

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

## **Molekulare Expressionsanalyse und Replikationskinetik des rekombinanten E1/E3-deletierten adenoviralen Vektors AdYB-1**

Gabriel Glockzin

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher
2. Priv.-Doz. Dr. A. Krüger

Die Dissertation wurde am 14.04.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2005 angenommen.

**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen**

293	Zelllinie, embryonale Niere, transformiert mit E1A
A-549	Zelllinie, humanes Bronchialkarzinom
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Ad	Adenovirus
Ad2 / Ad5	Adenovirus Typ 2 / Typ 5
Ad312	Adenoviraler Vektor, E1A-deletiert
ADP	Adenoviral death protein
AdYB-1	Adenoviraler Vektor, der das Protein YB-1 exprimiert
AFP	Alpha-Fetoprotein
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATF	Activating transcription factor
β-Gal	Beta-Galaktosidase
bp	base pairs (Basenpaare)
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
Ci, μCi	Curie, Mikrocurie
cm / mm / nm	Centi- / Milli- / Nanometer
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CPE	Cytopathic effect
CsCl	Cäsiumchlorid
CR	conserved region
CSD	cold shock domain (Kälteschockdomäne)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+)
CTP	Cytosintriphosphat
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DBP	DNA-bindendes Protein
dest.	destilliert
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestilatum

---

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F	zellulärer Transkriptionsfaktor
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
Enh	Enhancer
EtBr	Ethidiumbromid
EGF	Epithelial growth factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe	Eisen
g / mg / µg / ng	Gramm / Milli- / Mikro- / Nanogramm
GFP	Green fluorescent protein
GI	Gastrointestinal-
Glc	Glukose
Gln	Glutamin
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony stimulating factor
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HeLa	Zelllinie, humanes Cervixkarzinom
HPV	Humanes Papilloma-Virus
hsp	heat shock protein (Hitzeschockprotein)
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITR	Inverted terminal repeats
K	Kalium
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> / K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Kaliumhexacyanoferrat(II) / (III), Blutlaugensalz gelb / rot
kb	kilobase
KD (K)	Kilodalton
l / ml / µl	Liter / Milliliter / Mikroliter
LacZ	Beta-Galaktosidase-Gen

---

Luc	Luziferase-Gen
M / mM	molar / millimolar
MDR	Multidrug resistance (Vielfachresistenz)
Min.	Minute/n
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MLP	Major late promoter
MLTU	Major late transcription unit
MOI	Multiplicity of infection
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF	Nuclear factor
NSCLC	Non small cell lung cancer
OD	Optische Dichte
orf	open reading frame (offener Leserahmen)
<sup>32</sup> P	Phosphor 32 (radioaktives Element)
p53	Tumorsuppressorprotein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
pCMV-E4orf6	E4orf6-Plasmid
Pen	Penicillin
pfu	plaque forming units
p.i.	post infectionem
PMT	Pseudomonas aeruginosa Methyltransferase
PNS	Peripheres Nervensystem
Pol	Adenovirale DNA-Polymerase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Rb/pRb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCLC	Small cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Saline-sodium citrate
Std.	Stunde/n

---

Strep	Streptomycin
SV40	Simian Virus
T <sub>m</sub>	Annealing-Temperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TP / pTP	Terminales Protein / präterminales Protein
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
u	unit
U-2OS	Zelllinie, humanes Osteosarkom
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT-Ad5	Wildtyp des humanen Adenovirus Typ 5
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
YB-1	Y-Box bindendes Protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Maligne Tumoren und Tumorbiologie	10
1.2	Tumorthherapie und Vielfachresistenz	11
1.3	Humaner Transkriptionsfaktor YB-1	12
1.4	Gentherapie	14
1.5	Adenoviren	15
1.5.1	Einteilung und Struktur	15
1.5.2	Genomstruktur	16
1.5.3	Adenoviraler Vermehrungszyklus	17
1.5.4	Adenovirale E1A-Region	19
1.5.5	Frühe adenovirale Gene E1B-55K und E4orf6	21
1.5.6	E2-early- und E2-late-Promotor	23
1.5.7	Experimenteller Nachweis der adenoviralen DNA-Replikation	26
1.5.8	E3-Region und zytopathischer Effekt	27
1.6	Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie	28
1.7	Zielsetzung der Arbeit	32
<b>2</b>	<b>Methoden und Materialien</b>	<b>33</b>
2.1	Verwendete Viren/Vektoren	33
2.2	Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.1	Geextraktion	35
2.2.2	Konzentrationsbestimmung	36
2.3	Viruspräparation	36
2.3.1	Infektion von 293-/293-PMT-Zellen	36
2.3.2	Virusisolation	37
2.3.3	Virusreinigung	37
2.3.4	Titerbestimmung	38
2.3.5	Überprüfung der Vektoren auf E1A	38
2.4	Zellkultur und Zellsplitting	39
2.5	Infektion der Zellen mit Adenoviren	40
2.6	RNA-Isolation	40

---

2.7	Northern Blot	41
2.7.1	Gelelektrophorese	41
2.7.2	Blotten	41
2.7.3	Radioaktive Markierung der Sonden	41
2.7.4	Hybridisierung	42
2.8	DNA-Isolation	42
2.9	Southern Blot	42
2.10	Verwendete Plasmide	43
2.11	Transformation kompetenter Zellen	44
2.12	Plasmidpräparation von pCMV-E4orf6	44
2.13	Restriktion	46
2.14	Ligation	46
2.15	Transfektion verschiedener Zelllinien	46
2.16	Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (pfu)	47
2.17	Luziferase-Assay	47
2.18	X-Gal-Färbung	47
2.19	Kristallviolett-Färbung	48
2.20	FACS-Analyse	48
2.21	Materialien und Reagenzien	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1	Evaluation der Infektionseffizienz	52
3.2	Replikationsanalysen	54
3.3	Expressionsanalyse von AdYB-1	57
3.3.1	Expression der E1-Region	58
3.3.2	Expression der E2-Region	60
3.3.3	Expression der E3-Region	61
3.3.4	Expression der E4-Region	62
3.3.5	Expression der L4-Region	63
3.4	Kinetikstudien	63
3.4.1	Produktion Plaque-bildender Einheiten	64
3.4.2	Induktion von CPE	67
3.4.3	Freisetzung Plaque-bildender Einheiten	71
3.5	Substitution von E1B-55K und E4orf6	72

---

3.6	Adenoviraler E2-early Promotor	74
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1	Adenovirale DNA-Replikation von AdYB-1	88
4.1.1	MOI und Zellzyklusphase beeinflussen die E1A-unabhängige adenovirale DNA-Replikation	89
4.1.2	Die E1A-unabhängige DNA-Replikation ist abhängig von der infizierten Zelllinie	91
4.1.3	Die E1A-unabhängige DNA-Replikation von AdYB-1 ist nicht E4-vermittelt.	92
4.1.4	Die nukleäre Akkumulation von YB-1 erleichtert die E1A-unabhängige DNA-Replikation.	93
4.1.5	AdYB-1 zeigt eine für den therapeutischen Einsatz insuffiziente DNA-Replikation <i>in vivo</i> .	96
4.2	Die Expression der frühen adenoviralen Gene E1B-55K und E4orf6 verbessert die Effizienz der viralen Partikelbildung.	96
4.3	Kinetikstudien von AdYB-1 und Ad312	99
4.3.1	Die Überexpression von YB-1 fördert die Produktion viraler Partikel.	99
4.3.2	YB-1 induziert CPE in AdYB-1-infizierten Zellen.	100
4.3.3	Die Überexpression von YB-1 führt zu einer effizienten Freisetzung neu synthetisierter Adenoviren.	102
4.4	Adenoviraler E2-early-Promotor	102
4.4.1	Der adenovirale E2-early-Promotor kann E1A-abhängig und E1A-unabhängig induziert werden.	103
4.4.2	Der SV40-Enhancer aktiviert den adenoviralen E2-early-Promotor unabhängig von E1A.	104
4.4.3	Die Aktivierung des adenoviralen E2-late-Promotors ist entscheidend für die E1A-unabhängige DNA-Replikation.	105
4.5	Einsatz onkolytischer Adenoviren in klinischen Therapie-konzepten – ein Ausblick	106
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>



---

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>131</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Tumoren und Tumorbiologie

Maligne Erkrankungen zählen heute zu den führenden Todesursachen in Deutschland und Europa in der Altersgruppe unter 65 Jahren (WHO, 1997). Zwar nehmen Inzidenz und Mortalität im höheren Lebensalter weiter zu, ihre statistische Bedeutung tritt dann aber weit hinter die der Herz-/Kreislaufkrankungen zurück. Über ihre Rolle in der Todesursachenstatistik hinaus nehmen Tumorerkrankungen entscheidenden Einfluss auf die zunehmende Verschlechterung der Lebensqualität betroffener Patientinnen und Patienten.

Formal entstehen maligne Tumoren in vier Schritten (Mehrschritt-Theorie der Karzinogenese). Am Anfang der Tumorentstehung steht die maligne Transformation somatischer Zellen (Onkogenese). Es folgen klonales Wachstum, Invasion und schließlich die Metastasierung. Die Transformation erfolgt durch exogene Veränderungen der zellulären DNA durch Strahlung wie z.B. Röntgen- oder UV-Strahlung, chemische Karzinogene wie aromatische Kohlenwasserstoffe, synthetische Steroide, Pilztoxine uvm. und Viren wie diverse HPV-Typen, EBV, HSV-II, HBV und Onkornaviren oder aber endogen durch Vererbung und spontane Mutationen. Diese Alterationen betreffen entweder die sogenannten Protoonkogene, deren Genprodukte als Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren oder ‚second messengers‘ wesentliche Funktionen bei der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung übernehmen, oder Tumorsuppressorgene wie das p53- oder das Retinoblastom(Rb1)-Gen, die unter physiologischen Bedingungen eine überschießende Zellproliferation verhindern. Häufig sind bis zur Entstehung eines malignen Tumors mehrere solcher DNA-Schädigungen in Form von Gen-Amplifikation (z.B. c-/L-myc: SCLC, HER-2/neu: Mamma-/Ovarialkarzinom), chromosomaler Translokation (z.B. 8;14: Burkitt-Lymphom, 9;22 = Philadelphia-Chromosom: CML), (Punkt-)Mutation (z.B. Ki-ras: Adenokarzinom des Pankreas) oder Integration einer primär nicht onkogenen Sequenz (insertional mutagenesis: z.B. HCC durch HBV) notwendig. Ist durch die Transformation eine neoplastische Zelle entstanden, so vermehrt sich diese zunächst durch klonales Wachstum. Der entstehende Tumor wird anfangs per diffusionem versorgt. Ab einer Größe von 1-2 mm erfolgt die Tumorangiogenese und die Entwicklung von Tumorstroma. Durch die genetische Instabilität der Tumorzellen wird die Tumorzellpopulation zunehmend heterogen. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird durch das Verhältnis von Zellproduktions- zu Zellverlustrate durch Apoptose und Nekrose bestimmt. Mit zunehmender Größe erfolgt

schließlich die Invasion des malignen Tumors in das umgebende Gewebe durch Tumorzell-Dissoziation, enzymatische Degradation extrazellulärer Matrix und aktive Migration (Lokomotion) der Tumorzellen. Endpunkt der Karzinogenese ist die Metastasierung durch Eindringen der Tumorzellen in Lymphgefäße, Blutgefäße und Körperhöhlen. Es folgt die Verschleppung von einzelnen Tumorzellen oder Tumorzellverbänden und Anwachsen am Zielort im Sinne einer distinkten oder diffusen Metastasierung. Lokales Wachstum, Invasion und Metastasierung haben lokale und systemische klinische Auswirkungen. Dazu gehören Stenosen kanalikulärer Organe und tumornaher Gefäße, Tumorthrombosen und Tumorembolien, Funktionsstörungen von Organen und Geweben durch lokale Kompression und Invasion sowie Ulzerationen und Gefäßarrosionen mit Blutungen und Fistelentstehung. Systemische Folgen sind u.a. hormonelle Überfunktionssyndrome durch autonome endokrine Tumoren und eine Vielzahl von paraneoplastischen Syndromen. Die Progression der malignen Tumorerkrankung führt häufig zur Tumorkachexie mit zunehmender Abmagerung, Leistungsminderung, Appetitlosigkeit, Anämie und Apathie und schließlich zum Tod des Patienten.<sup>12</sup>

## 1.2 Tumorthherapie und Vielfachresistenz

Obwohl die Weiterentwicklung und Kombination etablierter Therapieoptionen wie Chemotherapie, Strahlentherapie und chirurgischer Intervention sowie eine verbesserte Diagnostik die Prognose zahlreicher Tumorentitäten in den letzten Jahren und Jahrzehnten deutlich verbessert hat, sind viele maligne Tumoren bis heute medizinisch nicht dauerhaft beherrschbar. In diesem Zusammenhang stellt die Resistenzentwicklung maligner Tumoren ein zentrales Problem der kurativen aber auch palliativen Krebstherapie mit Zytostatika dar. So ist die sogenannte Vielfachresistenz (multidrug resistance) für etwa die Hälfte der Non-Responder bei Chemotherapie verantwortlich. In den vergangenen zehn Jahren wurden eine ganze Reihe speziell gegen vielfachresistente Tumoren gerichteter Medikamente, sogenannte ‚multidrug resistance reversal agents‘, in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt, die allerdings bis heute keinen festen Platz in klinischen Therapieschemata gefunden haben.<sup>150</sup>

Eine Zytostatikaresistenz maligner Tumore wurde erstmals 1950 im Tiermodell entdeckt und beschrieben.<sup>19</sup> Gut zwanzig Jahre später, im Jahre 1973, konnte Dano den aktiven Transport von Daunomycin aus Tumorzellen mit Kreuzresistenz zu anderen

Zytostatika wie beispielsweise Vinblastin nachweisen<sup>27</sup>. 1976 folgte die Identifizierung des P-Glykoproteins, eines membranständigen ATP-abhängigen Medikamententransporters aus der Familie der ABC-Transporter<sup>76</sup>, und 1987 der codierenden Gensequenz (human multidrug resistance (MDR1) gene)<sup>182</sup>. Die physiologische Funktion der ABC-Transporter scheint der Schutz der Zelle gegen Schwermetalle und potentiell toxische Xenobiotika zu sein. Ihre Überexpression in der Tumorzelle kann allerdings durch den aktiven Transport zytotoxischer Substanzen aus dem Intrazellulärraum während einer Chemotherapie zur Resistenz führen. In der Folgezeit wurden eine Reihe weiterer ABC-Transporter und anderer Resistenzmechanismen entdeckt. Die P-Glykoprotein-vermittelte Vielfachresistenz zählt allerdings bis heute zu den am besten untersuchten. Die Expression des MDR1-Gens wird u.a. durch das Y-Box bindende Protein 1 (YB-1), einen humanen Transkriptionsfaktor, reguliert. Damit kommt YB-1 eine zentrale Bedeutung bei der Resistenzentwicklung maligner Tumoren zu.<sup>6,87</sup>

### 1.3 Humaner Transkriptionsfaktor YB-1

Der humane Transkriptionsfaktor YB-1 besteht aus drei Teilen, dem Amino-(N-)Terminus, der von prokaryotischen Kälteschock-Proteinen ausgehenden, hoch konservierten Kälteschockdomäne (cold shock domain, CSD) und dem Carboxyl-(C-)Terminus. Das Protein ist in der Lage direkt mit DNA, RNA und anderen Proteinen wie dem zellulären Transkriptionsfaktor p53 zu interagieren und besitzt enzymatische Aktivität. Seine DNA-Bindungsdomäne ist die invertierte CCAAT-Box (Y-Box),<sup>28</sup> die sich in den Promotorregionen diverser zellulärer, vor allem wachstumsassoziierter Gene findet.<sup>110,139,197</sup>

Unter genotoxischem Stress, beispielsweise durch Zytostatika<sup>6</sup>, Hyperthermie<sup>119,165</sup> oder UV-Bestrahlung<sup>84</sup>, kommt es wie beim Übergang in die S-Phase ebenfalls zu einer Kernlokalisierung von YB-1. Dieses sogenannte ‚Shuttling‘ scheint entscheidend für den Schutz der Zelle vor zytotoxischen Effekten zu sein. Eine vermehrte Kernlokalisierung von YB-1 wurde auch im Zusammenhang mit der Zytostatika-Resistenz humaner Tumoren (MDR: Multidrug resistance) beobachtet<sup>6,137</sup>. Im Nukleus ist YB-1 wie oben beschrieben an der Regulation der Expression des MDR1-P-Glykoproteins beteiligt<sup>6,87</sup>. Die Expression des Multidrug-Resistenz assoziierten Proteins, MRP1, eines weiteren ABC-Transporters (ABC = ATP-binding cassette) wird ebenfalls durch YB-1 hochreguliert.<sup>165</sup> Durch die Regulation der Expression von Resistenzgenen kommt YB-1 auch eine Bedeutung als Prognosefaktor

bei NSCLC (nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom)<sup>161</sup>, Mammakarzinom<sup>6,73</sup>, Ovarialkarzinom<sup>78</sup>, Kolonkarzinom<sup>162</sup>, Osteosarkom<sup>137</sup>, Prostatakarzinom<sup>41</sup>, Synoviasarkom<sup>136</sup> und vermutlich einer Reihe weiterer Tumorentitäten zu. Durch die Regulation diverser Transkriptions- und Translationsvorgänge scheint YB-1 u.a. auch an der anaplastischen Transformation des Schilddrüsenkarzinoms beteiligt zu sein<sup>71</sup>.

Besonders gut bindet YB-1 an einsträngige oder durch das Zytostatikum Cisplatin modifizierte DNA, wobei es zur Interaktion mit den zelleigenen DNA-Reparatursystemen kommt. So besitzt YB-1 selbst eine 3'→5' Exonukleaseaktivität und interagiert mit der humanen Endonuklease III und dem Proliferations-Zell-Nucleären-Antigen (PCNA), das für den Haupt-DNA-Reparaturmechanismus, die Nucleotid-Excisions-Reparatur (NER), benötigt wird.<sup>72,83,104</sup>

In glomerulären Mesangiumzellen kann YB-1 die Expression der Metalloproteinase 2 (MMP-2) sowohl aktivieren als auch inhibieren<sup>22,116,117</sup>. Dieses Enzym ist u.a. in der Lage, Typ IV-Kollagen als Teil der Basalmembran von Endothelzellen zu degradieren. Dadurch kann der Übertritt von Tumorzellen ins Gefäßsystem ermöglicht werden. Im Tiermodell korreliert bei verschiedenen metastasierenden Tumoren eine Überexpression von MMP-2 mit einem erhöhten Metastasierungspotential.<sup>164</sup>

Darüber hinaus aktiviert und reprimiert YB-1 viele weitere zelluläre Transkriptions- und Translationsvorgänge, die insbesondere für die Zellproliferation und die Zellzykluskontrolle verantwortliche Genabschnitte betreffen. Diverse Y-Box-Proteine beeinflussen u.a. die Transkription des EGF-Rezeptors, der Thymidinkinase und der Topoisomerase II $\alpha$ .<sup>110,138,139,197</sup> Ebenso scheint die Signaltransduktionskaskade zur Zellproliferation unabhängig von einer funktionellen TATA-Box über die invertierte CCAAT-Box durch YB-1 aktivierbar zu sein<sup>89</sup>. Entscheidend für die Funktionen des Transkriptionsfaktors ist seine Lokalisation innerhalb der Zelle. Während das Protein in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, akkumuliert es während des G<sub>1</sub>/S-Phasen-Übergangs im Nukleus. Dort aktiviert der Transkriptionsfaktor u.a. die Expression von Cyclin A und Cyclin B1. Diese beiden Proteine regulieren die Zellzyklusprogression in der S-Phase und den Übergang von der G<sub>2</sub>- zur Mitose-Phase.<sup>77</sup>

Auch an der Regulation Zelltod-assoziiierter Gene ist der Transkriptionsfaktor beteiligt. Zusammen mit weiteren Faktoren reprimiert YB-1 beispielsweise den *fas*-Promotor. Fas (CD95) gehört zur Familie der TNF/NFG-Rezeptoren, die am Beginn einer Signalkaskade zur Apoptoseinduktion stehen. Somit inhibiert YB-1 über eine verminderte Fas-Expression den CD95-vermittelten programmierten Zelltod.<sup>90</sup>

Im E2-late-Promotor des Adenovirus Typ 5 konnten ebenfalls drei invertierte CCAAT-Sequenzen (Y-Boxen) nachgewiesen werden. Über eine Bindung in diesen Bereichen ist YB-1 in der Lage, durch eine direkte Interaktion mit dem Promotor die Expression der adenoviralen E2-Region zu aktivieren, und ermöglicht dadurch eine E1A-unabhängige adenovirale Replikation.<sup>62</sup> Adenoviren werden in zahlreichen klinischen und präklinischen Modellen als Vektoren in der Gentherapie maligner Erkrankungen eingesetzt.

## 1.4 Gentherapie

Aufgrund der Therapieresistenz zahlreicher Tumore kommt der Entwicklung neuer, additiver Konzepte in der Tumorthherapie besondere Bedeutung zu. Therapieoptionen wie die Hormontherapie (Prostatakarzinom, Mammakarzinom) sowie der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (Mammakarzinom: Herceptin®) und Proteininhibitoren wie z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren (CML, GIST: Glivec®) haben sich bei verschiedenen Tumorentitäten bereits klinisch etabliert. Ein solcher innovativer Ansatz ist auch der Transfer spezifischer Gene in die Tumorzelle und deren Expression mit Hilfe nicht viraler und viraler Vektoren (Gentherapie). Der Begriff „Gentherapie“ („gene therapy“) wurde erstmals 1970 verwendet und bezog sich zunächst auf das Einbringen von Genen zur Kompensation eines Gendefektes in der Zielzelle<sup>141</sup>. Somit galt er v.a. für die Behandlung angeborener genetischer Erkrankungen. Heute ist diese Definition auf das Einbringen jeglicher therapeutischer Gene in eine Zielzelle mit Hilfe eines Vektors erweitert und umfasst somit auch die Therapie zahlreicher erworbener Erkrankungen wie maligner Tumoren, Herz-Kreislaufkrankungen, Autoimmunerkrankungen uvm.

Der therapeutische Gentransfer kann *ex vivo* oder *in vivo* stattfinden. Zudem unterscheidet man somatische und Keimbahn-Gentherapie. Entscheidend für den Therapieerfolg ist neben der Wahl des therapeutischen Transgens auch die des richtigen Transfersystems. Anforderungen an den idealen Vektor, der allerdings bis heute nicht gefunden wurde, sind effizienter und selektiver Gentransfer in die Zielzelle, hohe Sicherheit, leichte Manipulierbarkeit und die Möglichkeit der möglichst einfachen Produktion großer Vektormengen. Eine ganze Reihe nicht viraler und viraler Genvektoren und Transfersysteme, die diesen Anforderungen mehr oder weniger gerecht werden, stehen zur Auswahl. Zu den nicht viralen Gentransfer-Methoden zählen u.a. Transfektionen der Zielzellen mit nackter Plasmid-DNA, Lipid-DNA-Komplexen und Partikeln aus mit

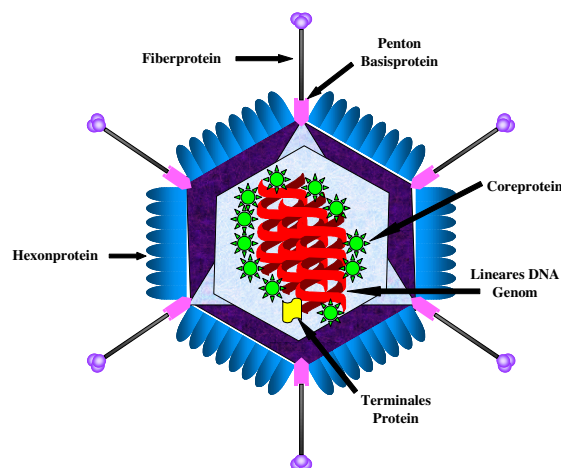
kationischen Polymeren kondensierter DNA. Als virale Vektoren werden verschiedene RNA- und DNA-Viren in präklinischen und klinischen Modellen eingesetzt. Hierzu gehören u.a. die ins Wirtsgenom integrierenden Retroviren (insbesondere murines Leukämie-Virus), die auf dem HIV basierenden Lentivirus-Vektoren (komplexe Retroviren) sowie das Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV1), die Adeno-assoziierten Viren (AAV) und die Adenoviren. Letztere gehören heute neben den Retroviren zu den am häufigsten verwendeten viralen Vektoren in der Gentherapie maligner Erkrankungen.<sup>23,143</sup>

## 1.5 Adenoviren

### 1.5.1 Einteilung und Struktur

Die Einteilung der Adenoviren erfolgt in zwei Gattungen, Mastadenoviren und Aviaadenoviren, sowie über 100 verschiedene Serotypen. Etwa 41 dieser Serotypen aus der Gruppe der Mastadenoviridae sind humanpathogen. Die meisten Adenovirus-Infektionen des immunkompetenten Erwachsenen verlaufen im Unterschied zum Kindesalter klinisch inapparent. Im Wesentlichen werden Epithelzellen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes sowie das Auge infiziert. So sind Adenoviren für etwa 5-10% der akuten respiratorischen Erkrankungen bei Kindern verantwortlich. Hierzu zählen die akute febrile Pharyngitis des Kleinkindes (Serotyp 1,2,5,6), das Pharyngokonjunktivale Fieber bei Kindern und Jugendlichen (Serotyp 3,7,14) und das insbesondere bei jungen Rekruten aufgetretene akute febrile respiratorische Syndrom (Serotyp 3,4,7,14,21). Die Infektion des Gastrointestinaltraktes führt bei Säuglingen und Kleinkindern zur Gastroenteritis mit akuter Diarrhoe (Serotyp 40, 41), die des Auges auch beim Erwachsenen zur epidemischen Keratokonjunktivitis (shipyard-eye, Serotyp 8).<sup>160</sup>

Adenoviren haben einen Durchmesser von 70-100 nm und einen isokaedrischen Aufbau. Ihr Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von ca. 36 kb Länge, die an beiden Enden sogenannte ‚inverted terminal repeats‘ (ITR) von je 100-165 bp Länge aufweist. An diese ITRs ist jeweils ein von der adenoviralen Genregion E2 codiertes Terminales Protein (TP) gebunden, das nach einer Infektion die Initiation der viralen DNA-Replikation ermöglicht. Das virale Genom wird von den Core-Proteinen umschlossen, welche wiederum von 252 das Viruskapsid bildenden Kapsomeren umgeben sind. Diese setzen sich aus 240 Hexon- und 12 Fiber-tragenden Penton-Proteinen zusammen.<sup>160</sup>



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Adenovirus.** Von innen nach außen folgen DNA, Core und Kapsid mit Fiberproteinen. Mit freundlicher Genehmigung der AG Plank, TUM, MRI, IEO

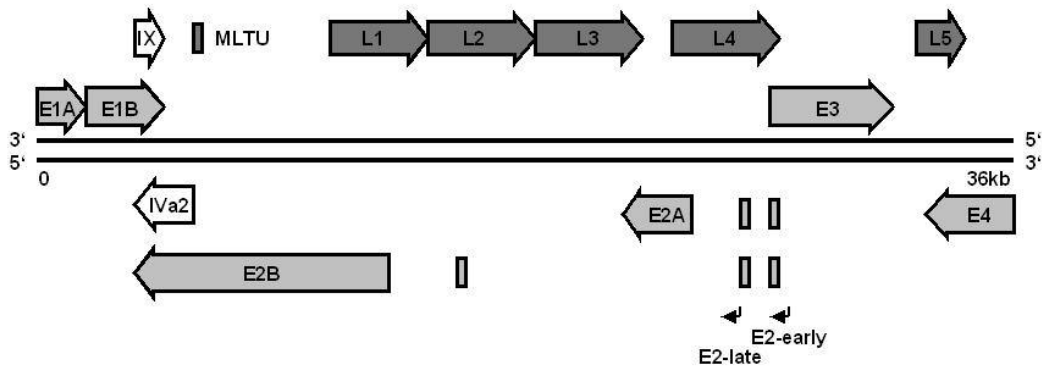
## 1.5.2 Genomstruktur

Entscheidend für den effizienten Ablauf des adenoviralen Vermehrungszyklus ist eine koordinierte Expression der viralen Gene. Das Genom des humanen Adenovirus Typ 5 (WT-Ad5) setzt sich aus drei Gruppen von Genen zusammen, die als frühe Gene (early genes, E1-E4), verzögerte frühe Gene (IX, IV2a) und späte Gene (late genes, L1-L5) bezeichnet werden. Die späten Gene werden als sogenannte ‚major late transcription unit‘ (MLTU) unter Kontrolle des ‚major late promoter‘ (MLP) zusammengefasst. Die Expression der adenoviralen Gene folgt einer genau definierten Chronologie.

Während die Genprodukte der frühen adenoviralen Gene insbesondere wichtige Funktionen für die virale DNA-Replikation haben, codieren die späten Gene v.a. für virale Strukturproteine. Alle Gene werden durch die adenovirale RNA-Polymerase II transkribiert. Das frühe Gen E1A wird als erstes exprimiert gefolgt von E2A, E3, E4, E1B und schließlich L1. Seine Genprodukte transaktivieren die Promotoren der anderen adenoviralen Gene.<sup>8,24,43,123,149</sup> Die Proteinsynthese erfolgt an den Ribosomen der Wirtszelle. Die zelleigene Proteinbiosynthese wird inhibiert.<sup>160</sup>

Die Transkriptionskarte von WT-Ad5 gibt Lage und Transkriptionsrichtung der genannten Gene schematisch wieder.

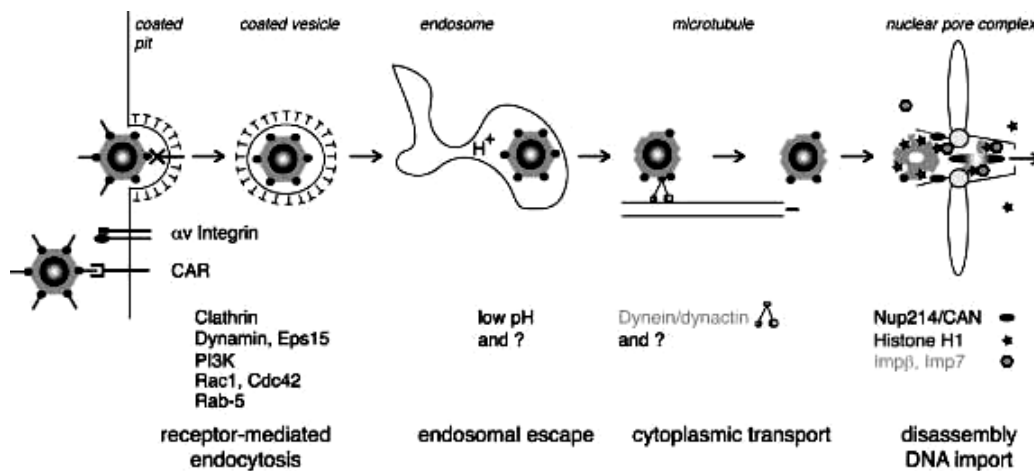




**Abb. 2: Transkriptionskarte von WT-Ad5.** Die Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung der verschiedenen Gene. Die Linien symbolisieren das doppelsträngige Virusgenom. Die frühen viralen Gene sind mit E1-E4, die intermediären mit IVa2 und IX und die späten mit L1-L5 bezeichnet. MLTU = Major Late Transcription Unit unter Kontrolle des Major Late Promoter (MLP). Modifiziert nach: Leppard KN, *J. Gen. Virol.* **78** 2131-2138 (1997)

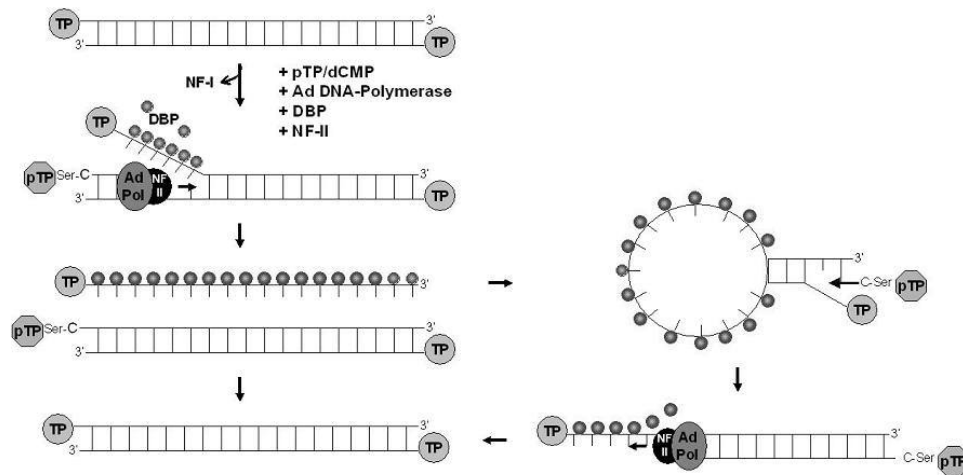
### 1.5.3 Adenoviraler Vermehrungszyklus

Der Vermehrungszyklus des humanen Adenovirus Typ 5 (WT-Ad5) mit einer Gesamtdauer von 20-24 Stunden lässt sich in zwei Phasen einteilen, die durch die Initiation der adenoviralen DNA-Replikation etwa 8-12 Stunden post infectionem (p.i.) getrennt werden. Die frühe Phase beginnt mit der Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Es folgen die Penetration mit Übertritt des Virus ins Zytoplasma, der Transport der viralen DNA in den Nukleus sowie Transkription und Translation der frühen adenoviralen Gene. Grundlage der Wirtszell-Infektion ist die Interaktion der adenoviralen Fiberproteine mit dem zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), einem Transmembranprotein, das zur Familie der Immunglobuline gehört, und Integrinen. CAR wird in vielen humanen Geweben und Organen exprimiert. Hierzu gehören Herz, Pankreas, ZNS, PNS, Prostata, Testes, Lunge, Leber und GI-Trakt. Auf B- und T-Zellen sowie in adultem Muskelgewebe ist nahezu keine CAR-Expression nachweisbar. Darüber hinaus konnte auch eine CAR-unabhängige Endozytose viraler Partikel nachgewiesen werden, deren Bedeutung für den infektiösen Zyklus allerdings nicht eindeutig geklärt ist. Im Anschluss an die zytoplasmatische Internalisation des Virus wird dieses entlang mikrotubulärer Strukturen aktiv zum Nucleus transportiert, und die virale DNA in das Zellkerninnere freigesetzt, wo schließlich die Expression der frühen viralen Gene erfolgt. Die resultierende Initiation der DNA-Replikation schließt die frühe Phase des viralen Zyklus ab.<sup>115,160</sup>



**Abb. 3: CAR-vermittelte Endozytose von Ad2 und Ad5 in Epithelzellen.** Fiber-CAR-Interaktionen führen zur Aktivierung von  $\alpha_V$ -Integrinen und zur Clathrin-vermittelten Endozytose. Der intrazelluläre Transport erfolgt entlang mikrotubulärer Strukturen zum Nukleus. Es folgt der Übertritt der viralen DNA in den Zellkern über Interaktion mit dem Kernporenkomplex-Rezeptor CAN/Nup214. Entnommen aus: Meier and Greber, *J. Gene Med.* **6**, 152-163 (2004)

Die adenovirale DNA-Replikation bildet die Grundlage für die Produktion neuer adenoviraler Partikel und erhöht die Expression der viralen Gene. Sie beginnt mit der Akkumulation der durch die virale E2-Region codierten Genprodukte und dem Übergang der infizierten Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Die drei für die DNA-Replikation essentiellen Proteine sind die virale DNA-Polymerase, das präterminale Protein und das DNA-bindende Protein (DBP). Weiterhin werden drei zelluläre Kernaktoren, NF-I, NF-II und NF-III, benötigt. Das präterminale Protein ermöglicht die Initiation der adenoviralen DNA-Polymerase. Die Replikation der viralen DNA erfolgt semikonservativ. Während der eine parentale DNA-Strang kontinuierlich repliziert wird (Typ I-Replikation), lagern sich an den anderen DNA-bindende Proteine an. Das DBP stabilisiert die einzelsträngige Virus-DNA und verhindert so die Ausbildung doppelsträngiger Strukturen sowie den Abbau durch zelluläre Nukleasen. Der stabilisierte Einzelstrang bildet mit Hilfe komplementärer Sequenzen an beiden Enden eine Pfannenstielstruktur aus, die die Bindung eines weiteren Initiationskomplexes und damit die dann ebenfalls kontinuierliche Replikation der quasizirkulären DNA ermöglicht (Typ II-Replikation). Auf diese Weise entstehen im Gegensatz zur Replikation beispielsweise des humanen Genoms keine sogenannten Okazaki-Fragmente, die anschließend wieder ligiert werden müssen.<sup>160</sup> Die folgende Abbildung stellt die adenovirale DNA-Replikation schematisch dar.



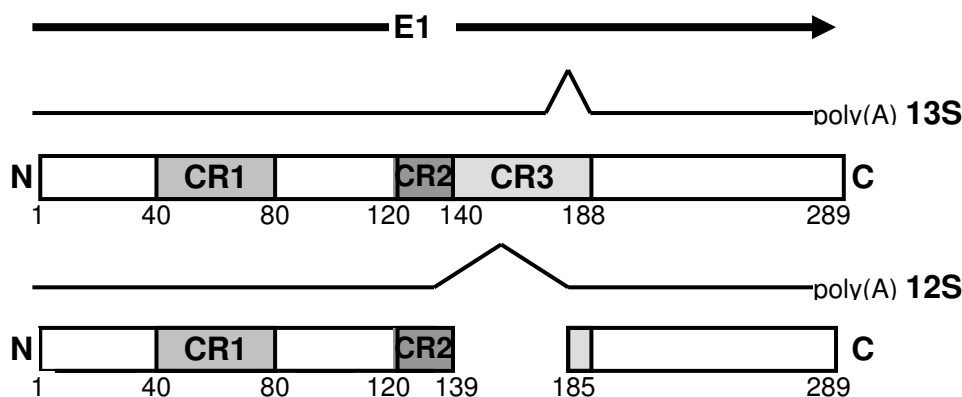
**Abb. 4: Adenovirale DNA-Replikation.** Das Virusgenom wird semikonservativ repliziert. Ein parentaler DNA-Strang wird kontinuierlich synthetisiert. Der andere wird durch E2A-Proteine komplexiert, bildet eine quasizirkuläre Struktur, und ermöglicht erst so die dann ebenfalls kontinuierliche Replikation. Modifiziert nach Modrow S, Falke D: Adenoviren. In: Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 391-411 (1997)

Die späte Phase des adenoviralen Vermehrungszyklus umfasst die Produktion der viralen Hüll- und Strukturproteine, die Verpackung der replizierten DNA und schließlich die Freisetzung der produzierten viralen Partikel durch aktive Lyse der Wirtszelle. Hinzu kommen Vorgänge wie die Adenovirus-induzierte Zellzyklus-Progression der Wirtszelle, Apoptose-Inhibition, Inhibition der zellulären Transkription und Translation sowie die Interaktion mit der Immunabwehr des Wirtsorganismus. Viele dieser Funktionen adenoviraler Genprodukte werden synchron ausgeübt und lassen sich daher keinem konkreten Zeitpunkt des Vermehrungszyklus zuordnen. Für eine effektive adenovirale DNA-Replikation und Virusvermehrung sind eine ganze Reihe verschiedener Interaktionen zwischen viralen und zellulären Proteinen und Signalkaskaden notwendig.<sup>115,160</sup>

#### 1.5.4 Adenovirale E1A-Region

Dem adenoviralen E1A-Protein kommt eine Schlüsselrolle bei der viralen DNA-Replikation zu. Diese beinhaltet die Aktivierung der übrigen frühen viralen Gene<sup>75</sup> und die Modulation der Zell-Zyklus-Progression (S-Phase-Induktion). Alternatives Splicing des E1A-Transkripts führt zu verschiedenen E1A-mRNA-Molekülen, von denen die 12S und die 13S mRNA, welche für ein kleines (243R) bzw. ein großes E1A-Protein (289R)

codieren, von besonderer Bedeutung sind. Diese Proteine stellen die Hauptgenprodukte der adenoviralen E1A-Region dar. Drei weitere Splicing-Varianten (11S, 10S, 9S) liefern in Zusammenhang mit der adenoviralen DNA-Replikation vermutlich weniger wichtige Proteine (217R, 171R, 55R). Das 9S-Genprodukt (55R) konnte sogar bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden.<sup>169</sup> Ein Vergleich der verschiedenen Adenovirus-Serotypen ergab innerhalb der E1A-Genprodukte drei hoch konservierte Regionen (CR),<sup>124</sup> die essentielle Bestandteile entscheidender E1A-Funktionen darstellen. Dies sind CR1 (AS 41-80), CR2 (AS 120-139) und CR3 (AS 140-188).



