der 13S-Konzentration ist zu vermuten. Die Konzentration des Ad5-pTRE-13S-bgh von 20 p/c weist lediglich eine Induktion um das 3,7-fache auf, was den geringgradigen *Trans*-Komplementierungs-Effekt bei dieser Dosierung demonstriert (vgl. auch Abb. 4.18.).

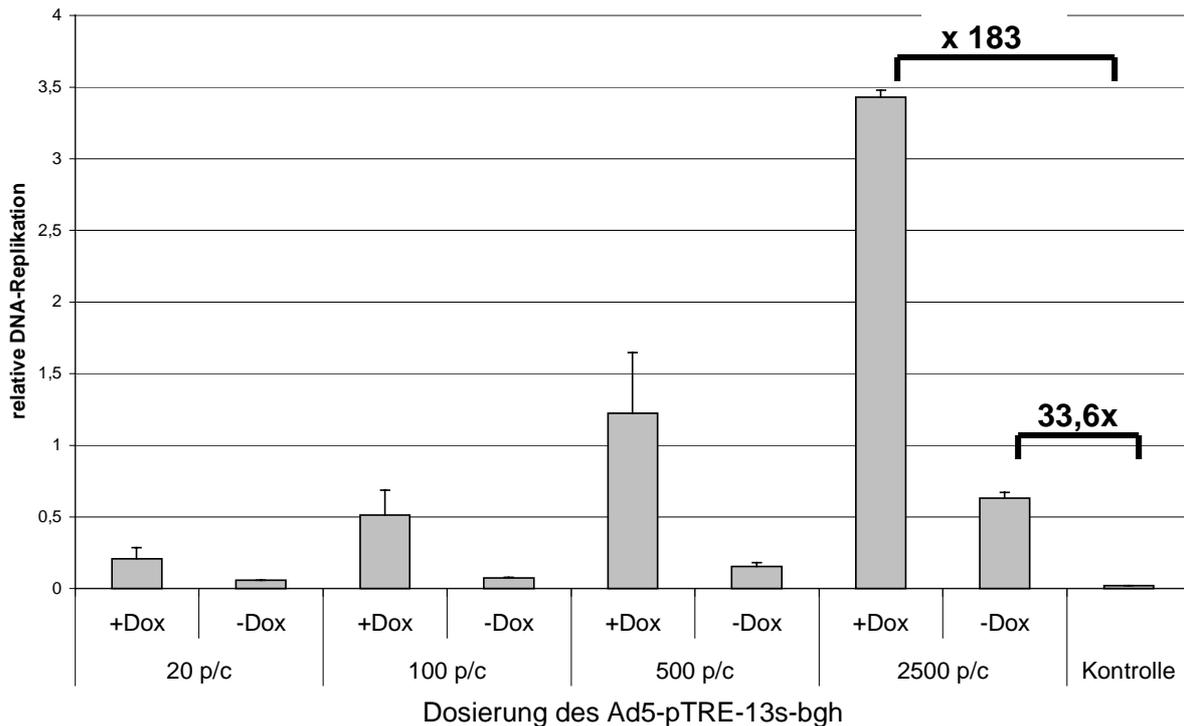


Abbildung 4.29.: Relative AdV-DNA-Replikation; Nachweis der Luciferase-DNA (quantitative PCR); HT-29

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: 1×10^4 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 20, 100, 500, $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 1×10^3 p/c; Ad5CMV-GFP: 1×10^3 p/c; Dox 300 ng/ml

Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh				
	20 p/c	100 p/c	500 p/c	2500 p/c
Differenz +/- Dox	3,71	7,03	7,94	5,44

Tabelle 4.10: Dosisabhängigkeit der Regulierbarkeit der AdV-Replikation in HT-29 Zellen

Die Werte wurden aus Abb. 4.29. berechnet.

Der visuelle Nachweis der GFP-Expression (Abb. 4.30.) wies ebenfalls mit steigender Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh eine Erhöhung der Transgenexpression auf, die durch eine vermehrte Anzahl fluoreszierender Zellen charakterisiert wurde, und somit auf den *Trans*-Komplementierungs-Effekt des Ad5-pTRE-13S-bgh und die dadurch verstärkte interzelluläre Ausbreitung zurückgeführt werden konnte. Allerdings trat hierbei in den mit Dox inkubierten Zellen eine deutlich geringere Fluoreszenz auf als in denjenigen, die ohne Dox inkubiert wurden. Es zeigte sich somit hier das gleiche Phänomen, wie bereits in Punkt 4.6.2.1. beschrieben, und ist ebenfalls mit größter

Wahrscheinlichkeit auf den kompetitiven Effekt zwischen dem rtTA-M2 und dem Ad5-pTRE-13S-bgh zurückzuführen.

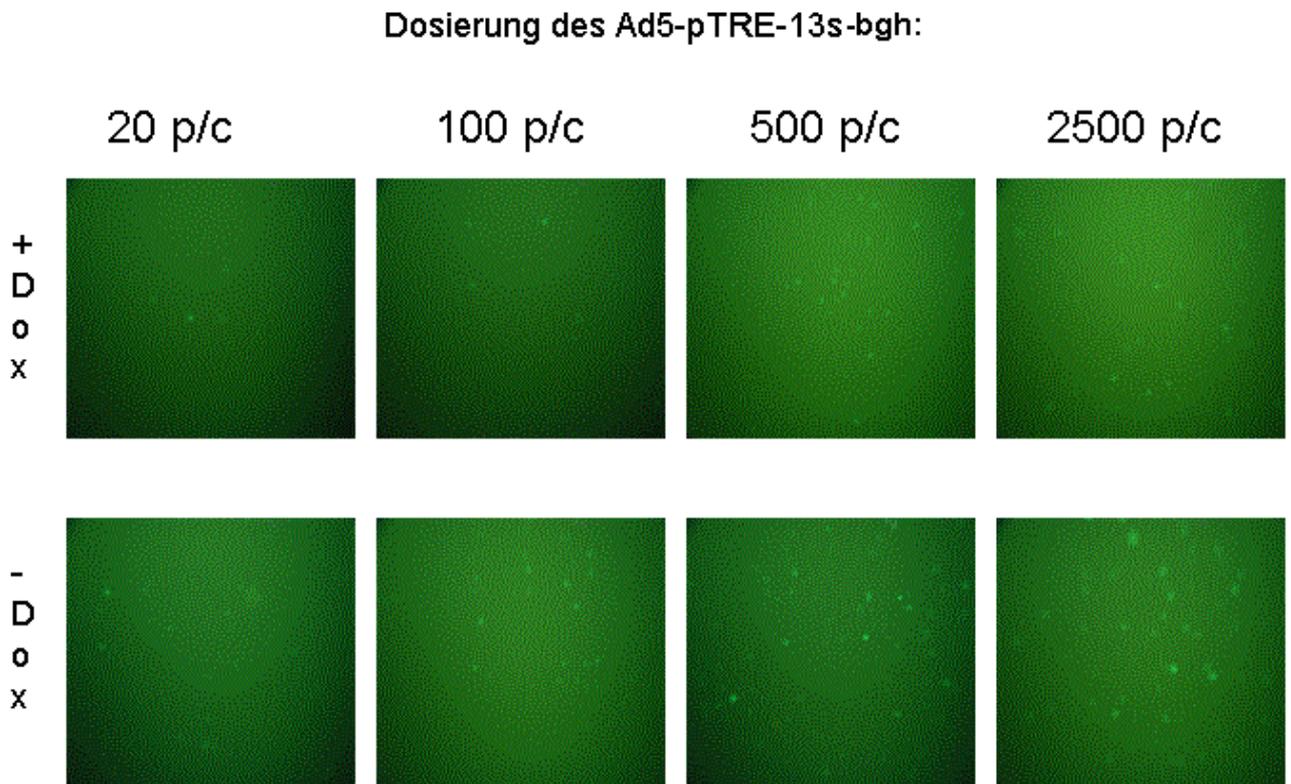


Abbildung 4.30.: visueller Nachweis der GFP-Expression in HT-29 bei Koinfektion mit Ad5-pTRE-13S-bgh in unterschiedlichen Dosierungen

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: 1×10^4 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 20, 100, 500, $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 1×10^3 p/c; Ad5CMV-GFP: 1×10^3 p/c; Dox 300 ng/ml

Um die Wirkung des Ad5CMV-tTS auf die adenovirale Replikation in einer weiteren Zelllinie zu untersuchen, erfolgte die Transfektion von HepG2 Zellen gleichermaßen wie die der HT-29 Zellen mit vorausgehender Transduktion des Ad5CMV-tTS und Ad5CMVrtTA-M2 für 24 h und der darauf folgenden Transduktion der weiteren Vektoren Ad5TRE-Luc und Ad5-pTRE-13S-bgh. Auch hier wurden die unterschiedlichen Dosierungen des RRCAs verwendet.