**Abb. 5: E1A-Region des Adenovirus Typ 5.** Die Abbildung zeigt schematisch die E1A-kodierende Sequenz des Ad5-Genoms, seine wichtigsten Splicing-Varianten, die 13S- und die 12S-mRNA, und die Protein- Grundstruktur der E1A-Genprodukte. Entnommen aus: Shenk T, Fields Virology, 3<sup>rd</sup> edition, 2111-2147 (1996)

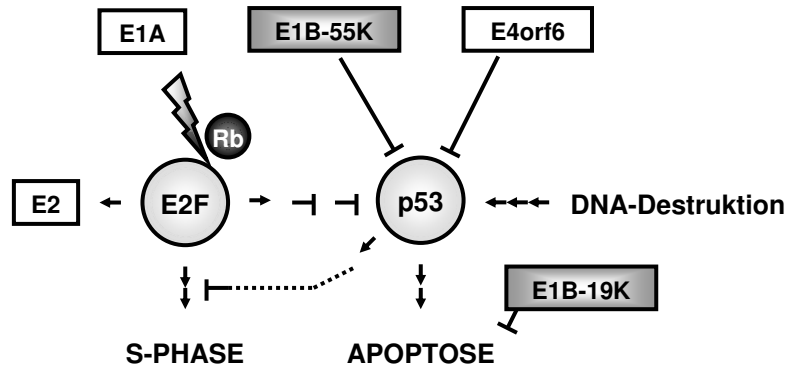
CR3 kommt nur innerhalb des 289R-Proteins vor. Die konservierte Region ist u.a. für die effektive Transaktivierung der frühen Gen-Promotoren E1B, E2-early, E3 und E4 verantwortlich<sup>8</sup>. Eine Domäne des C-Terminus von CR3 ermöglicht die Bindung an den Zielpromotor, eine Zinkfinger-Struktur über einen Promotor-gebundenen Aktivator die eigentliche Transkriptionsaktivierung.<sup>15,38,97</sup> Von besonderer Bedeutung ist die Aktivierung des E1A-induzierbaren E2-Promotors (E2-early) über die Freisetzung von E2F aus seiner Bindung zum Rb-Protein<sup>95,96,188</sup>. Das 243R-Protein verfügt ebenfalls über eine allerdings wesentlich schwächere Transaktivierungsfunktion<sup>190</sup>. Die Hauptfunktionen des 12S-mRNA-Genprodukts sind transkriptionelle Repression, Induktion der zellulären DNA-Synthese und virale Transformation infizierter Zellen. Sie beruhen auf Strukturen innerhalb der konservierten Regionen CR1 und CR2<sup>97</sup>. Mit den Bindungsstellen für das Rb-Protein innerhalb CR2 ist auch das E1A-243R-Protein in der Lage, E2F aus seiner Bindung zu Rb

freizusetzen, es fehlt jedoch die Bindung an die ATF-Bindungsstelle des adenoviralen E2-early-Promotors. Damit dient die Freisetzung des zellulären Transkriptionsfaktors E2F in diesem Fall weniger der Promotoraktivierung als vielmehr der S-Phase-Induktion in der Wirtszelle. E2F aktiviert verschiedene zelluläre Gene, die u.a. für das Onkogen c-myc, den Tyrosinkinase-Rezeptor-Liganden Elf-1, den Transkriptionsfaktor MyoD, die DNA-Polymerase  $\alpha$ , die Cycline A und E und das nukleäre Protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) codieren. Diese Gene übernehmen z.T. wichtige Funktionen bei der Zellproliferation.<sup>32</sup> CR1 unterstützt durch seinen stabilisierenden Einfluss die Funktionen von E2F.

### 1.5.5 Frühe adenovirale Gene E1B-55K und E4orf6

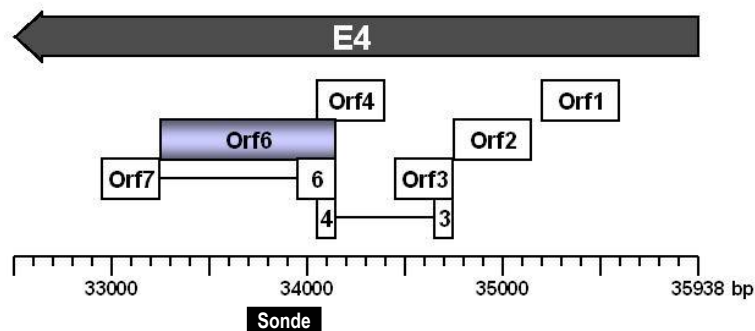
Das Phosphoprotein E1B-55K fungiert in der frühen Phase der Infektion als E1A-Antagonist und reprimiert über Komplexbildung mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 die Apoptose-Induktion. Zudem inhibiert E1B-55K die Transkription von p53 und unterstützt in Kooperation mit dem adenoviralen Genprodukt E4orf6 die Relokalisation von p53 ins Zytoplasma, wo dieses aktiv degradiert wird.<sup>107,147,158,174,175,189</sup> Aufgabe von p53 als Kontrollpunkt am Ende der G<sub>1</sub>-Phase des Zellteilungszyklus ist die Sicherstellung der vollständig abgelaufenen zellulären DNA-Replikation sowie der Integrität des Genoms, bevor die Zelle in die S-Phase (Synthesephase des Zellzyklus) übergeht. DNA-Destruktionen führen normalerweise zu einer Aktivierung von p53, welches dann den Übergang der geschädigten Zelle in die S-Phase inhibiert (Zellzyklus-Arrest) oder Apoptose induziert.<sup>107</sup> Die adenovirale p53-Inaktivierung durch E1B-55K ermöglicht somit den Übergang infizierter Zellen in die S-Phase, in der dann eine effektive adenovirale Replikation stattfinden kann<sup>158,174,189</sup>.

In der späten Phase der Infektion unterstützt E1B-55K in Kooperation mit dem E4orf6-Genprodukt die zytoplasmatische Akkumulation der späten viralen mRNA sowie das ‚mRNA-Shuttling‘ zwischen Nukleus und Cytoplasma und sorgt somit für eine effiziente Translation der viralen mRNA<sup>5</sup>. Verantwortlich für diese Funktion ist u.a. ein funktionelles, Leucin-reiches NES (nuclear export signal) innerhalb des viralen Proteins<sup>31</sup>. Gleichzeitig ist E1B-55K am sogenannten ‚Shutoff‘ des zellulären mRNA-Exportes und der zellulären Proteinsynthese beteiligt.



**Abb. 6: Funktionen der E1B-Region.** E1B-55K inhibiert in Kooperation mit E4orf6 die p53-vermittelte Apoptose-Induktion und ermöglicht den Übergang der Zelle in die S-Phase. Das Genprodukt E1B-19K inhibiert ebenfalls zelluläre Apoptose-Vorgänge. Modifiziert nach: McCormick, *Nat. Rev. Cancer* **1**, 130-141 (2001)

Das E4-Gen liegt am 5'-Ende des Ad5-Genoms. Das E4orf6-Genprodukt ist eines von sechs funktionellen E4-Proteinen, die nach ihren korrespondierenden Leserahmen mit E4orf1 bis E4orf6/7 bezeichnet werden<sup>91</sup>. Die für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse verwendete DNA-Sonde liegt zwischen bp 33701 und bp 34078 im Bereich der besonders gut untersuchten E4orf6- und E4orf6/7-Region. Die folgende Abbildung zeigt schematisch die Organisation der E4-Region, ihre Lagebeziehung zum Ad5-Genom und die Lage der verwendeten DNA-Sonde.



**Abb. 7: Ad5 E4-Gen mit offenen Leserahmen und Lage auf dem Ad5-Genom.** Der Zahlenstrahl repräsentiert das Ad5-Genom mit Längenangaben in Basenpaaren (bp) vom konventionellen 3'-Ende. Der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung an. Der schwarze Kasten zeigt die Lage der verwendeten DNA-Sonde. Modifiziert nach Leppard KN, *J. Gen. Virol.* **78**, 2131-2138 (1997).

Die Expression der E4-Gene erfolgt unter Kontrolle des E4-Promotors.<sup>40,185</sup> Dieser wird durch E1A-289R transaktiviert<sup>74,153</sup> und bleibt während des gesamten Replikationszyklus aktiv. Nach einer initial starken Expression erfolgt jedoch eine negative Transkriptionsregulation durch E2-DBP und E4orf4. In Abwesenheit von E4orf3 und E4orf6 inhibiert E4orf4 auch die E2-Expression.<sup>13,100,114,130</sup> Neben der Inhibition bei der p53-vermittelten Apoptose in Verbindung mit E1B-55K, spielt E4orf6 eine wichtige Rolle bei der adenoviralen DNA-Replikation, der Synthese der späten viralen Genprodukte, dem Shut-off der zellulären Proteinbiosynthese und der Produktion viraler Partikel<sup>52,65,187</sup>. In Kooperation mit E1B-55K kann E4orf6 E1A-verwandte Funktionen wahrnehmen, womit den beiden Genprodukten eine besondere Bedeutung bei der Replikation E1A-deletierter Adenoviren zukommt.

E4orf6 ist ebenso wie E4orf3 u.a. für die Akkumulation der späten viralen mRNA im Nukleus und deren Stabilisierung verantwortlich. Viele Funktionen von E4orf3 können durch E4orf6 kompensiert werden und vice versa. Dennoch scheinen die beeinflussten Signalkaskaden unterschiedlich zu sein. Beide Proteine unterstützen über noch unbekannte Mechanismen direkt und indirekt die Expression der späten Gene und die virale DNA-Replikation. Über Interaktionen mit Matrix-assoziierten Multiproteinkomplexen, den sogenannten ‚nuclear bodies‘ (NB), scheint insbesondere E4orf3 an der Reorganisation dieser Strukturen beteiligt zu sein. Die Assoziation von NB-Faktoren und E1B-55K mit den Kompartimenten der viralen Transkription und Replikation ist entscheidend für eine effiziente DNA-Replikation und Expression der späten adenoviralen Gene. Darüber hinaus werden E4orf3 und E4orf6 für das komplexe Splicing der MLTU benötigt. Während E4orf3 den Einschluss von Exonsequenzen bewirkt, ist E4orf6 für den Exon-Ausschluss im MLTU-Transkript verantwortlich. Trotz seiner zahlreichen Funktionen spielt E4orf3 keine kritische Rolle im adenoviralen Vermehrungszyklus.<sup>68,91,135,140,186</sup>

Eine Funktion, die von E4orf3 nicht kompensiert werden kann, ist die Destabilisierung von Komponenten der zellulären Doppelstrangbruch-Reparatur u.a. über Interaktion mit der DNA-abhängigen Proteinkinase.<sup>14,121</sup>

### 1.5.6 E2-early- und E2-late Promotor

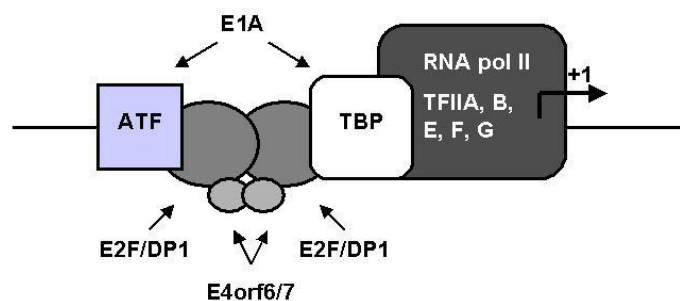
Die Expression der zentralen adenoviralen E2-Region wird durch zwei Promotoren, den E2-early- und den E2-late-Promotor kontrolliert. Der adenovirale E2-early-Promotor

kontrolliert die E2-Transkription während der frühen Phase der Infektion, bis es ca. 6 Std. p.i. mit dem sogenannten 'switch' zur Übernahme der Transkriptionskontrolle durch den E2-late-Promotor kommt. Der genaue Mechanismus dieser Expressionsübernahme ist noch unbekannt. Der E2-early Promotor setzt sich aus zwei sich überlappenden Promotorstrukturen mit zwei unabhängig voneinander kontrollierten Transkriptionsstartstellen bei Nukleotid +1 ('major promoter') und bei Nukleotid -26 ('minor promoter') zusammen.<sup>109,171</sup> Der Hauptpromotor (+1) wird etwa zwanzig mal stärker transkribiert als der Nebenpromotor (-26) und scheint damit entscheidend für die E2-early-Promotorvermittelte Expression der adenoviralen E2-Region verantwortlich zu sein. Beide Promotoren haben etwa 30 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts atypische TATA-Box-Sequenzen (-26: TAAATT; +1: TTAAGA), die eine Bindung des humanen TATA-Box bindenden Proteins (TBP) ermöglichen. Die TATA-Box ist bei Eukaryonten für die korrekte Initiation des Transkriptionsvorgangs verantwortlich. Die TTAAGA-Sequenz des E2-early-Hauptpromotors (+1) zwischen Nukleotid -22 und -30 erfüllt eine vergleichbare Funktion. Neben der TATA-Box-analogen Sequenz enthält der Hauptpromotor (+1) drei weitere Aktivierungselemente. Hierzu gehören zwei E2F-Bindungsstellen (TTTCGCGC) zwischen Nukleotid -36 und -43 sowie -60 und -67 in invertierter Orientierung zueinander und eine Bindungsstelle für den aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF), der zwischen Nukleotid -68 und -77 lokalisiert ist. Diese ATF-Bindungsstelle ist auch in den Promotoren der frühen adenoviralen Gene E3 und E4 sowie in einer Reihe cAMP-abhängiger zellulärer Promotoren nachweisbar. Sowohl E2F als auch ATF nehmen über ihre Interaktionen mit den adenoviralen Genprodukten E1A bzw. E4orf6/7 entscheidenden Einfluss auf die E2-Expression. In die E1A-unabhängige E2-early-Promotor-Aktivierung und die daraus resultierende sogenannte basale E2-Expression sind alle vier regulativen Elemente involviert.<sup>23,171</sup>

Im Mittelpunkt der E1A-vermittelten Induktion des adenoviralen E2-early-Promotors steht der zelluläre Transkriptionsfaktor E2F. Bereits im Jahre 1987 konnten Reichel et al. in der Teratomzelllinie F9 einen positiven Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen E2F-Aktivität und der adenoviralen E1A-Genexpression nachweisen<sup>148</sup>. Heute ist bekannt, dass diesem Zusammenhang die bereits in vorangegangenen Abschnitten erläuterte E1A-vermittelte Freisetzung von E2F aus seiner Bindung zu p107, einem Protein der Rb-Familie, zugrunde liegt. Die Promotoren von E1B, E3 und E4 werden durch freigesetztes E2F ebenso wenig aktiviert wie der adenovirale E2-late- und der Major Late Promotor (MLP).<sup>85</sup> Zusätzlich zu den beiden E2F-Bindungsstellen des E2-early-Promotors sind auch

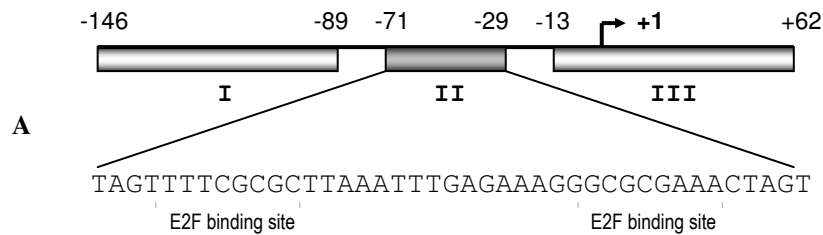


die Bindungsstelle für den aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF), sowie die TATA-Box-analoge Promotorsequenz für die E1A-Induktion notwendig. Neben der Freisetzung von E2F aus seiner Bindung zum Rb-Protein konnte auch eine direkte Interaktion von E1A mit den zellulären Transkriptionsfaktoren ATF und TBP nachgewiesen werden. Vermutet wird eine Brückenbildung zwischen TBP und E2F sowie zwischen TBP und ATF durch das E1A-Protein, die die Bildung eines stabilen Transkriptionskomplexes unterstützt. Direkte Interaktionen von E1A mit anderen adenoviralen Genprodukten scheinen für die E1A-vermittelte Transaktivierung des E2-early-Promotors keine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>171</sup>



**Abb. 8: Transaktivierung des E2-early-Promotors durch E1A.** E2F/DP1 = Heterodimer aus den Transkriptionsfaktoren E2F und DP1, ATF = aktivierender Transkriptionsfaktor, TBP = TATA-Box-bindendes Protein, TF = Transkriptionsfaktor. Entnommen aus: Swaminathan et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 177-194 (1995)

Das kleinste, von Imperiale et al. als E1A-induzierbar publizierte E2-early-Promotorkonstrukt umfasst 79 Nukleotide oberhalb des Transkriptionsstarts +1 und enthält alle vier Regulationselemente. Die Sequenz von Nukleotid -21 bis -79 ist essentiell für die E1A-vermittelte Promotorinduktion.<sup>69</sup> Zajchowski et al. haben jedoch mit Hilfe von Mutagenese und Co-Transfektion gezeigt, dass für eine vollständige E1A-Induktion weitere Elemente oberhalb und unterhalb des Transkriptionsstarts +1 des Wildtyp-E2-early-Promotors notwendig sind. Diese essentiellen Promotorsequenzen werden mit Element I, II und III bezeichnet, wobei Element II von Nukleotid -29 bis -71 nahezu dem von Imperiale et al. publizierten Minimalpromotor entspricht.<sup>194</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde für die Evaluation der E2-Early-Promotoraktivierung der vollständige E2-early-Promotor (bp -146 bis bp +62) eingesetzt.



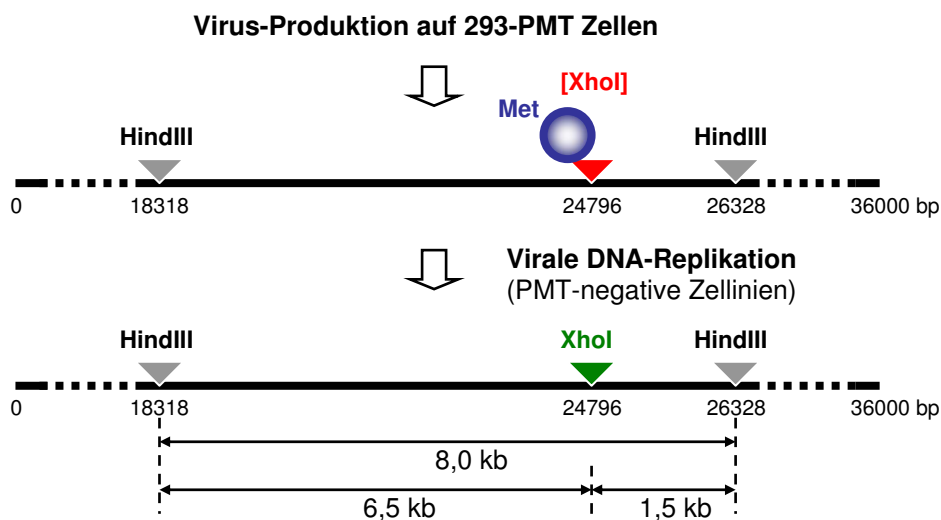
**Abb. 9: E2-early-Promotor-Konstrukt.** Die Abschnitte I, II und III sind für die volle Induktion durch E1A notwendig. Für den zentralen Teil II mit den beiden E2F-Bindungsstellen ist die DNA-Sequenz angegeben. Modifiziert nach Zaichowski et al., *Gene* **58**, 243-256 (1987)

Der adenovirale E2-late-Promotor kontrolliert die E2-Expression während der intermediären und der späten Phase der Infektion. Im Gegensatz zu den Promotoren der anderen frühen Gene ist der E2-late-Promotor durch die E1A-Genprodukte nicht transaktivierbar<sup>171</sup>. Der Promotor setzt sich aus drei essentiellen Kontrollelementen, Region I, II und III, zusammen. Region I beinhaltet die TATA-Box-analoga Sequenz TACAAATTT und eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1. Eine zweite sogenannte Sp1-Box befindet sich in Region II. Hinzu kommen mehrere invertierte CCAAT-Box-Sequenzen innerhalb des Promotors, die potente Bindungsstellen für den humanen Transkriptionsfaktor YB-1 darstellen.<sup>9</sup> Holm et al. konnten durch die Analyse von Promotormutanten zeigen, dass YB-1 durch Interaktion mit diesen Y-Boxen die E2-late-Promotor-vermittelte Genexpression aktiviert. Über diesen Mechanismus nimmt YB-1 Einfluss auf die adenovirale DNA-Replikation<sup>63</sup>.

### 1.5.7 Experimenteller Nachweis der adenoviralen DNA-Replikation

In der vorliegenden Arbeit wurde die adenovirale DNA-Replikation mit Hilfe des Northern Blot-Verfahrens nachgewiesen. Zusätzlich wurden methylierte Viren nach einem Verfahren von James E. Nelson und Mark A. Kay der Replikationsanalyse unterzogen. Dieses Verfahren ermöglicht es, zwischen Virus-DNA-Input (= durch die Infektion in die Zelle eingebrachte Viruslast) und neu produzierter Virus-DNA (= virale DNA-Replikation) zu differenzieren. Die verwendeten Viren wurden hierzu auf sogenannten 293-PMT-Zellen (freundlicherweise erhalten von André Lieber, Division of Medical Genetics, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA) vermehrt. Diese Zellen enthalten neben

der adenoviralen E1A-Region das *Pseudomonas aeruginosa* Methyltransferase-Gen und sind somit in der Lage, das virale Genom sequenzspezifisch an XhoI-Restriktionsstellen zu methylieren. Dadurch kann das Restriktionsenzym XhoI nicht mehr schneiden.<sup>127,166</sup> Infiziert man nun PMT-negative Zellen wie die verwendeten Tumorzelllinien mit den methylierten Viren, so entstehen durch die virale DNA-Replikation nur Partikel mit intakten, nicht methylierten XhoI-Schnittstellen. Dies ermöglicht durch eine spätere Restriktion mit HindIII und XhoI zwischen eingebrachter und replizierter viraler DNA zu differenzieren. Während die Input-DNA nur von HindIII geschnitten werden kann (8,0 kb-Fragment), verfügt die replizierte DNA zusätzlich über eine zwischen zwei HindIII-Schnittstellen liegende XhoI-Schnittstelle und liefert somit zwei Fragmente (6,5 kb und 1,5 kb), die im Southern Blot durch eine spezifische Sonde detektiert werden können.<sup>127</sup>



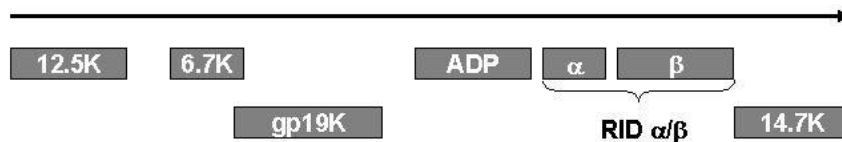
**Abb. 10: Virale Replikationsanalyse mit Hilfe methylierter Viren nach Nelson und Kay.**

<sup>Met</sup> ● = Methylierung, ▼ = Restriktionsstelle.

### 1.5.8 E3-Region und zytopathischer Effekt

Die Lyse der Wirtszelle durch die Induktion des sogenannten zytopathischen Effektes (CPE) ist entscheidend für die Freisetzung viraler Partikel und die Infektion umliegender Zellen. Sie spielt damit auch eine wichtige Rolle für den Einsatz adenoviraler Vektoren als onkolytische Viren in der Gentherapie. Ein zentraler Faktor bei der Induktion von CPE ist das in der adenoviralen E3-Region codierte Adenoviral Death Protein (ADP). ADP ist eines der diversen Proteine, die durch alternatives Splicing aus dem E3-Transkript entstehen. Die

Genprodukte der E3-Region haben wichtige Funktionen im Rahmen der Viruspersistenz in infizierten Zellen sowie der effektiven viralen Zellyse.<sup>193</sup> Für eine effiziente adenovirale DNA-Replikation sind sie nicht notwendig, weshalb die E3-Region in den meisten gentherapeutisch eingesetzten Vektoren zugunsten der Transgen-DNA deletiert ist.<sup>3,4,20</sup>



**Abb. 11: Expressionskarte der adenoviralen E3-Region.** Die grauen Boxen symbolisieren die sieben E3-Genprodukte. Der Pfeil zeigt die Transkriptionsrichtung. RID = receptor internalization and degradation proteins. Entnommen aus: Hawkins and Hermiston, *Gene Therapy* **8**, 1132-1141 (2001)

Im Gegensatz zu den übrigen Genprodukten der adenoviralen E3-Region, wird die Expression des E3-11.6K-Proteins (ADP) nicht durch den E3-Promotor, sondern im wesentlichen durch den Major Late Promoter (MLP) vermittelt. Somit wird das Adenoviral Death Protein v.a. in der späten Phase der Infektion ca. 20-24 Stunden p.i. synthetisiert. Es handelt sich hierbei um ein integratives Kernmembran-Glykoprotein, welches für die Induktion einer Art atypischer Apoptose der Wirtszelle sowie die effiziente Freisetzung der viralen Partikel in der Spätphase der Infektion verantwortlich ist. Als zugrunde liegender Mechanismus wird eine Interaktion mit dem Apoptose-protectiven E1B-19K-Protein und bcl-2 diskutiert.<sup>30,55,176</sup> Andere E3-Genprodukte wie beispielsweise E3-gp19K, E3-14.7K oder der 10.4K-14.5K-Proteinkomplex nehmen v.a. immunmodulatorische Funktionen wahr und sind daher entscheidend an der Viruspersistenz *in vivo* beteiligt<sup>64,94,142,176</sup>. Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Analysen spielen sie im Gegensatz zum E3-11.6K-Protein (ADP) eine untergeordnete Rolle.

## 1.6 Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie

Mit ihrer im Vergleich zu anderen Viren geringen Pathogenität, der hohen Infektionseffizienz und dem breiten Wirtsspektrum, das sich teilende, ruhende und ausdifferenzierte Zellen einschließt, erfüllen Adenoviren die verschiedenen Anforderungen an gentherapeutische Vektoren für einen effizienten und sicheren Gentransfer. Hinzu

kommen eine gute genetische Manipulierbarkeit, ein hoher Reinheitsgrad und die Möglichkeit zur Produktion hoher Virustiter. Als adenovirale Gentransfer-Vektoren werden insbesondere die Serotypen 5 und 2 eingesetzt, da für diese in Versuchen mit Rattenzellen im Gegensatz zu anderen Serotypen kein onkogenes Potential nachgewiesen werden konnte. Anfang der 90er Jahre wurden zunächst verschiedene Systeme mit replikationsinkompetenten adenoviralen Vektoren etabliert. Bei diesen Vektoren der ersten Generation wurde das E1A-Gen sowie die E3-Region deletiert.<sup>47</sup>

Die verschiedenen Ansatzpunkte der statt der deletierten Gensequenzen in das Virusgenom eingebrachten therapeutischen Transgene lassen sich im wesentlichen in fünf Kategorien einteilen: 1) Kompensation tumorspezifischer Mutationen, 2) molekulare Chemotherapie im Sinne einer Prodrug- bzw. Suizidgen-Therapie, 3) Gen-basierte Immuntherapie, 4) genetische Modulation der Resistenz bzw. Sensibilität und 5) Antiangiogenese. Da die meisten humanen Tumoren durch Verlust oder Mutation wichtiger regulatorischer Komponenten der Zellzyklus-Kontrolle entstehen, ist das Ziel einer gentherapeutischen Kompensation, die entsprechenden Gene entweder zu ersetzen oder zu inaktivieren. Ein solches in Tumorzellen häufig mutiertes Gen ist das p53-Tumorsuppressorgen, das normalerweise bei multiplen genetischen Alterationen in der Zelle Apoptose (programmierten Zelltod) induziert. Durch die Übertragung eines funktionellen p53-Gens (wt-p53) in Tumorzellen mit defektem p53-Status mit Hilfe adenoviraler Vektoren konnte *in vitro* und *in vivo* eine Verminderung von Tumorprogression und Metastasierung für verschiedene Tumorentitäten erreicht werden. Darüber hinaus kann die Zytostatika- und Strahlensensibilität einiger Tumoren durch den wiederhergestellten p53-Status deutlich erhöht werden.<sup>11,24,115,141,142</sup> Bei der Suizidgen-Therapie wird in das Genom des adenoviralen Vektors eine für ein sogenanntes Prodrug-Converting-Enzym codierende Gensequenz integriert. Durch die Expression dieses Gens in der Tumorzelle kann eine eigentlich nicht toxische Substanz (Prodrug) in ein wirksames Zytostatikum umgewandelt werden. Das bekannteste dieser Systeme ist HSV-TK (Herpes simplex Virus-Thymidinkinase) in Verbindung mit Ganciclovir. Bereits 1994 konnte die Wirksamkeit dieses Systems in einem adenoviralen Vektor in einem Mausmodell mit Hirntumoren (Gliomen) nachgewiesen werden<sup>21</sup>. Derzeit befinden sich verschiedene Vektoren mit dem HSV-TK/Ganciclovir-System in klinischen Studien. Die Gen-basierte Immuntherapie hat zum Ziel, die natürliche humorale und zelluläre Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Antigene zu verstärken. Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-6 (IL-6), Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) sind wichtige

Mediatoren dieser Immunantwort. Durch eine Internalisierung in die Tumorzelle und Überexpression dieser Zytokine mit Hilfe adenoviraler Vektoren kann daher eine immunogene Tumorregression erreicht werden.<sup>1,2,106,120,172,177,196</sup> Ein anderer Ansatz ist die Patienten-spezifische Vakzinierung. Hierzu wird das GM-CSF-Gen (Granulozyten/Makrophagen ‚colony stimulating factor‘) mit Hilfe adenoviraler Vektoren in autologen Tumorzellen zur Expression gebracht. Eine bei malignem Melanom eingesetzte Vakzine hat bereits Phase I der Klinischen Studien erfolgreich durchlaufen.<sup>86</sup> Schließlich kann auch durch die Inhibition der Tumorangiogenese hemmend in das Tumorstadium eingegriffen werden. Dies geschieht beispielsweise durch adenovirale Vektoren, die Angiostatin exprimieren. Angiostatin hemmt die Endothelzellproliferation und dadurch das Wachstum des Primärtumors und der Metastasen.<sup>51</sup>

Obwohl die replikationsinkompetenten adenoviralen Vektoren der ersten Generation hohe Transduktionsraten *in vitro* gezeigt und die Anforderungen an die Sicherheit der Therapie erfüllt haben, zeigen die Klinischen Studien, dass sie nicht für alle Therapie-strategien bei der Tumorbehandlung einsetzbar sind. Ein Problem ist die zeitlich relativ kurze und niedrige Transgenexpression in der Zielzelle *in vivo*. Eine effektive Therapie erfordert meist die wiederholte Applikation des therapeutischen Vektors über einen längeren Zeitraum. Die hohen Erwartungen an replikationsinkompetente Systeme in der Tumortherapie konnten somit bisher nicht erfüllt werden. Daher kommen in den letzten Jahren zunehmend selektiv replizierende adenovirale Vektoren zum Einsatz. Der Vorteil gegenüber den replikationsinkompetenten Vektoren liegt zum einen in der Induktion der viralen Lyse infizierter Zellen (Onkolyse) und zum anderen in einer deutlichen (bis zu 100fach) Erhöhung der Expression therapeutischer Transgene durch die Freisetzung viraler Partikel. Durch die Verbreitung der neu gebildeten Viren im umliegenden Gewebe können im Vergleich zu nicht replikativen Systemen deutlich mehr Tumorzellen durch den replikationskompetenten Vektor infiziert werden. Die Dauer der Transgenexpression lässt sich auf bis zu vier Wochen steigern.<sup>67</sup>

Bereits drei Jahre nach der ersten Isolation im Jahre 1953 wurden 30 Patientinnen mit Cervixkarzinom im Rahmen einer durch das National Cancer Institute initiierten klinischen Studie mit verschiedenen natürlich vorkommenden, also gentechnisch nicht manipulierten und damit replikationskompetenten Adenoviren behandelt. Ziel war die Zerstörung der entarteten Zellen durch virale Replikation. Auf eine initiale Tumorregression folgte damals bei allen Patientinnen eine erneute Tumorprogression.<sup>125,163</sup> In den 90er Jahren wurde die Idee des onkolytischen Adenovirus wieder aufgenommen und auf Grundlage der neuen

Erkenntnisse über Virus- und Tumorbologie mit den Möglichkeiten der Gentechnik kombiniert.<sup>23,111,125</sup> Ein entscheidendes Ziel der genetischen Manipulation ist die selektive Replikation der Vektoren in Tumorzellen. Drei Strategien haben hierbei in den letzten Jahren besondere Bedeutung erlangt: Die ersten beiden nutzen die Deletion viraler Gene, deren Verlust nur in der deregulierten Tumorzelle ausgeglichen werden kann (p53, Rb). Die dritte besteht in der Verwendung tumorspezifischer Promotoren. Einige dieser Systeme befinden sich derzeit in klinischen Studien.<sup>3,23,155</sup> So wurde bei dem adenoviralen Vektor dl1520 (ONYX-015) das E1B-55K-Gen deletiert, dessen Genprodukt normalerweise das zelluläre Tumorsuppressor-Protein p53 inaktiviert, dadurch die p53-abhängige Apoptose der Wirtszelle verhindert und die virale Replikation erlaubt. Auf diese Weise soll eine selektive Replikation in p53-negativen Tumorzellen erreicht werden.<sup>10,59</sup> Der adenovirale Vektor Delta24 trägt eine 24 bp große Deletion innerhalb der Region des E1A-Gens, die für die Bindung des Rb-Proteins verantwortlich ist. Die Interaktion zwischen adenoviralem E1A- und zellulärem Rb-Protein führt zur S-Phase-Induktion in der Wirtszelle und zur Freisetzung des zellulären Transkriptionsfaktors E2F. E2F bindet und aktiviert seinerseits den adenoviralen E2early-Promotor, der über die Transkription der E2-Region die virale Replikation ermöglicht. Durch die Deletion ist Delta24 nicht mehr in der Lage, das Rb-Protein zu binden, und kann somit nur in Tumorzellen mit defektem Rb-Status replizieren. Dieser selektive onkolytische Effekt ist für einige Gliome und maligne Melanome wissenschaftlich belegt.<sup>36,128</sup> Tumorspezifische Promotoren wie beispielsweise der Telomerase-, der AFP- oder der PSA-Promotor werden insbesondere zur Regulation der für eine effiziente virale Replikation sehr wichtigen adenoviralen E1A-Region oder eines Suizidgens eingesetzt.<sup>3,23,99,128</sup> Entsprechende Viren sind beispielsweise Calydon CN706, bei dem der PSA-Promotor E1A kontrolliert, und CV787, dessen E1A-Gen unter der Kontrolle des Ratten-Probasin-Promotors steht, und dessen E1B-Expression ebenfalls durch den PSA-Promotor angetrieben wird. Beide Vektoren werden bei Prostatakarzinomen eingesetzt.<sup>151,192,193</sup>

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Ergebnisse bereits publizierter Studien zeigen, dass die Kernlokalisierung von YB-1 eine entscheidende Rolle für die multiplen Funktionen des Transkriptionsfaktors im zellulären und adenoviralen Kontext spielt. Eine Überexpression von YB-1 in der Zelle korreliert mit einer vermehrten Akkumulation des Proteins im Nucleus<sup>6</sup>. Durch die Integration der YB-1-codierenden Sequenz in den E1/E3-deletierten adenoviralen Vektor AdYB-1 unter CMV-Promotor-Kontrolle kommt es in infizierten Zellen durch die Überexpression des Transgens ebenfalls zu einer vermehrten Kernlokalisierung von YB-1. Diese führt zu einer E1A-unabhängigen adenoviralen Replikation des eigentlich replikationsinkompetenten Vektors AdYB-1.<sup>63</sup> Da YB-1 auch in vielfachresistenten Tumorzellen vermehrt kernlokalisiert ist, stellt der Transkriptionsfaktor ein ideales Ziel für die Gentherapie maligner Tumoren dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss der YB-1-Überexpression auf den adenoviralen Vermehrungszyklus näher *in vitro* zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang wurde AdYB-1 im Vergleich zu dem lediglich E1A-deletierten Adenovirus Ad312 und dem Wildtyp des Adenovirus Typ 5 in Bezug auf

- (1) die E1A-unabhängige DNA-Replikation,
- (2) die Kinetik, Zellyse und Freisetzung viraler Partikel,
- (3) den Einfluss der frühen adenoviralen Gene E1B-55K und E4orf6 und
- (4) die Aktivierung der beiden Promotoren der adenoviralen E2-Region

untersucht. DNA-Replikation und virale Zellyse sind für die Effizienz einer Therapie mit selektiv replizierenden onkolytischen Adenoviren von zentraler Bedeutung. Die durchgeführten Untersuchungen und ihre Ergebnisse bilden somit die Grundlage für die Entwicklung neuer, YB-1-basierter, onkolytischer Adenoviren und deren Optimierung für den Einsatz in der Gentherapie maligner Erkrankungen.



## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Verwendete Viren/Vektoren

Folgende Viren und Vektoren wurden verwendet:

WT-Ad5	Wildtyp des Adenovirus Typ 5
Ad312	E1A-deletierter adenoviraler Vektor
AdYB-1	E1-/E3-deletierter adenoviraler Vektor enthält das Gen für den humanen Transkriptionsfaktor YB-1 unter CMV-Promotor Kontrolle in der E1-Region
Ad-55K	E1/E3-deletierter adenoviraler Vektor enthält die für das frühe virale Gen E1B-55K codierende DNA-Sequenz unter CMV-Promotor-Kontrolle in der E1-Region
AdCMV-LacZ	E1/E3-deletierter adenoviraler Vektor enthält das $\beta$ -Galactosidase-Gen (LacZ) unter CMV-Promotor-Kontrolle
AdCMV-GFP	E1/E3-deletierter adenoviraler Vektor enthält das GFP-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle

	E1A	E1B	E2	E3	E4	L1-L5	Transgen
<b>WT-Ad5</b>	+	+	+	+	+	+	
<b>Ad312</b>		+	+	+*	+	+	
<b>AdYB-1</b>			+		+	+	CMV-YB-1
<b>Ad-55K</b>			+		+	+	CMV-E1B-55K
<b>AdCMV-LacZ</b>			+		+	+	CMV- $\beta$ -Gal
<b>AdCMV-GFP</b>			+		+	+	CMV-GFP

**Tab. 1: Verwendete adenovirale Vektoren mit Deletionen und Transgenen.**

+\* = partielle Deletion (E3-ADP nicht deletiert)

## 2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die 50 µl-PCR-Ansätze für die Sondenherstellung bestanden aus 400 µM dNTP-Mix (dATP/dCTP/dGTP/dTTP), 200 µM forward primer (code), 200 µM reversed primer (anticode), 1x PCR-Puffer, 5U Taq-Polymerase (Fa. Roche) und 100 ng template-DNA (WT-Ad5).