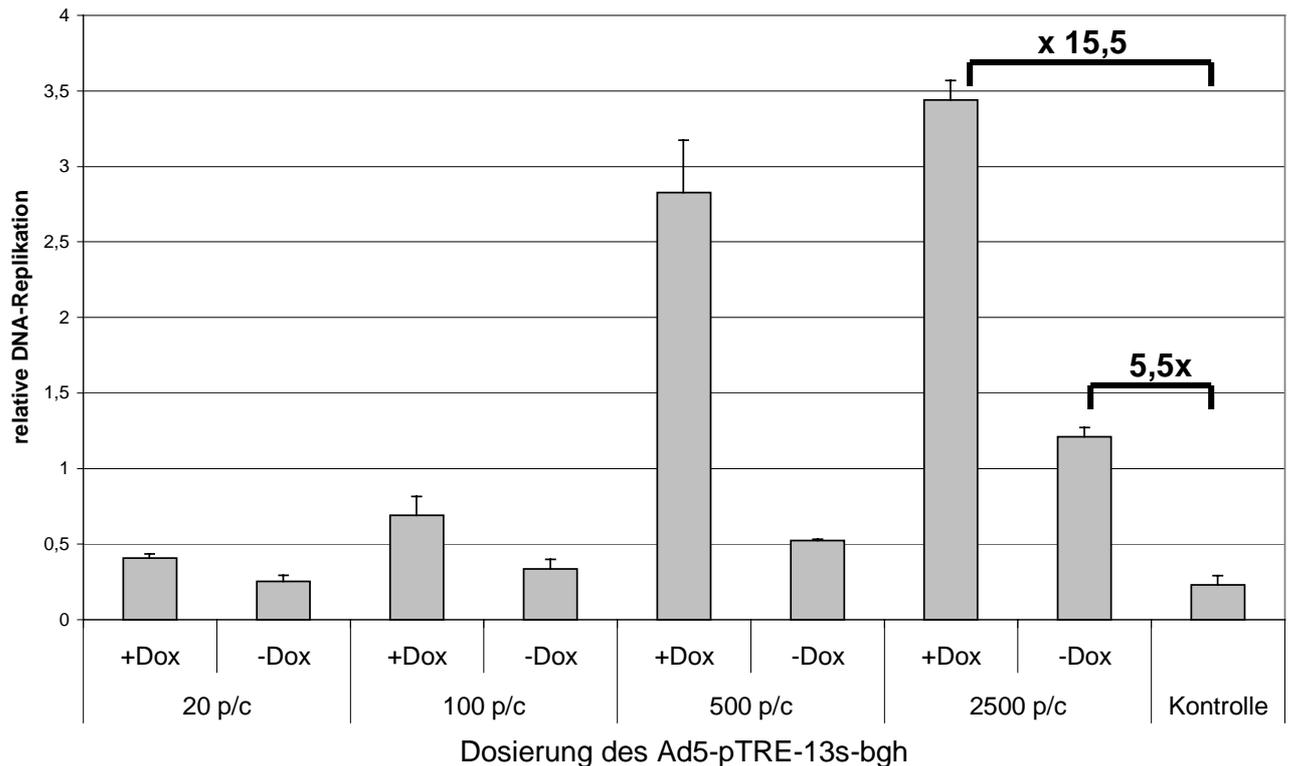


Abbildung 4.31.: E1A-13S-vermittelte AdV-DNA-Replikation in HepG2; Nachweis der relativen Luciferase-DNA-Replikation mittels quantitativer PCR

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: 1×10^4 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 20, 100, 500, $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 1×10^3 p/c; Dox 300 ng/ml

Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh				
	20 p/c	100 p/c	500 p/c	2500 p/c
Differenz +/- Dox	1,63	2,02	5,42	2,83

Tabelle 4.11.: Differenz +/-Dox (Induktionsrate) bei E1A-13S-vermittelter AdV-DNA-Replikation in HepG2. Die Werte wurden aus Abb. 4.31. berechnet.

Auch in diesem Versuch zeigte sich die Dox-abhängige Regulierbarkeit der AdV-DNA-Replikation, die jedoch schwächer ausgeprägt war (15,5x) als in HT-29 Zellen (183x; vgl. Abb. 4.29.) und eine geringere Differenz zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand aufzeigte. Die Induktionsrate (+/-Dox) fiel auch hierbei bei 500 p/c Ad5-pTRE-13S-bgh am größten aus und zeigte eine in der Tendenz ähnliche Verlaufskurve sowie die Steigerung der Basalreplikation in Abhängigkeit von der E1A-13S-Dosierung wie in HT-29 (Tab. 4.11.).

4.6.3.5. Vergleich der Regulierbarkeit der Tumorzelldestruktion mittels Dox am Beispiel von EA.hy926 Zellen

Für den Vergleich der Regulierbarkeit der Tumorzelldestruktion zwischen dem AdV-rtTA-RRCA-, dem AdV-tTS-RRCA- und dem AdV-rtTA-tTS-RRCA-System mittels Dox wurde ein Cell-Killing-Assay durchgeführt. Ea.hy926 Zellen wurden mit jeweils $2,5 \times 10^3$ p/c Ad5CMV-tTS und Ad5CMVrtTA-M2 oder in Dosisgleichheit mit dem AdV Ad5CMV-TTP für 24 h transduziert. Es folgte die Infektion mit 500 p/c Ad5-pTRE-13S-bgh oder mit der äquivalenten Dosis des AdV Ad5CMV-TTP als Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle diente die Infektion der Zellen mit einem RCA. Die Induktion des Systems erfolgte täglich mit $1\mu\text{g/ml}$ Dox. Nach 6 Tagen wurden die Zellkulturplatten ausgewertet. Die Fixierung und darauffolgende Färbung mit Kristallviolett ergab nachstehendes Bild (Abb. 4.32.). Die Zellen einer zweiten Zellkulturplatte, die auf gleiche Weise transduziert worden war, wurden abtrypsinisiert und gezählt (Tab. 4.12.).

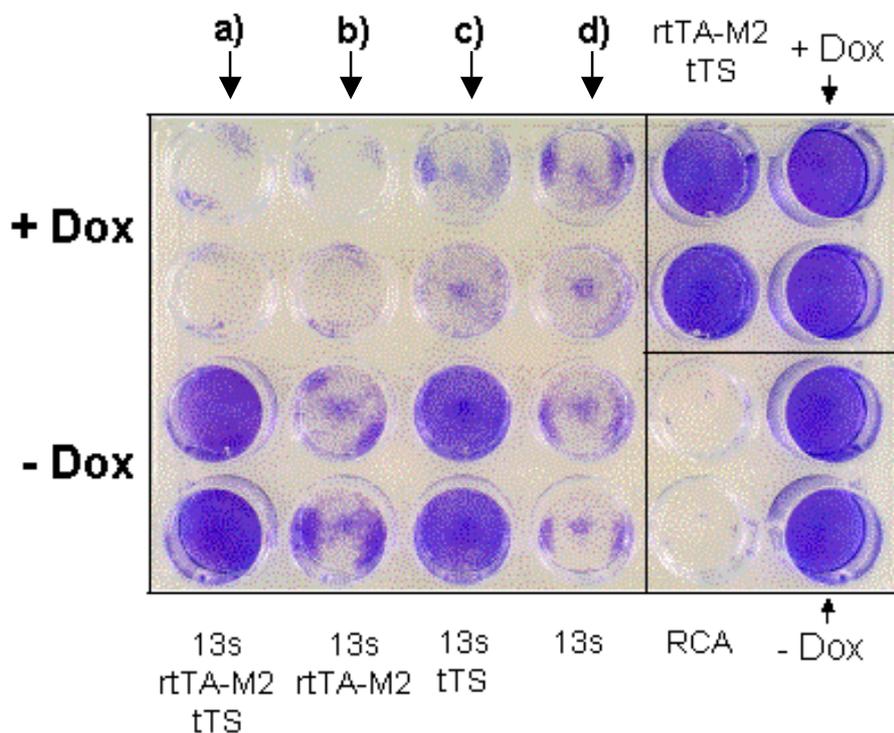


Abbildung 4.32.: Cell-Killing-Assay auf EA.hy926; die Auswertung erfolgte nach 6 Tagen.

a) AdV-rtTA-tTS-RRCA-System; b) AdV-rtTA-RRCA-System; c) AdV-tTS-RRCA-System; d) Ad5-pTRE-13S-bgh; RCA = Positiv-Kontrolle
Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; RCA: 500 p/c; Dox $1\mu\text{g/ml}$

Aus Abbildung 4.32. ergab sich, dass das AdV-rtTA-tTS-RRCA-System (a) bei Applikation von Dox eine mit dem RCA vergleichbare Zelllyse induziert. Ohne Dox-Applikation wurden die Zellen kaum lysiert. Im induzierten AdV-tTS-RRCA-System (c) war die Zelllyse weniger deutlich ausgeprägt, und es trat auch in Abwesenheit von Dox eine vermehrte Zelllyse auf. Das AdV-rtTA-RRCA-System (b) dagegen zeigte eine starke Limitierung der Dox-abhängigen Regulierbarkeit der Zelllyse, und die Infektion der Zellen mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh allein (d) erlaubte nahezu keine Regulation durch Dox.

Die Auswertung der Zellzahl überlebender Zellen pro well (Tab. 4.12.) bestätigte die visuell erlangten Resultate.

	Kontrolle	TRE-13S +M2 +CMV- tTS	TRE-13S +M2	TRE-13S +CMV-tTS	TRE-13S	CMV-TTP +M2 +CMV- tTS	RCA
+ Dox	$4,77 \times 10^5$	$0,57 \times 10^5$	$0,47 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$3,62 \times 10^5$	$0,75 \times 10^5$
- Dox	$5,27 \times 10^5$	$3,42 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$	$1,85 \times 10^5$	$1,35 \times 10^5$		

Tabelle 4.12.: Cell-Killing-Assay; EA.hy926; die Auswertung erfolgte nach 6 Tagen (Vgl. Abb. 4.32.).

Angegeben ist die Anzahl überlebender Zellen pro well.

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2 (M2): $2,5 \times 10^3$ p/c; RCA: 500 p/c; Dox 1 µg/ml

4.6.3.6. Dox-abhängige Kontrolle der AdV-Replikation (ON-OFF)

Die Dox-abhängige Kontrolle der AdV-DNA-Replikation wurde am Beispiel von HT-29 demonstriert. Die Zellen wurden mit AdVCMV-tTS für 24 h transduziert und folgend mit den Vektoren Ad5-pTRE-13S-bgh, Ad5CMVrtTA-M2 und Ad5TRE-Luc kotransfiziert. Das Medium wurde mit 300 ng/ml Dox versehen und gegebenenfalls nach 24 h durch frisches Medium ohne Dox ersetzt. Die weitere Dox-Applikation erfolgte täglich.

Aus Abbildung 4.33. wird ersichtlich, dass eine Dox-abhängige Kontrolle der AdV-Replikation besteht. Durch die tägliche Dox-Administration für 96 h wird eine Steigerung der AdV-DNA-Replikation um das 46,4-fache erzielt. Verglichen mit der Replikation in Zellen, die nicht mit Dox inkubiert wurden, bedeutet dies eine Zunahme um das 4,8-fache.

Zellen, die nach anfänglicher Dox-Applikation ohne weiteren Zusatz von Dox inkubiert wurden, zeigten nach 72 h einen Abfall der relativen AdV-DNA-Menge auf die Hälfte.

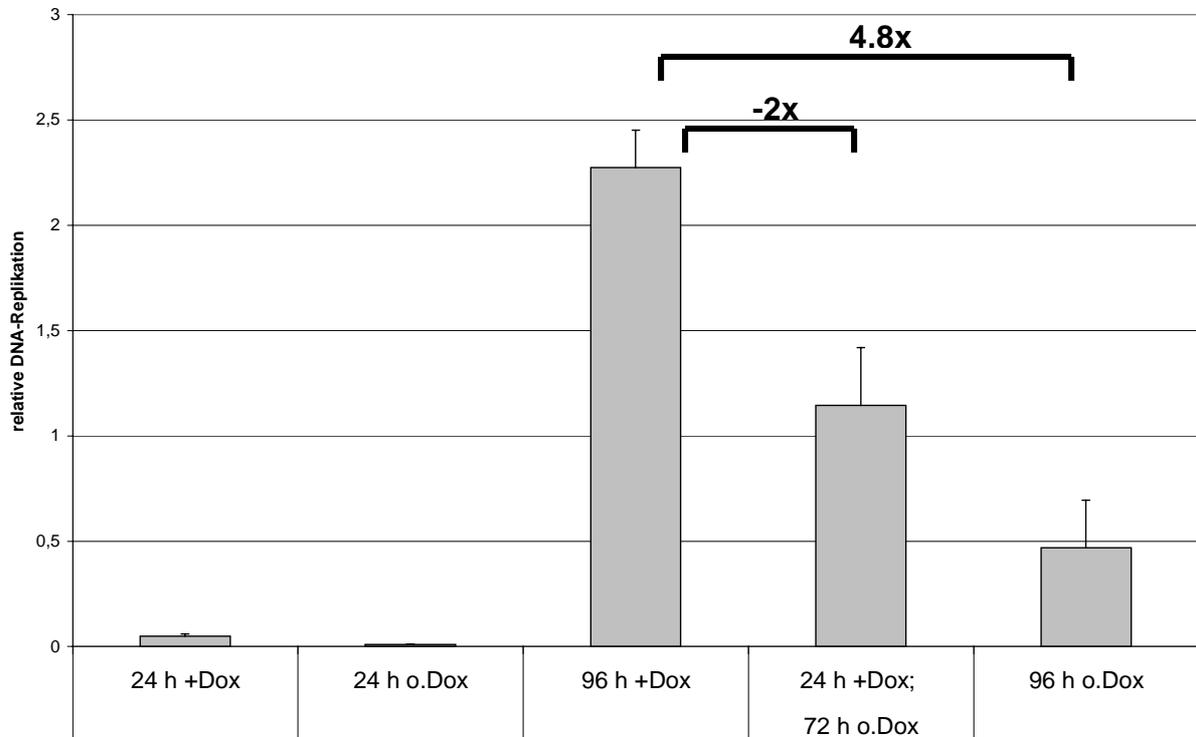


Abbildung 4.33.: An- und Abschalten der DNA-Replikation im AdV-rtTA-RRCA-tTS-System; HT-29; Nachweis der relativen Luciferase-DNA-Replikation mittels quantitativer PCR

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-tTS: 1×10^4 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5TRE-Luc: 1×10^3 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 100 p/c; Dox 300 ng/ml

Das System demonstrierte hierdurch abermals seine Induzierbarkeit durch die Applikation von Dox und zugleich die Möglichkeit zur Reversibilität der Induktion durch einen Abbruch der kontinuierlichen Dox-Applikation mit einer Halbwertszeit von 72 h.