Jede DNA-Sonde für das Northern- bzw. Southern-Blot-Verfahren wurde in einem eigenen Ansatz amplifiziert. Zur Amplifikation der E3-Sonde wurden dem o.g. Ansatz 10 µl Q-Solution (Fa. Qiagen) zugesetzt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen.

Das PCR-Protokoll umfasste 32 Zyklen. Der initiale Denaturierungsschritt erfolgte für 5 Min. bei 95°C. Es folgten 30 Zyklen mit je 1 Min. bei 95°C (Denaturierung), 1 Min. bei 55°C (Annealing) und 1 Min. bei 72°C (Synthese). Der terminale Syntheseschritt dauerte 5 Min. bei 72°C. Dies entspricht dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase.

Für die Sondenherstellung wurden folgende Primer verwendet:

Code	Sequenz 5' → 3'	Bp	Lokalisation	T <sub>m</sub>	Sonde
E1A					
code	5'-ATGGCCGCCAGTCTTTTG-3'	18	602-619	56°C	bp
anti	5'-GCCATGCAAGTTAAACATTATC-3'	22	1623-1644	55°C	1043
E1B-55K					
code	5'-CCTGCGAGTGTGGCGGTAAA-3'	20	3376-3395	61°C	bp
anti	5'-CAAACCTCAGCGCGGGTGCAG-3'	20	3464-3483	63°C	108
E2-early					
code	5'-GGATAGCAAGACTCTGACAAAG-3'	22	26780-26791	68°C	bp
anti	5'-AGCTGATCTTCGCTTTTG-3'	18	27002-27019	52°C	212
E2-late					
code	5'-GTCGGAGATCAGATCCGCGT-3'	20	22734-22753	61°C	bp
anti	5'-GGTCCTCGTCGCTTCGCTT-3'	20	24216-24235	61°C	1502
E3-14.7K					
code	5'-GAATTATTACAGAGCAGCGCC-3'	21	30484-30504	58°C	bp
anti	5'-AGATCCTCAGGTCCTTGACAA-3'	21	30764-30784	62°C	301
E4orf6					
code	5'-CAATGACAGTGGAGAGCCCA-3'	20	33701-33720	59°C	bp
anti	5'-TATGACTACGTCCGCGGTTTC-3'	20	34059-34078	59°C	378
L4-100K					
code	5'-TTCTGCAGCTAGCCAACTA-3'	19	25679-25697	55°C	bp
anti	5'-TAATCTCGTGGCGTGGTA-3'	19	25948-25966	57°C	288

**Tab. 2:** Zur Amplifikation der DNA-Sonden für Northern und Southern Blot verwendete Primer. bp = Primerlänge. T<sub>m</sub> = Annealing-Temperatur

Alle weiteren PCRs wurden mit Hilfe eines selbst hergestellten Master-Mix in 25 µl Ansätzen durchgeführt. Dieser enthielt 400 µM dNTP-Mix (dATP/dCTP/ dGTP/dTTP), 1x PCR-Puffer, 8% Glycerin und Kresolrot. Jedem Ansatz wurden 200 µM forward primer

(code), 200  $\mu$ M reversed primer (anticode), 2,5 U Taq-Polymerase und 1  $\mu$ l template-DNA unterschiedlicher Konzentration zugesetzt.

Kontroll-PCR-Ansätze von Bakterien-über-Nacht-Kulturen wurden vor Zugabe der Taq-Polymerase 10 Minuten bei 95°C denaturiert.

Folgende weitere Primer wurden verwendet:

Code	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'	bp	Zielsequenz	T <sub>m</sub>
CMVp-for				
code	5'-GCGATGTACGGGCCAGATATACGC-3'	24	CMV-Promotor	66°C
RV-for				
code	5'-CTAGCAAATAGGCTGTCCC-3'	20	RV binding site	60°C
E2eRS-for				
code	CCCAAGCTTCAGGGGCCAAGAACAAGAG	28	E2early-Promotor	70°C
E2eRS-rev				
anti	CCGCTCGAGGGGCGTGGGAATTCCTTG	28	E2early-Promotor	72°C
Luc-rev				
anti	5'-TCTAGAATTACACGGC-3'	16	Luziferase-Gen	47°C
EGFP-rev				
anti	5'-ACTTCAGGGTCAGCTTGC-3'	18	GFP-Gen	56°C
SV40-Enh-rev				
anti	5'-GCAGAAGTATGCAAAGCA-3'	18	SV40-Enhancer	51°C

**Tab. 3:** Weitere verwendete Primer. bp = Primerlänge. T<sub>m</sub> = Annealing-Temperatur

### 2.2.1 Gelextraktion

Zur Reinigung der amplifizierten Sonden wurde eine Gelextraktion durchgeführt. Zunächst wurden die DNA-Proben mittels Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt, um die Sonden von restlichen Primern und unspezifischen PCR-Produkten zu trennen. Hierzu wurden je 20  $\mu$ l Probe mit je 2  $\mu$ l Bromphenolblau versetzt und auf ein 1xTBE-Gel (1% Agarose, 20-30  $\mu$ g Ethidiumbromid) aufgetragen. Zusätzlich wurden in die erste Tasche 10  $\mu$ l 1kb-ladder (2  $\mu$ l 1kb-ladder-DNA (Fa. MBI), 4  $\mu$ l Bromphenolblau, 4  $\mu$ l dest. H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer) pipettiert. Anschließend wurden 90 V Spannung für 60-65 Minuten angelegt. Als Laufpuffer diente 1xTBE-Puffer (54 g Trisbase, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA ad 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH 8.0).

Die durch Interkalation des EtBr angefärbten DNA-Banden konnten anschließend unter UV-Licht (254 nm oder 300 nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell exzidiert werden. Die spezifische Zuordnung einer Bande zu der entsprechenden Sonde erfolgte mit Hilfe der 1kb-ladder, die Banden von 100 bis 12000 bp im Abstand von je ca. 1000 bp

generiert. So konnte die rechnerisch bestimmte Sondengröße mit der sichtbaren Bande korreliert werden.

Die exzidierten Banden wurden mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) nach dem entsprechenden Protokoll aufgereinigt und die gewonnene DNA in 30 µl mitgeliefertem Elution Buffer aufgenommen.

### **2.2.2 Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration im Eluat nach Gelextraktion und Reinigung erfolgte photometrisch. Aus der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm lässt sich anhand der optischen Dichte (OD) der DNA- bzw. RNA-Gehalt einer Probe rechnerisch bestimmen. Der gleichzeitig gemessene Wert bei 320 nm lässt Rückschlüsse auf Verunreinigungen durch Proteine zu.

## **2.3 Viruspräparation**

Die Viruspräparation dient der Vermehrung der vorhandenen Viren sowie deren Aufreinigung zum Einsatz für die *in vitro* Experimente. Für *in vivo* Versuche ist zusätzlich eine Dialyse der isolierten Virussuspension notwendig, der auch die hier verwendeten Viren unterzogen wurden, um das toxische CsCl vollständig zu entfernen. Durch hohe Virus-Titer und Reinheit erreicht man eine verminderte Zytotoxizität bei der Infektion. Dies ermöglicht den Einsatz einer höheren MOI und erleichtert den Nachweis des virusinduzierten zytopathischen Effektes (CPE).

### **2.3.1 Infektion und 293-Zellen**

293-Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bis zu etwa 80%iger Konfluenz gezüchtet und dann mit dem entsprechenden Virus-Stock mit einer Multiplicity of Infection (MOI) von 3-6 pfu/cell in 5 ml Optimem-Medium infiziert und 1 Stunde bei 37°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden den Zellen 13 ml DMEM zugeben, die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und beobachtet bis sie erste Anzeichen von CPE (cytopathic effect) zeigten, aber noch nicht lysiert waren. Zu diesem Zeitpunkt (nach

ca. 36 h) wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon Tube überführt, 15 Min. bei 3500 U/min zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Alle Pellets wurden anschließend gemeinsam in 8 ml Optimem-Medium resuspendiert.

### 2.3.2 Virusisolation

Zur Virusfreisetzung wurden die resuspendierten Zellen durch dreimaliges alternierendes Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bzw. in flüssigem Stickstoff bei  $-198^{\circ}\text{C}$  und Auftauen aufgespalten (thaw and freeze). Nach dem dritten Zyklus wurde die Probe 20 Min. bei 3500 U/min zentrifugiert, und der die Viren enthaltende Überstand vorsichtig dekantiert.

### 2.3.3 Virusreinigung

Die Reinigung des virushaltigen Mediums erfolgte mit Hilfe einer Cäsiumchloridpräparation nach dem ‚Iowa City Protocol‘. Dabei wird das zu isolierende Virus via Ultrazentrifugation durch einen Gradienten aus zwei Cäsiumchloridlösungen unterschiedlicher Dichte von den Zellbestandteilen getrennt. Für den ersten Gradienten wurden 17 ml 1,33 CsCl (454,2 mg CsCl pro ml, 5 mM Hepes-Puffer pH 7,8), 9 ml 1,45 CsCl (609 mg CsCl pro ml, 5 mM Hepes-Puffer pH 7,8) und 10 ml Virus-Lysat in SW28-Tubes pipettiert und für 3 Stunden mit 18000 U/min bei  $18^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurde die Virusbande bis zu einem maximalen Volumen von 2 ml abgezogen und mit 10 mM Tris-Puffer auf 4 ml Gesamtvolumen eingestellt. Aus dieser Virussuspension sowie je 3,5 ml 1,33 und 1,45 CsCl wurde der zweite Gradient in SW41-Tubes hergestellt und über Nacht mit 25000 U/min bei  $18^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Am nächsten Morgen wurde die i.d.R. deutlich sichtbare Virusbande vorsichtig abgezogen.

Zur weiteren Reinigung wurde die Virussuspension in eine Dialysekammer (Slide-A-Lyzer, Fa. Pierce) überführt und 18 Stunden in 10mM Tris-Puffer pH 8.0 bei  $6^{\circ}\text{C}$  dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wurde während dieser Zeit zweimal ausgetauscht.

Anschließend wurde die Virussuspension mit 1% Viral Preservation Medium (1 M Tris-Puffer pH 8.0, 5 M NaCl, 1 g/ml BSA, 50% Glycerol) versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

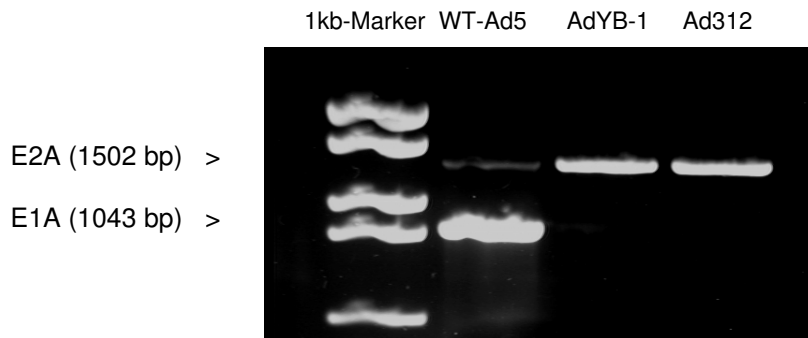
### 2.3.4 Titerbestimmung

Der Virustiter beschreibt die Anzahl der infektiösen, d.h. intakten, Viruspartikel in der isolierten Virussuspension. Seine Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines Plaqueassays auf 293-Zellen. Diese stabil transformierte Zelllinie liefert das für die Virusreplikation wichtige virale E1A-Gen in trans und ermöglicht so eine optimale Vermehrung auch E1-deletierter adenoviraler Vektoren.

Zunächst wurden 293-Zellen auf 60 mm Platten bis zur vollständigen Konfluenz gezüchtet. Von der isolierten Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen  $1:10^8$ ,  $1:10^9$  und  $1:10^{10}$  (ggf. auch  $10^{11}$ ) in Optimem-Medium angelegt, und die konfluenten Zellen mit 500  $\mu$ l der verschiedenen Verdünnungen 1 Std. bei  $37^\circ\text{C}$  unter regelmäßigem Schwenken infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 50% 2x Plaque Assay Medium und 50% flüssiger Agarose ( $42^\circ\text{C}$ ) überschichtet. Nach dem Aushärten wurden die Platten im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Durch die virale Replikation intakter Viruspartikel bilden sich Plaques im dichten Zellrasen. Nach ca. 10 Tagen können die entstandenen Plaques ausgezählt, und der Virustiter anhand der verschiedenen Verdünnungen in pfu/ml angegeben werden. Da nur mit 500  $\mu$ l infiziert wurde, wurde die Anzahl der Plaques mit 2 und anschließend mit der entsprechenden Verdünnungsstufe ( $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  usw.) multipliziert

### 2.3.5 Überprüfung der Vektoren auf E1A

Die Überprüfung der adenoviralen Vektoren auf die Genregion E1A dient dem Ausschluss einer ungewollten E1A-Expression trotz E1A-Deletion. Ein eventueller Nachweis des E1A-Gens innerhalb der verwendeten Vektorgenome ließe aufgrund weitreichender Funktionen der E1A-Genprodukte im adenoviralen Vermehrungszyklus keine suffiziente Dateninterpretation zu. Die E1A-Kontrolle erfolgte via Multiplex-PCR. Die durch mehrfaches Aufkochen denaturierte Virus-DNA wurde nach dem unter 2.2 geschilderten Verfahren in einem Ansatz im Sinne einer Duplex-PCR auf die viralen Gene E1A und E2A getestet. Hierzu wurden die Primer der entsprechenden Sonden verwendet. Sowohl Ad312 als auch AdYB-1 sind E1A-deletiert, d.h. der Nachweis des E1A-Gens bedeutet den Nachweis einer ‚Kontamination‘. Die erfolgreiche Amplifikation des in allen Viren vorhandenen E2A-Gens beweist das Funktionieren der Reaktion.



**Abb. 12: Überprüfung der Vektoren auf E1A.** WT-Ad5, AdYB-1, Ad312 via Duplex-PCR durch Nachweis des E1A-Gens. Positivkontrolle: E2A.

## 2.4 Zellkultur und Zellsplitting

Folgende Zelllinien wurden verwendet und in Kultur gehalten:

- 293 humane embryonale Niere, transformiert mit 15% des Genoms des Adenovirus Typ 5 (WT-Ad 5) inklusive E1A-Region [Graham, L, Smiley, J, Russel, WC, Nairn, R. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977)]
- 293-PMT zusätzlich transformiert mit dem XhoI Isoschizomer *Pseudomonas aeruginosa* R7 Methyltransferase (PMT)-Gen [Nelson, JE, Kay, MA. *J. Virol.* **71** (11), 8902-8907 (1997)]
- A-549 humanes Bronchialkarzinom eines 58-jährigen weißen Mannes [Lieber, M, Smith, B, Szakal, A, Nelson-Rees, W, Todaro, G. *Int. J. Cancer* **17**, 62-70 (1976)]
- U-2OS humanes Osteosarkom einer 15-jährigen weißen Frau [Ponten, J, Saksela, E. *Int. J. Cancer* **2** (5), 434-447 (1967)]
- HeLa humanes Zervixkarzinom einer 31-jährigen Frau, später Diagnose geändert in Adenokarzinom [Gey, GO et al. *Cancer Res.* **12**, 264 (1952)]

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen kultiviert und regelmäßig trypsiniert und gesplittet. Die 293-, A-549-, U-2OS-, und HeLa-Zellen wurden in DMEM kultiviert. Das Medium enthielt 10% FBS, 2 mmol/l Glutamin, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).

## 2.5 Infektion der Zellen mit Adenoviren

Für die Infektion der *in vitro* Kulturen wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen auf 10 cm Platten über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch 1,5 ml Infektionsmedium (Optimem) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit der entsprechenden MOI mit den verschiedenen Viren infiziert und 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während der Inkubation wurden die Platten alle 10 Minuten vorsichtig geschwenkt. Nach der Infektion wurden Infektionsmedium und Virus abgesaugt, und die Zellen mit 10 ml Vollmedium überschichtet.

## 2.6 RNA-Isolation

Die Isolation der zellulären RNA erfolgte 72 Stunden post infectionem (p.i.). Zunächst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und durch Abschaben von der Platte vorsichtig in 5 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 Min. bei 3500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Zellpellet in 1 ml Trizol-Reagenz (Fa. GibcoBRL) resuspendiert und anschließend 1 Minute bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Flüssigkeiten durch kurzes, kräftiges Schütteln gemischt und erneut 1 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 15 Min. bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und in 500 µl vorgelegtes Isopropanol überführt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 U/min und 4°C. Am Boden der Tubes bildet sich bei diesem Schritt ein deutlich sichtbares weißliches RNA-Pellet. Dieses wurde zweimal mit je 1 ml 70% Ethanol gereinigt und erneut 5 Min. bei 7500 U/min und 4°C zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde vorsichtig getrocknet und schließlich in 30 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.



## 2.7 Northern Blot

Das Northern Blot Verfahren dient dem Nachweis von RNA über spezifische, radioaktiv markierte DNA-Sonden. Auf diese Weise kann auf Ebene der mRNA die Aktivierung viraler Gene nachgewiesen werden.

### 2.7.1 Gelelektrophorese

Zunächst wurden je 10 µg der isolierten RNA mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 5 µl eingestellt und mit 10 µl ‚RNA sample loading buffer‘ (inkl. EtBr, Fa. Sigma) versetzt. Nach einem Denaturierungsschritt von 10 Min. bei 65°C wurden die Proben auf ein RNA-Gel (60 ml 1x MOPS, 65 g Agarose, 3.2 ml Formalin) aufgetragen. Anschließend wurden für 3 Stunden 70 V an die Elektrophoresekammer angelegt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS.

### 2.7.2 Blotten

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der denaturierten RNA wurde diese über Nacht mit Hilfe des ‚Nytran Super Charge Kit‘ (Fa. Schleicher & Schuell) auf eine Nylon-Membran übertragen. Durch UV-Bestrahlung (UV-Linker) wurde die RNA anschließend auf der Membran fixiert.

### 2.7.3 Radioaktive Markierung der Sonden

Vor der Hybridisierung des fixierten Blots wurden zunächst die DNA-Sonden (vgl. Abschnitt 2.3) mit <sup>32</sup>P radioaktiv markiert. Dies erfolgte mit Hilfe des ‚Random Primer Labeling Kit‘ (Fa. Stratagene) nach beiliegendem Protokoll: 25 ng Sonde und 10 µl Random Primer wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 34 µl eingestellt und 2 Min. in kochendem Wasser denaturiert. Anschließend wurden 10 µl dCTP-Puffer, 5 µl α-<sup>32</sup>P-dCTP Solution (Fa. ICN) und 1 µl Klenow-Exonuklease hinzugegeben und die Probe 10 Min. bei 37°C inkubiert. Es folgte die Reinigung der Probe von nicht eingebauten Radionukleotiden via MicroSpin G-25 Columns (Fa. Amersham) via Zentrifugation.

#### **2.7.4 Hybridisierung**

Zunächst wurde der fixierte Blot mindestens 30 Min. mit Hybridisierungs-Lösung (Fa. Clontech) bei 55°C im Hybridisierungsofen ohne Sonde prähybridisiert. Vor Zugabe der gereinigten Sonde wurde diese 2 Min. in kochendem Wasser denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der Blot 2 x 20 Minuten mit 0,2x SSC + 0,1% SDS in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Mit Hilfe des Phosphor-Imagers ließen sich die Blots bereits nach einer Filmexpositionszeit von 30 Min. bis 1 Stunde je nach Strahlungsintensität auswerten. Dieser detektiert die bestrahlten Filmareale und setzt die digitalen Signale optisch in Graustufen um (s. Abbildungen). Zusätzlich wurde anschließend für mehrere Tage ein gängiger Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt und konventionell entwickelt.

#### **2.8 DNA-Isolation**

Zur Isolation der DNA infizierter Zellen wurde das ‚DNeasy Tissue Kit‘ (Fa. Qiagen) eingesetzt und nach dem beiliegenden Protokoll verfahren. Die DNA wurde in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, und die Konzentration der Probe photometrisch bestimmt.

#### **2.9 Southern Blot**

Zunächst wurden 2 µg DNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10x Puffer B und je 1 µl der Restriktionsenzyme HindIII und XhoI über Nacht verdaut. Anschließend wurden die Proben mit 2 µl Bromphenolblau versetzt und auf ein 1xTBE-Gel aufgetragen. An die Elektrophoresekammer wurden für 3 Stunden 50 V angelegt (Laufpuffer: 1xTBE). Das Gel wurde je 30 Min. denaturiert (Denaturierungspuffer: 660 ml ddH<sub>2</sub>O, 120ml 5M NaCl, 20 ml 10M NaOH), neutralisiert (Neutralisierungspuffer: 480ml ddH<sub>2</sub>O, 120 ml 5M NaCl, 200 ml 1M Tris pH 7.0) und in 10x SSC geschwenkt. Blotten, radioaktive Markierung der Sonde, Hybridisierung und Auswertung erfolgten wie im Abschnitt 2.8 (Northern Blot) beschrieben.

## 2.10 Verwendete Plasmide

pCMV-E4orf6 enthält des adenvirale E4orf6-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle (erhalten von Dr. M. Dobbelstein, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg)

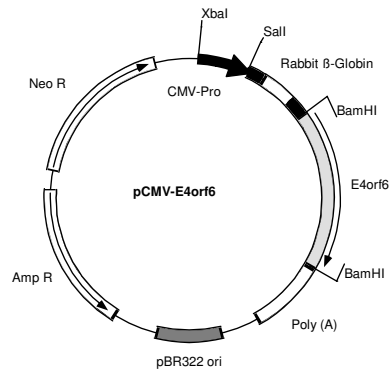


Abb. 13: pCMV-E4orf6

pGL3-Enh-CMV-GFP enthält das GFP-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle (erhalten von Klaus Mantwill, AG Holm, Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung, TUM)

pGL3-Enh-E2l-GFP enthält das GFP-Gen unter Kontrolle eines adenviralen E2-late-Promotor-Konstruktes mit einer Y-Box (erhalten von Klaus Mantwill, AG Holm, Institut für Exp. Onkologie und Therapieforschung, TUM)

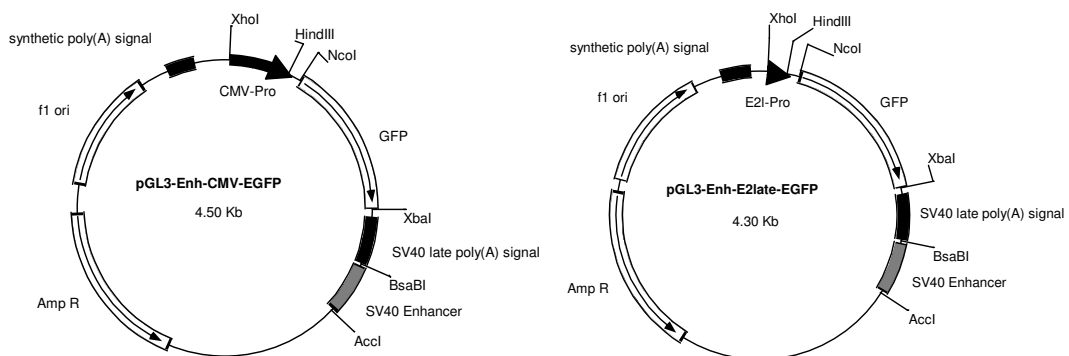


Abb. 14: pGL3-Enhancer-Vektoren

---

pGL3-Enh-E2e-GFP	enthält das GFP-Gen Kontrolle eines adenoviralen E2-early-Promotor-Konstruktes (I-III)
pGL3-Vektoren <i>ohne</i> SV40-Enhancer:	
pGL3-CMV-GFP enthält das GFP-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle	
pGL3-E2l-GFP	enthält das GFP-Gen unter Kontrolle eines E2-late-Promotor-Konstruktes mit einer Y-Box
pGL3-E2e-GFP	enthält das GFP-Gen unter Kontrolle eines E2-early-Promotor-Konstruktes (I-III)
pGL3-CMV-Luc	enthält das Luziferase-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle
pGL3-E2e-Luc	enthält das Luziferase-Gen unter Kontrolle eines E2-early-Promotor-Konstruktes (I-III)
pGL3-E2l-Luc	enthält das Luziferase-Gen unter Kontrolle eines E2-late-Promotor-Konstruktes mit einer Y-Box

## 2.11 Transformation kompetenter Zellen

Zunächst wurden kompetente *E. coli* Bakterien (DH5 $\alpha$  bzw. DH10B) mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Dazu wurde 1  $\mu$ g des supercoiled Plasmides zu 100  $\mu$ l kompetenter Zellen gegeben, und diese 15-30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 2 Min. bei 42°C. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Probe erneut 15-30 Min. auf Eis inkubiert. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte über das Ampicillin-Resistenzgen der Plasmide durch Ausplattieren auf Agarplatten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin und Inkubation über Nacht bei 37°C.

## 2.12 Plasmidpräparation von pCMV-E4orf6

Zunächst wurde der Erfolg der Transformation durch eine Mini-Präparation von 1 ml Über-Nacht-Kulturen (LB-Medium + 80  $\mu$ g/ml Amp) gepickter resistenter Kolonien überprüft. Hierzu wurden das E4orf6-Plasmid nach dem folgenden ‚quick and dirty‘-Protokoll isoliert: Zunächst wurden die kompetenten Bakterienzellen durch 5 Min. Zentrifugation bei 14000 U/min ausgefällt, in je 200  $\mu$ l einer zuvor hergestellten

Lösung (50mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) resuspendiert und durch mehrmaliges Invertieren mit je 400 µl 0,2 M NaOH/1% SDS vermischt. Es folgte die Extraktion der DNA durch Zugabe von 300 µl eiskalter 3 M Na-5M-Acetat-Lösung, pH 4.8, Inkubation auf Eis für 15-30 Min. und schließlich Zentrifugation bei 4°C für 15 Min. bei 14000 U/min. Durch Zugabe von 700 µl Isopropanol und erneuter Zentrifugation wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand ausgefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die resuspendierte Plasmid-DNA zur Kontrolle über Nacht mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut. Anhand spezifischer Fragmente erfolgte der Nachweis des korrekten Plasmides. Eine der positiv getesteten Kolonien wurde anschließend für die Maxipräparation des Plasmides eingesetzt. Hierzu wurden die Plasmid-positiven DH5α E. coli-Bakterien zunächst in 500 ml LB-Medium (80 µg/ml Amp) unter leichtem Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Zellsuspension 10 Min. bei 6000 U/min zentrifugiert, und das Pellet anschließend in 40 ml Lysozym-Puffer (10 mM EDTA, 50 mM Glc, 25 mM Tris pH 8, 5 mg/ml Lysozym in dest. H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Nach 20 Min. Inkubation wurden 80 ml NaOH/SDS-Puffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben, und die Suspension 5-10 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 60 ml 5M Kaliumacetat und eine erneute Inkubation auf Eis für 15-30 Minuten. Anschließend wurden 10 ml ddH<sub>2</sub>O zugegeben und die Probe 10 Min. bei 10000 U/min zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde nun vorsichtig dekantiert, und die DNA durch Zugabe von 100 ml Isopropanol und Zentrifugation für 30 Min. bei 10000 U/min gefällt. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 8 ml 0,1x SSC resuspendiert und mit 8g CsCl versetzt. Die anschließende Inkubation auf Eis für 30 Min. sowie die Zentrifugation bei 3800 U/min für weitere 30 Min. diente der RNA- und Protein-Fällung. Nach Zugabe von 200 µl EtBr (10 mg/ml) wurde die Probe in 8.9 ml opti seal tubes über Nacht bei 55000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die unter langwelligem UV-Licht gut sichtbare Plasmidbande vorsichtig abgesaugt und das EtBr mit CsCl-gesättigtem Isopropanol via Zentrifugation extrahiert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 100% Ethanol durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 30 Min. gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 100% und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 300 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Alle anderen verwendeten Plasmide wurden mit dem ‚QIASpin Mini Prep‘-Kit (Fa. Qiagen) nach beiliegendem Protokoll gereinigt. Diese Plasmide wurden ebenfalls mit Hilfe eines Kontrollverdaus und/oder einer Kontroll-PCR überprüft. Die Vermehrung dieser Plasmide erfolgte in DH10B E. coli-Bakterien.

Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte photometrisch.

### 2.13 Restriktion

Die Restriktionen wurden in 20 µl-Ansätzen durchgeführt. Diese enthielten 2 µl des entsprechenden Restriktionspuffers, je 1 µl Restriktionsenzym und eine jeweils unterschiedliche Menge an Plasmid-DNA. Das fehlende Volumen wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz wurde für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert, und die DNA anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.14 Ligation

Die Ligationsansätze enthielten 2 µl T4 Ligase und 2 µl T4 Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das Verhältnis von Plasmid-DNA zu Insert-DNA wurde nach der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Vektormenge [ng]} \div \text{Vektorgröße [bp]} \times \text{Insertgröße [bp]} \times 5 = \text{Insertmenge [ng]}.$$

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert, anschließend für 10 Min. bei 70°C inaktiviert, und die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.15 Transfektion verschiedener Zelllinien

Zunächst wurden je 10<sup>5</sup> Zellen/well der verwendeten Zelllinien auf 6-well-plates über Nacht kultiviert. Die U-2OS-Zellen wurden je ‚well‘ mit 0,6 µg Plasmid-DNA und 3 µl DMRIE transfiziert. Hierzu wurden Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz zunächst in 300 µl Optimem-Medium gemischt und zur Komplexbildung 15-20 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben und nach 4-5 Std. nach dreimaligem Waschen mit PBS durch Vollmedium ersetzt.

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte mit Hilfe des pGL3-CMV-GFP-Vektors. Aufgrund der Expression des GFP-Gens erscheinen erfolgreich transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop leuchtend grün.

## 2.16 Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (pfu)

Zunächst wurden transfizierte und nicht transfizierte Zellen mit einer MOI von 50 pfu/cell mit AdYB-1 infiziert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen vorsichtig abgeschabt und mit dem Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Suspension dreimal alternierend eingefroren und wieder aufgetaut (thaw/freeze), und die Zellbestandteile 15 Min. bei 3500 U/min abzentrifugiert. Die Bestimmung der Plaque-bildenden Einheiten (pfu/ml) erfolgte aus dem Überstand via Plaqueassay auf 293-Zellen (s. 2.4.4).

Zusätzlich zum Plaqueassay kann die Partikelzahl photometrisch bestimmt werden. Sie dient in Relation zur gemessenen Konzentration an Plaque-bildenden Einheiten der Plausibilitätskontrolle. Dabei entspricht 1 OD ca.  $10^{12}$  Partikeln.

## 2.17 Luziferase-Assay

Dieser Assay dient dem Nachweis der Luziferase-Expression in mit entsprechenden Plasmiden transfizierten Zellen. Zunächst wurden hierzu 250.000 Zellen/well auf ein 6-well-plate ausplatiert, nach ca. 12 Std. mit den pGL3-Luziferase-Konstrukten transfiziert und anschließend ggf. mit den verschiedenen Viren infiziert. Nach weiteren 48 Std. wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 300 µl 1x Lysis-Puffer (Promega) resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. auf Eis wurde die Suspension durch Vortexen gemischt und 2 Min. bei 4°C mit 14.000 U/min zentrifugiert. 50 µl Überstand wurden vorsichtig abgenommen und mit 100 µl Luziferase Assay-Reagenz (Promega) vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Luziferase-Expression durch Messung der mittleren Fluoreszenz der verschiedenen Proben mit dem Luminometer quantitativ bestimmt.

## 2.18 X-Gal Färbung

Die X-Gal Färbung dient dem Nachweis der Expression des  $\beta$ -Galactosidase-Gens in AdLacZ-infizierten Zellen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und bei 37°C für 10 Min. mit 0,5% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden sie zweimal

für je 15 Min. mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS überschichtet und bei 37°C inkubiert. Die Färbung erfolgte mit 1 mg/ml X-Gal, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mehrfach gewaschen, mit 70% Glycerol überschichtet und mikroskopisch ausgewertet.

### **2.19 Kristallviolett-Färbung**

Die Kristallviolett-Färbung dient der Anfärbung vitaler Zellen *in vitro*. Diese ermöglicht u.a. eine Beurteilung des virusinduzierten CPE.

Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese anschließend mit Kristallviolettlösung (60% Ethanol, 3,3% Formalin, 4,3% Essigsäure, 10 mg/ml Kristallviolett) überschichtet. Nach 15-30 Min. Inkubation wurde die Lösung abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal sorgfältig mit PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

### **2.20 FACS-Analyse**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lässt sich die mittlere Fluoreszenz GFP-transfizierter Zellen messen. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert, in je 100 µl PBS aufgenommen und gut gemischt. Die anschließende Messung der mittleren Fluoreszenz mit dem FACS Vantage (Fa. Becton Dickinson) wurde unter Standardbedingungen von Tanja Dravits, Institut für Experimentelle Onkologie, AG Holm, durchgeführt.



## 2.21 Materialien und Reagenzien

Verwendete Zelllinien: siehe 2.4 (Zellkultur und Zellsplitting)

Verwendete Bakterien: DH5 $\alpha$ , DH10B (kompetente Escherichia coli)

Verwendete Geräte (außerhalb der Labor-Grundausrüstung):

Hybridisierungsöfen: GFL 7601

Kühlzentrifuge: Hettich EBA 12 R bzw. Heraeus Biofuge ‚fresco‘

Phosphorimager: Fuji BAS 2000

PCR-Gerät: Stratagene Robocycler Gradient 40

UV-Linker: Stratagene Stratalinker UV 2400

Ultrazentrifuge: Beckmann Optima LE-80K

FACS: Becton Dickinson FACS Vantage

Luminometer: Packard TopCount Luminescence Counter

Verwendete Chemikalien:

Die Radiochemikalien ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP) wurden von der Firma ICN Biomedicals, Eschwege, bezogen.

Weitere Materialien sind im folgenden tabellarisch aufgeführt:

<i>Material</i>	<i>Firma</i>	<i>Bestellnummer</i>
Agarose	PegLab	35-1020
Ampicillin	Sigma	A9518
BamHI	Boehringer Mannheim	656275
Cesium Chloride (CsCl)	Quantum	7647-17-8
Chlorophorm	Merck	100983
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	D2650
D-MEM	GibcoBRL	41965-039
DMRIE C Reagent	Invitrogen	10459-014
Dneasy Tissue Kit	Qiagen	69504
dNTP Set	MBI Fermentas	R0181
Dulbecco's MEM	Biochrom	FG0435
Ethanol absolut, reinst	Merck	100986

Ethidiumbromid (EtBr)	Roche	200271
ExpressHyb Hybridization Sol.	Clontech	80151
Fetal Bovine Serum	Biochrom	S0115
Formaldehyd 36.5-38%	Sigma	F-8775
FuGENE Transfection Reagent	Roche	1 814 443
Gel Loading Solution	Sigma	G7654
Gene Ruler 1kb Ladder	MBI Fermentas	SM0312
Glutaraldehyd	Fluka	49626
Glyzerin	Fluka	50049
Hyb Hybridization Solution	Clontech	8015-1
Isopropanol, 2-Propanol	Merck	109634
Kanamycin	Sigma	K4000
KpnI	Amersham Pharmacia	270908-01
Kresolrot	Sigma-Aldrich	11447-2
Leibovitz L-15 Medium	Biochrom	F1315
Leifson-Agar	DIFCO	0273-17
L-Glutamin	Biochrom	K0283
MicroSpin G-25 Columns	Amersham Pharmacia	27-5325-01
MOPS	Promega	H5341
Nuclease Free Water	Promega	P119C
Nytran Super Charge Kit	Schleicher&Schuell	10416328
Optimem	GibcoBRL	51985-026
PBS-Dulbecco	Biochrom	L1825
Penicillin/Streptomycin Solution	Sigma	P0781
pGL3-Enhancer Vector	Promega	E1771
pGL3-Basic Vector	Promega	E1751
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen	301105
Proteinase K	Qiagen	19131
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
QIAprep Spin Mini Prep Kit	Qiagen	27106
Q-Solution	Qiagen	-----
Random Primer Labeling Kit	Stratagene	300385
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim	diverse
	MBI Fermentas	

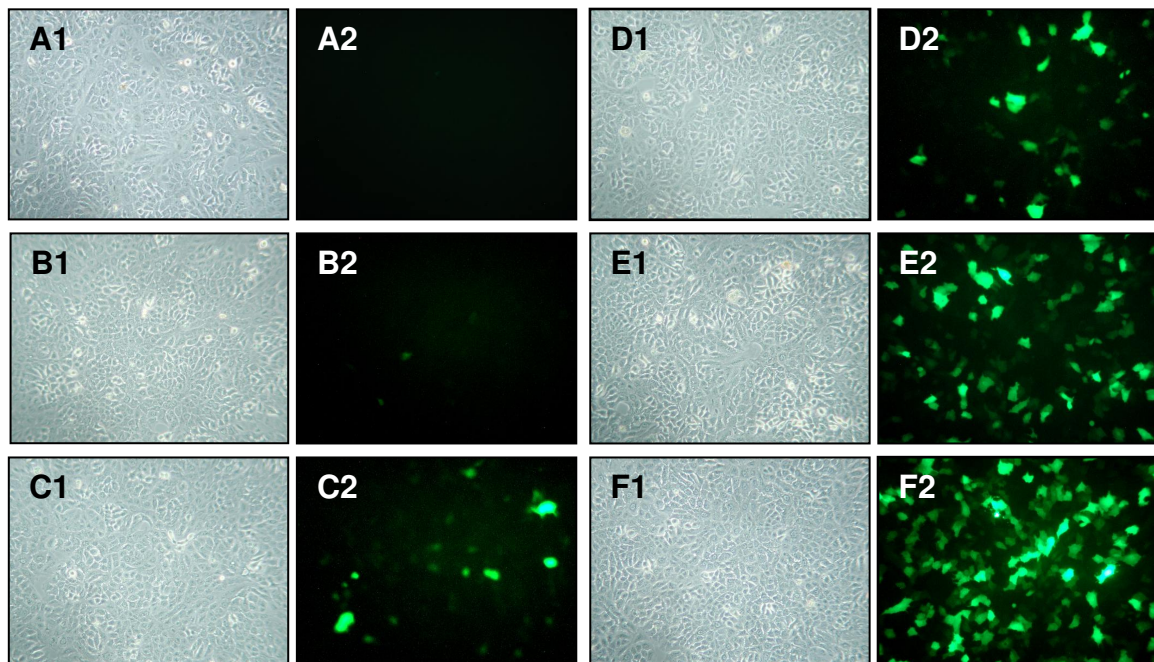
---

RNA Sample Loading Buffer	Sigma	R4268
T4 Ligase	MBI Fermentas	EL0016
Taq-Polymerase	Roche	1 146 165
Taq-Polymerase	MBI Fermentas	EP0404
Tris	Roche	708 976
Trizol Reagent	GibcoBRL	15596-026
Trypan Blue Solution	Sigma	T8154
Trypsin/EDTA	Biochrom	L2163
Tryptone Peptone	DIFCO	211705
X-Gal	MBI Fermentas	CH8091
Yeast Extract	DIFCO	212750
Zellkultur-Flaschen etc.	TPP	diverse

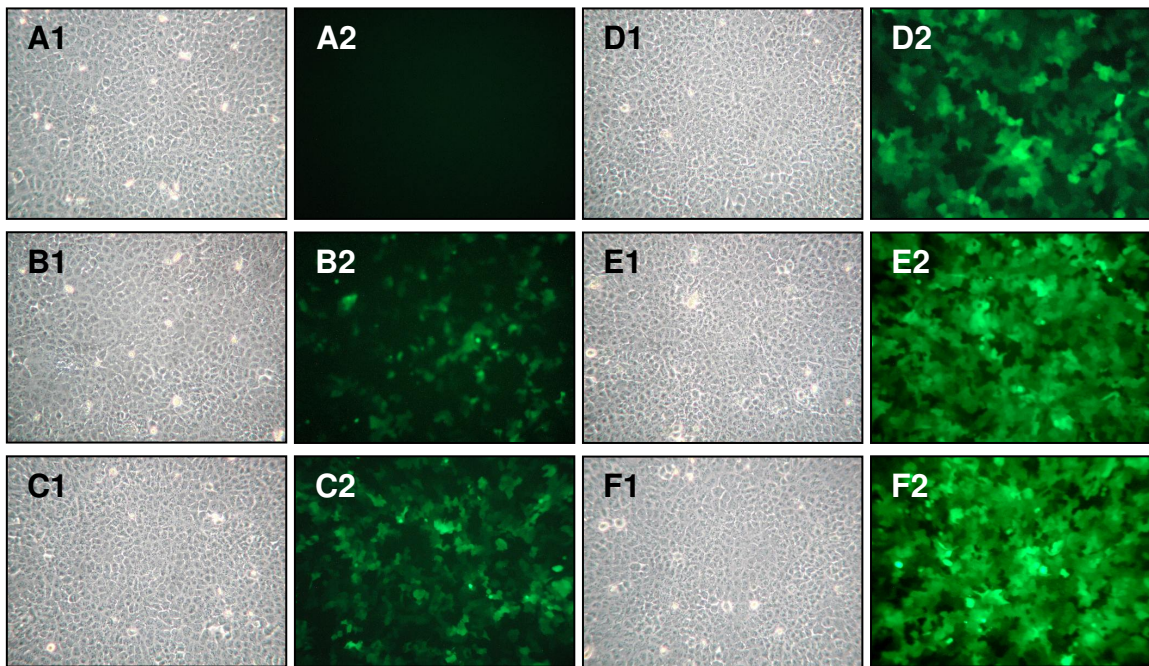
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Evaluation der Infektionseffizienz

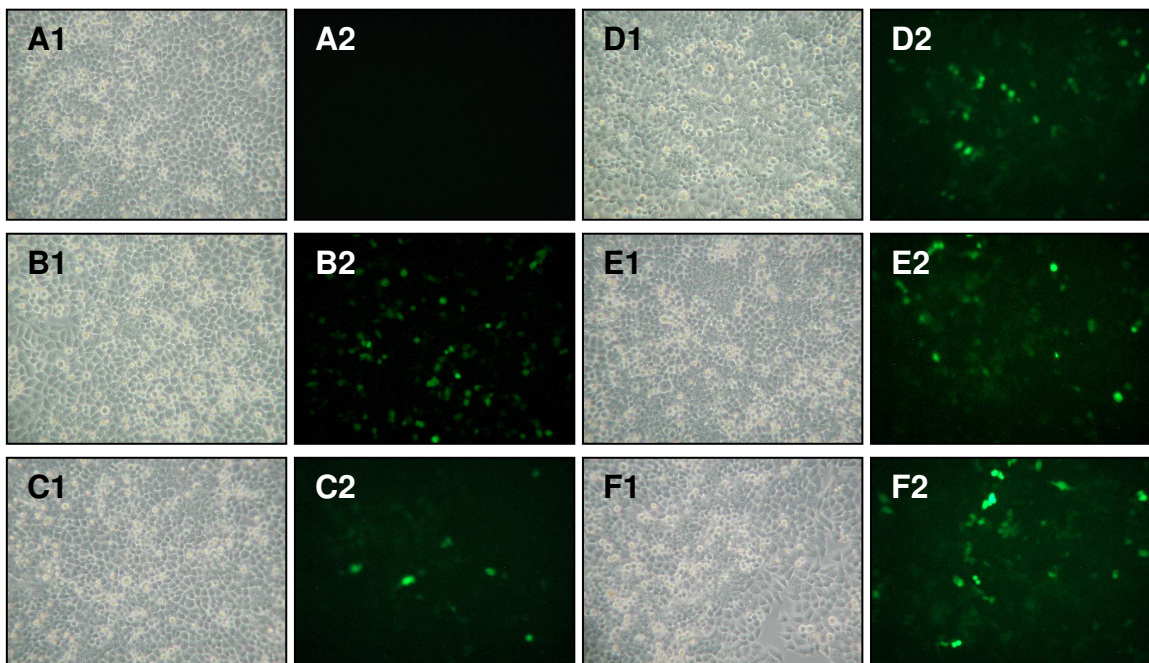
Zur Evaluation der Infektionseffizienz *in vitro* wurden je  $10^5$  Zellen der verwendeten Zelllinien mit verschiedenen MOI des E1/E3-deletierten adenoviralen Vektors AdCMV-GFP infiziert, der das GFP-Gen unter CMV-Promotor-Kontrolle exprimiert. Das Green Fluorescent Protein (GFP) ist ein nicht zytotoxisches Quallenprotein, das bei Anregung durch blaues (oder UV-) Licht grünes Licht abstrahlt. Unter Fluoreszenzlicht erscheinen die infizierten Zellen durch die GFP-Expression im mikroskopischen Bild somit grün. Die Auswertung via Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie erfolgte 48 Std. post infectionem. Eine genaue Quantifizierung der GFP-Expression mittels FACS-Analyse wurde nicht durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei verwendeten Zelllinien gut infizierbar sind. Mit zunehmender MOI nimmt auch die Infektionseffizienz und damit die GFP-Expression zu.