4.6.4. Untersuchungen zur gewebsspezifischen Protektion unter Anwendung des Ad5hAAT-tTS

Um eine gewebsspezifische Protektion gegenüber einer ungewollten TRE-vermittelten Expression von E1A-13S und der damit einhergehenden Virusreplikation zu erreichen, wurde der tTS unter die Kontrolle des leberzellspezifischen humanen

α_1 -Antitrypsin (hAAT)-Promotors gesetzt. Im Falle einer RRCA-gestützten Behandlung von Fremdmetastasen in der Leber sollte hierdurch das gesunde Gewebe geschützt und eine effektive viroonkolytische Behandlung der metastasierten Tumorzellen möglich gemacht werden. Hieraus entstand das Adv-rtTA-hAAT-tTS-RRCA-System.

4.6.4.1. Vergleich der Expression des hAAT-Promotor-kontrollierten tTS in verschiedenen Zelllinien

Wie die Northern-Blot Analyse mittels einer hAAT-spezifischen Sonde zeigte, war erwartungsgemäß eine hohe Aktivität des hAAT-Promotors in der hepatogenen Zelllinie HepG2 nachzuweisen. Gleichzeitig war jedoch auch in der kolorektalen Karzinom-Zelllinie HT-29 eine deutliche Aktivität des Promotors erkennbar (Abb. 4.34.).

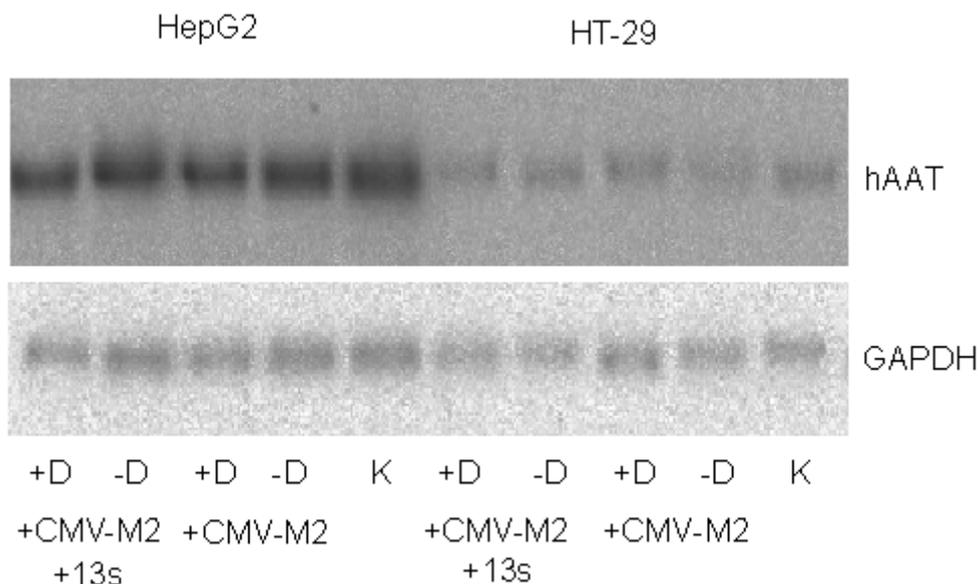


Abbildung 4.34.: Nachweis der hAAT-mRNA in HepG2 und HT-29 mittels Northern-Blot Analyse

K = Kontrolle; D = Dox

Eingesetzte Vektoren: Ad5hAAT-tTS: 1×10^4 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 500 p/c; Dox 300 ng/ml

Sowohl die Applikation von Dox als auch die Kotransduktion der Zellen mit dem Ad5CMVrtTA-M2 zeigten kaum Auswirkungen auf die mRNA-Expression. Die Auswertung mittels der BASReader Software belegte eine nur geringfügig erhöhte

Expression der hAAT-mRNA nach Koinfektion der Zellen mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh.

Um weitere Zelllinien auf die Aktivität des hAAT-Promotors zu untersuchen, wurden neben HepG2 noch die Zelllinien EA.hy926, LS174-T und Kyse140 mit dem Ad5hAAT-tTS transduziert und 24 h darauf mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh koinfiziert. Ein Teil der Zellen wurde mit Dox, ein Teil ohne Dox inkubiert und die Gesamt-RNA nach 48 h präpariert.

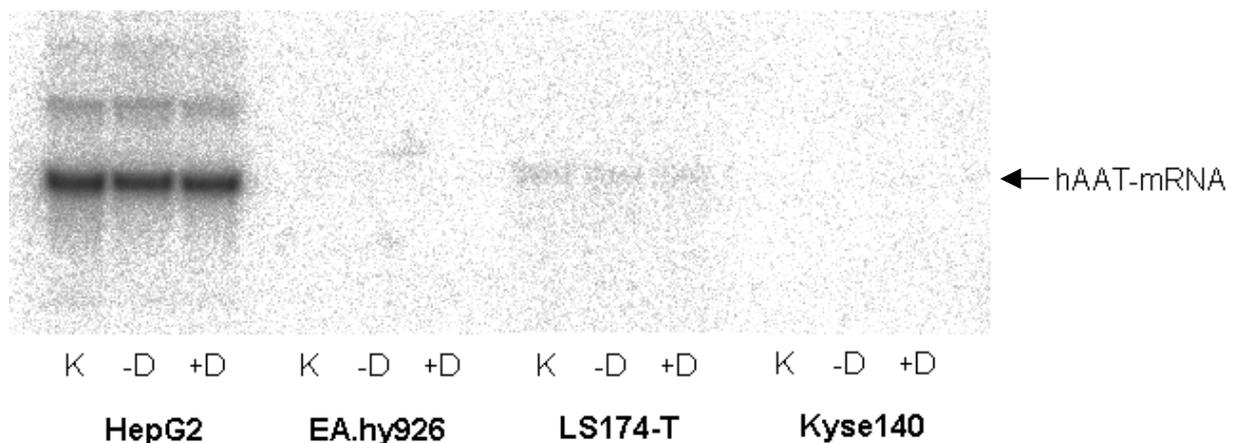


Abbildung 4.35.: Nachweis der hAAT-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien; Northern-Blot

K = Ad5hAAT-tTS; **-D** = Ad5hAAT-tTS + Ad5-pTRE-13s-bgh - Dox; **+D** = Ad5hAAT-tTS + Ad5-pTRE-13s-bgh + Dox

Eingesetzte Vektoren: Ad5hAAT-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13s-bgh: 500 p/c; Dox 300 ng/ml

Abbildung 4.35. zeigt, dass sowohl in EA.hy926 als auch in Kyse140 im Northern-Blot keine hAAT-mRNA-Expression nachzuweisen ist. In der Zelllinie LS174-T dagegen ist eine schwache Aktivität des Promotors feststellbar. Die Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh lässt in den hier untersuchten Zelllinien weder mit Dox noch ohne Dox eine Wirkung auf die Expression der endogenen hAAT-mRNA erkennen. Der in Abbildung 4.35. gezeigte Blot wurde nach Strippen der hAAT-Sonde mit einer tTS-spezifischen Sonde hybridisiert und ergab das in Abbildung 4.36. wiedergegebene Resultat. Es zeigte sich hier, dass durch die Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh und der Applikation von Dox sowohl in HepG2 als auch in LS174-T eine nur leichte Steigerung der hAAT-kontrollierten tTS-mRNA-Expression festzustellen war. Bemerkenswert dagegen war die Expressionssteigerung der hAAT-kontrollierten tTS-mRNA in den Zelllinien EA.hy926 und Kyse140, in denen weder eine Aktivität des endogenen hAAT-Promotors noch die Aktivierung desselben durch E1A-13S nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.35.). Erst durch die Koinfektion mit dem Ad5-

pTRE-13S-bgh wird hier die Expression der tTS-mRNA erkennbar, was eine Transaktivierung des hAAT-Promotors in Ad5hAAT-tTS durch E1A-13S wahrscheinlich werden lässt .

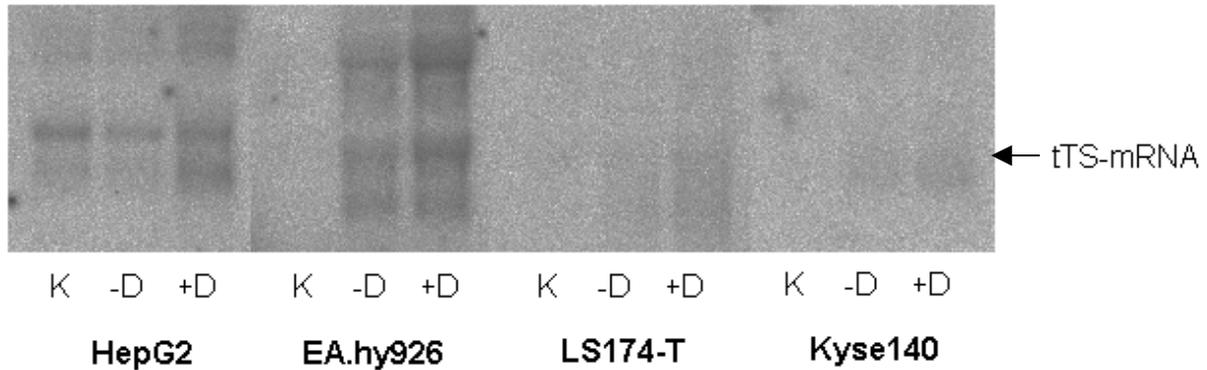


Abbildung 4.36.: Nachweis der tTS-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien; Northern-Blot

K = Ad5hAAT-tTS; **-D** = Ad5hAAT-tTS + Ad5-pTRE-13S-bgh - Dox; **+D** = Ad5hAAT-tTS + Ad5-pTRE-13S-bgh + Dox
 Eingesetzte Vektoren: Ad5hAAT-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 500 p/c; Dox 300 ng/ml

Aus diesen Ergebnissen konnte somit zum einen die beschränkte Spezifität des hAAT-Promotors in den hier untersuchten Tumorzelllinien abgeleitet werden. Außer in der Zelllinie HepG2 war eine deutliche Aktivität des hAAT-Promotors auch in HT-29 und LS174-T erkennbar. Zum anderen zeigte sich, dass die Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Aktivierung des heterologen hAAT-Promotors induzierte. Besonders stark fiel die Aktivierung in den Zelllinien aus, die keine endogene hAAT-Expression aufzeigten (EA.hy926, Kyse140). In den Zelllinien, die dagegen eine hohe endogene Aktivität des hAAT-Promotors aufweisen, war die Transaktivierung durch E1A-13S geringer.

4.6.4.2. Transaktivierung des leberzellspezifischen hAAT-Promotors durch Ad5-pTRE-13S-bgh

Um die Transaktivierung des hAAT-Promotors durch E1A-13S zu näher zu untersuchen, wurden die Zelllinien HT-29 und EA.hy926 mit Ad5hAATrtTA-M2 und Ad5-pTRE-13S-bgh kotransduziert und die RNA 48 h später präpariert. Zum Nachweis der Basalexpression von Ad5hAATrtTA-M2 erfolgte die Transduktion des Vektors allein.

Der Nachweis der rtTA-M2-mRNA in Abbildung 4.37. zeigt sowohl in HT-29 als auch in EA.hy926 deutlich die Aktivierung des hAAT-Promotors durch E1A-13S.

Die Auswertung mittels der BASReader Software ergab, dass in HT-29 der hAAT-Promotor bei einer Koinfektion des Ad5-pTRE-13S-bgh um das 4,8-fache, in EA.hy926 um das 9,7-fache aktiver ist als während der Monotransduktion des Ad5hAATrtTA-M2 (Abb. 4.37.). Dies bestätigt somit die Vermutung, dass die Aktivierung des in den AdV einklonierten hAAT-Promotors durch E1A-13S in Zelllinien mit geringer bzw. keiner endogenen hAAT-Expression (EA.hy926) stärker ausgeprägt ist als in Zellen mit hoher endogener hAAT-Expression (HT-29).

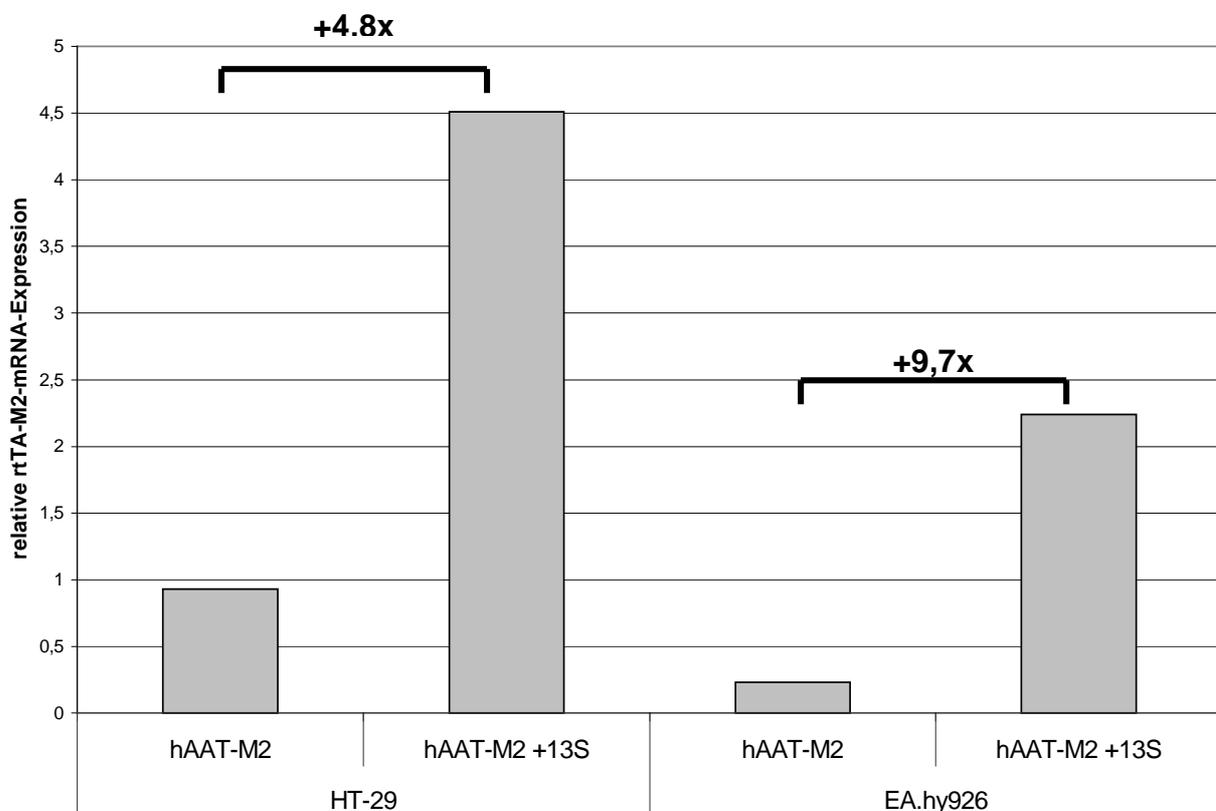


Abbildung 4.37.: semiquantitative Analyse der relativen rtTA-M2-mRNA-Expression (Northern-Blot); Aktivierung des hAAT-Promotors durch E1A-13S (HT-29, EA.hy926)

Eingesetzte Vektoren: Ad5hAATrtTA-M2 (hAAT-M2): $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 1×10^4 p/c

Für einen Vergleich zwischen hAAT- und CMV-vermittelter Expression des tTS und der Transaktivierung dieser Promotoren durch E1A-13S, wurden HepG2 und HT-29 Zellen mit dem Ad5CMV-tTS bzw. dem Ad5hAAT-tTS transduziert. 24 h später erfolgte die Koinfektion mit Ad5TRE-Luc und zwei unterschiedlichen Dosierungen

des Ad5-pTRE-13S-bgh. Die Aktivität der Luciferase wurde 48 h darauf bestimmt. Abbildung 4.38. zeigt, dass in HepG2 bei den jeweils gleichen Dosierungen des Ad5-pTRE-13S-bgh die Suppression der Luciferase-Expression durch CMV- und hAAT-vermittelte Expression des tTS nahezu gleich ist (schwarze/grüne Klammern). In der Zelllinie HT-29 reduzierte der hAAT-kontrollierte tTS bei Kotransfektion des 13S-Vektors in einer Dosierung von 500 p/c die Transgenexpression bereits stärker als der CMV-kontrollierte tTS (blaue Klammer), was sich bei einer höheren Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh (5×10^3 p/c) noch verdeutlichte (gelbe Klammern). Dies zeigt die stärkere Transaktivierung des hAAT-Promotors in Ad5hAAT-tTS durch E1A-13S in der Zelllinie HT-29, welche, wie unter 4.6.4.1. gezeigt, eine geringe endogene hAAT-Expression aufweist als HepG2.