**Abb. 15: Infektionseffizienz mit AdCMV-GFP, A-549-Zellen, 48 Std. p.i.** MOI: 0, 5, 10, 25, 50, 100 pfu/cell (A-F); A1-F1: Durchlichtmikroskopie, A2-F2: Fluoreszenzmikroskopie



**Abb. 16: Infektionseffizienz mit AdCMV-GFP, U-2OS-Zellen, 48 Std. p.i.** MOI: 0, 5, 10, 25, 50, 100 pfu/cell (A-F); A1-F1: Durchlichtmikroskopie, A2-F2: Fluoreszenzmikroskopie



**Abb. 17: Infektionseffizienz mit AdCMV-GFP, HeLa-Zellen, 48 Std. p.i.** MOI: 0, 5, 10, 25, 50, 100 pfu/cell (A-F); A1-F1: Durchlichtmikroskopie, A2-F2: Fluoreszenzmikroskopie

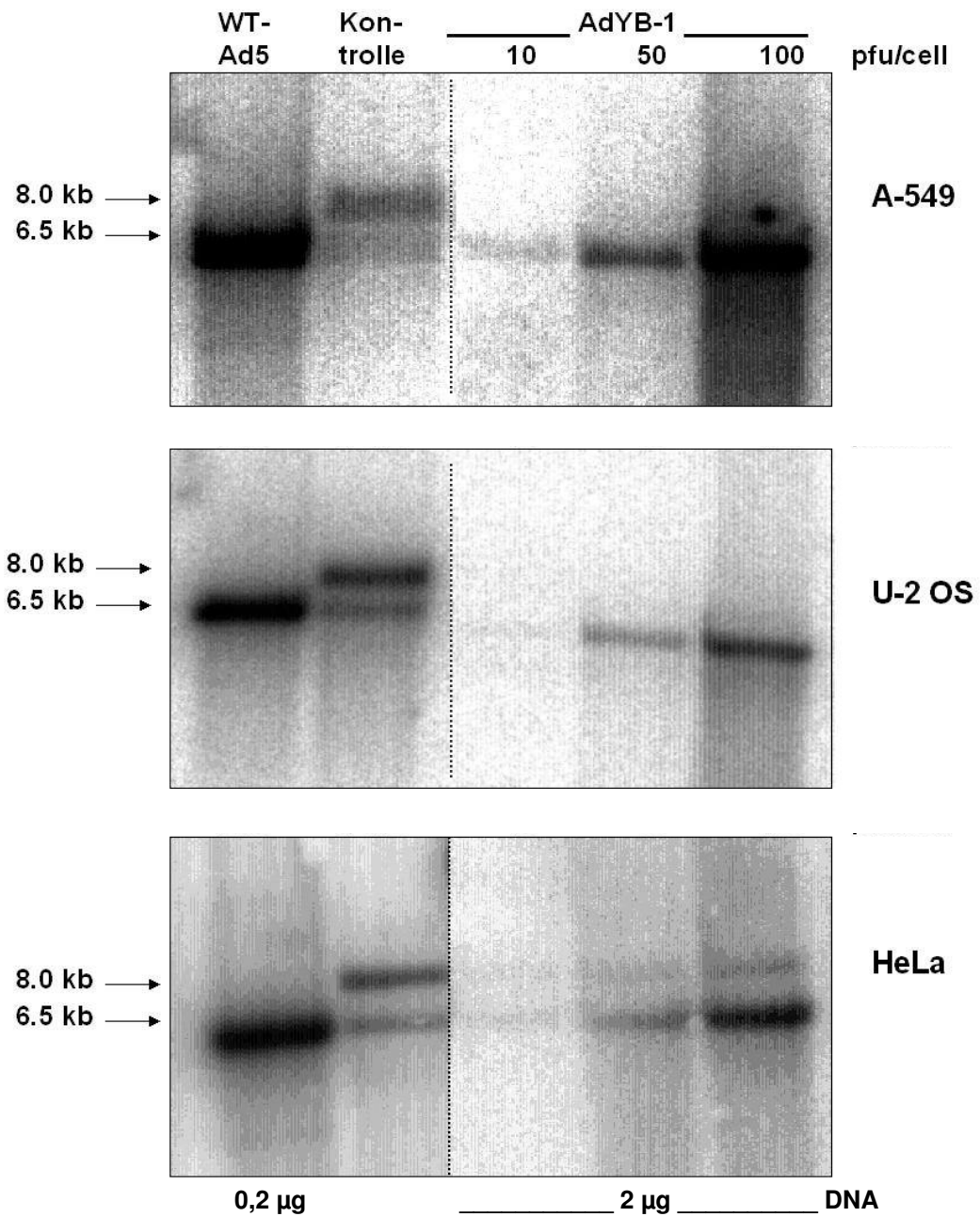
Färbungen von AdCMV-LacZ-infizierten A-549-Zellen mit X-Gal zeigten vergleichbare Ergebnisse. AdCMV-LacZ ist ebenfalls ein E1/E3-deletierter adenoviraler Vektor (Daten nicht gezeigt). Er exprimiert das Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Enzym erzeugt nach Fixierung der Zellen durch Umsetzung des Substrates X-Gal eine Blaufärbung infizierter Zellen. Eine Quantifizierung dieser Enzym/Substrat-Reaktion ist ebenfalls möglich, wurde aber nicht durchgeführt.

### 3.2 Replikationsanalysen

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Abhängigkeit der viralen DNA-Replikation von der eingesetzten Virusmenge an AdYB-1 im Vergleich zu Ad312 *in vitro*. Diese Evaluation der viralen DNA-Replikation bildet die Grundlage für alle weiteren Experimente. Es wurden drei verschiedene Tumor-Zelllinien verwendet: U-2OS-, A-549- und HeLa-Zellen. AdYB-1 zeigt in allen drei Zelllinien im Vergleich zu Ad312 initiale DNA-Replikation bei einer deutlich geringeren MOI.

Für die Replikationsanalysen mit Hilfe des Southern Blot Verfahrens wurde eine E2A-cDNA (E2-late-Sonde: bp 24235-22734) eingesetzt, da das für die virale Replikation essentielle E2-Gen in allen Konstrukten vorhanden ist und sich somit für die Detektion anbietet. Diese Sonde entspricht der für die Evaluation der E2-Expression durch den E2-late-Promotor verwendeten (s. Abschnitt 3.3.2). Diese Sonde wurde im Gegensatz zu den angegebenen Publikationen<sup>127,166</sup> auch für die Analyse methylierter Adenoviren nach Nelson und Kay eingesetzt (s. auch Abschnitt 1.5.7). Da das 1,5 kb-Fragment der XhoI/HindIII-geschnittenen DNA außerhalb der spezifischen Sequenz dieser Sonde liegt, kann es im Southern Blot Verfahren nicht detektiert werden.

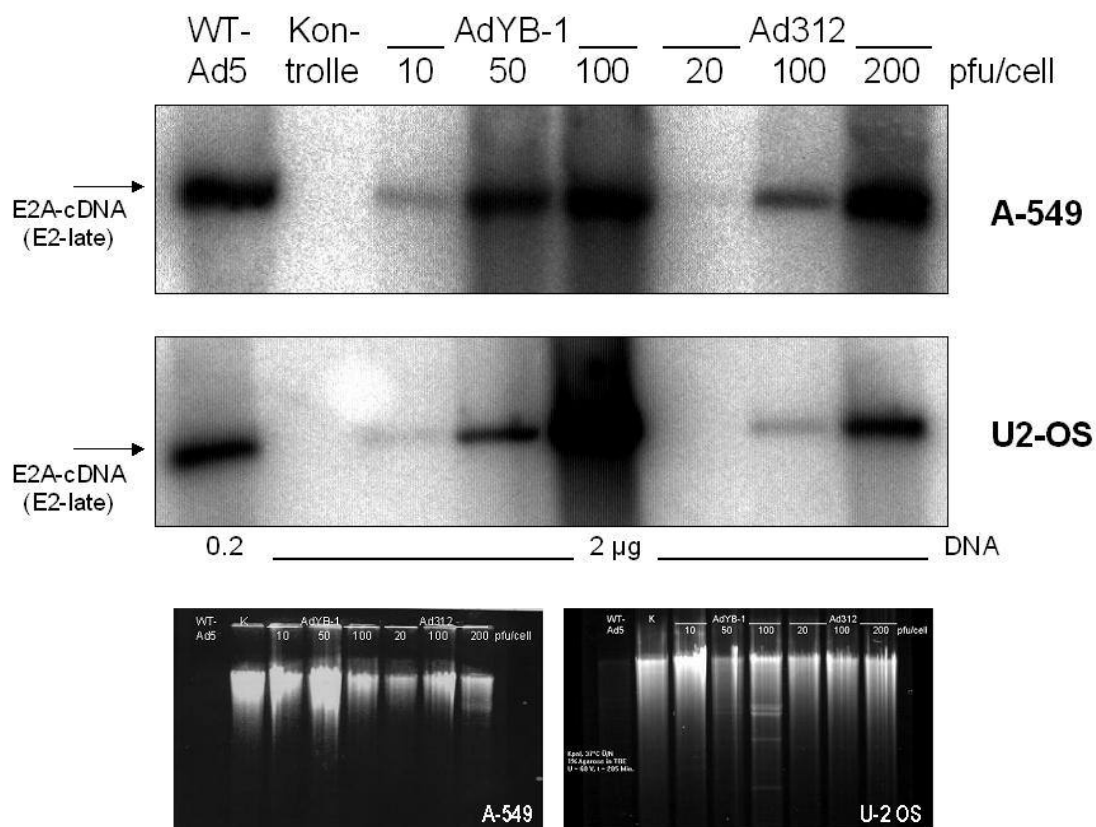
Jeweils  $10^6$  Zellen der verwendeten Zelllinien wurden mit 10, 50 und 100 pfu/cell methylierten AdYB-1 infiziert, und die DNA nach 72 Std. isoliert. Weitere  $10^6$  Zellen wurden mit 5-10 pfu/cell WT-Ad5 infiziert, die DNA allerdings aufgrund der effizienten viralen Zellyse bereits nach 24 Std. isoliert. Diese DNA wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Ein gleichmäßiger DNA-Auftrag wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) sowie durch eine Analyse des ethidiumbromidgefärbten DNA-Gels unter UV-Lichtexposition sichergestellt. Aufgrund der virus-induzierten aktiven Degeneration der Wirtszell-DNA wurde auf eine gegen ein Wirtszellgen gerichtete,  $^{32}\text{P}$ -markierte Kontrollsonde verzichtet.



**Abb. 18: Adenovirale Replikation des methylierten Vektors AdYB-1.** Die 8,0 kb-Bande zeigt die virale Input-DNA, die 6,5 kb-Bande die virale DNA-Replikation. Die 1,5 kb-Bande wurde nicht detektiert. Die Abbildungen zeigen jeweils Banden von einer Membran zum identischen Auswertungszeitpunkt. Die gestrichelten Linien markieren lediglich die Schnittstelle zwischen Kontrolle und drei ausgeschnittenen Banden ohne verwertbares Signal (andere Vektoren). Die Positivkontrolle besteht aus isolierter DNA von WT-Ad5-infizierten 293 und 293-PMT-Zellen.

Als Positivkontrolle wurden 293-PMT- und nicht PMT-transformierte 293-Zellen mit WT-Ad5 infiziert und die DNA ebenfalls 24 Std. p.i. isoliert. Anschließend wurden die DNA-Konzentration dieser Proben photometrisch bestimmt, und die Proben zu gleichen Anteilen gemischt. Somit lassen sich 8,0 kb- und 6,5 kb-Bande in vergleichbarer Intensität darstellen. Diese DNA dient der Überprüfung der Funktion der eingesetzten Sonde sowie der korrekten Zuordnung der detektierten Banden.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den eingesetzten MOIs keine bzw. im Vergleich zum 6,5 kb-Fragment vernachlässigbar wenig virale Input-DNA detektierbar ist. Somit zeigen alle im Southern Blot Verfahren entstandenen Banden im wesentlichen replizierte virale DNA. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Replikationsanalysen mit nicht methylierten Viren erneut durchgeführt, um eine eventuelle Beeinflussung der Transgen-Expression oder der Replikationskinetik durch die spezifischen Methylierungen im Virusgenom zu vermeiden. Die virale DNA-Replikation von Ad312 wurde zusätzlich untersucht.



**Abb. 19: Virale DNA-Replikation in A-549 und U-2OS-Zellen.** Für das Southern Blot-Verfahren wurde DNA aus mit 10, 50, 100 pfu/cell AdYB-1- bzw. 20, 100, 200 pfu/cell Ad312-infizierten Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten WT-Ad5- als Negativkontrolle nicht infizierte Zellen. Die Gelbilder zeigen im Sinne einer Ladungskontrolle keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Um ein Überstrahlen benachbarter Signale zu verhindern wurde bei WT-Ad5 10mal weniger DNA aufgetragen

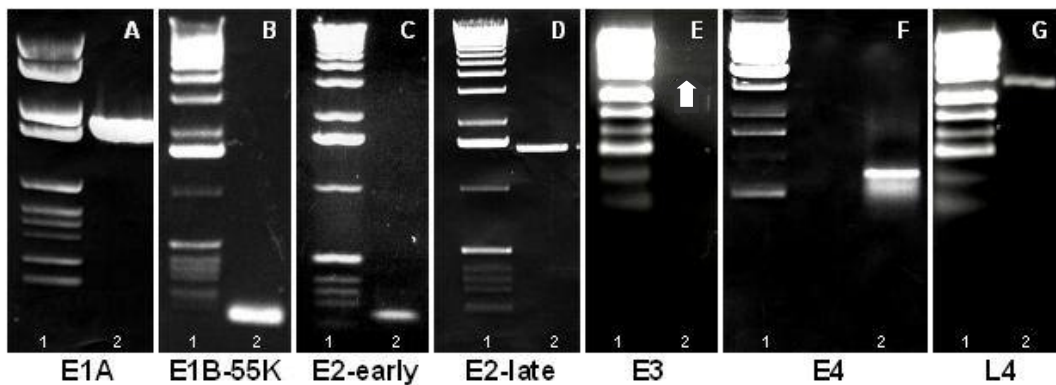


Jeweils  $10^6$  A-549- und U-2OS-Zellen wurden mit 10, 50, 100 (AdYB-1) bzw. 20, 100, 200 pfu/cell (Ad312) des entsprechenden Virus infiziert. Die DNA der infizierten Zellen wurde nach 72 Stunden isoliert, WT-Ad5 bereits nach 24 Stunden. Die Auswertung zeigt, dass AdYB-1 im Gegensatz zu Ad312 bereits bei einer MOI von 10 pfu/cell initial repliziert. Darüber hinaus ergeben sich deutliche Unterschiede in der Menge an replizierter DNA bei 50 bzw. 100 pfu/cell. Die virale DNA-Replikation des E1/E3-deletierten Vektors AdYB-1 ist signifikant stärker als die des E1A-deletierten Vektors Ad312.

### 3.3 Expressionsanalyse von AdYB-1

Zur Evaluation der Expression viraler Gene wurden A-549-Zellen (humanes nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom; NSCLC) mit WT-Ad5, AdYB-1 und Ad312 infiziert. Die zelluläre RNA wurde 72 Stunden p.i. isoliert und dem Northern Blot-Verfahren unterzogen.

Aufgrund der unter 3.2 gezeigten Ergebnisse wurde für die Expressionsanalysen von AdYB-1 und Ad312 eine MOI von 50 pfu/cell gewählt. Bei dieser MOI zeigt AdYB-1 auf allen getesteten Zelllinien *in vitro* virale DNA-Replikation. Ad312 hingegen beginnt erst ab einer MOI  $>50$  pfu/cell effektiv zu replizieren. Aufgrund der im Vergleich zur RT-PCR deutlich geringeren Sensitivität des Northern Blot Verfahrens ist somit bei 50 pfu/cell kein Nachweis viraler mRNA zu erwarten. Ad312 dient also der Kontrolle der eingesetzten MOI, die RNA nicht infizierter Zellen als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde mit dem Wildtyp des humanen Adenovirus Typ 5 (WT-Ad5) infiziert. Hierbei wurde aufgrund der effektiven viralen Replikation und der schnellen viralen Lyse Wildtyp-infizierter Zellen lediglich eine MOI von 5-10 pfu/cell eingesetzt und die zelluläre RNA bereits 24-48 Stunden p.i. isoliert. Der Nachweis der Expression erfolgte mit Hilfe des Northern Blot Verfahrens. Hierzu wurden zunächst die verschiedenen spezifischen DNA-Sonden via PCR hergestellt. Die Primer für die Sonden E1B-55K, E3, E4 und L4 wurden nach Marienfeld et al.<sup>105</sup> gewählt und z.T. modifiziert. Dies ermöglichte später den Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Daten. Die Primersequenzen für die Sonden E1A, E2-early und E2-late waren in der Arbeitsgruppe Holm bereits vorhanden und etabliert<sup>63</sup>. Die folgende Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der als Sonden verwendeten PCR-Produkte (2). Sie ergibt eine für jede Sonde spezifische Bande definierter Größe, die sich anschließend leicht ausschneiden und reinigen lässt. Zum Größenvergleich wurde eine DNA-Leiter mit definiertem Bandenmuster (1) aufgetragen.



**Abb. 20: PCR der verwendeten DNA-Sonden (A-G).** 1: DNA-Marker (A1: 0.25-2.1 kb Ladder, B1-D1 + F1: 1 kb Ladder, E1 + G1: Low Molecular Weight Marker, LMW); A2-G2: PCR-Produkt (Sonde) als spezifische Bande im Agarose-Gel. Die Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und als DNA-Sonden für das Northern (Southern) Blot-Verfahren eingesetzt.  $\hat{\uparrow}$  = Markierung der im Bild nur schwach sichtbaren E3-Bande

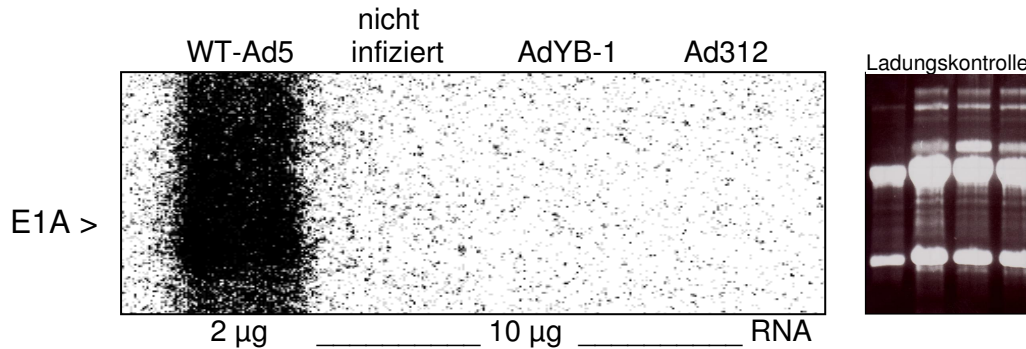
### 3.3.1 Expression der E1-Region

Die adenovirale E1-Region setzt sich aus den frühen viralen Genen E1A und E1B zusammen. Im folgenden wurde die Expression von E1A und E1B-55K evaluiert. Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse zeigen, dass bei beiden getesteten Viren bei einer MOI von 50 pfu/cell drei Tage nach der Infektion weder E1A noch E1B-55K exprimiert werden.

Zum Nachweis der E1A-mRNA wurde eine spezifische, radioaktiv markierte DNA-Sonde von 1042 bp Länge hergestellt. Diese liegt auf dem WT-Ad5-Genom zwischen bp 602 und bp 1644 und umfasst damit die codierende Sequenz für CR1, CR2 und CR3 des adenoviralen E1A-Gens.

Sowohl AdYB-1 als auch Ad312 sind E1A-deletiert, d.h. das Gen befindet sich nicht mehr im viralen Genom. Daher ist auch keine E1A-Expression zu erwarten. Dies wird durch das Ergebnis der Northern Blot Analyse bestätigt. Weder bei AdYB-1 noch bei Ad312 ist 72 Stunden nach der Infektion von A-549-Zellen mit 50 pfu/cell die Expression der viralen E1A-Region nachweisbar. WT-Ad5 (10 pfu/cell, 36 Std. p.i.) zeigt hingegen als Positivkontrolle ein deutliches Signal. E1A wird in der frühen Phase der viralen Replikation stark hochreguliert und exprimiert. Um ein „Überstrahlen“ anderer radioaktiver Banden durch die Positivkontrolle zu vermeiden, wurden hier lediglich 2  $\mu$ g zelluläre RNA

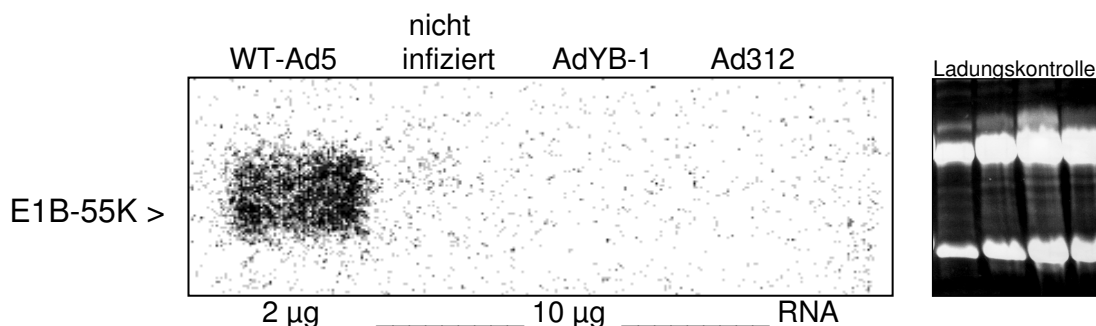
aufgetragen. Das RNA-Gelbild neben der Northern-Blot-Analyse zeigt keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Negativkontrolle, AdYB-1 und Ad312 vor dem Blotten. Es dient der Ladungskontrolle.



**Abb. 21: Northern Blot Analyse der E1A-Region.** RNA aus infizierten A-549-Zellen, MOI: 50 pfu/cell, Isolation: 72 Std. p.i. Um eine Überstrahlung zu vermeiden wurden aufgrund der starken E1A-Expression bei WT-Ad5 nur 2 µg RNA aufgetragen. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel dient der Ladungskontrolle.

Stellvertretend für das gesamte adenovirale E1B-Gen wurde mit Hilfe des Northern Blot Verfahrens die Expression von E1B-55K ebenfalls mit einer spezifischen, <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonde nachgewiesen. Die Primer für diese Sonde wurden so gewählt, dass das PCR-Amplifikat mit einer Länge von 108 bp einem spezifischen Teil der für E1B-55K codierenden Gensequenz (bp 3376-3483) entspricht.

Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass weder der vollständig E1-deletierte Vektor AdYB-1 noch der lediglich E1A-deletierte Vektor Ad312 die frühe virale E1B-55K-Region exprimieren.

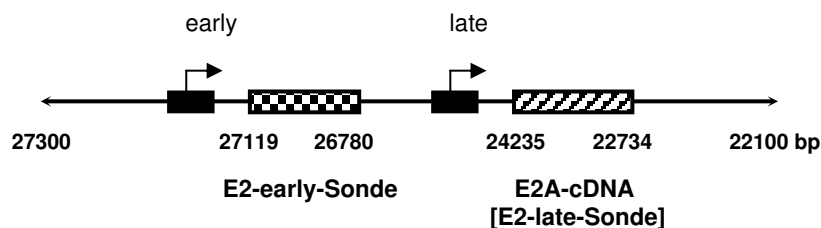


**Abb. 22: Northern Blot Analyse der E1B-Region (E1B-55K).** RNA aus infizierten A-549-Zellen, MOI: 50 pfu/cell, Isolation: 72 Std. p.i. Um eine Überstrahlung zu vermeiden wurden aufgrund der starken E1B-Expression bei WT-Ad5 nur 2 µg RNA aufgetragen. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel dient der Ladungskontrolle.

### 3.3.2 Expression der E2-Region

Die E2-Region bestehend aus E2A und E2B codiert für drei für die virale DNA-Replikation essentielle Genprodukte: die virale DNA-Polymerase, das präterminale Protein und das DBP (DNA binding protein). Ohne die Expression dieser Gene ist eine virale DNA-Replikation nicht möglich.

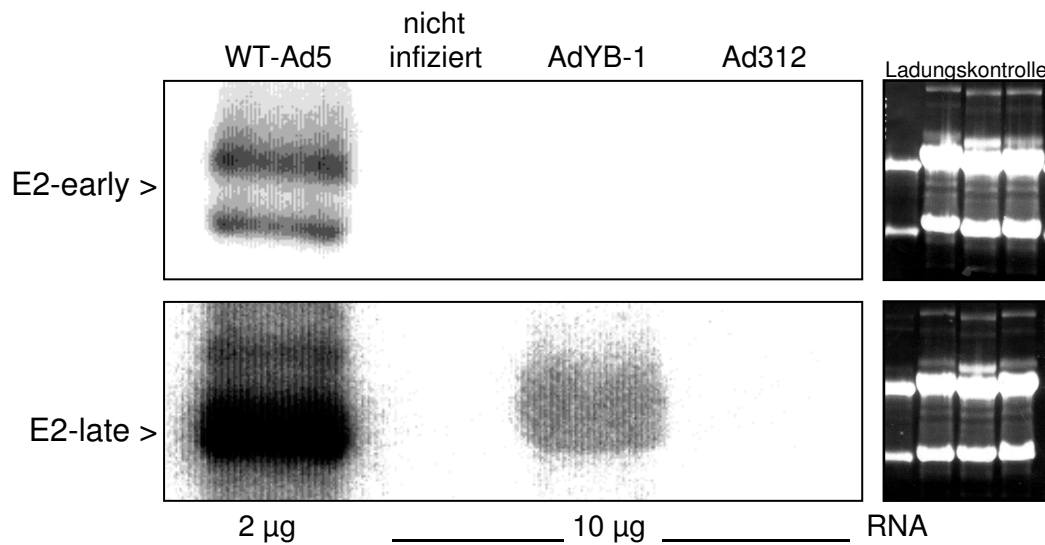
Reguliert wird die Expression der E2-Region durch zwei Promotoren, den E2F-abhängigen (E2-early-) und den E2-late-Promotor. Durch den Einsatz zweier spezifischer DNA-Sonden konnte die Expression der E2-Region durch den entsprechenden Promotor evaluiert werden. Die folgende Abbildung stellt die Lage der beiden verwendeten DNA-Sonden im Ad5-Genom schematisch dar. Erfolgt die Expression von E2A unter E2-late-Promotor-Kontrolle, kann mit der E2-early-Sonde keine virale mRNA detektiert werden.



**Abb. 23: E2-early- und E2-late-Sonde.** Die Lage der E2-early-Sonde in Ableserichtung oberhalb des E2-late-Promotors im Ad5-Genom ermöglicht eine Differenzierung zwischen E2-early und E2-late-Promotor-Aktivierung auf RNA-Ebene. Entnommen aus: Holm et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 10427-10434 (2002).

Aufgrund der starken E2-Expression in WT-Ad5-infizierten Zellen wurden nur 2 µg RNA als Positivkontrolle aufgetragen. Eine eventuelle Übertsrahlung benachbarter Signale kann so vermieden werden. Als Ladungskontrolle dienten OD-Bestimmung und ethidiumbromidgefärbtes RNA-Gel.

Die Northern Blot Analyse zeigt, dass AdYB-1 72 Std. p.i. das adenovirale E2A-Gen unter Kontrolle des E2-late-Promotors exprimiert. E2A-Expression unter E2-early-Promotor-Kontrolle konnte bei 50 pfu/cell 72 Std. p.i. nicht nachgewiesen werden.

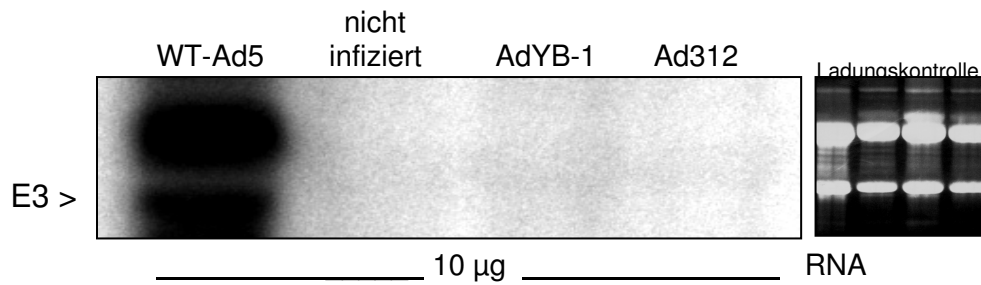


**Abb. 24: Northern Blot Analyse der E2-Region (E2-early, E2-late).** RNA aus infizierten A-549-Zellen, MOI: 50 pfu/cell, Isolation: 72 Std. p.i. Als Positivkontrolle dient RNA aus WT-Ad5-infizierten, als Negativkontrolle RNA aus nicht infizierten Zellen. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel wurde zur Ladungskontrolle herangezogen.

### 3.3.3 Expression der E3-Region

Die für das Northern Blot Verfahren verwendete DNA-Sonde liegt zwischen bp 30484 und bp 30784 im Bereich der für das E3-14.7K-Protein codierenden Sequenz und detektiert damit die Expression der E3-Region während der Frühphase der adenoviralen Replikation. Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass eine E3-Expression bei der zur Infektion eingesetzten MOI weder für den E3-deletierten Vektor AdYB-1 noch für Ad312 nachweisbar ist. Mehrere sichtbare Banden kommen durch die unterschiedlichen Splicing-Varianten des E3-RNA-Transkripts zustande.

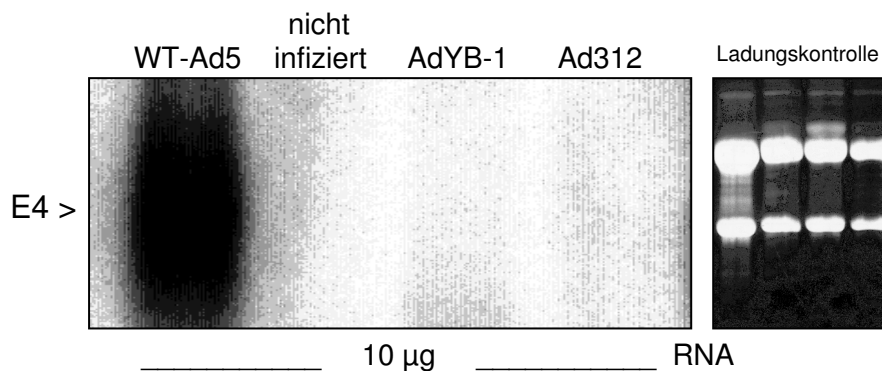
Aufgrund der im Vergleich zu E1 und E2 schwächeren Expression der E3-Region wurden hier als Positivkontrolle 10 µg RNA eingesetzt, um ein intensives positives Signal zu generieren.



**Abb. 25: Northern Blot Analyse der E3-Region (E3-14.7K).** RNA aus infizierten A-549-Zellen, MOI: 50 pfu/cell, Isolation: 72 Std. p.i. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel dient der Ladungskontrolle.

### 3.3.4 Expression der E4-Region

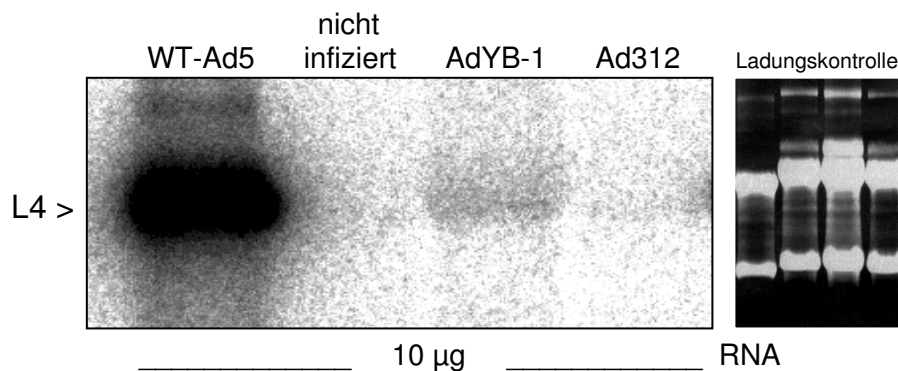
Die Expressionsanalyse der E4-Region via Northern Blot zeigt keine Expression in AdYB-1- und Ad312-infizierten Zellen 72 Stunden p.i. bei einer MOI von 50 pfu/cell. Aufgrund der im Vergleich zu E1 und E2 deutlich schwächeren Expression des E4-Gens wurden wie bei der Expressionsanalyse der E3-Region als Positivkontrolle 10 µg RNA aus WT-Ad5-infizierten A-549-Zellen aufgetragen. Die Negativkontrolle zeigt keinerlei Aktivitätsanreicherung.



**Abb. 26: Northern Blot Analyse der E4-Region (E4orf6).** RNA aus infizierten A-549-Zellen, MOI: 50 pfu/cell, Isolation: 72 Std. p.i. Das großflächige Signal der Positivkontrolle (WT-Ad5) entsteht durch die Detektion verschiedener Splicing-Varianten der analysierten Sequenz durch die verwendete Sonde (s. Abb. 7). Es entspricht einer E4-spezifischen Einzelbande. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel dient der Ladungskontrolle.

### 3.3.5 Expression der L4-Region

Die Expressionsanalyse der adenoviralen L4-Region wurde stellvertretend für die Expression der späten adenoviralen Gene, die als MLTU unter Kontrolle des ‚major late promoter‘ (MLP) zusammengefasst werden, durchgeführt. Die 288 bp große L4-Sonde liegt zwischen bp 25679 und bp 25966 auf dem Ad5-Genom im Bereich der u.a. für das L4-100K-Protein codierenden Sequenz. Die Ergebnisse zeigen, dass in den AdYB-1-infizierten A-549-Zellen bei einer MOI von 50 pfu/cell nach 72 Stunden das entsprechende L4-Transkript nachweisbar ist. Negativkontrolle und Ad312-infizierte Zellen zeigen keinerlei Aktivitätsanreicherung. WT-Ad5 ist erwartungsgemäß stark positiv (Positivkontrolle).



**Abb. 27: Northern Blot Analyse der L4-Region (späte virale Gene).** RNA aus infizierten A-549-Zellen, MOI: 50 pfu/cell, Isolation: 72 Std. p.i. Als Positivkontrolle dient RNA aus WT-Ad5-infizierten, als Negativkontrolle RNA aus nicht infizierten Zellen. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel wurde zur Ladungskontrolle herangezogen.

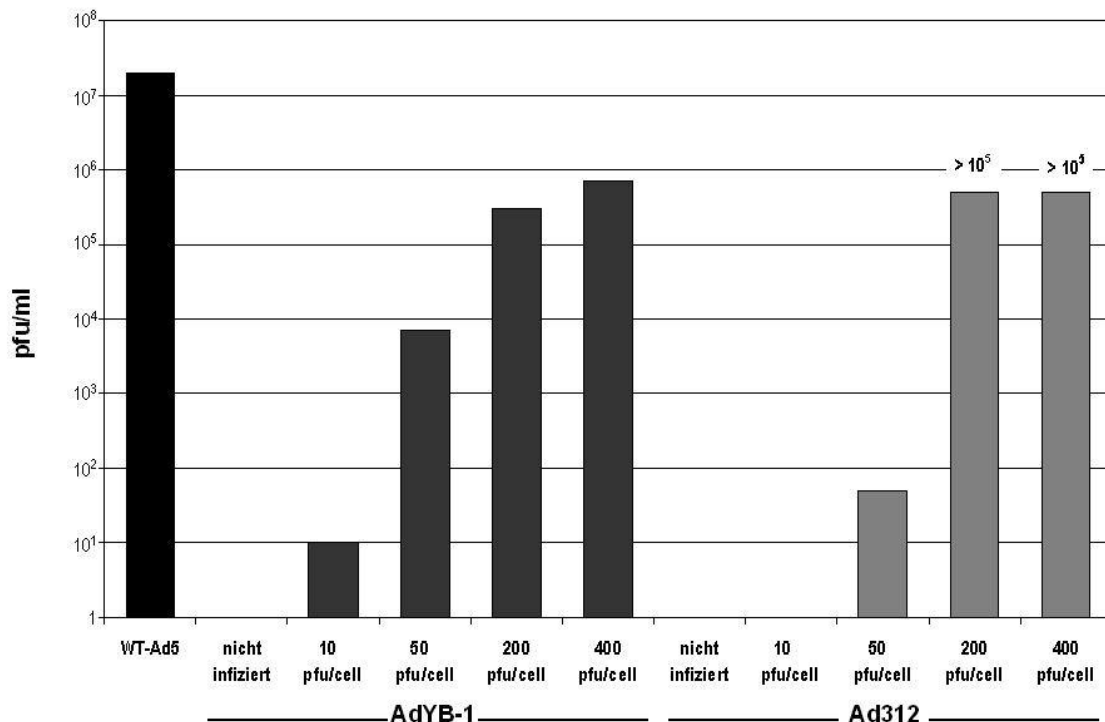
### 3.4 Kinetikstudien

In den vergleichenden Kinetikstudien wurde zum einen die Bildung infektiöser Partikel und zum anderen die Entwicklung des viral induzierten zytopathischen Effektes (CPE) durch AdYB-1 und Ad312 in Abhängigkeit von der eingesetzten Virusmenge (MOI) und der Zeit untersucht. Hierzu wurden verschiedene humane Tumorzelllinien (A-549, U-2OS und HeLa) mit den beiden adenoviralen Vektoren infiziert. Die Evaluation der Partikelbildung erfolgte mit Hilfe des Plaque Assay auf 293-Zellen. Zur Darstellung des CPE wurden Durchlichtmikroskopie und Kristallviolett färbung eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass AdYB-1 bei niedriger MOI signifikant mehr virale Partikel bildet als Ad312. Darüber hinaus zeigen AdYB-1-infizierte Zellen im Gegensatz zu Ad312-infizierten im

zeitlichen Verlauf deutlich CPE. Es kommt zur adenoviralen Zellyse durch AdYB-1. Die zeitabhängige Kinetik, d.h. der Zeitraum zwischen Infektion und CPE-Entwicklung, differiert in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie.

### 3.4.1 Produktion Plaque-bildender Einheiten

Die Bildung viraler Partikel wurde mit Hilfe des Plaqueassay auf 293-Zellen evaluiert. Damit wurde die Konzentration Plaque-bildender Einheiten (plaque forming units, pfu) der verwendeten adenoviralen Vektoren bestimmt. Diese ist von der Gesamtzahl der gebildeten viralen Partikel abzugrenzen, von denen ein Teil nicht infektiös ist. Einige der infektiösen Partikel wiederum zeigen keine Plaquebildung auf 293-Zellen. Die Zahl viraler wie auch infektiöser Partikel ist damit höher als die gemessene Konzentration an Plaque-bildenden Einheiten.



**Abb. 28: Plaque-bildende Einheiten von AdYB-1 und Ad312 in mit unterschiedlichen MOI infizierten A-549-Zellen.** Die Virusisolation erfolgte 72 Std. nach Infektion. Die Konzentration ist in pfu/ml angegeben. Ad312 200 und 400 pfu/cell waren nicht exakt quantifizierbar ( $6 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  pfu/ml). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis mehrerer unabhängiger Experimente.

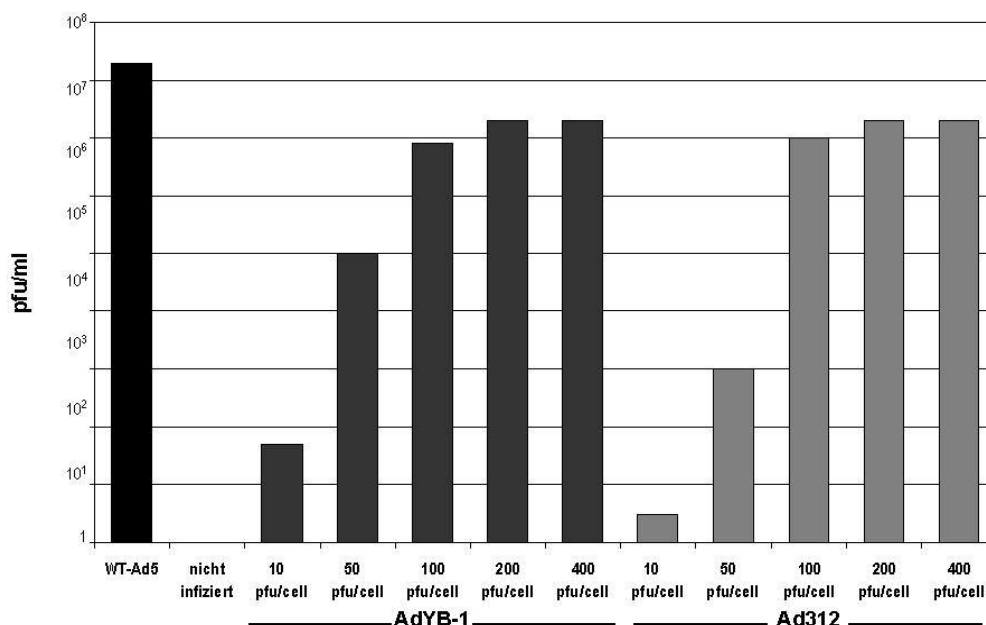


Je  $10^5$  A-549-Zellen wurden mit AdYB-1 und Ad312 mit einer MOI von 10, 50, 200 und 400 pfu/cell infiziert und nach 72 Stunden isoliert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die viralen Partikel freigesetzt und mit Hilfe des Plaqueassay quantifiziert. Von WT-Ad5 wurden 5 pfu/cell zur Infektion eingesetzt.

Das Ergebnis der Auswertung zeigt, dass AdYB-1 bereits ab einer MOI von 10 pfu/cell Plaque-bildende Einheiten produziert (initiale Replikation), während Ad312 erst ab einer MOI von 50 pfu/cell Bildung dieser Partikel zeigt. Die maximale Differenz ergibt sich bei 50 pfu/cell. Bei dieser MOI bildet AdYB-1 etwa 140 mal mehr Plaque-bildende Einheiten als Ad312. Durch die logarithmische Darstellung erscheint der Unterschied in der Abbildung geringer.

Bei höheren MOI (200, 400 pfu/cell) werden von AdYB-1 und Ad312 vergleichbare Mengen Plaque-bildender Einheiten gebildet. Es sind dies etwa 10 mal weniger pfu/ml als bei WT-Ad5.

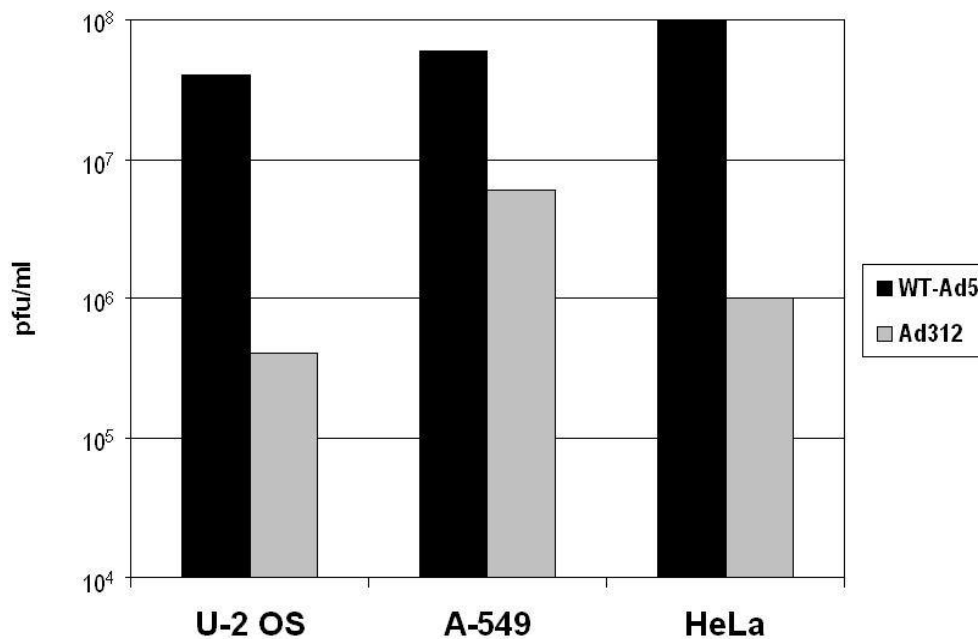
Je  $10^5$  U-2OS-Zellen wurden mit AdYB-1 und Ad312 mit einer MOI von 10, 50, 100, 200 und 400 pfu/cell infiziert und nach 72 Stunden isoliert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die viralen Partikel freigesetzt und mit Hilfe des Plaqueassay die Plaque-bildenden Einheiten quantifiziert. Von WT-Ad5 wurden ca. 5 pfu/cell für die Infektion eingesetzt.



**Abb. 29: Plaque-bildende Einheiten von AdYB-1 und Ad312 in mit unterschiedlichen MOI infizierten U-2OS-Zellen.** Die Virusisolierung erfolgte 72 Std. nach Infektion. Die Konzentration ist in pfu/ml angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis mehrerer unabhängiger Experimente.

Die Auswertung des Versuchsansatzes zeigt, dass die Ergebnisse mit denen der infizierten A-549-Zellen vergleichbar sind. Auch hier besteht die größte Differenz bei einer MOI von 50 pfu/cell. Insgesamt werden jeweils etwa zehnmal mehr Plaque-bildende Einheiten durch die verwendeten Viren gebildet als in A-549-Zellen.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Zahl der von Ad312 gebildeten Plaque-bildenden Einheiten im Vergleich zu WT-Ad5 auf unterschiedlichen Tumorzelllinien untersucht. Hierzu wurden ebenfalls je  $10^5$  Zellen (A-549, U-2OS und HeLa) mit einer MOI von 200 pfu/cell Ad312 infiziert. Von WT-Ad5 wurden wieder etwa 5 pfu/cell eingesetzt. Die Auswertung des nach 72 Stunden durchgeführten Plaqueassay zeigt, dass Ad312 in A-549-Zellen etwa 5-10 mal mehr Plaque-bildende Einheiten produziert als nach Infektion von HeLa oder U-2OS, während WT-Ad5 in allen drei Zelllinien vergleichbare Partikelzahlen (pfu) generiert.

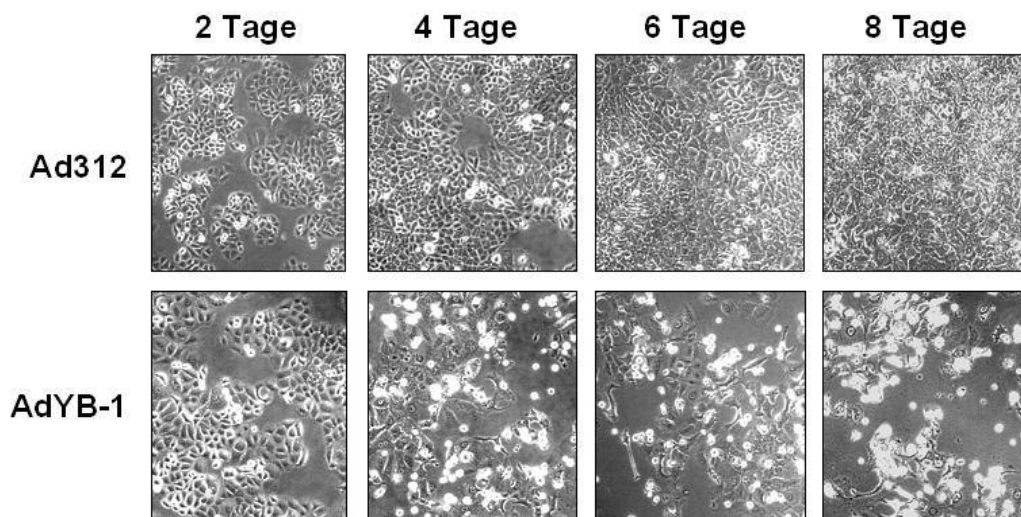


**Abb. 30: Plaque-bildende Einheiten von Ad312, 200 pfu/cell, im Vergleich zu WT-Ad5 in verschiedenen humanen Tumorzelllinien.** Die schwarzen Balken zeigen die 72 Std. nach Infektion mit WT-Ad5 gebildeten pfu. Die grauen Balken repräsentieren Ad312. Die Konzentration ist in pfu/ml angegeben. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis mehrerer unabhängiger Experimente.

Im Vergleich zu WT-Ad5 produziert Ad312 in U-2OS- und HeLa-Zellen 100mal weniger Plaque-bildende Einheiten, in A-549-Zellen nur zehnmal weniger. Die Produktion viraler Partikel ist somit nicht nur abhängig von der Art des viralen Vektors und der eingesetzten MOI, sondern v.a. auch von der verwendeten Zelllinie.

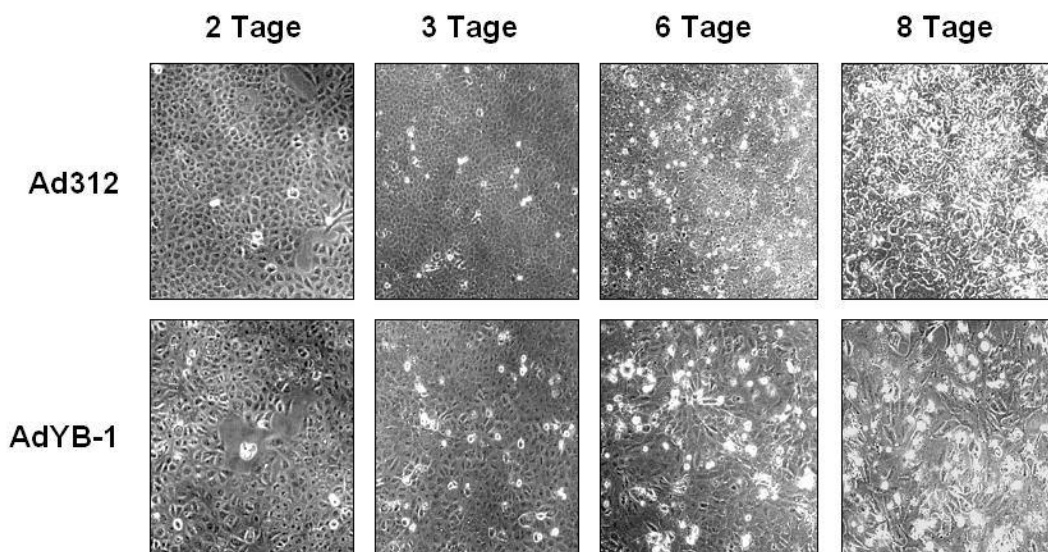
### 3.4.2 Induktion von CPE

Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass die adenovirale DNA-Replikation und die Produktion viraler Partikel im Sinne von Plaque-bildenden Einheiten (pfu) nicht mit der Induktion des zytopathischen Effektes (CPE) durch adenovirale Vektoren korrelieren. Die Entwicklung des Virus-vermittelten zytopathischen Effektes wurde mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie und der Kristallviolettfärbung evaluiert. Im mikroskopischen Bild zeigt sich der CPE durch abgekugelte Zellen mit hyperdensem, lichtbrechendem Randsaum. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die Entwicklung dieser Veränderungen in infizierten A-549- und U-2OS-Zellen über acht Tage. Je  $10^5$  Zellen wurden mit einer MOI von 100 pfu/cell mit AdYB-1 und Ad312 infiziert, nach 2, 4, 6 und 8 Tagen unter dem Mikroskop mit 100facher Vergrößerung betrachtet und photographiert.



**Abb. 31: Kinetik von AdYB-1 und Ad312, 100 pfu/cell auf A-549-Zellen.** Die infizierten Zellen wurden 2, 4, 6 und 8 Tage p.i. photographiert. Die Entwicklung von CPE zeigt sich lichtmikroskopisch zum einen in einer Wachstumshemmung/Zellyse zum anderen in einem hyperdensen, lichtbrechenden Randsaum und der Abrundung infizierter Zellen. 100fache Vergrößerung.

Die Abbildung zeigt, dass AdYB-1 bereits nach 4 Tagen deutlich CPE-ähnliche Zellyse induziert. Nach 8 Tagen ist der Großteil der A-549 Zellen lysiert. Im Gegensatz dazu zeigen die Ad312-infizierten Zellen nahezu keine CPE-Entwicklung. Nach 8 Tagen ist die Platte hyperkonfluent. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die infizierten U-2OS-Zellen:



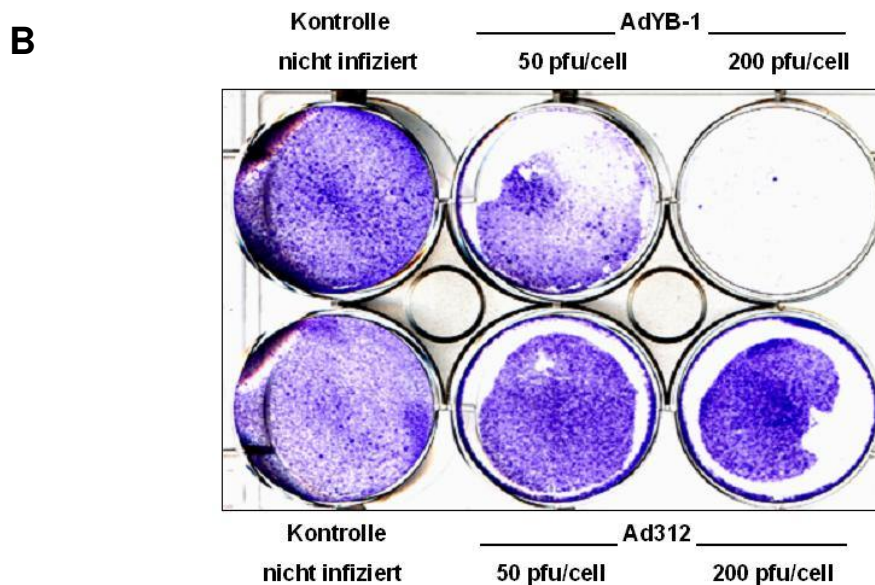
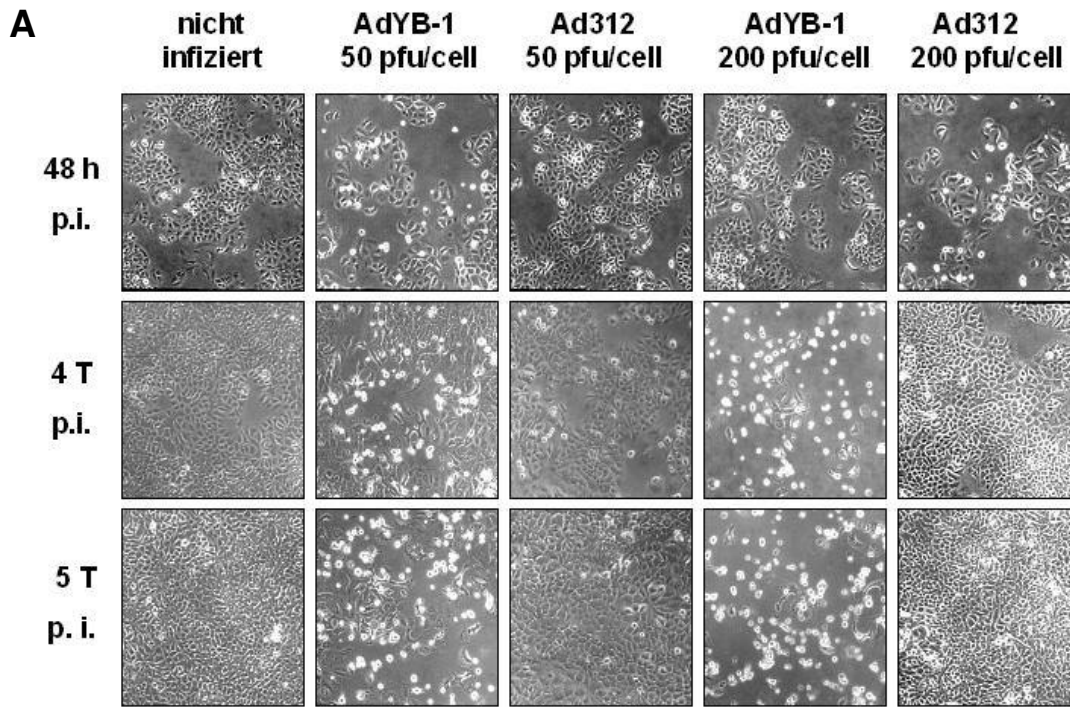
**Abb. 32: Kinetik von AdYB-1 und Ad312, 100 pfu/cell auf U-2OS-Zellen.** Die infizierten Zellen wurden 2, 4, 6 und 8 Tage p.i. photographiert. Die Entwicklung von CPE zeigt sich lichtmikroskopisch zum einen in einer Wachstumshemmung/Zellyse zum anderen in einem hyperdensen, lichtbrechenden Randsaum und der Abrundung infizierter Zellen. 100fache Vergrößerung.

Die AdYB-1-infizierten U-2OS-Zellen entwickeln im Gegensatz zu den Ad312-infizierten ebenfalls deutlich CPE. Zwar ist der Effekt schwächer als bei A-549, dennoch werden auch viele U-2OS-Zellen durch AdYB-1 nach 8 Tagen lysiert.

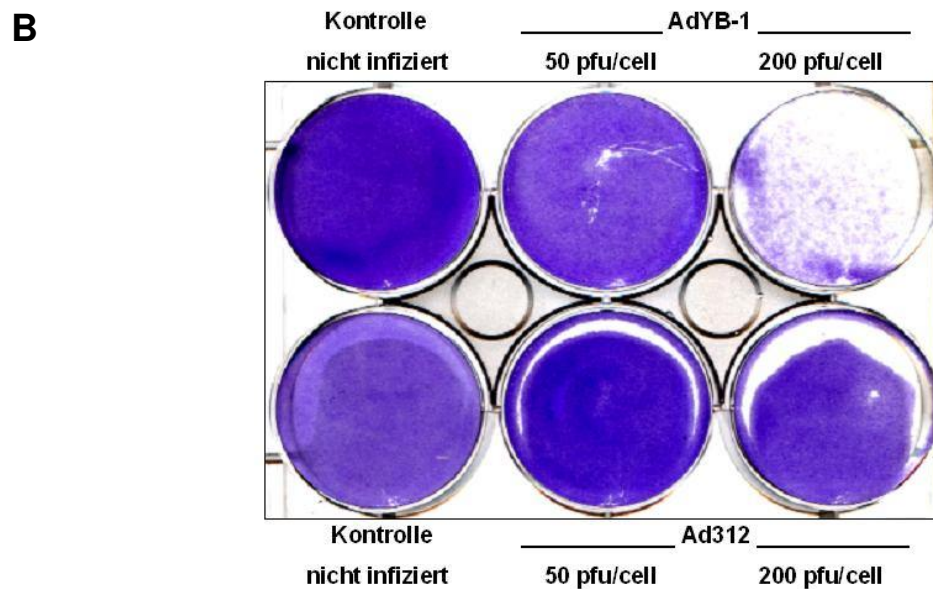
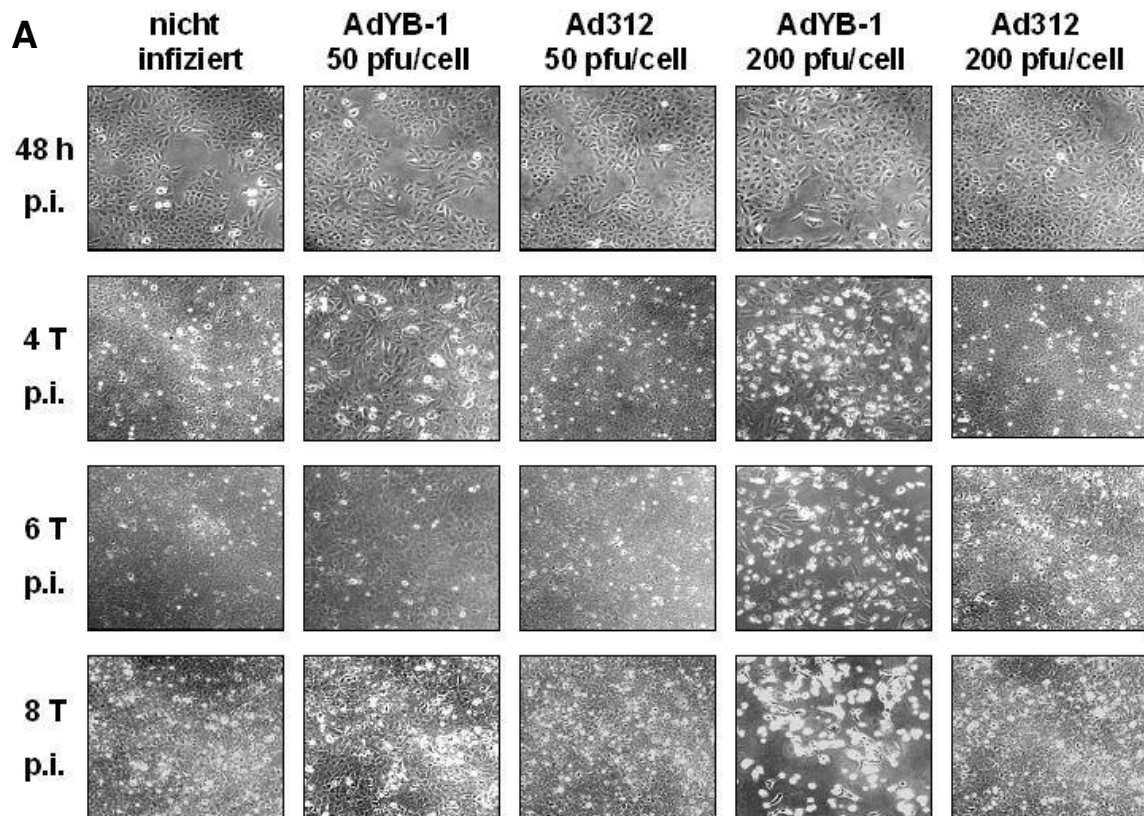
In weiteren Analysen wurden verschiedene MOI von AdYB-1 und Ad312 auf A-549-, U-2OS- und HeLa-Zellen eingesetzt. Zusätzlich zur Durchlichtmikroskopie wurden Kristallviolett-färbungen durchgeführt. Diese Färbung dient dem Nachweis zum Zeitpunkt der Fixierung lebender Zellen. Virale Zellyse bzw. CPE können so gut sichtbar gemacht werden. Je  $10^5$  Zellen wurden mit einer MOI von 50 und 200 pfu/cell AdYB-1 und Ad312 infiziert. Aufgrund der effektiveren Zellyse durch AdYB-1 wurde die Kristallviolett-färbung der A-549- bereits nach 5 Tagen, die der HeLa-Zellen nach 8 Tagen durchgeführt. Die folgenden zwei Abbildungen (Abb.26/27) zeigen Durchlichtmikroskopie nach 2, 4 und 5 (A-549) bzw. 2, 4, 6 und 8 Tagen (HeLa) und die abschließenden Kristallviolett-färbungen. Die Analyse der U-2OS-Zellen zeigt mit A-549 vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Sowohl bei relativ niedriger (50 pfu/cell) als auch bei hoher MOI (200 pfu/cell) induziert AdYB-1 im Gegensatz zu Ad312 deutlich CPE. Die Kristallviolett-färbungen

zeigen, dass die mit einer MOI von 200 pfu/cell infizierten A-549-, U-2OS- und HeLa-Zellen durch AdYB-1 nach 5 bzw. 8 Tagen vollständig lysiert wurden. Die Ad312-infizierten Zellen zeigen auch bei einer MOI von 200 pfu/cell nahezu keine CPE-Entwicklung. Die Platten sind nach 5 bzw. 8 Tagen hyperkonfluent.



**Abb. 33: Kristallviolett färbung von AdYB-1 und Ad312, 50/200 pfu/cell auf A-549-Zellen.**  
**A:** Durchlichtmikroskopie: Die infizierten Zellen wurden 2, 4 und 5 Tage p.i. photographiert. Die Induktion von Zellyse zeigt sich an abnehmender Konfluenz und der Zunahme abgekugelter Zellen mit hyperdensem Randsaum. 100fache Vergrößerung. **B:** Kristallviolett färbung 5 Tage p.i.: Kristallviolett färbt die lebenden Zellen an. Ungefärbte Areale repräsentieren adenovirale Zellyse.

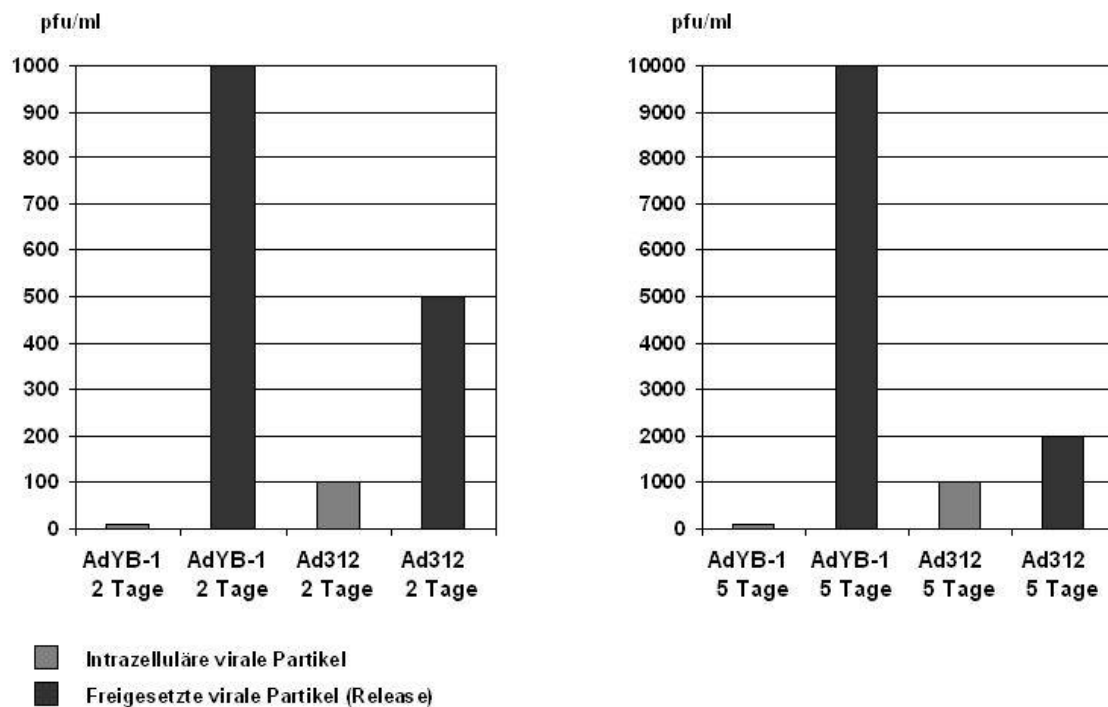


**Abb. 34: Kristallviolett färbung von AdYB-1 und Ad312, 50/200 pfu/cell auf HeLa-Zellen.**

**A:** Durchlichtmikroskopie: Die infizierten Zellen wurden 2, 4, 6 und 8 Tage p.i. photographiert. Die Induktion von Zellyse zeigt sich an abnehmender Konfluenz und der Zunahme abgekugelter Zellen mit hyperdensem Randsaum. 100fache Vergrößerung. **B:** Kristallviolett färbung 8 Tage p.i.: Kristallviolett färbt die lebenden Zellen an. Ungefärbte Areale repräsentieren adenovirale Zellyse.

### 3.4.3 Freisetzung Plaque-bildender Einheiten

Die vorangegangenen Kinetikstudien haben gezeigt, dass Produktion Plaque-bildender Einheiten (pfu) und Entwicklung von zytopathischem Effekt (CPE) nicht korrelieren. Aufgrund dieser Beobachtung wurden im folgenden intrazelluläre und freigesetzte Plaque-bildende Einheiten getrennt voneinander erfasst. Hierzu wurden jeweils  $10^5$  A-549-Zellen mit einer MOI von 50 pfu/cell mit AdYB-1 und Ad312 infiziert.



**Abb. 35: Freisetzung Plaque-bildender Einheiten.** Die Freisetzung viraler Partikel wurde 2 und 5 Tage nach Infektion von A-549-Zellen mit 50 pfu/cell AdYB-1 bzw. Ad312 via Plaque Assay überprüft. Mediumüberstand und Zellen wurde getrennt voneinander isoliert und analysiert. Mediumüberstand = freigesetzte Partikel, adhärenente Zellen = intrazelluläre Partikel. Die Partikelzahl ist in pfu/ml angegeben. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Linke Graphik: 2 Tage p.i.; rechte Graphik: 5 Tage p.i.

Zwei und fünf Tage post infectionem wurden Mediumüberstand und adhärenente Zellen getrennt voneinander isoliert, die viralen Partikel aus den adhärenenten Zellen mittels mehrmaligem Einfrieren und Auftauen freigesetzt, und die Partikelzahl als pfu/ml via Plaqueassay auf 293-Zellen bestimmt.

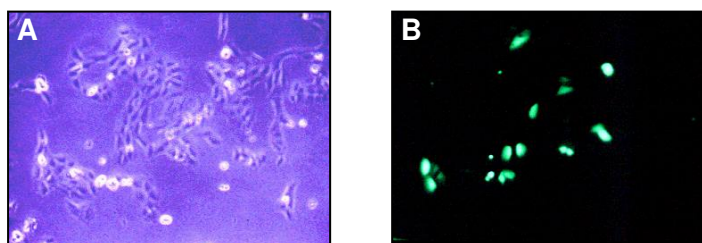
Nach 5 Tagen zeigen die AdYB-1-infizierten Zellen im Gegensatz zu den Ad312-infizierten deutlich CPE. Durch die virale Lyse sind die AdYB-1-infizierten Zellen deutlich

weniger konfluent (Daten nicht gezeigt). Die Graphik zeigt, dass AdYB-1 bei einer MOI von 50 pfu/cell nicht nur insgesamt mehr Plaque-bildende Einheiten produziert als Ad312, sondern die gebildeten Partikel auch im wesentlichen freisetzt. Die Freisetzung der Plaque-bildenden Einheiten korreliert mit der Entwicklung von CPE.

### 3.5 Substitution von E1B-55K und E4orf6

Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, die Partikelbildung von AdYB-1 durch die zusätzliche Expression der frühen viralen Gene E4orf6 und E1B-55K signifikant zu steigern. Um die Effekte dieser beiden Gene auf die Partikelbildung zu untersuchen, wurden je  $10^5$  U-2OS-Zellen mit 50 pfu/cell AdYB-1 infiziert. Ein Versuchsansatz wurde zuvor mit dem Plasmid pCMV-E4orf6 (freundlicherweise erhalten von Dr. M. Dobbstein, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) transfiziert, ein weiterer mit 50 pfu/cell des E1/E3-deletierten adenoviralen Vektors Ad-55K (freundlicherweise erhalten von Dr. M. Dobbstein) co-infiziert. Ein dritter Versuchsansatz wurde mit pCMV-E4orf6 transfiziert und mit 50 pfu/cell Ad-55K co-infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen, als Referenzwert für die Partikelbildung der lediglich mit AdYB-1 infizierte Ansatz. 48 Stunden p.i. wurden die Zellen unter dem Mikroskop photographiert und anschließend mitsamt dem Medium isoliert. Die Auswertung der Partikelbildung erfolgte mit Hilfe eines Plaqueassay auf 293-Zellen.

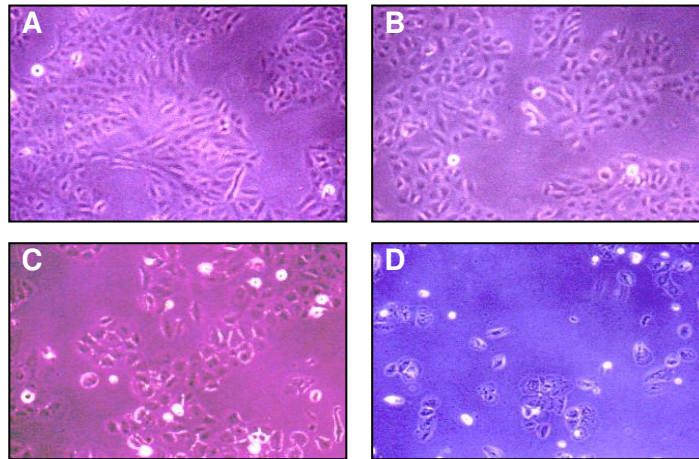
Die Effizienz der Transfektion mit pCMV-E4orf6 wurde mit Hilfe eines GFP-Plasmides (pGL3-Enh-CMV-GFP) überprüft. Etwa 10-20% der Zellen konnten erfolgreich transfiziert werden. Die folgende Abbildung zeigt Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie der pGL3-Enh-CMV-GFP-transfizierten Zellen.



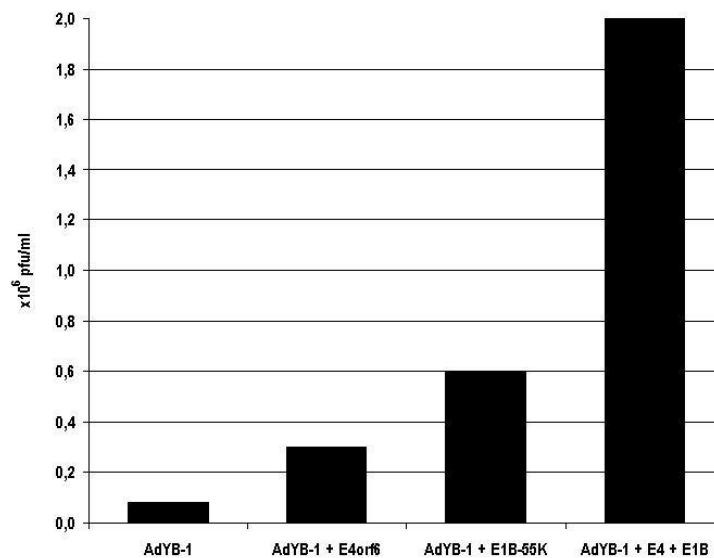
**Abb. 36: Transfektionseffizienz.** **A:** Durchlichtmikroskopie pGL3-GFP-transfizierter Zellen. 100fache Vergrößerung, **B:** Fluoreszenzmikroskopie desselben Gesichtsfeldes wie A. Die Transfektionseffizienz liegt bei ca. 10%.