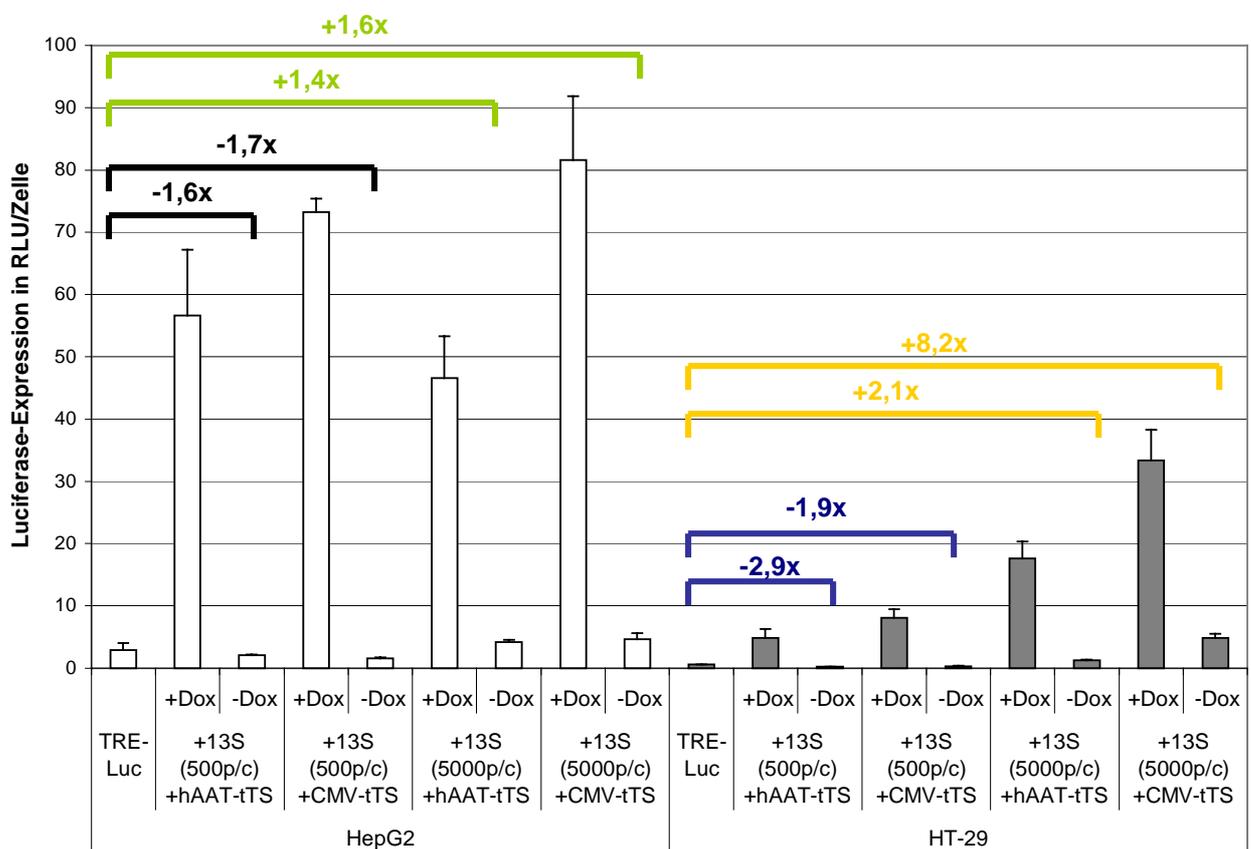


Abbildung 4.38.: Transaktivierung des hAAT-Promotors durch Ad5-pTRE-13S in HepG2 und HT-29

Die jeweils gleichfarbigen Klammern kennzeichnen die zu vergleichenden Werte, die bei der Transduktion von hAAT- und CMV-Promotor-kontrolliertem tTS auftreten. In HepG2 ist der Einfluss des Ad5-pTRE-13S-bgh auf den hAAT- und CMV-Promotor nahezu gleich. In HT-29 scheint die Transaktivierung des hAAT-Promotors durch den Ad5-pTRE-13S-bgh stärker zu sein als die des CMV-Promotors.

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV/hAAT-tTS: 2×10^4 p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: $500/5 \times 10^3$ p/c; Dox 300 ng/ml

Die Werte aus Tabelle 4.13. zeigen, dass in HepG2 die Induktionsrate (+/-Dox) der Luciferase-Expression bei CMV-vermittelter Expression des tTS stets größer ist als bei einer hAAT-vermittelten tTS-Expression, was kaum eine Transaktivierung des hAAT-Promotors durch den Ad5-pTRE-13S-bgh demonstriert. In der Zelllinie HT-29 ist bei einer Konzentration des Ad5-pTRE-13S-bgh von 500 p/c nur ein geringer Unterschied der Induktionsrate während CMV- und hAAT-Promotor-vermittelter Suppression nachweisbar. Bei einer Konzentration von 5×10^3 p/c allerdings übertrifft die Induktionsrate der Luciferase-Expression während einer hAAT-vermittelten Suppression sogar die, die während einer CMV-vermittelten Expression des tTS erreicht wird, um das Doppelte, was auch hier die stärkere Aktivierung des hAAT-Promotors durch E1A-13S im Vergleich zu HepG2 darlegt.

	Differenz der Luciferase-Expression +/- Doxyzyklin			
	13S (500 p/c) hAAT-tTS	13S (500 p/c) CMV-tTS	13S (5×10^3 p/c) hAAT-tTS	13S (5×10^3 p/c) CMV-tTS
HepG2	27,28	46,65	11,04	17,74
HT-29	23,26	26,5	14,2	6,81

Tabelle 4.13: Differenz +/-Dox (Induktionsrate); Ad5CMV-tTS und Ad5hAAT-tTS im Vergleich; HepG2, HT-29

Die Werte wurden aus Abb. 4.39. berechnet.

Um die Spezifität des Ad5hAAT-tTS weiter zu bestimmen und die Effekte des Ad5-pTRE-13S-bgh auch in Nicht-Tumorzellen zu untersuchen, wurden primäre Keratinozyten in gleicher Weise transfiziert. Eine Ausnahme bildete hierbei die Dosierung des RRCAs mit 250 p/c.

In diesem Versuch (Abb. 4.39.) konnte die weitestgehende Inaktivität des hAAT-Promotors demonstriert werden, die durch die Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh kaum beeinflusst wurde. Somit ließ sich mit Hilfe des Ad5CMV-tTS die Basalexpression des AdV (+Ad5-pTRE-13S-bgh) um den Faktor 59 verringern, während die Induktion mittels Dox hierbei das 17,8-fache betrug. Dagegen konnte während der Kotransduktion des Ad5hAAT-tTS kein Unterschied zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand nachgewiesen werden, wobei auch hier indirekt durch die 3,2-fache Reduktion der basalen Transgenexpression (+Ad5-pTRE-13S-bgh) eine schwache Aktivität des hAAT-Promotors bzw. eine geringe Aktivierung durch E1A-13S anzunehmen ist (s. grüne Klammer).