Die Durchlichtmikroskopie zeigt bereits die Unterschiede bei der Entwicklung von CPE zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen. Das mikroskopische Bild der Kombination von AdYB-1 und E4orf6 ist vergleichbar mit der AdYB-1/Ad-55K-Coinfektion (nicht gezeigt). Die Auswertung der Partikelzahl als pfu/ml macht den Substitutionseffekt graphisch sichtbar.



**Abb. 37: Durchlichtmikroskopie der transfizierten/infizierten U-2OS-Zellen.** Abnehmende Konfluenz und abgerundete Zellen mit hyperdensem Randsaum sind lichtmikroskopische Zeichen für adenovirale Replikation und Zellyse. 100fache Vergrößerung. **A:** Kontrolle, nicht infiziert; **B:** AdYB-1, 50 pfu/cell; **C:** AdYB-1, 50 pfu/cell + Ad-55K, 50pfu/cell; **D:** pCMV-E4orf6 + AdYB-1, 50 pfu/cell + Ad-55K, 50 pfu/cell.

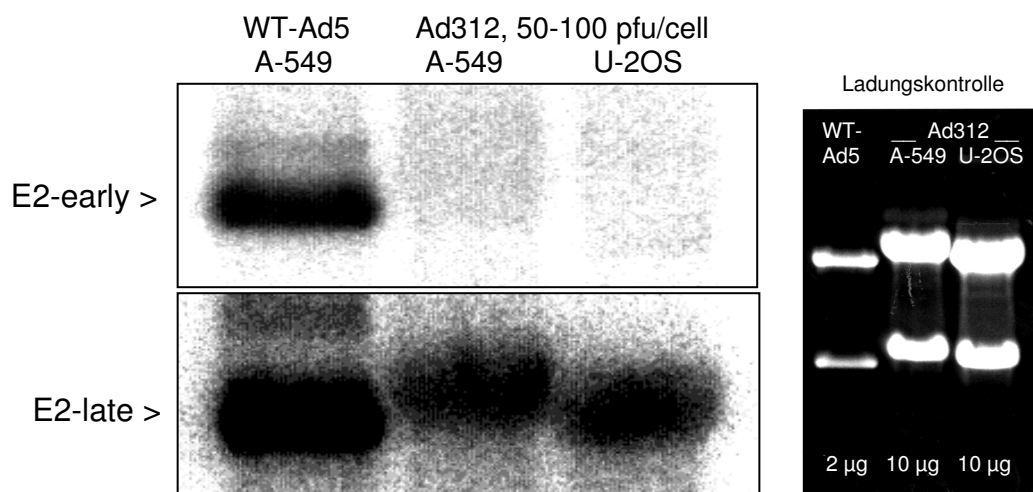


**Abb. 38: Substitution von E1B-55K und E4orf6.** Die Abbildung zeigt die Bildung von pfu 5 Tage nach Infektion/Transfektion. Die Zahl der Plaque-bildenden Einheiten ist in 10<sup>6</sup> pfu/ml angegeben.

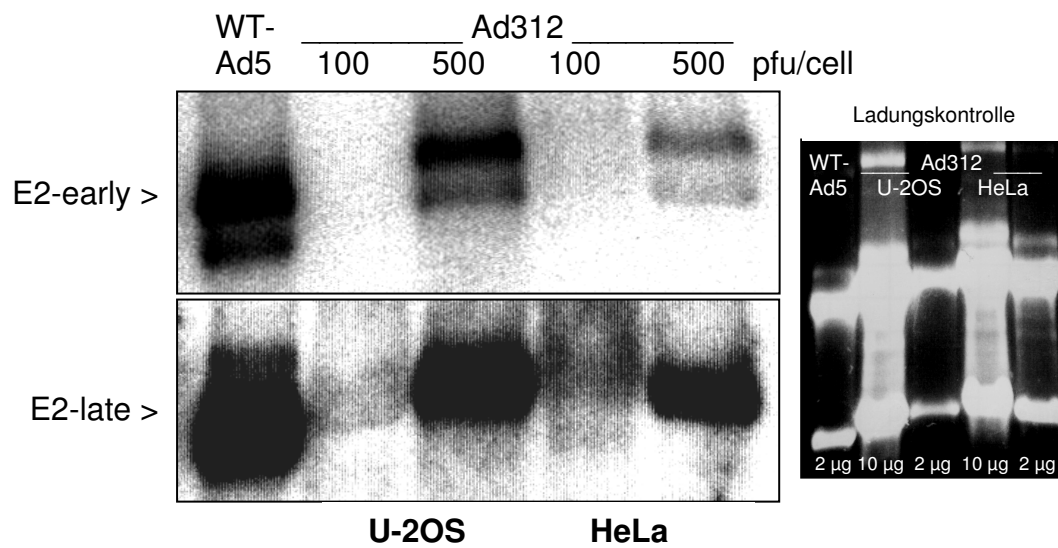
Die Kombination aus AdYB-1, E4orf6 und E1B-55K bildet etwa 25mal mehr virale Partikel (Plaques-bildende Einheiten) als AdYB-1 allein. Die Effekte von E1B-55K und E4orf6 sind additiv, d.h. AdYB-1 mit Ad-55K bzw. E4orf6 allein zeigt eine wesentlich geringere Zunahme der Partikelzahl. Bei der Co-Infektion mit Ad-55K kommt hinzu, dass durch die Kombination der beiden Vektoren insgesamt mehr Virus (je 50 pfu/cell) eingesetzt wurde.

### 3.6 Adenoviraler E2-early-Promotor

Die Evaluation der Aktivierung des adenoviralen E2-early-Promotors erfolgte mit zwei unterschiedlichen Systemen. Zum einen wurde eine Expressionsanalyse des frühen viralen Gens E2A mit Hilfe des Northern Blot Verfahrens (s. auch 3.3.2) durchgeführt. Hierbei lässt sich durch den Einsatz zweier verschiedener Sonden zwischen einer Expression durch den adenoviralen E2-early-Promotor und den E2-late-Promotor unterscheiden. Die Ergebnisse zeigen, dass 48 Stunden nach der Infektion mit einer MOI von 50 pfu/cell Ad312 bei keiner der beiden getesteten Zelllinien (A-549 und U-2OS) E2A unter Kontrolle des adenoviralen E2-early-Promotors exprimiert wird. Die Expression erfolgt durch den E2-late-Promotor. Bei hohen MOI's ( $\gg$  100 pfu/cell) werden E2-early- und E2-late-Promotor bei allen untersuchten Zelllinien eingeschaltet. Die Infektion mit WT-Ad5 dient als Positivkontrolle.



**Abb. 39: E2-early-/E2-late-Promotor-Aktivierung, Northern Blot.** Als Positivkontrolle wurden 2 µg RNA aus WT-Ad5-infizierten Zellen aufgetragen. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel dient der Ladungskontrolle. **Oben:** Hybridisierung mit E2-early-Sonde. **Unten:** Blot gestrippt, Hybridisierung mit E2-late-Sonde.

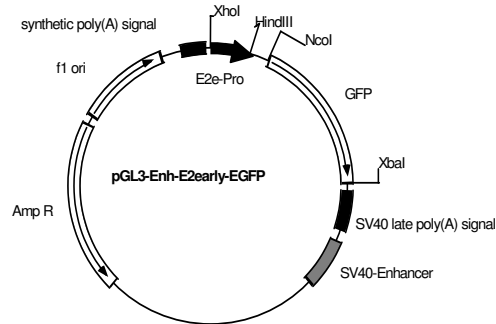


**Abb. 40: E2-early-/E2-late-Promotor-Aktivierung bei niedriger (100 pfu/cell) und hoher MOI (500 pfu/cell), Northern Blot.** Als Positivkontrolle wurden 2 µg RNA aus WT-Ad5-infizierten Zellen aufgetragen. Um ein Überstrahlen benachbarter Signale zu vermeiden wurden bei hoher MOI nur 2 µg RNA aufgetragen. Das ethidiumbromidgefärbte RNA-Gel dient der Ladungskontrolle. **Oben:** Hybridisierung mit E2-early-Sonde. **Unten:** Blot gestrippt, Hybridisierung mit E2-late-Sonde.

Zur Sicherung der Ergebnisse und zur Erhöhung der Sensitivität wurde für weitere Versuche ein Plasmidmodell eingesetzt. Hierzu wurde der CMV-Promotor von pGL3-Enh-CMV-GFP (freundlicherweise erhalten von Klaus Mantwill, AG Holm) enzymatisch herausgeschnitten und durch ein PCR-Amplifikat eines Teiles des adenoviralen E2-early-Promotors ersetzt. Das Vektor-Backbone (pGL3-Enhancer-Vektor) stammt von der Firma Promega. Die Grünfärbung GFP-Plasmid-transfizierter Zellen unter Fluoreszenzlicht spiegelt die Expression des Green Fluorescent Protein (GFP) und damit die Aktivierung des vorgeschalteten Promotors wider. Durch Infektion der GFP-transfizierten Zellen kann die Aktivierung des Promotors durch verschiedene Viren bzw. unterschiedliche MOI eines adenoviralen Vektors untersucht werden. Mit Hilfe der FACS-Analyse lässt sich durch Messung der mittleren Fluoreszenz die GFP-Expression quantifizieren.

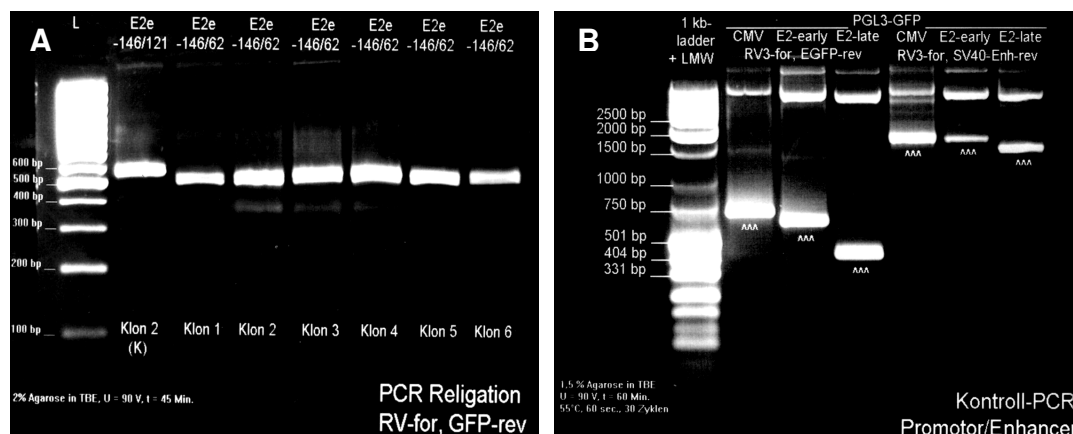
Die Primer für die Amplifikation des E2-early-Promotors sind so gewählt, dass das PCR-Produkt durch die adenoviralen E1A-Genprodukte voll induzierbar ist. Hierzu sind mindestens zwei von drei definierten Regionen innerhalb des Promotors notwendig. Das ca. 200 bp große Konstrukt enthält alle drei dieser für die E1A-Induzierbarkeit essentiellen Regionen (s. auch Abschnitt 1.5.6). Zusätzlich enthalten die verwendeten Primer bereits die

für die Ligation mit dem restringierten Plasmid pGL3-Enh-(CMV)-GFP notwendigen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und XhoI. Nach der Ligation wurde der Promotor durch eine Restriktion des Plasmides mit HindIII und PvuII um 60 bp verkürzt. Die folgende Abbildung zeigt eine Schemazeichnung von pGL3-Enh-E2e-GFP.



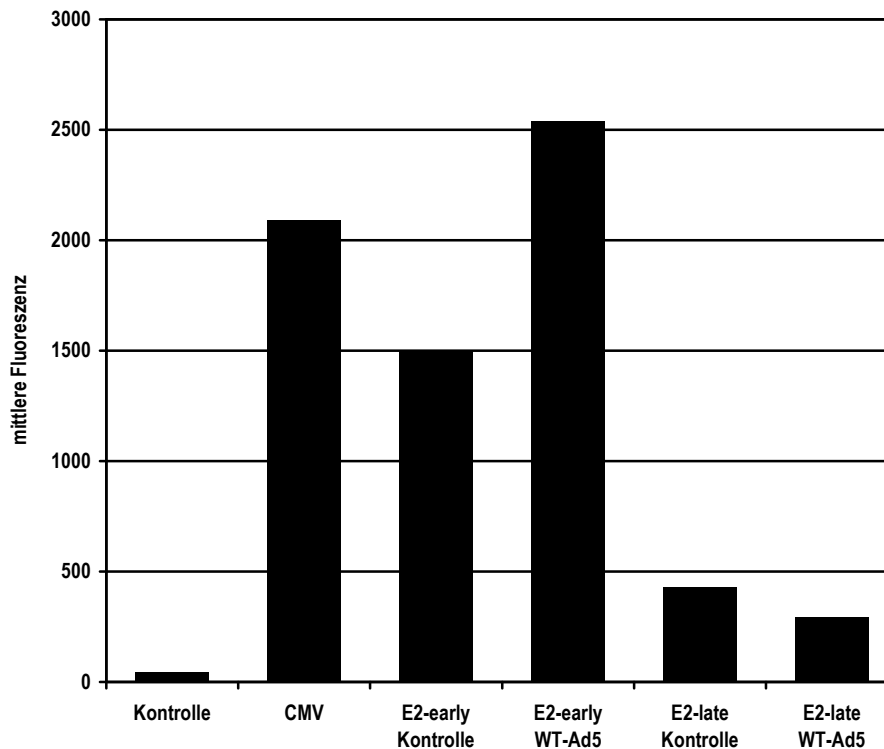
**Abb. 41: pGL3-Enh-E2e-GFP.** Der pGL3-Enhancer-Vektor enthält das GFP-Gen unter Kontrolle eines adenoviralen E2-early-Promotor-Konstruktes.

Neben pGL3-Enh-E2e-GFP wurden zwei weitere pGL3-Enhancer-Vektoren eingesetzt. Diese exprimieren GFP unter CMV- bzw. E2-late-Promotor-Kontrolle. Alle drei Vektoren wurden via PCR überprüft.



**Abb. 42: Kontrolle von pGL3-Enh-E2e-GFP.** **A:** Kontroll-PCR nach Religation. von links: a) 100bp-Leiter, b) pGL3-Enh-E2e(-146/121)-GFP als Kontrolle (548 bp PCR-Fragment), c)-h) pGL3-Enh E2e-GFP (486 bp PCR-Fragment), **B:** Kontroll-PCR der pGL3-Enhancer-Vektoren. von links: a) 1kb-Leiter+LMW, b)-d): Promotor-PCR CMV/E2e/e2l, e)-g): Enhancer-PCR CMV/E2e/E2l

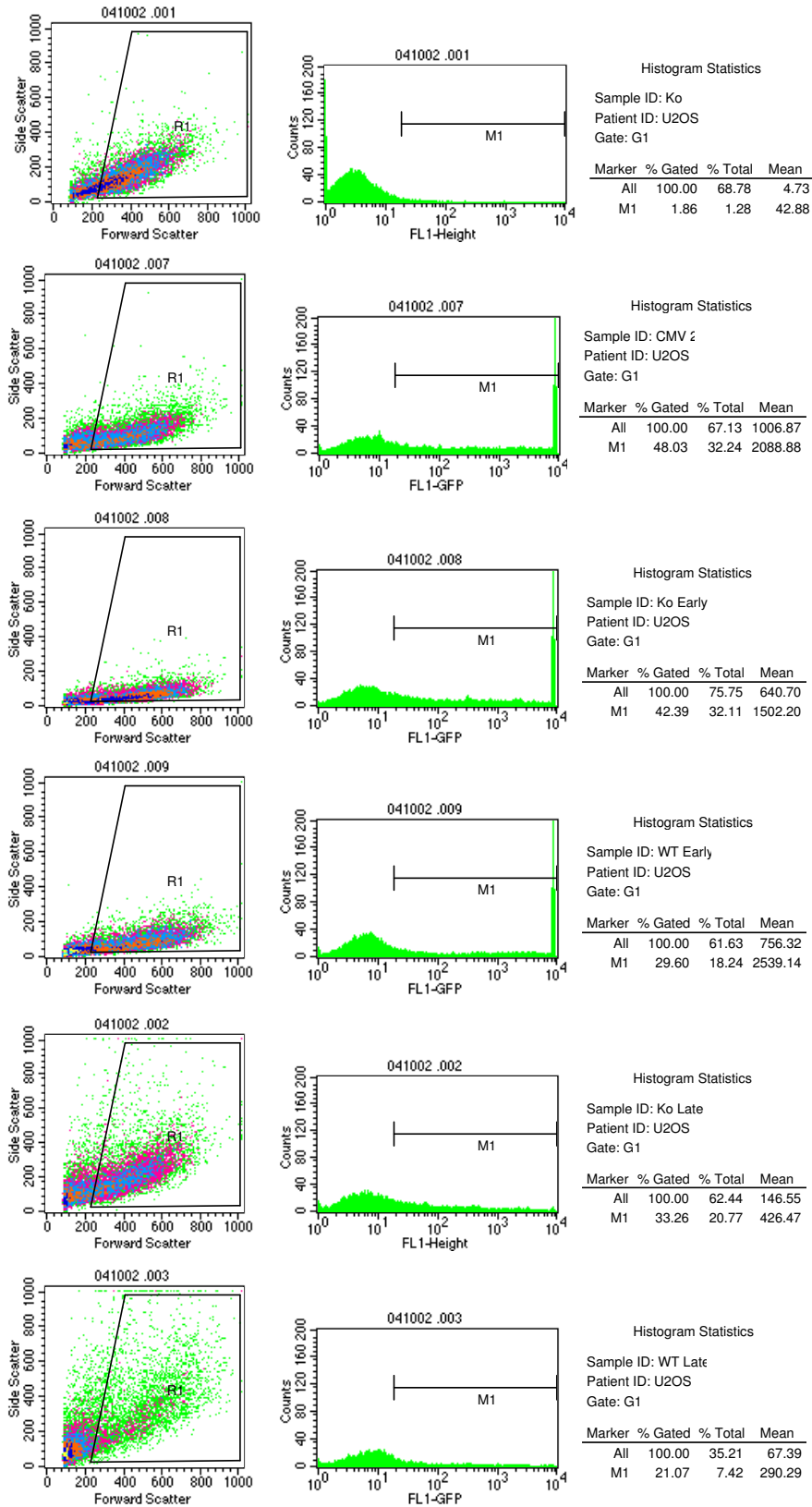
Zur Evaluation der Promotoraktivierung wurden je  $10^5$  U-2OS-Zellen mit den verschiedenen pGL3-Enhancer-Vektoren transfiziert und anschließend mit einer MOI von ca. 5 pfu/cell WT-Ad5 infiziert. Die Auswertung erfolgte 48 Std. p.i. qualitativ durch Fluoreszenzmikroskopie (Daten nicht gezeigt) und quantitativ mit Hilfe der FACS-Analyse. Im Zellsorter (FACS) wurde nach Anregung durch UV-Licht die mittlere Fluoreszenz von je  $10^4$  GFP-transfizierten Zellen gemessen.



**Abb. 43: E2-early/E2-late-Promotoraktivierung nach Infektion mit WT-Ad5.** Die Abbildung zeigt die Auswertung der FACS-Analyse der mit den pGL3-Enhancer-Plasmide transfizierten und anschließend infizierten Zellen 48 Std. p.i. Die Balken zeigen die mittlere Fluoreszenz der gemessenen U-2OS-Zellen. Kontrolle = nicht infiziert; CMV = Positivkontrolle für Transfektion

Die Auswertung zeigt, dass die U-2OS-Zellen gut transfizierbar sind (CMV) und nahezu keine Eigenfluoreszenz zeigen (Kontrolle). Die E2-early-Kontrolle zeigt eine hohe Hintergrundexpression von GFP. Der Promotor ist durch WT-Ad5 induzierbar. GFP unter E2-late-Promotor-Kontrolle zeigt im Vergleich zu E2-early eine wesentlich geringere Hintergrundexpression. Der E2-late-Promotor ist im Plasmidmodell durch WT-Ad5 nicht induzierbar.

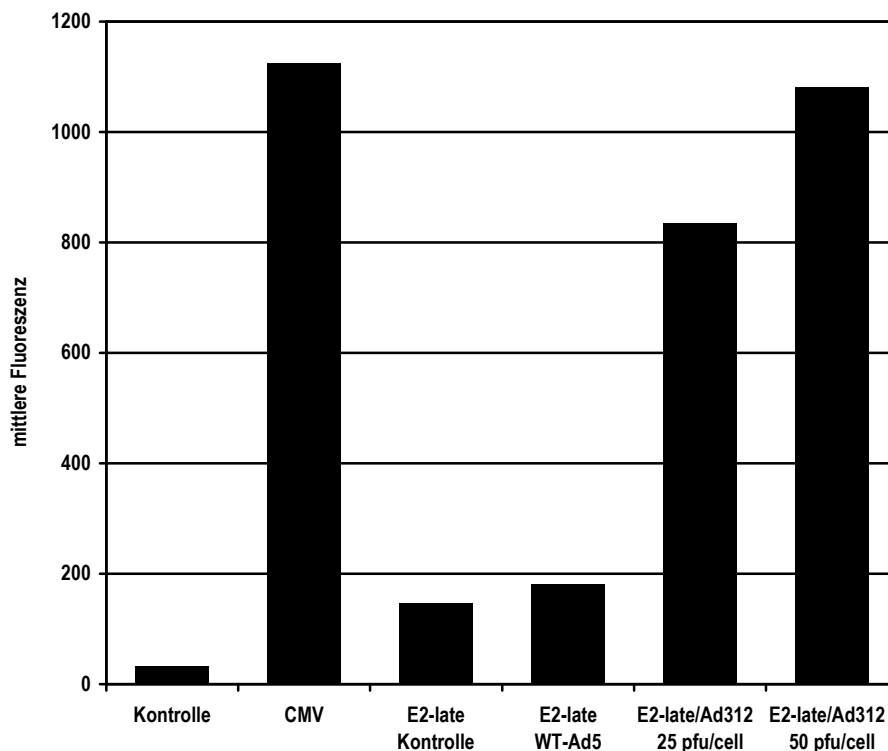
Die folgende Abbildung zeigt die Daten der zugehörigen FACS-Analyse.



**Abb. 44: Fluoreszenzanalyse der pGL3-Enh-GFP-transfizierten U-2OS-Zellen.** Gezeigt sind die originären FACS-Daten. Von oben nach unten folgen: Kontrolle, CMV, E2-early/Kontrolle, E2-early/WT-Ad5, E2-late/Kontrolle, E2-late/WT-Ad5

Aufgrund der hohen Hintergrundexpression des E2-early-Promotor-Plasmides mit SV40-Enhancer, wurde bei folgenden Versuchsansätzen nur die GFP-Expression unter E2-late-Promotor-Kontrolle ausgewertet. Eine Vergleichbarkeit zwischen pGL3-Enh-E2e-GFP und pGL3-Enh-E2l-GFP war nicht gegeben.

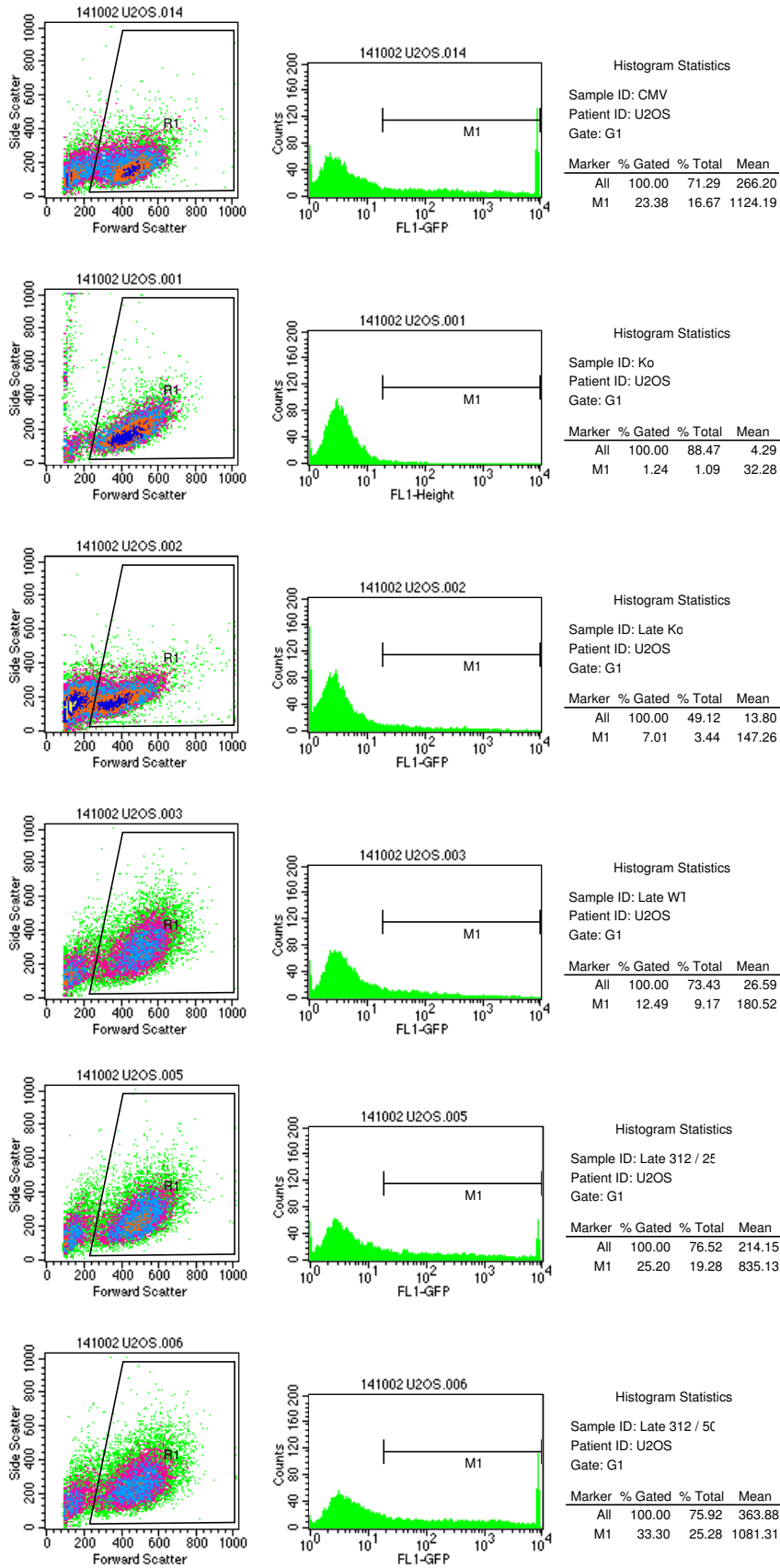
Je  $10^5$  U-2OS-Zellen wurden mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert und anschließend mit einer MOI von 25-50 und 50-100 pfu/cell Ad312 infiziert. Die quantitative Auswertung via FACS-Analyse erfolgte 48 Std. post infectionem.



**Abb. 45: E2-late Promotoraktivierung durch WT-Ad5 und Ad312.** Die Abbildung zeigt die Auswertung der Fluoreszenzanalyse pGL3-Enh-E2l-GFP-transfizierter Zellen 48 Std. p.i. Die Balken zeigen die mittlere Fluoreszenz der gemessenen U-2OS-Zellen. Kontrolle = nicht infiziert; CMV = Positivkontrolle für Transfektion

Das Diagramm zeigt, dass der E2-late-Promotor im Plasmidmodell bereits bei geringer MOI induziert wird. Nach Infektion mit WT-Ad5 ergibt sich erneut keine E2-late-Promotor-Aktivierung.

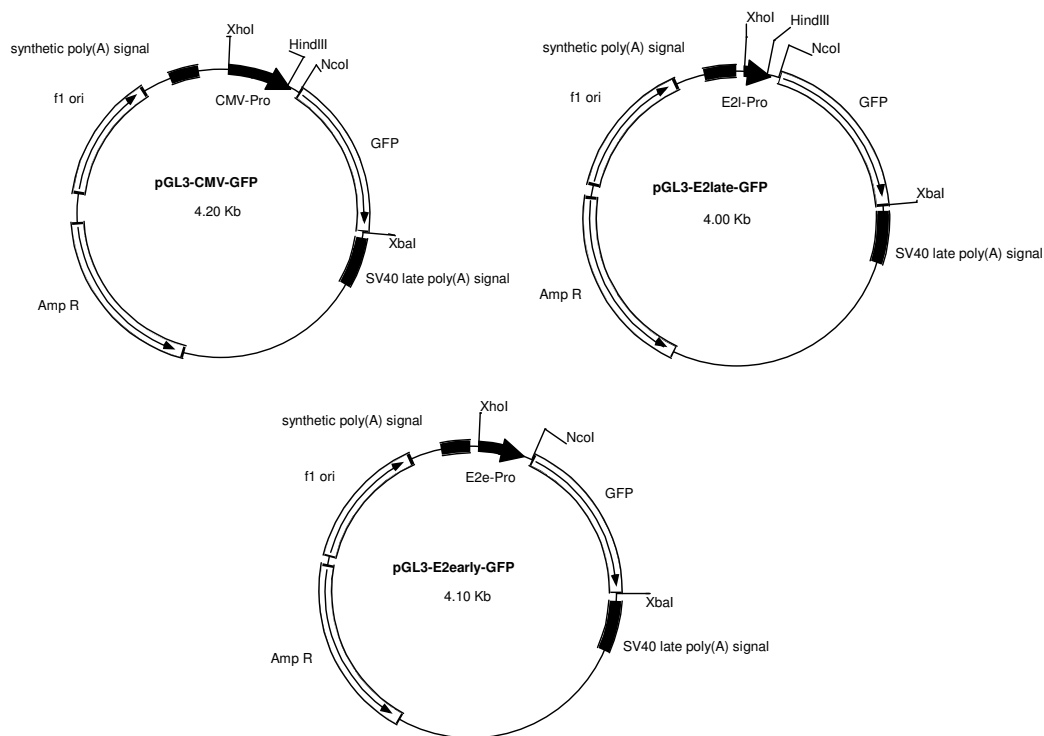
Die folgende Abbildung zeigt die Daten der zugehörigen FACS-Analyse.



**Abb. 46: Fluoreszenzanalyse der pGL3-Enh-GFP-transfizierten U-2OS-Zellen.** Gezeigt sind die originären FACS-Daten. Von oben nach unten folgen: CMV, Kontrolle, E2-late/Kontrolle, E2-late/WT-Ad5, E2-late/Ad312, 25pfu/cell, E2-late/Ad312, 50 pfu/cell

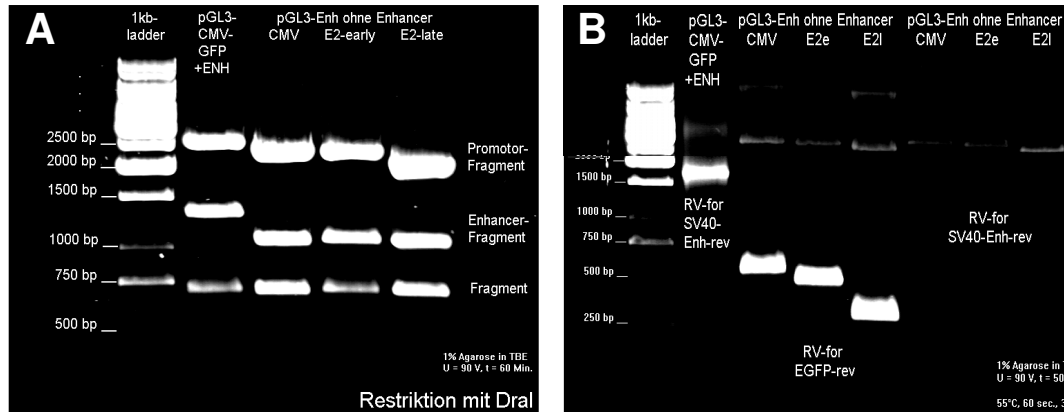


Aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit zwischen den E2-early- und E2-late-Promotor-Vektoren mit SV40-Enhancer wegen der starken Induktion des E2-early-Promotors in nicht infizierten Zellen (Hintergrundexpression), wurde der SV40-Enhancer aus dem Plasmid-Backbone entfernt.



**Abb. 47: pGL3-GFP-Plasmide ohne Enhancer.** Die Abbildung zeigt schematisch die drei verwendeten SV40-Enhancer-freien pGL3-Vektoren.

Die SV40-Enhancer-freien Vektoren wurden via Restriktionsanalyse und Kontroll-PCR überprüft. Die Restriktion mit DraI ergibt ein Fragment, das ca. 250 bp kleiner ist als das entsprechende Fragment des Enhancer-positiven Kontrollvektors. Diese Längendifferenz entspricht der restringierten SV40-Enhancer-Sequenz. Die PCR überprüft zum einen die Promotoren und zum anderen den SV40-Enhancer. Alle drei Plasmide sind Enhancer-frei.



**Abb. 48: Kontrolle der pGL3-GFP-Plasmide ohne SV40-Enhancer.** **A:** Restriktionsanalyse mit DraI, von links: a) 1kb-Leiter, b) Positivkontrolle, c)-e) Kontrollrestriktion. **B:** Kontroll-PCR, von links: a) 1kb-Leiter, b) Enh-PCR - Positivkontrolle, c)-e) Promotor-PCR, f)-h) Enh-PCR

Je  $10^5$  U-2OS-Zellen wurden mit den pGL3-Vektoren *ohne* SV40-Enhancer transfiziert und anschließend mit einer MOI von ca. 5 pfu/cell WT-Ad5 infiziert. Nach 48 Std. wurde die GFP-Expression der transfizierten und infizierten Zellen durch Messung der mittleren Fluoreszenz mit Hilfe der FACS-Analyse quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hintergrundexpression von GFP in pGL3-E2e-GFP- und pGL3-E2l-GFP-transfizierten Zellen vergleichbar ist. Der E2-early-Promotor wird nach Infektion mit WT-Ad5 stark induziert. Die Promotor-Aktivierung ist deutlich von der Hintergrundexpression differenzierbar. Der E2-late-Promotor ist auch im SV40-Enhancer-negativen Plasmid nicht durch WT-Ad5 induzierbar. Die GFP-Expression der WT-Ad5-infizierten Zellen unterscheidet sich nicht von der Hintergrundexpression.

In einem weiteren Ansatz wurden je  $10^5$  U-2OS-Zellen mit pGL3-E2e-GFP transfiziert und anschließend mit WT-Ad5 und 25-50 bzw. 50-100 pfu/cell Ad312 infiziert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach 48 Stunden. Der E2-early-Promotor ist durch WT-Ad5 sowie durch 50-100 pfu/cell Ad312 stark induzierbar. Bei einer MOI von 25-50 pfu/cell wird der E2-early-Promotor durch Ad312 kaum induziert. pGL3-CMV-GFP zeigt bei diesem Versuchsansatz nur schwache GFP-Expression. Der Vektor wurde durch einen anderen Klon ersetzt.

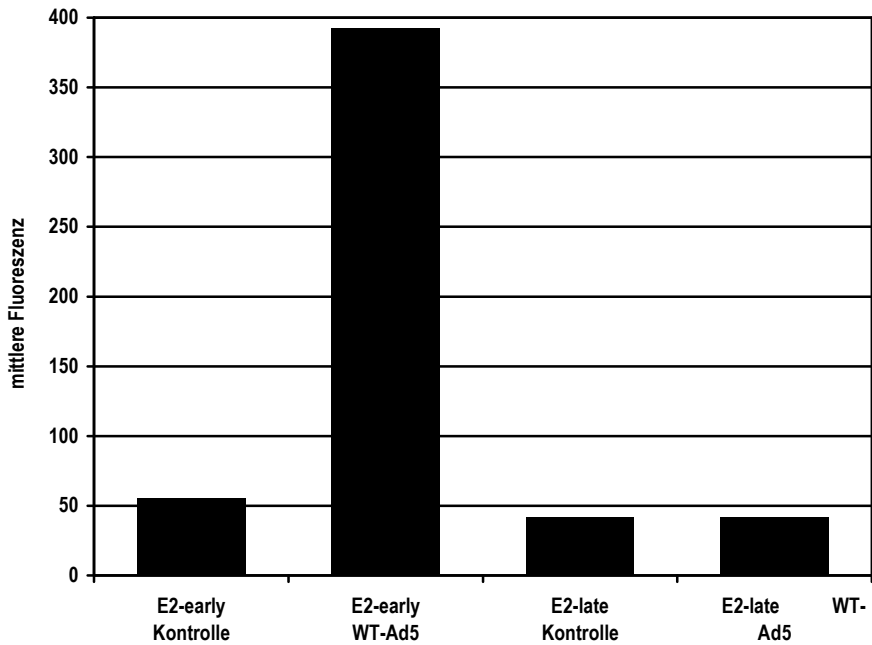
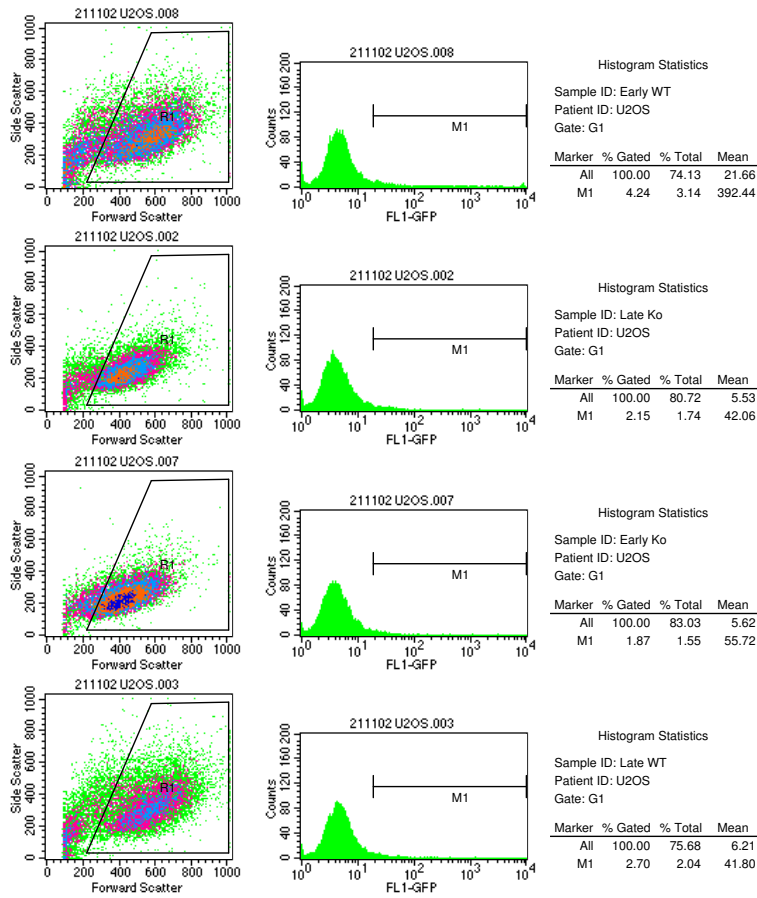
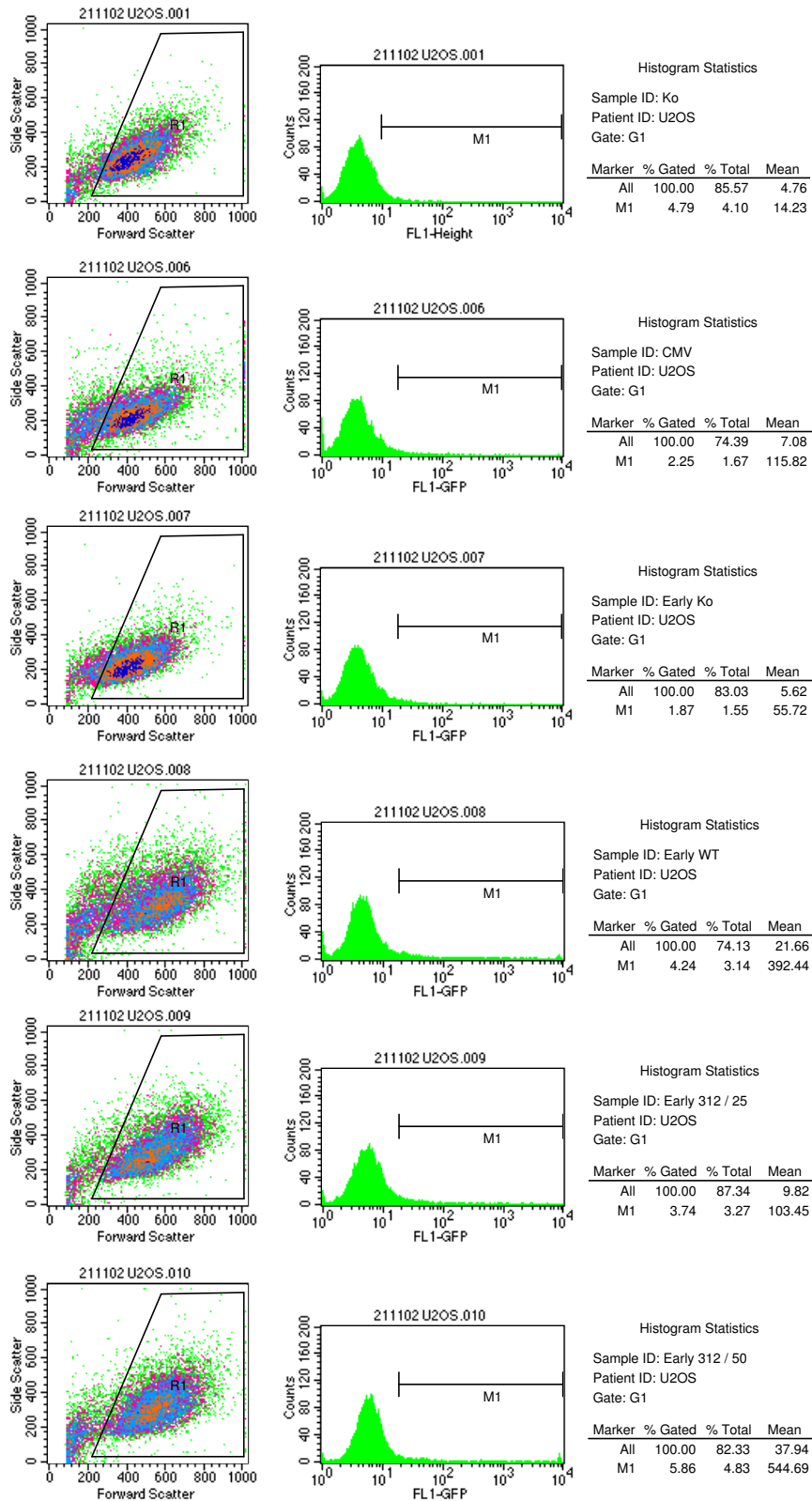
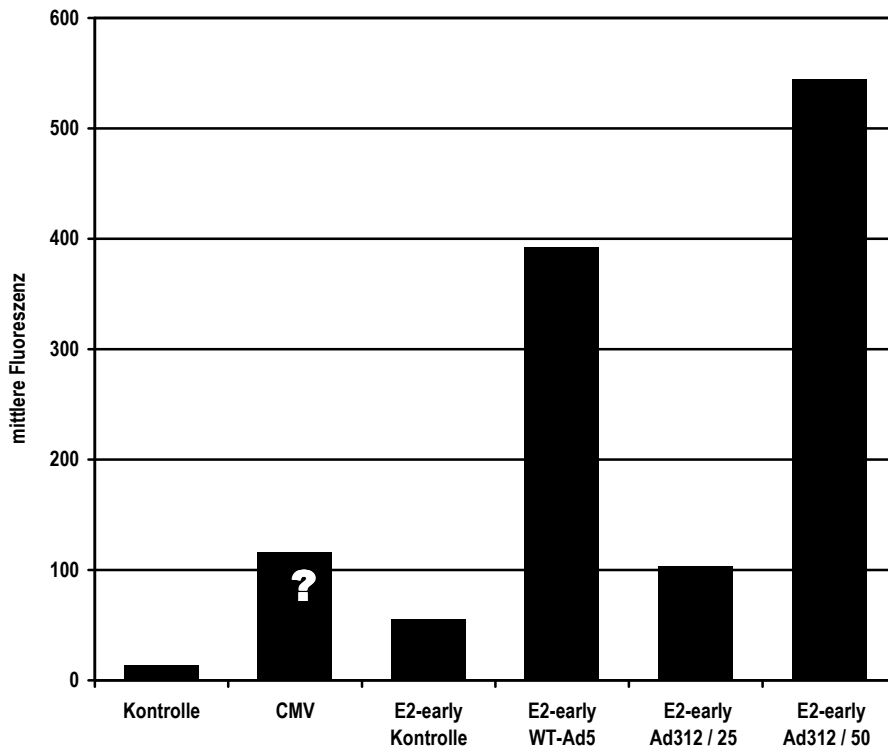


Abb. 49: E2-early/E2late-Promotoraktivierung durch WT-Ad5 ohne SV40-Enhancer-Effekt. Die obere Abbildung zeigt die originären FACS-Daten der pGL3-GFP-transfizierten U-2OS-Zellen, ohne SV 40-Enhancer. Die untere Abbildung zeigt die Auswertung der Daten anhand der mittleren Fluoreszenz. Kontrolle = nicht infiziert.



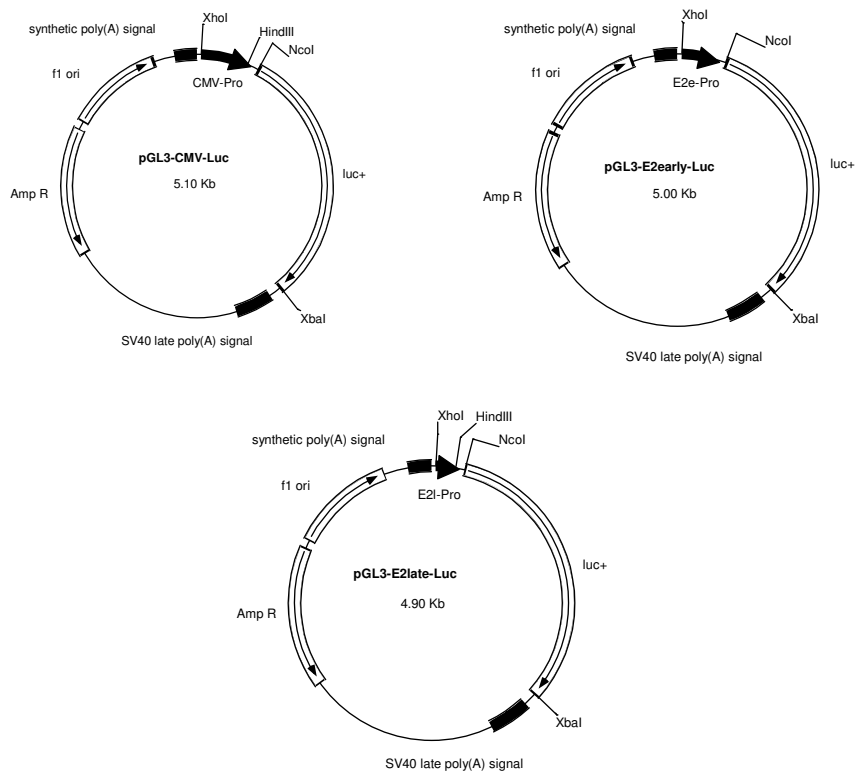
**Abb. 50: Fluoreszenzanalyse der pGL3-GFP-transfizierten U-2OS-Zellen.** Gezeigt sind die originären FACS-Daten. Von oben nach unten folgen: Kontrolle, CMV, E2-early/Kontrolle, E2-early/WT-Ad5, E2-early/Ad312, 25 pfu/cell, E2-early/Ad312, 50 pfu/cell. pGL3-CMV-GFP als Positivkontrolle zeigt bei diesem Versuch nur geringe GFP-Expression. Der Vektor wurde daher bei nachfolgenden Versuchen durch einen anderen Klon ersetzt.



**Abb. 51: E2-early-Promotoraktivierung durch WT-Ad5 und Ad312 ohne SV40-Enhancer-Effekte.** Die Abbildung zeigt die Auswertung der Fluoreszenzanalyse der pGL3-E2e-GFP-transfizierten U-2OS-Zellen 48 Std. p.i. Kontrolle = nicht infiziert; CMV = Positivkontrolle für Transfektion; ? = vermutlich Mutation in der CMV-Promotor-Sequenz.

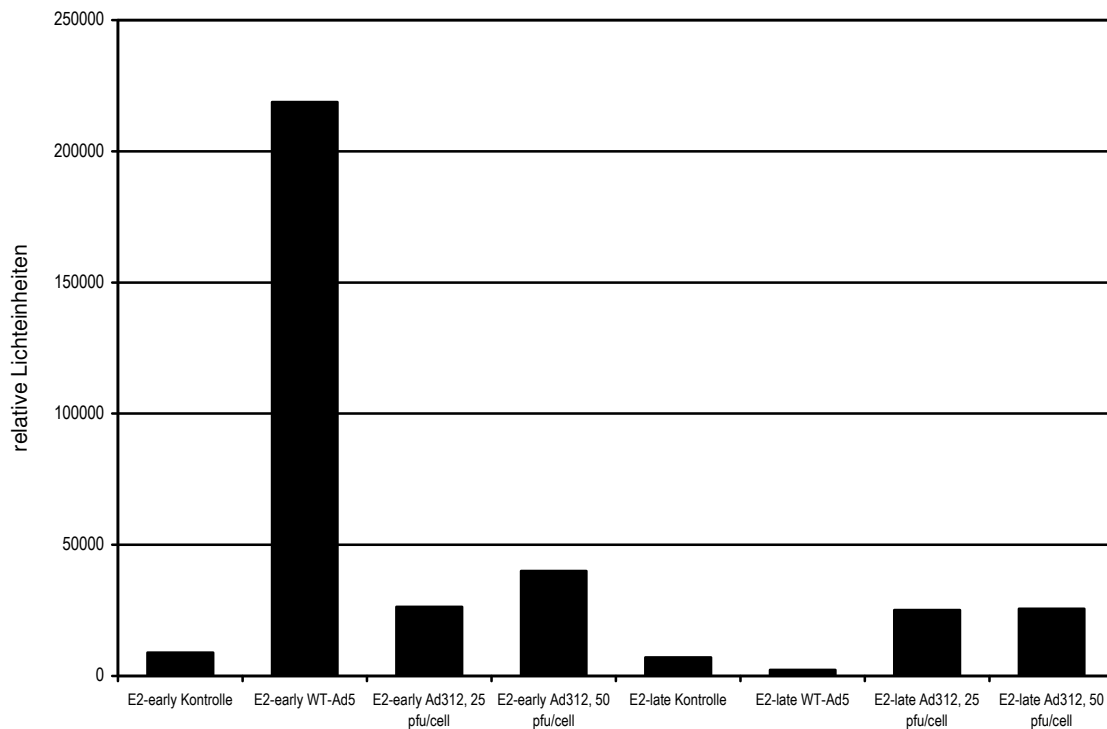
Zur Bestätigung und schnelleren Quantifizierung der mit den GFP-Plasmiden gewonnenen Ergebnisse wurde in den drei verwendeten pGL3-Vektoren das GFP- durch das Luziferase-Gen ersetzt. Dieses Enzym setzt Luciferin, ATP und  $Mg^{2+}$  in einer chemischen Reaktion zu Licht um. Die Expression der Luziferase lässt sich durch die Messung des entstehenden Fluoreszenzlichtes im Luminometer leicht quantifizieren. Eine anschließende Bestimmung der Protein-konzentration der verwendeten Proben und die Berechnung der Fluorezenz pro definierte Menge Protein ermöglicht einen direkten Vergleich der gewonnenen Messwerte.

Die Umklonierung der SV40-Enhancer-freien GFP-Vektoren erfolgte durch Restriktion mit den Enzymen NcoI und XbaI, gelelektrophoretischer Auftrennung, Gelextraktion und schließlich Ligation mit einem NcoI/XbaI-geschnittenen Luziferase-Fragment. Die folgenden Abbildungen zeigen die schematische Darstellung sowie die Kontroll-PCR der Luziferase-Vektoren.



**Abb. 52: pGL3-Luziferase-Plasmide *ohne* Enhancer.** Die Abbildung zeigt schematisch die drei verwendeten SV40-Enhancer-freien pGL3-Luziferase-Vektoren.

Je  $10^5$  U-2OS-Zellen wurden mit den verschiedenen Luziferase-Vektoren transfiziert und anschließend mit einer MOI von 25 pfu/cell bzw. 50 pfu/cell Ad312 infiziert. Die Kontrollen wurden nicht bzw. mit einer MOI von ca. 5 pfu/cell WT-Ad5 infiziert. Als Transfektionskontrolle wurden ebenfalls  $10^5$  U-2OS-Zellen mit pGL3-Enh-CMV-Luc transfiziert, als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte/infizierte Zellen (Eigenfluoreszenz). Die Auswertung 48 Std. p.i. zeigt, dass der adenovirale E2-early-Promotor durch WT-Ad5 voll induziert wird. Nach Infektion mit 25 pfu/cell Ad312 zeigt sich eine im Vergleich zu WT-Ad5 geringgradige, bei 50 pfu/cell bereits eine deutliche Aktivierung. Der adenovirale E2-late-Promotor wird durch WT-Ad5 nicht, durch Ad312, 25 pfu/cell, und Ad312, 50 pfu/cell, etwa gleich stark aktiviert. Die Fluoreszenzwerte sind mit den nach Infektion mit 25 pfu/cell Ad312 gemessenen vergleichbar.



**Abb. 53: E2-early/E2-late-Promotoraktivierung durch WT-Ad5 und Ad312.** Die Abbildung zeigt die Auswertung der Luziferase-Expression in den pGL3-Luziferase-transfizierten U-2OS-Zellen 48 Std. nach Infektion mit WT-Ad5, 5 pfu/cell, bzw. Ad312, 25 und 50 pfu/cell. Das Ergebnis ist repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente. Kontrolle = nicht infiziert, 1-4: pGL3-E2e-Luc, 5-8: pGL3-E2l-Luc

Die Negativkontrolle zeigt eine vernachlässigbar geringe Eigenfluoreszenz der U-2OS-Zellen, die Positivkontrolle mit hohen Fluoreszenzwerten spricht für eine gute Transfektionseffizienz (Daten nicht gezeigt).

Die Messung des Proteingehaltes der verwendeten Proben zeigte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Daher wurde auf eine Äquilibration der Fluoreszenzwerte auf eine definierte Menge Protein verzichtet.

Die gezeigten Ergebnisse konnten mit den hier verwendeten Klonen sowie mit Luziferase-Plasmiden anderer Bakterienklone mehrfach reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die adenovirale DNA-Replikation, die Expression der adenoviralen Gene sowie die Kinetik des viralen Zyklus des rekombinanten adenoviralen Vektors AdYB-1 im Vergleich zu Ad312 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine E1A-unabhängige adenovirale DNA-Replikation durch die Überexpression des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 als Transgen im adenoviralen Genom (AdYB-1) und die damit verbundene Kernlokalisation von YB-1 in der Wirtszelle bereits bei relativ niedriger MOI *in vitro* möglich ist. Adenovirale DNA-Replikation und virale Zellyse sind nicht direkt korreliert. Die gewonnenen Daten zeigen, dass YB-1 über eine Aktivierung des adenoviralen E2-late-Promotors an der Initiation der DNA-Replikation und über noch unbekannte Mechanismen an der Induktion der viralen Zellyse (CPE) entscheidend beteiligt ist. Durch die Überexpression der frühen adenoviralen Gene E1B-55K und E4orf6 *in trans*, die wichtige Funktionen bei der DNA-Replikation übernehmen und die durch AdYB-1 nicht exprimiert werden, konnte die Effektivität der E1A-unabhängigen DNA-Replikation und der Partikelbildung von AdYB-1 stark gesteigert werden, und erreichte nahezu das Niveau des Wildtyp des Adenovirus Typ 5 (WT-Ad5).

### 4.1 Adenovirale DNA-Replikation von AdYB-1

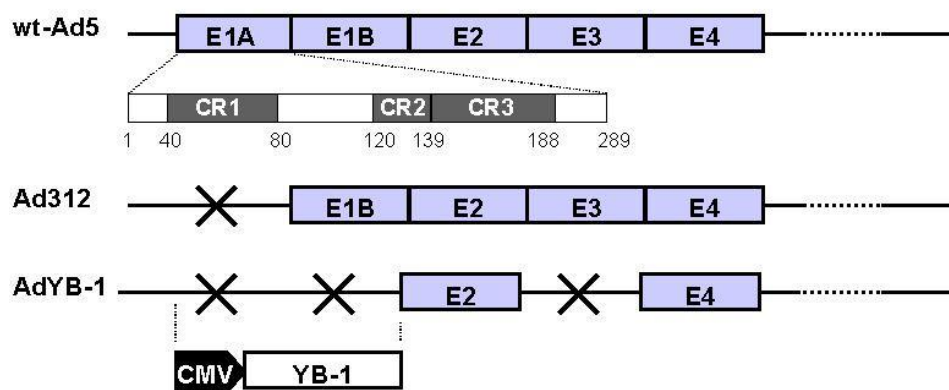
Die Ergebnisse der komparativen Replikationsanalysen von AdYB-1 und Ad312 legen bereits die Vermutung nahe, dass die Überexpression des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 als Transgen im adenoviralen Genom (AdYB-1) eine zentrale Rolle bei der E1A-unabhängigen adenoviralen DNA-Replikation spielt. Im Gegensatz zu Ad312 repliziert AdYB-1 bereits bei einer relativ geringen MOI von 5-10 pfu/cell (Abb. 19), obwohl es als E1/E3-deletiertes Adenovirus zu den definitionsgemäß replikationsinkompetenten adenoviralen Vektoren der ersten Generation gehört.

Aufgrund der Beobachtung, dass AdYB-1 deutlich effizienter repliziert als Ad312, wurde die Expression einiger für die adenovirale DNA-Replikation entscheidender Gene mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens untersucht. Dies sind insbesondere die frühen adenoviralen Gene E1A, E1B-55K und E4. Es ist bemerkenswert, dass AdYB-1 bereits bei relativ geringer MOI effiziente adenovirale DNA-Replikation und Partikelbildung zeigt, obwohl mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens keine Expression eines dieser Gene



nachgewiesen werden konnte (Abb. 21, 22, 26). Auf die zentrale Rolle der E1A-Genprodukte bei der adenoviralen DNA-Replikation wurde in der Einleitung bereits hingewiesen. Daher ist der Ausschluss einer E1A-Kontamination der verwendeten E1A-deletierten Vektoren von besonderer Bedeutung für die Interpretation der gewonnenen Daten. Durch mehrfach wiederholte Kontroll-PCRs konnten keine Verunreinigungen mit E1A-DNA nachgewiesen werden (Abb. 12). Die Northern-Blot-Analyse zeigt ebenfalls keine E1A-Expression nach Infektion mit AdYB-1 und Ad312 (Abb. 21).

Die folgende Abbildung stellt die beiden verwendeten Vektoren mit ihren Deletionen im Vergleich zu WT-Ad5 nochmals schematisch dar.



**Abb. 54: Schematische Darstellung des Genoms von AdYB-1 und Ad312 im Vergleich zu WT-Ad5.** Die frühen viralen Gene sind einzeln dargestellt, das übrige Genom wird durch die gestrichelte Linie symbolisiert. AdYB-1 exprimiert zusätzlich den humanen Transkriptionsfaktor YB-1 unter CMV-Promotor-Kontrolle. X = Deletion; ▶ = CMV-Promotor

#### 4.1.1 MOI und Zellzyklusphase beeinflussen die E1A-unabhängige adenovirale DNA-Replikation.

Aus einer Vielzahl von Publikationen ist bekannt, dass Vektoren der ersten Generation durchaus in der Lage sind, bei höheren MOI unabhängig von E1A in Tumorzellen *in vitro* zu replizieren. Nevins konnte zeigen, dass sich nach Infektion von HeLa-Zellen mit dem E1A-deletierten Vektor dl312 (Ad312) mit einer MOI von 20 pfu/cell keine zytoplasmatische mRNA der frühen adenoviralen Gene E1B, E2, E3 und E4 nachweisen lässt. Bei einer MOI von 200 pfu/cell werden die Gene jedoch transkribiert und neue Viren produziert<sup>132</sup>. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Replikations- und Expressions-

analysen und die Evaluation der Partikelbildung von Ad312 stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Adenovirale DNA-Replikation lässt sich bei den getesteten Zelllinien erst bei einer MOI von 50-100 pfu/cell nachweisen (Abb. 19). Unterhalb einer MOI von etwa 50 pfu/cell kann eine Expression der viralen Gene von Ad312 mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens nicht detektiert werden (Abb. 21 bis 27). DNA-Replikation und Partikelbildung sind insuffizient. Infiziert man A-549-, HeLa- oder U-2OS-Zellen mit Ad312 mit einer MOI >100 pfu/cell, zeigt der Vektor E1A-unabhängige DNA-Replikation und Partikelbildung. Bei einer MOI von 200 pfu/cell bildet Ad312 je nach Zelllinie etwa 10-100mal weniger virale Partikel als WT-Ad5 (Abb. 30). Die Replikationseffizienz bei dieser MOI ist mit der von AdYB-1 bei 50 pfu/cell vergleichbar. Damit repliziert der vollständig E1/E3-deletierte adenovirale Vektor AdYB-1 deutlich effizienter als der lediglich E1A-defiziente Vektor Ad312. Diese Beobachtung belegt eine Beteiligung des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 an der E1A-unabhängigen adenoviralen DNA-Replikation.

Die Effektivität der DNA-Replikation ist abhängig von der Zelllinie und der Zellzyklusphase der infizierten Zellen. Während der G<sub>2</sub>/M-Phase erfolgt die Internalisierung der E1-deletierten adenoviralen Vektoren besonders effektiv. Aufgrund der E1-Deletion entfällt die Adenovirus-vermittelte S-Phase-Induktion<sup>166</sup>. Turnell et al. konnten anhand des E1B-55K-deletierten Adenovirus dl1520 (ONYX-015), das die S-Phase in infizierten Zellen ebenso effektiv induziert wie WT-Ad5, belegen, dass diese S-Phase-Induktion allein für eine effiziente adenovirale DNA-Replikation nicht ausreicht<sup>181</sup>. Versuche mit HeLa-Zellen zeigen allerdings, dass virale Zellzyklusarrest und Partikelbildung nach Infektion während der S-Phase besonders effektiv ablaufen<sup>46</sup>. Von Vorteil für den Vermehrungszyklus E1-deletierter Viren scheint daher ein schnelles Durchlaufen des Zellzyklus durch die infizierten Zellen zu sein<sup>181</sup>, da so sowohl die effektivere Internalisierung während der G<sub>2</sub>/M-Phase als auch die effektivere Replikation während der S-Phase genutzt werden kann. Die Beobachtung, dass AdYB-1 und Ad312 in den sehr schnell wachsenden U-2OS-Zellen besonders gut replizieren, unterstützt diese Hypothese. Allerdings zeigt die Infektion von U-2OS-Zellen mit AdCMV-GFP auch eine besonders effiziente Virusinternalisierung (Abb. 16), was die adenovirale Replikation zusätzlich begünstigt.

#### 4.1.2 Die E1A-unabhängige DNA-Replikation ist abhängig von der infizierten Zelllinie.

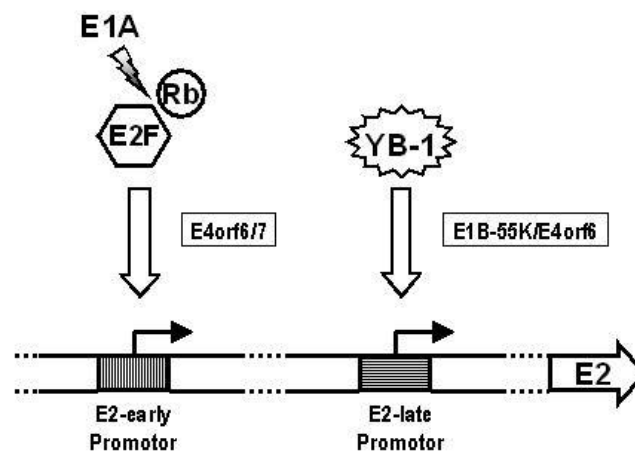
Nelson und Kay konnten mit Hilfe ihres auch in dieser Arbeit eingesetzten PMT-Systems (s. auch Abschnitt 1.5.7) die Abhängigkeit der Replikationseffizienz von der verwendeten Zelllinie belegen. Ihr methylierter E1-deletierter Vektor zeigte in A-549-Zellen bereits bei einer MOI von 10 pfu/cell initiale DNA-Replikation, auf HeLa-Zellen erst ab einer MOI von 50 pfu/cell<sup>127</sup>. Die Replikationsanalysen von AdYB-1 und Ad312 belegen ebenfalls eine effizientere adenovirale DNA-Replikation in A-549-Zellen (Abb. 18, 19). Allerdings liegt die initiale Replikation von AdYB-1 in allen getesteten Zelllinien deutlich unter der von Ad312 und auch unter der des von Nelson und Kay eingesetzten E1-deletierten Vektors. Die Untersuchung der Partikelbildung von Ad312 zeigt, dass das Virus auf A-549-Zellen im Vergleich zu HeLa und U-2OS auch etwa zehnmal mehr Plaquebildende Einheiten bildet (Abb. 30). Die Evaluation der Infektionseffizienz ergibt allerdings die stärkste Internalisation des E1/E3-deletierten GFP-Vektors in U-2OS-Zellen (Abb. 15 bis 17), so dass sich die Unterschiede bei der Partikelbildung offensichtlich nicht allein durch eine höhere CAR-Expression und eine damit verbundene verbesserte Virusaufnahme in A-549-Zellen erklären lassen. Vielmehr scheint der biologische und molekulare Status der infizierten Zelle entscheidend zu sein. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang p53- und Rb-Status, die in Tumorzellen häufig alteriert sind. Für den E1B-55K-deletierten Vektor dl1520 (ONYX-015) wurde beispielsweise eine alleinige Replikation in p53-defizienten Zellen postuliert<sup>10</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, A-549, U-2OS und HeLa, sind alle p53-positiv, wobei man durch die Expression von HPV 18-E6 in HeLa-Zellen von einer Inhibition des Tumorsuppressorproteins ausgehen muss<sup>154</sup>. Eine Reihe von *in vitro*- und *in vivo*-Analysen haben jedoch gezeigt, dass dl1520 unabhängig vom p53-Status der Zielzelle repliziert<sup>45,154,181,183</sup>. Dies trifft somit wohl umso mehr für das komplett E1-deletierte Adenovirus AdYB-1 zu. Übereinstimmend mit eigenen Resultaten scheint die adenovirale DNA-Replikation insbesondere auch E1A-deletierter Vektoren v.a. abhängig von der eingesetzten MOI zu sein<sup>154,183</sup>. Die von Rothmann et al. für dl1520 beschriebene Inhibition der Virusproduktion in U-2OS-Zellen im Vergleich zu A-549 und HeLa ließ sich für AdYB-1 und Ad312 nicht nachweisen. Für die DNA-Replikation von dl1520 ergab sich – ebenso wenig wie in eigenen Versuchen für AdYB-1 und Ad312 – keine signifikante Inhibition.<sup>45</sup>

### 4.1.3 Die E1A-unabhängige DNA-Replikation von AdYB-1 ist nicht E4-vermittelt.

Versuche mit E1-deletierten adenoviralen Vektoren, die E4orf6/7 unter CMV-Promotor-Kontrolle exprimieren, haben gezeigt, dass diese *in vitro* effizient replizieren. E4orf6/7 kompensiert bei ausreichender Expression offensichtlich funktionell die E1A-Deletion dieser Adenoviren. Diese Beobachtung resultiert aus einer direkten Interaktion mit dem freien zellulären E2F. Durch Komplexierung mit E4orf6/7 wird die Bindung des Transkriptionsfaktors an die beiden E2F-Bindungsstellen des adenoviralen E2-early-Promotors stabilisiert. Dies führt zur Transkriptionsaktivierung. Darüber hinaus scheint E4orf6/7 in der Lage zu sein, E2F unabhängig von E1A aus seiner Bindung zu Rb freizusetzen.<sup>108,126,135,158</sup> E1/E4-deletierte adenovirale Vektoren zeigen nur noch geringes Replikationspotential. Eine E2-DBP-Synthese konnte nur bei sehr hoher MOI (> 500 pfu/cell) nachgewiesen werden<sup>98</sup>. Dies lässt auf eine E4orf6/7-unabhängige Aktivierung der E2-Expression bei hoher MOI schließen. Ob die E2-DBP-Synthese bei hoher MOI mit einer YB-1-Kernlokalisation korreliert und ggf. durch den E2-late-Promotor vermittelt wird, wurde von Lusky et al. nicht untersucht. Interessanterweise ist mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens bei einer MOI von 50 pfu/cell keine E4-Expression durch AdYB-1 nachweisbar (Abb. 26). Zwar mag diese durch RT-PCR als sensitiveres Verfahren detektierbar sein, wäre dann allerdings in jedem Fall sehr gering. Für die beschriebene E1A-Kompensation wird aber eine relativ starke E4-Expression gefordert<sup>135</sup>. Die Expressionsanalyse von Ad312 zeigt, dass nach Infektion mit hohem MOI die E2-Expression durch den E2-early-Promotor aktiviert wird (Abb. 40). Bei niedriger MOI lässt sich mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens lediglich die E2-late-Promotor-Aktivierung nachweisen (Abb. 39). Diese Resultate belegen die Notwendigkeit einer suffizienten Expression von E4orf6/7 zur Kompensation von E1A. Damit scheinen die genannten Effekte keine ausreichende Erklärung für die effektive Replikation und Partikelbildung von AdYB-1 zu liefern. Bei der Infektion von HeLa-Zellen kann ein diesem E4orf6/7-Effekt vergleichbarer Einfluss der frühen Gene E6 und E7 des humanen Papillomavirus Typ 18 (HPV 18) diskutiert werden. Diese werden in HeLa-Zellen exprimiert und könnten durch ihre Bindung zu Rb und p53 die adenovirale Replikation insbesondere E1-deletierter Adenoviren unterstützen.<sup>144,157</sup> Replikationsanalysen und Partikelbildung zeigen jedoch bei AdYB-1 und Ad312 im Vergleich zu U-2OS und A-549 keine verbesserte Effizienz.

#### 4.1.4 Die nukleäre Akkumulation von YB-1 erleichtert die E1A-unabhängige DNA-Replikation.

Holm et al. konnten zeigen, dass die nukleäre Akkumulation von YB-1 mit der Effizienz der adenoviralen DNA-Replikation korreliert. Durch Versuche mit einem Luziferase-Plasmidkonstrukt konnte zudem die Induktion des adenoviralen E2-late-Promotors durch den humanen Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Der E2-late-Promotor ist für die Aufrechterhaltung einer starken E2-Expression während des viralen Zyklus verantwortlich und steht damit im Zentrum der adenoviralen DNA-Replikation. Über 90% aller E2-codierten Proteine werden unter seiner Kontrolle transkribiert und anschließend synthetisiert.<sup>24,91</sup> Der Promotor enthält drei invertierte CCAAT-Boxen (Y-Box) als Bindungsstellen für den humanen Transkriptionsfaktor YB-1.<sup>63</sup> Über eine direkte Interaktion mit diesen Sequenzen aktiviert YB-1 die Expression der adenoviralen E2-Region und nimmt damit entscheidenden Einfluss auf die adenovirale DNA-Replikation. Die folgende Abbildung stellt die Regulation der E2-Expression über die E1A-vermittelte Induktion des E2-early-Promotors durch E2F und die Aktivierung des E2-late-Promotors durch YB-1 schematisch dar.



**Abb. 55: Regulation der E2-Gen-Expression.** E1A spaltet Rb von E2F und ermöglicht die E2F-abhängige E2-early-Promotoraktivierung. E4orf6/7 stabilisiert die Promotorbindung von E2F. YB-1 aktiviert direkt den E2-late-Promotor und unterstützt so die E1A-unabhängige adenovirale DNA-Replikation. E1B-55K und E4orf6 unterstützen das aktive Shuttling von YB-1 in den Zellkern.

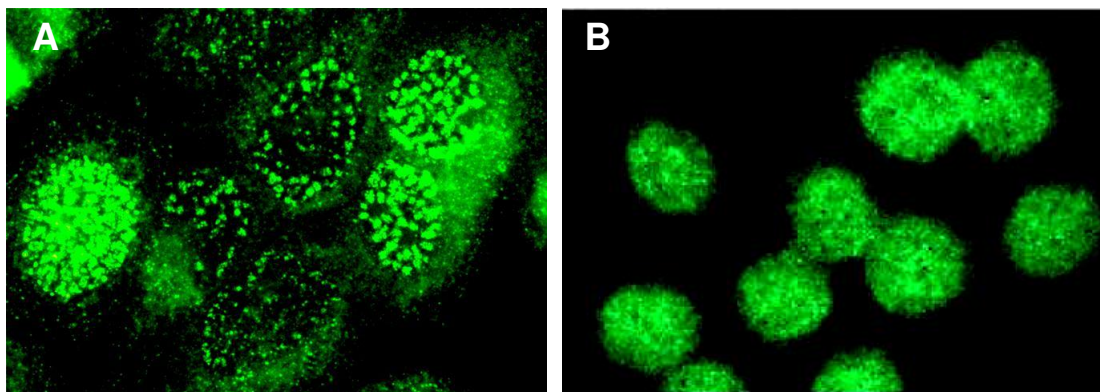
Die Expressionsanalyse von AdYB-1 mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens zeigt, dass aufgrund der E1-Deletion E1A und E1B-55K erwartungsgemäß nicht exprimiert werden (Abb. 20, 21). Wie oben beschrieben ist auch keine E4-Expression im Northern-

Blot detektierbar (Abb. 26). Auf die Funktionen von E4orf6/7 in Zusammenhang mit Freisetzung und Stabilisierung von E2F wurde bereits hingewiesen. Die Beteiligung des E1B-55K/E4orf6-Komplexes an der E2-late-Promotor-Induktion wird im Abschnitt 4.2 diskutiert. Interessanterweise lässt sich bei der Evaluation der E2-Expression bei niedriger MOI nur eine E2-late-Promotor-vermittelte Expression nachweisen (Abb. 39). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass der YB-1-induzierbare E2-late-Promotor entscheidend für die Expression der adenoviralen E2-Gene in AdYB-1-infizierten Zellen verantwortlich ist. Zusammen mit den Ergebnissen der Replikationsanalyse, die eine im Vergleich zu Ad312 deutlich effizientere Replikation von AdYB-1 zeigen (Abb. 18), ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die zentrale Rolle des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 bei der adenoviralen DNA-Replikation. Die Beobachtung von Holm et al., dass E1A-deletierte Adenoviren wie Ad312 in Multidrug-resistenten Tumorzellen, die durch eine hohe nukleäre Konzentration an YB-1 charakterisiert sind, deutlich effizienter replizieren als in nicht MDR-Zellen<sup>64</sup>, deutet ebenfalls auf eine Beteiligung des humanen Transkriptionsfaktors an der E1A-unabhängigen adenoviralen DNA-Replikation hin. Es ist bekannt, dass verschiedene Zytostatika wie z.B. Doxorubicin oder Cisplatin P-Glykoprotein-vermittelte Vielfach-Resistenz (MDR) induzieren. Dieses Phänomen korreliert mit einer vermehrten zellulären Akkumulation von YB-1.<sup>6,136</sup> Gleichzeitig wurde für gentherapeutische Adenoviren wie den E1B-55K-deletierten Vektor dl1520 (ONYX-015) eine verbesserte DNA-Replikation und Partikelbildung in Zytostatika-behandelten Zellen festgestellt<sup>37,57,184</sup>. YB-1 scheint durch seine nukleäre Lokalisation und die Interaktion mit dem adenoviralen E2-late-Promotor der entscheidende Faktor dieser verbesserten Replikation zu sein. Auch E1A-deletierte adenovirale Vektoren zeigen eine verbesserte DNA-Replikation in vielfach-resistenten Tumorzellen<sup>64</sup> und anderen Zellen mit vermehrter YB-1-Kernlokalisation. Hierzu gehören beispielsweise murine embryonale Karzinomzellen<sup>88</sup>.

Goodrum und Ornelles konnten für dl1520 bei erhöhten Temperaturen eine Zellzyklus-unabhängige Replikation und Partikelbildung nachweisen. Als Ursache dieser Beobachtung wurde ein zellulärer Faktor postuliert, der die virale DNA-Replikation beeinflusst und vermutlich mit E1B-55K und E4orf6 interagiert<sup>46</sup>. Interessanterweise führt Hyperthermie ebenfalls zu einer vermehrten nukleären Akkumulation von YB-1<sup>165</sup>. Gleichzeitig wurde der Einfluss von YB-1 auf die Regulation der E2-Expression und die Colokalisation mit E1B-55K belegt<sup>63</sup>. Damit weist YB-1 die wesentlichen Charakteristika des von Goodrum und Ornelles postulierten Faktors auf. Zwar akkumulieren auch Hitzeschockproteine wie hsp70 und hsp40, deren Beteiligung an Transkription und Replikation anderer viraler

Systeme wie beispielsweise SV40, HPV oder Masernviren belegt werden konnte, durch Hyperthermie, eine direkte Interaktion mit adenoviralen Genprodukten oder Promotoren konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden<sup>44,54,70</sup>.

Die folgende Abbildung zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von YB-1 in mit AdYB-1 (A) bzw. Ad312 (B) infizierten HeLa-Zellen. Die eingesetzte MOI beträgt bei AdYB-1 50 pfu/cell, bei Ad312 200 pfu/cell. In beiden Fällen ist nahezu das gesamte, zuvor diffus zytoplasmatisch verteilte YB-1 kernlokalisiert. Nach der Infektion mit AdYB-1 ist die Bildung viraler Einschlusskörperchen im Nukleus gut zu erkennen (A). Die nukleäre Verteilung von YB-1 nach Infektion mit Ad312 bleibt diffus. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Karsten Jürchott, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, und Dr. Per S. Holm durchgeführt.



**Abb. 56: Nukleäre Akkumulation von YB-1 nach Infektion von HeLa-Zellen mit AdYB-1 und Ad312.** Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem YB-1-spezifischen Antikörper. **A:** AdYB-1, 50 pfu/cell. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Dr. Karsten Jürchott und Dr. Per S. Holm. **B:** Ad312, 200 pfu/cell. Entnommen aus: Holm et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 10427-10434 (2002)

Die Beobachtung, dass Ad312 den humanen Transkriptionsfaktor YB-1 aktiv in den Nucleus transloziert, legt die Vermutung nahe, dass auch die E1A-unabhängige DNA-Replikation von Ad312 YB-1-vermittelt ist<sup>63</sup>. Die Expressionsanalyse von Ad312 zeigt wie die von AdYB-1 nur E2-Expression unter E2-late-Promotor-Kontrolle (Abb. 39). Eine E2-early-Promotor-Aktivierung ist - zumindest mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens - nicht nachweisbar. Der YB-1-induzierbare E2-late-Promotor scheint also auch für die DNA-Replikation von Ad312 und damit vermutlich auch anderer E1A-deletierter Vektoren von zentraler Bedeutung zu sein. Aufgrund dieser Überlegungen wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung des adenoviralen E2-early-Promotors im Vergleich zum E2-late-

Promotor mit Hilfe eines Plasmid-Modells näher untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Abschnitt 4.4 diskutiert.