Der hier durchgeführte direkte Vergleich zwischen dem AdV-tTS-RRCA- (ohne rtTA-M2) und dem AdV-rtTA-tTS-RRCA-System demonstrierte zusätzlich die signifikante Erhöhung der Induktionsrate durch die Koapplikation des rtTA-M2.

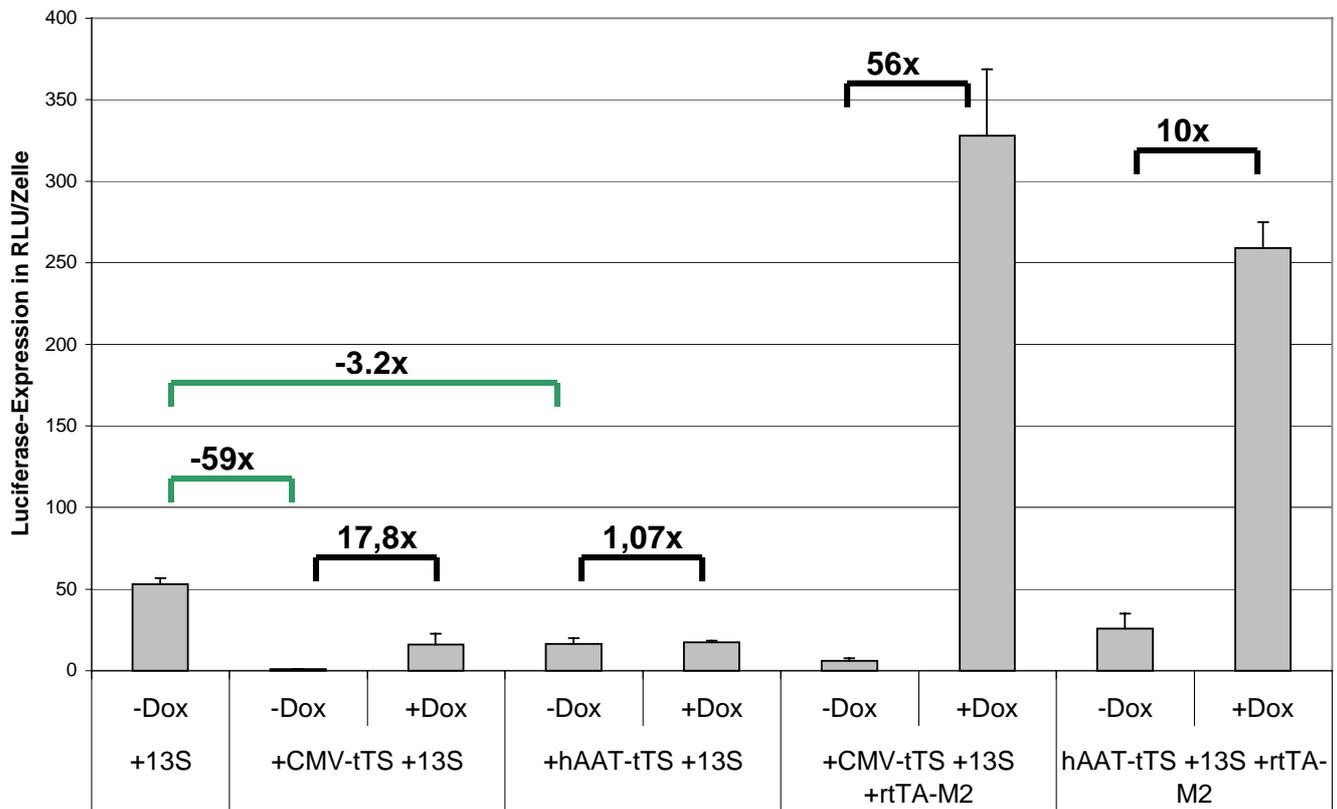


Abbildung 4.39.: ausbleibende Transaktivierung des Ad5hAAT-tTS durch E1A-13S in primären Keratinozyten

Die grünen Klammern zeigen die Suppression der basalen Luciferase-Expression (+Ad5-pTRE-13S-bgh) durch den Ad5CMV- bzw- den Ad5hAAT-tTS an.
 Eingesetzte Vektoren: Ad5hAAT-tTS/Ad5CMV-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 250 p/c; Dox 300 ng/ml

Der Nachweis der relativen AdV-DNA-Replikation in Abbildung 4.40. zeigte noch deutlicher, dass in den primären Keratinozyten der Ad5hAAT-tTS kaum eine suppressive Wirkung auf die *Trans*-Komplementierung eines koapplizierten AdV durch E1A-13S ausübte. Während der Ad5CMV-tTS eine deutliche Reduktion der E1A-13S-vermittelten DNA-Replikation um das 3,7-fache (AdV-tTS-RRCA-System) bzw. um das 7,7-fache (AdV-rtTA-tTS-RRCA-System) aufwies und eine Induktion durch Dox um das 11,2-fache bzw. das 11,9-fache zuließ, zeigte der Ad5hAAT-tTS keine suppressive Wirkung auf das System.

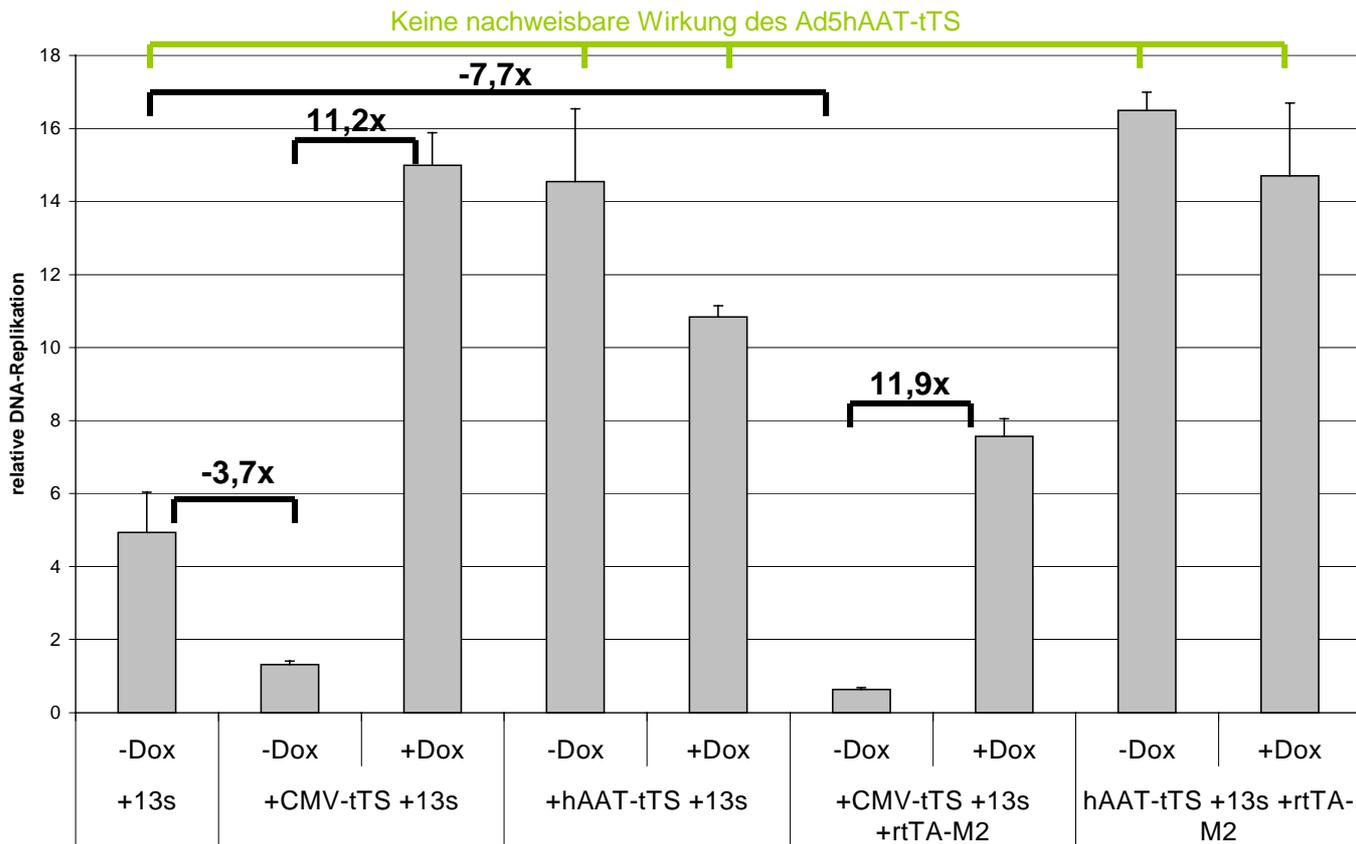


Abbildung 4.40.: ausbleibende Transaktivierung des Ad5hAAT-tTS durch E1A-13S in primären Keratinozyten; Nachweis der relativen Luciferase-DNA-Replikation mittels quantitativer PCR

Eingesetzte Vektoren: Ad5hAAT-tTS/Ad5CMV-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 250 p/c; Dox 300 ng/ml

Aus diesen Ergebnissen kann zusammenfassend geschlossen werden, dass durch eine hohe endogene Aktivität des hAAT-Promotors eine Transaktivierung durch die E1A-13S Region relativiert wird. Ist dagegen nur eine geringe oder keine endogene hAAT-Expression vorhanden, verstärkt sich die Transaktivierung des in den Ad5hAAT-tTS inserierten hAAT-Promotors durch Ad5-pTRE-13S-bgh.

In der Primärzellkultur bestätigte sich dieses Resultat allerdings nicht, so dass angenommen werden kann, dass die autonome Replikation der Tumorzellen im Gegensatz zum ruhenden Zellstadium der Primärzellkultur einen wichtigen Aspekt zur Aktivierung heterologer Promotoren durch die E1A-13S Region darzustellen scheint. Diese Hypothese wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter erörtert.

Zudem konnte grundsätzlich demonstriert werden, dass die Spezifität des hAAT-Promotors nicht auf hepatogene Zellen beschränkt ist, sondern auch andere hier

untersuchte Tumor-Zelllinien eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Aktivität aufweisen. Hierbei zeigten HepG2 erwartungsgemäß die stärkste Aktivität, die in absteigender Reihenfolge von HT-29 und LS174-T gefolgt wurde. Die Zelllinien EA.hy926 und Kyse140 wiesen keine endogene Promotoraktivität auf.

In einem abschließenden Versuch wurden EA.hy926- und HepG2-Zellen für ein Cell-Killing-Assay zum einen mit dem AdV-tTS-RRCA-System und zum anderen mit dem AdV-hAAT-tTS-RRCA-System transfiziert.

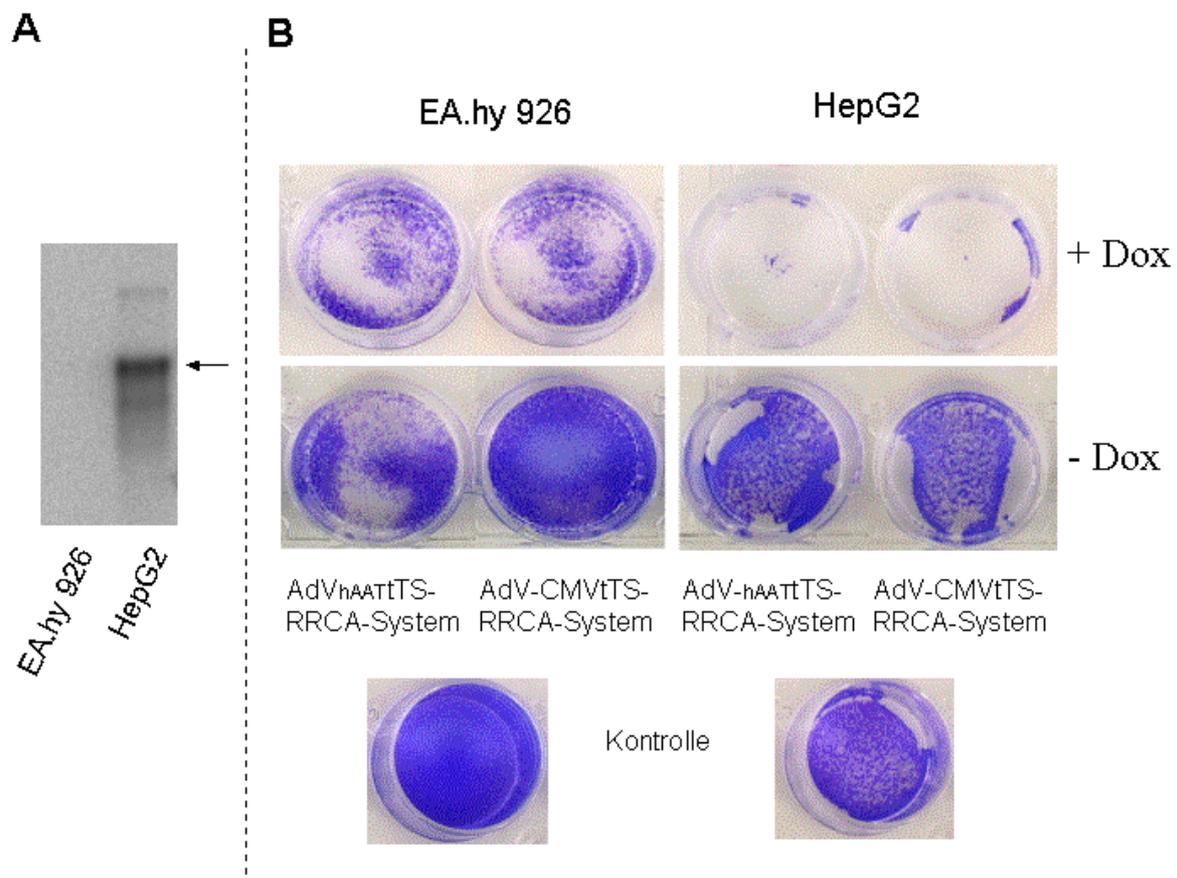


Abbildung 4.41.: Cell-Killing-Assay; Vergleich zwischen AdV-tTS-RRCA- und AdV-hAAT-tTS-RRCA-System in EA.hy926 und HepG2

A: Nachweis der endogenen hAAT-mRNA-Expression; B: Cell-Killing-Assay
Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-/Ad5hAAT-tTS: $2,5 \times 10^3$ p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 500 p/c; Dox $1 \mu\text{g/ml}$

Aus dem in Abbildung 4.41. wiedergegebenen Ergebnis wird offensichtlich, dass in der hAAT_{endogen}-negativen Zelllinie EA.hy926 das AdV-hAAT-tTS-RRCA-System unabhängig vom Dox-Status eine deutliche Zelllyse induziert, was die geringe Funktionalität des hAAT-kontrollierten tTS in dieser Zelllinie demonstriert. Allerdings

zeigt die etwas schwächer ausgeprägte Zellyse bei ausbleibender Dox-Applikation eine geringe Wirkung des hAAT-kontrollierten tTS auf. Der Einsatz des CMV-kontrollierten tTS dagegen verhindert in Abwesenheit von Dox weitaus wirkungsvoller die Zellyse, wobei bei Dox-Applikation eine effektive Induktion der Zellyse auftritt, die vergleichbar mit dem AdV-hAAT-tTS-RRCA-System ist. In der hAAT_{endogen}-positiven Zelllinie HepG2 dagegen zeigt sich eine analoge Funktionalität zwischen CMV- und hAAT-kontrollierten tTS, und die Regulierbarkeit beider Systeme ist eindeutig gegeben.