Im Gegensatz zu AdYB-1 und Ad312 ist dl1520 (ONYX-015) nicht in der Lage, das zytoplasmatische YB-1 in den Nukleus zu translozieren (unveröffentlichte Daten), was eine mögliche Erklärung für die verminderte Effizienz des E1B-55K-deletierten Vektors in Zellen mit zytoplasmatischer YB-1-Lokalisation ist. Zudem gibt diese Beobachtung bereits einen Hinweis auf die Beteiligung des E1B-55K-Genprodukts an der Adenovirus-vermittelten Translokation von YB-1 in den Zellkern, die im Abschnitt 4.2 diskutiert wird.

#### **4.1.5 AdYB-1 zeigt eine für den therapeutischen Einsatz insuffiziente adenovirale Replikation *in vivo*.**

Versuche von Alexandra Bernshausen, Arbeitsgruppe Holm, im Rahmen ihrer Doktorarbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München haben gezeigt, dass AdYB-1 in einem Mausmodell mit xenotransplantierten humanen Tumoren *in vivo* nicht effektiv repliziert (s. dort). Als Ursache ist vor allem die geringe MOI *in vivo* zu diskutieren. Bei intratumoraler Injektion des adenoviralen Vektors kann nur eine MOI von 1-10 pfu/cell erreicht werden. Bei dieser MOI ist in den verwendeten Zelllinien auch *in vitro* keine effektive DNA-Replikation durch AdYB-1 nachweisbar. Aufgrund der enormen Effekte von E1B-55K und E4orf6 auf die Replikationseffizienz von AdYB-1 *in vitro* (Abb. 38) liegt die Vermutung nahe, dass sich durch die Expression dieser Gene im adenoviralen Kontext das onkolytische Potential von AdYB-1 auch *in vivo* signifikant steigern lässt.

#### **4.2 Die Expression der frühen adenoviralen Gene E1B-55K und E4orf6 verbessert die Effizienz der viralen Partikelbildung.**

Entscheidend für die Funktionen des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 bei der adenoviralen DNA-Replikation ist seine Lokalisation im Nukleus. Diese scheint im adenoviralen Kontext durch das frühe Genprodukt E1B-55K im Komplex mit E4orf6 vermittelt zu werden<sup>63</sup>. Aufgrund der vollständigen E1-Deletion wird E1B-55K allerdings in AdYB-1-infizierten Zellen nicht exprimiert, was die Expressionsanalyse bestätigt.



Bargou et al. konnten jedoch zeigen, dass bei vielfachresistenten Zellen allein die Überexpression des zellulären Transkriptionsfaktors YB-1 zu einer vermehrten Kernlokalisation führt<sup>6</sup>. Ebenso wird YB-1 auch durch die Überexpression als Transgen unter CMV-Promotor-Kontrolle nach Infektion mit AdYB-1 unabhängig von E1B-55K und E4orf6 in den Nukleus transloziert. Auf die komplexen Funktionen von E1B-55K und E4orf6 wurde in der Einleitung bereits hingewiesen. Ein signifikanter Einfluss auf die Virusvermehrung konnte allerdings lediglich für die Deletion von E4orf6 in HeLa-Zellen nachgewiesen werden<sup>65</sup>. Der E1B-55K/E4orf6-Komplex ist aktiv am Shuttling der adenoviralen mRNA ins Zytoplasma beteiligt<sup>31,46,121</sup>. E4orf6-defiziente adenovirale Vektoren zeigen daher zwar mit WT-Ad5 vergleichbare Mengen an replizierter viraler DNA, jedoch deutlich weniger Partikelbildung und keinen synchronisierten, effizienten Übergang in die späte Phase des viralen Vermehrungszyklus<sup>17,61</sup>. Die genauen Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation der adenoviralen RNA-Produktion sind noch ungeklärt. Sie scheinen jedoch insbesondere für die Zellzyklus-unabhängige Virusvermehrung von Bedeutung zu sein.<sup>46,79</sup> Die Colokalisation des E1B-55K/E4orf6-Komplexes mit den nukleären Kompartimenten der adenoviralen Transkription und Replikation, den viralen Einschlusskörperchen, ist notwendig für deren Bildung. Sie verbessern wie oben angeführt die Effizienz der adenoviralen DNA-Replikation und Partikelbildung.<sup>140</sup>

Interessanterweise lässt sich mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens keine E4-Expression in AdYB-1-infizierten Zellen nachweisen (Abb. 26). Aufgrund der E1-Deletion von AdYB-1 wird auch E1B-55K nicht exprimiert. Umso erstaunlicher ist, dass AdYB-1 effizient repliziert und virale Partikel bildet. Darüber hinaus lässt sich die Bildung von viralen Einschlusskörperchen nachweisen (Abb. 56), die somit offensichtlich ebenfalls Folge der Überexpression von YB-1 ist. Diese Beobachtung hat zu der Hypothese geführt, dass sich die Effizienz des rekombinanten Vektors AdYB-1 durch Expression von E4orf6 und E1B-55K weiter steigern lässt. Zur Bestätigung dieser Überlegung wurden E4orf6 und E1B-55K durch Transfektion bzw. Co-Infektion in AdYB-1-infizierten Zellen *in trans* exprimiert. Die Co-Infektion der U-2OS-Zellen mit AdYB-1 und einem E1B-55K-exprimierenden Vektor (Ad-55K) zeigt, dass sich die Effizienz der Partikelbildung (pfu/ml) *in vitro* signifikant steigern lässt. Um ein Vielfaches verstärken lässt sich dieser Effekt durch die zusätzliche Transfektion mit einem CMV-E4orf6-Plasmid. AdYB-1 bildet durch die Expression von E1B-55K und E4orf6 *in trans* bis zu zwanzig mal mehr Partikel (pfu/ml) als AdYB-1 allein (Abb. 38). Zieht man die Transfektionseffizienz von etwa 10-

20% in Betracht (Abb. 36), entspricht die Partikelbildung etwa der von WT-Ad5. Diese Beobachtungen zeigen, dass der E1B-55K/E4orf6-Komplex einen entscheidenden Einfluss auf die verstärkte DNA-Replikation und Partikelbildung von AdYB-1 hat. Holm et al. konnten die Colokalisation von YB-1 und E1B-55K mit den nukleären Kompartimenten der adenoviralen Transkription und Replikation belegen<sup>63</sup>. Darüber hinaus ist publiziert, dass die Colokalisation von E1B-55K mit den viralen Einschlusskörperchen das E4orf6-Genprodukt benötigt<sup>140</sup>. In Zusammenhang mit der Beobachtung, dass die nukleäre Lokalisation von YB-1 die E1A-unabhängige adenovirale DNA-Replikation erleichtert<sup>63,64</sup>, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der E1B-55K/E4orf6-Komplex durch einen aktiven Transportprozess die nukleäre YB-1-Akkumulation fördert. Nach der Infektion mit AdYB-1 allein kommt es bereits durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors als Transgen im adenoviralen Vektor zu einer vermehrten YB-1-Kernlokalisation (Abb. 56). Durch die zusätzliche Expression des E1B-55K/E4orf6-Komplexes wird diese aktiv verstärkt und damit die Effizienz der adenoviralen DNA-Replikation erhöht. In der Folge können mehr virale Partikel produziert werden. Nevins et al. haben gezeigt, dass der lediglich E1A-deletierte Vektor Ad312 nach Infektion mit einer hohen MOI E1B-55K und E4orf6 exprimiert<sup>132</sup>. Gleichzeitig zeigt Ad312 dann nicht nur effiziente virale DNA-Replikation und Partikelbildung sondern induziert auch eine vermehrte nukleäre Akkumulation von YB-1<sup>63</sup>. Diese aktive Kernlokalisation des Transkriptionsfaktors durch Ad312 bei hohen MOI scheint somit ebenfalls durch E1B-55K und E4orf6 vermittelt zu sein. Interessanterweise bleibt YB-1 nach Infektion mit dem E1B-55K-deletierten Vektor dl1520 (ONYX-015) auch bei Einsatz einer hohen MOI zytoplasmatisch lokalisiert<sup>63</sup>. Aufgrund der Expression von E1A zeigt dl1520 allerdings ebenfalls effektive DNA-Replikation und Partikelbildung *in vitro*.

Über die aktive YB-1-Kernlokalisation (Shuttling) hinaus wirken sich sicher auch die vielfältigen weiteren Funktionen von E1B-55K und E4orf6 allein und im Komplex (s. auch Abschnitt 1.5.5) positiv auf Replikation und Partikelbildung aus.

### 4.3 Kinetikstudien von AdYB-1 und Ad312

Im Rahmen der vergleichenden Kinetikstudien von AdYB-1 und Ad312 wurden die Induktion des zytopathischen Effektes (CPE), die Partikelbildung und die Freisetzung der gebildeten Partikel *in vitro* in ihrer Abhängigkeit von der eingesetzten MOI sowie im zeitlichen Verlauf untersucht. Die Partikelbildung der beiden adenoviralen Vektoren AdYB-1 und Ad312 wurde mit Hilfe des Plaqueassay evaluiert. Daher sind die adenoviralen Partikel im folgenden als Plaque-bildende Einheiten (pfu) definiert. Die Ergebnisse zeigen, dass der humane Transkriptionsfaktor YB-1 an der CPE-Induktion und der Freisetzung neuer Viren beteiligt ist. Die Überexpression von YB-1 im adenoviralen Kontext (AdYB-1) führt zu einer verstärkten viralen Zellyse und einer deutlich effizienteren Virusfreisetzung.

#### 4.3.1 Die Überexpression von YB-1 fördert die Produktion viraler Partikel besonders bei niedriger MOI.

Die Produktion Plaque-bildender Einheiten durch AdYB-1 und Ad312 *in vitro* korreliert mit der Effizienz der adenoviralen DNA-Replikation, nicht aber mit der CPE-Induktion (Abb. 18, 19, 33, 34). Eine effiziente Produktion der Plaque-bildenden Einheiten setzt die Expression der späten viralen Gene L1-L5 voraus. Sie codieren im wesentlichen für adenovirale Strukturproteine. Nicht-Strukturproteine sind lediglich die Genprodukte L1-52/55K, L4-100K und L4-33K. Während der frühen Phase der Infektion ist der MLP nur sehr wenig aktiv. Lediglich L1-52/55K wird exprimiert<sup>129</sup>. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Virusreifung und nimmt möglicherweise Einfluss auf die Regulation der MLTU-Expression<sup>50,53,196</sup>. In der späten Phase der Replikation wird der Major Late Promoter stark aktiviert. Stellvertretend für alle späten Gene wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der L4-Region untersucht. Sie gilt als Schlüsselereignis des sogenannten ‚early-late-switch‘, der Initiation der MLTU-Expression<sup>33,34,35,160</sup>. Das Genprodukt L4-100K induziert durch eine direkte Interaktion mit dem Major Late Promoter die effiziente Translation der späten viralen mRNA und damit die Synthese der adenoviralen Strukturproteine<sup>56</sup>. Die Northern-Blot-Analyse von AdYB-1 weist die Expression von L4 nach (Abb. 27). Umgekehrt kann durch den Nachweis effektiver Partikelbildung auf eine suffiziente Expression der Strukturgene geschlossen werden.

Bereits bei einer MOI von 10 pfu/cell produziert AdYB-1 im Gegensatz zu Ad312 eine signifikante Anzahl Plaque-bildender Einheiten. Die größte Differenz zwischen den beiden Vektoren ergibt sich bei einer MOI von 50 pfu/cell. AdYB-1 produziert hier etwa 100 mal mehr Plaque-bildende Einheiten als Ad312 (Abb. 28, 29). Die maximale Konzentration an Plaque-bildenden Einheiten liegt für beide Vektoren je nach Zelllinie 100fach bis 10fach unter der von WT-Ad5 (Abb. 30). Vergleichbare Ergebnisse sind für dl1520 (ONYX-015)<sup>181</sup> und Ad312<sup>129</sup> bereits publiziert. Sie lassen sich durch Eskalation der MOI nicht weiter steigern. Die Abhängigkeit der DNA-Replikation und Partikelbildung von der eingesetzten Zelllinie und dem zellulären Status wurde bereits im Rahmen der DNA-Replikation von AdYB-1 diskutiert. Die signifikanten Unterschiede bei der Bildung viraler Partikel sind als Folge einer durch die Überexpression und Kernlokalisierung von YB-1 vermittelten effizienteren viralen DNA-Replikation und Genexpression in AdYB-1-infizierten Zellen zu verstehen. Ob YB-1 darüber hinaus direkten Einfluss auf die Transkription des MLP oder die posttranskriptionelle Kontrolle der MLTU-Expression nimmt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

#### 4.3.2 YB-1 induziert CPE in AdYB-1 infizierten Zellen.

Im Gegensatz zur Bildung Plaque-bildender Einheiten korreliert die CPE-Induktion nur bedingt mit der Effizienz der adenoviralen DNA-Replikation. Nach Infektion mit AdYB-1 steigt die Zahl lysierter Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten MOI parallel zu DNA-Replikation und Partikelbildung an (Abb. 19, 28, 29, 33 und 34). Ad312 hingegen induziert auch bei einer MOI von über 100 pfu/cell, bei der es nachweislich gut repliziert und virale Partikel bildet, nahezu keine virale Zellyse bei den verwendeten Tumorzellen (Abb. 28 bis 34). Die MOI konnte *in vitro* auf über 500 pfu/cell ohne Nachweis signifikant zunehmender CPE-Induktion gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von YB-1 unabhängig von Genprodukten der adenoviralen E1- und E3-Region zu einer Induktion viraler Zellyse führt.

Der Virus-vermittelte zytopathische Effekt (CPE) unterscheidet sich in seinen Mechanismen deutlich vom programmierten Zelltod (Apoptose), der ebenfalls durch adenovirale Genprodukte induziert werden kann. So vermittelt z.B. E1A durch seine Interaktion mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 die Apoptose der Wirtszelle<sup>160</sup>. Dieser Effekt wird während der frühen Phase der Infektion durch E1B-55K - z.T. in Kooperation mit E4orf6 - antagonisiert<sup>107,159,189</sup>. Zusammen mit E4orf4 kann E1A auch

unabhängig von p53 Apoptose induzieren<sup>101,102,103</sup>. Ein weiteres E1B-Genprodukt, E1B-19K, inhibiert die p53-unabhängige Apoptose der Wirtszelle<sup>112</sup>. Durch die E1-Deletion von AdYB-1 werden weder E1A noch E1B exprimiert (Abb. 18, 19). Mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens ließ sich auch keine E4-Expression nachweisen (Abb. 26). Damit entfällt die Grundlage für eine Adenovirus-vermittelte Apoptose-Induktion. Zudem konnten nach Infektion mit AdYB-1 in der FACS-Analyse keine spezifischen Apoptose-Marker nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei dem AdYB-1-vermittelten Zelltod handelt es sich somit nicht um Apoptose sondern um eine Art zytopathischen Effekt (CPE).

Durch die Deletion der E3-Region wird ADP nach AdYB-1-Infektion per definitionem nicht exprimiert, was die zugehörige Expressionsanalyse belegt (Abb. 25). Die starke CPE-Induktion durch AdYB-1 im Gegensatz zu dem lediglich E1A-deletierten Vektor Ad312 (Abb. 31 bis 34) muss somit als Funktion des Transgens YB-1 verstanden werden. Die ADP-Expression nach Infektion mit Ad312 wurde nicht untersucht. Da sie unter Kontrolle des adenoviralen Major Late Promotors steht, und durch die Evaluation der Partikelbildung eine effiziente Expression der späten Gene (MLTU) belegt ist (Abb. 28 bis 30), darf allerdings von einer ADP-Expression nach Ad312-Infektion ausgegangen werden. Diese reicht jedoch offensichtlich für eine effektive Zellyse nicht aus. Die Ergebnisse von Holm et al. belegen allerdings eine stark erhöhte CPE-Induktion nach Infektion vielfach-resistenter Zellen mit dem E1A-deletierten Adenovirus Ad312 versus nicht resistente Zellen<sup>64</sup>. Die vielfachresistenten Zellen weisen eine stark erhöhte YB-1-Kernlokalisation auf. Die Überexpression von YB-1 als Transgen (AdYB-1) führt somit offenbar ebenfalls über eine vermehrte YB-1-Kernlokalisation zu effizienter viraler Zellyse.

Der zeitliche Ablauf der CPE-Induktion durch AdYB-1 ist im Vergleich zu WT-Ad5 deutlich verzögert. Die Zeit bis zur vollständigen Lyse aller ausplattierten Tumorzellen ist zudem abhängig von der eingesetzten Zelllinie (Abb. 31 bis 34). Die Erklärung liegt vermutlich in der Geschwindigkeit der Translokation des zytoplasmatischen YB-1 in den Nukleus durch AdYB-1. Voraussetzung hierfür ist die Überexpression des viralen, also exogenen YB-1. Sie ist somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der YB-1-vermittelten CPE-Induktion. Wie die Expression anderer viraler Gene ist die Transgen-Expression u.a. abhängig von der Effizienz der Adsorption und Virusinternalisation und damit von der jeweiligen Zelllinie. Zudem sind auch die Effizienz der Transgen-Expression und der adenoviralen DNA-Replikation positiv korreliert. Die Abhängigkeit der DNA-Replikation von der infizierten Zelllinie wurde in Abschnitt 4.1.2 bereits ausführlich diskutiert.

### 4.3.3 Die Überexpression von YB-1 führt zu einer effizienten Freisetzung neu synthetisierter Adenoviren.

Um die auffällige Diskrepanz zwischen viraler Zellyse und Produktion Plaque-bildender Einheiten genauer zu untersuchen, wurden nach Infektion mit AdYB-1 und Ad312 (50 pfu/cell) intrazelluläre und freigesetzte Adenoviren nach zwei und fünf Tagen getrennt voneinander evaluiert. Die Ergebnisse zeigen, dass AdYB-1 bei einer MOI von 50 pfu/cell nicht nur insgesamt mehr Plaque-bildende Einheiten produziert als Ad312, sondern auch die überwiegende Zahl der gebildeten Viruspartikel freisetzt (Abb. 35). Diese vermehrte Freisetzung ergibt sich offensichtlich als Folge der YB-1-vermittelten CPE-Induktion in der Wirtszelle kombiniert mit einer effizienteren Partikelbildung insbesondere bei niedriger MOI. Die Expressionsanalyse belegt, dass dieser Effekt unabhängig von der bei AdYB-1 deletierten adenoviralen E3-Region und dem hier codierten ‚Adenoviral Death Protein‘ (ADP) auftritt (Abb. 25). Effiziente Zellyse und Partikelfreisetzung bilden eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz adenoviraler Vektoren in der Gentherapie maligner Tumoren. Durch die Freisetzung neuer Viren aus infizierten Tumorzellen können umliegende Tumorzellen infiziert und damit die onkolytische Potenz eines Vektors signifikant gesteigert werden. Diese gesteigerte Effizienz durch effiziente Partikelfreisetzung *in vitro* und *in vivo* ist durch die Überexpression von E3-ADP in verschiedenen therapeutischen adenoviralen Vektoren bereits belegt<sup>178,179,193</sup>.

## 4.4 Adenoviraler E2-early-Promotor

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits ausführlich dargestellt steht die Expression der E2-Region im Zentrum der adenoviralen DNA-Replikation. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion der beiden E2-Promotoren in Anwesenheit und unabhängig von E1A mit Hilfe des NorthernBlot-Verfahrens sowie in einem Expressionsplasmidmodell untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die intrazellulären Verhältnisse nach Adenovirusinfektion im Plasmidmodell nur unzureichend abbilden lassen. Dennoch geben die gewonnenen Daten einen Hinweis auf eine E1A-unabhängige E2-early-Promotoraktivierung und belegen die zentrale Bedeutung der E2-late-Promotoraktivierung insbesondere für die E1A-unabhängige DNA-Replikation.

#### 4.4.1 Der adenovirale E2-early-Promotor kann E1A-abhängig und E1A-unabhängig induziert werden.

Die Untersuchung der E2-Expression des E1A-deletierten adenoviralen Vektors Ad312 mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens ergab, dass sich nach Infektion mit einer MOI von 50-100 pfu/cell keine E2-early-Promotor-Transkription nachweisen lässt. Die E2-late-Transkription bleibt hingegen detektierbar (Abb. 39). Nach Infektion mit höheren MOI *in vitro* ergeben sowohl E2-early- als auch E2-late-Sonde ein positives Signal (Abb. 40). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die E1A-unabhängige Aktivierung des E2-early-Promotors durch Ad312 bei niedriger MOI (< 100 pfu/cell) im Vergleich zur E1A-Induktion durch WT-Ad5 und zur E2-late-Promotor-Aktivierung untersucht.

Bei den Experimenten von Zajchowski et al. betrug die maximale E2-early-Promotorstimulation durch E1A das Zehnfache der Basisexpression. Eine vollständige oder nahezu vollständige E1A-Induktion konnte nur durch Kombination von mindestens zwei der drei Aktivierungselemente innerhalb des E2-early-Promotors erreicht werden, wobei die Integration von Element II essentiell ist (s. auch Abschnitt 1.5.6). Element II allein ist hingegen nur schwach durch E1A induzierbar.<sup>194</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors E2F zusammen mit der Bindung von ATF und TBP zwar eine kritische, aber allein nicht ausreichende Rolle bei der E2-early-Aktivierung spielt. Eigene Messungen der GFP-Expression unter Kontrolle eines E2-early-Promotor-Konstruktes von Nukleotid -80 bis +10 nach Infektion mit dem Wildtyp des Adenovirus Typ 5 zeigen ebenfalls nur geringe Promotorinduktion (Daten nicht gezeigt). Für die Evaluation der E2-early-Promotor-Aktivierung durch den E1A-deletierten Vektor Ad312 wurde ein Promotorkonstrukt von Nukleotid -146 bis +62 verwendet, das alle drei Aktivierungselemente enthält, um einen suffizienten Vergleich mit der Aktivierung durch WT-Ad5 zu gewährleisten. Die Messungen der GFP- bzw. Luziferaseexpression in den mit den entsprechenden Plasmiden transfizierten U-2OS-Zellen nach Infektion mit WT-Ad5 belegen die starke E1A-Induktion dieses Promotorkonstruktes (Abb. 43, 44, 49-51 und 53).

Die Hypothese, dass die E1A-unabhängige E2-Expression durch Ad312 bei niedriger MOI nicht mit einer signifikanten E2-early-Aktivierung einhergeht, ließ sich mit Hilfe des eingesetzten GFP- bzw. Luziferase-Plasmidmodells nicht bestätigen. Auch wenn sich die durch transiente Transfektion gewonnenen Daten nicht vorbehaltlos auf die Aktivierungsvorgänge nach einer Adenovirus-Infektion übertragen lassen, weisen sie doch auf eine E1A-unabhängige E2-early-Promotor-Aktivierung durch Ad312 hin. Die

Aufrechterhaltung der E2-Expression erfolgt allerdings offensichtlich wie bei WT-Ad5 durch den E2-late-Promotor .

#### **4.4.2 Der SV40-Enhancer aktiviert den adenoviralen E2-early-Promotor unabhängig von E1A.**

Die Evaluation der E2-early-Promotoraktivierung mit Hilfe des pGL3-Enhancer-Vektors (Fa. Promega), der zur Transkriptionsverstärkung eine Enhancer-Sequenz des Polyomavirus SV40 in Kombination mit dem SV40-Poly-A-Signal enthält, zeigt, dass die basale Expression (d.h. vor Infektion mit WT-Ad5 bzw. Ad312) des Reportergens GFP im Vergleich zum E2-late-Promotor-Plasmid deutlich erhöhte Werte ergibt (Abb. 43 bis 46). Die SV40-Sequenz des pGL3-Enhancer-Vektors beinhaltet mehrere sich überschneidende regulative Elemente. Hierzu gehören der größte Teil der sogenannten ‚replication origin auxiliary region‘, eine Bindungsregion für das große SV40-Tumorantigen (‚large t antigen‘), die Wiederholungssequenzen ‚non-tandem repeat I‘, ‚tandem repeat II‘ und ‚tandem repeat III‘ sowie die beiden 72 bp Tandem-Repeat Enhancer-Sequenzen A und B<sup>64</sup>. Solche regulativen DNA-Sequenzen sind in der Lage, die Transkription eines Gens in *cis* unabhängig von ihrer Orientierung und Position zu verstärken. Die physiologischen Funktionen des SV40-Enhancers im Vermehrungszyklus des Polyomavirus sind die Aktivierung des viralen Early-Promotors und die Regulation von Transkription und viraler DNA-Replikation durch Interaktion mit diversen Enhancer-bindenden Proteinen.<sup>173</sup>

Nach vollständiger Restriktion der SV40-Enhancer-Region des pGL3-Enhancer-Vektors zeigt die basale GFP-Expression unter E2-early- und E2-late-Promotor-Kontrolle vergleichbar niedrige Werte (Abb. 49 bis 51). Der erhöhten GFP-Expression nach Transfektion mit pGL3-E2e-GFP *in vitro* liegt also offensichtlich eine *cis*-Aktivierung des adenoviralen E2-early-Promotors durch den SV40-Enhancer zugrunde. Der genaue Mechanismus ist dabei noch unbekannt. Eine solche *cis*-Aktivierung durch den 72 bp Tandem-Repeat SV40-Enhancer konnte allerdings für den E3-Promotor des Adenovirus Typ 5 (Ad5E3) sowie für den Major Late Promotor des Adenovirus Typ 2 (Ad2MLP) bereits nachgewiesen werden<sup>156</sup>. Knox et al. haben gezeigt, dass sich in einem Plasmidmodell die Reportergenexpression unter Ad2MLP-Kontrolle durch Integration des SV40-Enhancers signifikant steigern lässt (bis zu 40fach)<sup>83</sup>. Auch verschiedene zelluläre Gene wie z.B. das humane  $\beta$ -Globin-Gen können durch Fusion mit dem SV40-Enhancer *in*



*in vitro* aktiviert werden<sup>180</sup>. Xu et al. konnten zeigen, dass die Integration einer SV40-Enhancer-Sequenz in Kombination mit dem SV40-Poly-A-Signal (SV40 P(A)) und dem CMV-Promotor/Enhancer (CMV P/E) in einen E1/E3-deletierten adenoviralen Vektor *in vitro* und *in vivo* ebenfalls zu einer verstärkten Transgenexpression führt<sup>191</sup>. Ein möglicher Einfluss auf den adenoviralen E2-early-Promotor wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Ob es im adenoviralen Kontext *in vivo* überhaupt zu einer *cis*-Aktivierung des E2-early-Promotors durch den SV40-Enhancer kommt, bleibt somit unklar. Sollte dies jedoch der Fall sein, ist es denkbar, dass der SV40-Enhancer in Kombination mit anderen regulativen Elementen zukünftig nicht nur zur Verstärkung der Transgenexpression sondern auch zur Verbesserung der Replikationseffizienz rekombinanter adenoviraler Vektoren in der Gentherapie eingesetzt werden kann.

#### **4.4.3 Die Aktivierung des adenoviralen E2-late-Promotors ist entscheidend für die E1A-unabhängige DNA-Replikation.**

Guifoye et al. haben mit Hilfe von transienter Co-Transfektion eines E2-late-Promotor-Plasmides mit verschiedenen E1A-Plasmiden in HeLa-Zellen gezeigt, dass das E1A-12S-Genprodukt die Transkription des DNA-bindenden Proteins (DBP) und des Reportergens CAT sogar inhibiert. Bei diesen *in vitro*-Versuchen wurden DBP- und CAT-Expression weder durch das vollständige E1A noch durch E1A-13S allein transaktiviert.<sup>48</sup> Diese Beobachtung deckt sich mit den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten. Nach Infektion E2-late-Promotor-Plasmid-transfizierter U-2OS-Zellen mit WT-Ad5, der E1A vollständig exprimiert, werden die verwendeten Reportergene GFP und Luziferase im Vergleich zur Kontrolle (Basisexpression) ebenfalls nicht vermehrt exprimiert (Abb. 43-46, 49 und 53). Nach Infektion mit WT-Ad5 kommt es zu einer aktiven Translokation des zytoplasmatischen YB-1 in den Nukleus der Wirtszelle. Dort ist YB-1 - wie nach Infektion mit AdYB-1 - in den viralen Einschlusskörperchen lokalisiert und steht somit in direktem Kontakt mit dem viralen Genom. Dadurch wird offensichtlich eine direkte Interaktion zwischen dem E2-late-Promotor des Plasmidkonstruktes und dem zellulären Transkriptionsfaktor verhindert. Die Bindung von YB-1 an die Y-Boxen des Promotors und die damit verbundene Transkriptionsaktivierung, die im Zentrum der adenoviralen DNA-Replikation steht, können so vermutlich nicht stattfinden. Die Northern-Blot-Analyse nach Infektion mit WT-Ad5 zeigt hingegen 24-48 Std. p.i. eine starke E2-Expression unter E2-

late-Promotor-Kontrolle (Abb. 39, 40), da YB-1 hier in den Kompartimenten der Transkription und DNA-Replikation mit dem E2-late-Promotor co-lokalisiert ist. Diese Ergebnisse sprechen für eine zentrale Rolle der E2-late-Promotoraktivierung bei der E1A-unabhängigen adenoviralen DNA-Replikation. Ergebnisse von Bath et al. belegen ebenfalls E2-late-Promotor-vermittelte E2-Expression in Adenovirus-infizierten Zellen<sup>9</sup>. Im Gegensatz zu WT-Ad5 bildet Ad312 keine viralen Einschlusskörperchen. Nach Infektion mit dem E1A-deletierten Vektor ist YB-1 diffus im Zellkern lokalisiert<sup>63</sup>. Diese diffuse Lokalisation ermöglicht anscheinend den Kontakt zwischen der Plasmid-DNA und dem Transkriptionsfaktor und damit eine Promotoraktivierung. Somit ist nach Infektion mit Ad312 eine deutliche E2-late-Promotor-Aktivierung im Plasmidmodell ebenso nachweisbar wie im adenoviralen Kontext mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens. Als weitere Ursache der fehlenden E2-late-Promotor-Aktivierung durch WT-Ad5 muss zudem die von Guifoyle et al. publizierte, E1A-243R-vermittelte Repression in Plasmidmodellen mit transienter Transfektion gewertet werden<sup>48</sup>.

Die vorgestellten Resultate zeigen, dass sich die Ergebnisse des Plasmidmodells nicht vorbehaltlos auf die physiologischen Regulationsvorgänge im adenoviralen Zyklus übertragen lassen. Letztlich können erst Versuche mit adenoviralen Deletionsmutanten klären, ob die alleinige Aktivierung des adenoviralen E2-late-Promotors für eine effiziente DNA-Replikation ausreicht. Die zentrale Bedeutung des späten E2-Promotors für die adenovirale DNA-Replikation konnte allerdings durch die gezeigten Ergebnisse der Replikations- und Expressionsanalyse von AdYB-1 und Ad312 belegt werden.

#### **4.5 Einsatz onkolytischer Adenoviren in klinischen Therapiekonzepten – ein Ausblick**

In einer Vielzahl präklinischer und klinischer Studien konnten Effizienz und Sicherheit selektiv replizierender, onkolytischer Adenoviren belegt werden. Ihr Einsatz stellt eine vielversprechende additive Therapieoption bei malignen Tumorerkrankungen dar. Die zentrale Bedeutung der Kernlokalisation des humanen Transkriptionsfaktors YB-1 für die adenovirale DNA-Replikation E1A-deletierter Vektoren und seine Beteiligung an der CPE-Induktion eröffnen neue Möglichkeiten für den Einsatz onkolytischer Adenoviren in diversen Therapiekonzepten.

Insbesondere vielfach-resistente Tumorzellen, die P-Glykoprotein exprimieren und bereits eine vermehrte Kernlokalisation von YB-1 aufweisen<sup>6</sup>, bieten sich als Zielzellen für

die adenovirale Tumorthherapie an. Ein hoher Anteil YB-1 kernpositiver Tumorzellen konnte für verschiedene Tumorentitäten wie z.B. NSCLC (nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom)<sup>161</sup>, Mammakarzinom<sup>6,73</sup>, Ovarialkarzinom<sup>78</sup>, Kolonkarzinom<sup>162</sup>, Osteosarkom<sup>137</sup> und Synoviasarkom<sup>136</sup> nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde außerdem festgestellt, dass nach Chemotherapie die Anzahl der YB-1-kernpositiven Tumorzellen bzw. Tumore signifikant ansteigt. Interessanterweise sind auch eine Vielzahl der Rezidive verschiedener Tumore vielfach-resistent und damit einer Therapie mit mehreren, strukturell unterschiedlichen Zytostatika nicht mehr zugänglich<sup>113</sup>. Ferner konnte erst kürzlich nachgewiesen werden, dass die Progression des Prostatakarzinoms durch YB-1 vermittelt wird<sup>41</sup>. Holm et al. konnten in einem Mausmodell mit xenotransplantierten, vielfach-resistenten Magenkarzinomzellen eine starke Wachstumsinhibition und teilweise Tumorregression nach Infektion mit dem E1A-mutierten Vektor dl520 im Vergleich zur PBS-Kontrolle nachweisen. Für nicht-resistente Zervixkarzinomzellen ergab sich kein zytoreduktiver Effekt.<sup>64</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass eine signifikante Regression vielfach-resistenter Tumoren durch selektiv-replizierende Adenoviren *in vivo* induziert werden kann. Es ist damit durchaus vorstellbar, dass onkolytische Adenoviren als innovatives Behandlungskonzept in Zukunft einen festen Platz in der Therapie vielfach-resistenter Tumoren einnehmen werden. Es steht außer Frage, dass sich das onkolytische Potential durch den Einsatz neuer, optimierter Vektoren weiter steigern lässt. Die durch die Analysen der Vermehrungszyklen von AdYB-1 und Ad312 gewonnenen Ergebnisse haben entscheidend zu der Entwicklung eines solchen optimierten Vektors beigetragen. Dieses E1A/E3-deletierte Adenovirus überexprimiert die frühen adenoviralen Gene E1B-55K und E4orf6. Hierdurch kommt es zu einer aktiven, virus-vermittelten Kernlokalisation von YB-1. Die Effizienz der adenoviralen DNA-Replikation und Zellyse wird damit unabhängig von einer primären YB-1-Kernlokalisation und der Expression von E1A gesteigert. Durch die Deletion von E1B-19K entfällt eine effiziente Adenovirus-vermittelte Apoptose-Protektion der Wirtszelle. Erste *in vitro*-Versuche zeigen ermutigende Ergebnisse. Bereits bei einer MOI von 1-20 pfu/cell lassen sich effektive DNA-Replikation und Zellyse in diversen humanen Tumorzellen nachweisen (Holm, persönliche Mitteilung). Die derzeit im Rahmen präklinischer Studien untersuchten Mausmodelle mit xenotransplantierten humanen Prostatakarzinom-, Urothelkarzinom- und Pankreaskarzinomzellen werden zeigen, ob der neu entwickelte adenovirale Vektor auch *in vivo* effizient repliziert und Tumorregression induziert.

Ähnlich wie bei der Radiochemotherapie oder Polychemotherapie, bei der die additiven Effekte von Radiatio und Chemotherapie bzw. unterschiedlicher Zytostatika therapeutisch genutzt werden, lassen sich auch onkolytische Adenoviren in kombinierten Therapieschemata einsetzen. Die therapeutischen Vektoren wirken synergistisch mit der entsprechenden Standardtherapie. Eine Kreuzresistenz, wie sie beim Einsatz verschiedener Zytostatika auftreten kann, entsteht nicht. Für diverse gentherapeutische Adenoviren, darunter die Vektoren ONYX-015 und Calydon Virus 890, konnte eine verbesserte onkolytische Potenz in Kombination mit Chemotherapie oder Bestrahlung *in vivo* bereits nachgewiesen werden<sup>39,57,58,80,92,152</sup>. Grundlage dieser Beobachtung ist anscheinend die Entwicklung von Vielfachresistenz unter Chemotherapie und Bestrahlung<sup>133</sup>, die wiederum mit einer verstärkten YB-1 Kernlokalisierung einhergeht. Da YB-1 u.a. an Reparaturvorgängen an geschädigter zellulärer DNA beteiligt ist und nach Virusinfektion diese Aufgabe nicht länger erfüllen kann, ist zu vermuten, dass das zytoreduktive Potential diverser zytotoxischer Substanzen bzw. der Bestrahlung durch die Kombination mit onkolytischen Adenoviren signifikant gesteigert werden kann. Somit ergeben sich synergistische antitumorale Effekte für eine Kombination von Zytostatika oder Radiatio und selektiv replizierenden adenoviralen Vektoren. Klinische Studien mit ONYX-015 zeigen die beste onkolytische Aktivität nach intratumoraler Injektion in Verbindung mit systemischer Polychemotherapie<sup>80</sup>. Durch die Integration selektiv replizierender Adenoviren könnten etablierte kombinierte Therapieschemata somit um eine tumorspezifische Komponente erweitert und ihre Effektivität gesteigert werden.

Besonders aussichtsreich erscheint der Einsatz adenoviraler Vektoren in neoadjuvanten Therapieschemata. Durch die zusätzliche intratumorale Injektion tumorspezifischer Adenoviren kann u.U. eine zusätzliche präoperative Tumorregression im Sinne eines Downstaging erreicht werden. Durch die ebenfalls applizierte Chemotherapie würden eventuell vorhandene Mikrometastasen unspezifisch erfasst. Darüber hinaus ist auch eine direkte intraoperative Injektion im Bereich der Tumorabsetzungsänder denkbar. Klinische Studien müssen in Zukunft zeigen, ob durch solche Therapieschemata die postoperative Rezidivrate signifikant gesenkt werden kann.

Steinwaerder et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass nach intravenöser Injektion ein Großteil der verwendeten E1A-deletierten adenoviralen Vektoren bereits bei der ersten Passage in der Leber verbleibt und Hepatozyten infiziert. Eine adenovirale Replikation in den normalen Leberzellen erfolgte jedoch nicht.<sup>167</sup> Aufgrund dieser Beobachtung könnte ein Einsatz selektiv replizierender Vektoren bei Lebermetastasen oder

in der Therapie maligner Lebertumoren wie z.B. des hepatozellulären Karzinoms (HCC) ggf. auch im Rahmen einer Chemoembolisation diskutiert werden.

Die Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien, die u.a. durch den Einsatz des adenoviralen Vektors ONYX-015 gewonnen wurden, zeigen, dass mit selektiv-replizierenden Adenoviren eine sichere Therapieoption zur Verfügung steht<sup>80</sup>. Die Entwicklung verbesserter adenoviraler Vektoren und ihr Einsatz im Rahmen klinischer Studien könnte ein weiterer wichtiger Schritt auf dem Weg zur Etablierung einer (Radio-)Virochemotherapie in der Behandlung maligner Tumore sein. Erste Daten geben zur Hoffnung Anlass, dass durch die Ergänzung etablierter Therapieschemata durch eine tumorspezifische Komponente mit den Möglichkeiten der Gentherapie in Zukunft eine signifikante Senkung der Mortalitätsrate und eine Verbesserung der Lebensqualität krebserkrankter Patientinnen und Patienten erreicht werden kann.

Es steht allerdings außer Frage, dass auf dem Weg zur standardisierten Anwendung onkolytischer Adenoviren noch einige Hürden überwunden werden müssen. Ein besonderes therapeutisches Problem stellt hierbei das metastasierte Krebsleiden dar. Durch den oben beschriebenen first-pass Effekt in der Leber<sup>167</sup> und durch die Induktion einer Immunantwort ist die systemische Anwendung adenoviraler Vektoren im Sinne einer intravenösen Injektion derzeit noch stark limitiert. Darüber hinaus besteht eine weite Verbreitung präformierter anti-adenoviraler Antikörper in der Bevölkerung.<sup>64,160,183</sup> Ein Einsatz der Vektoren in adjuvanten Therapieschemata bei Patienten ohne definierte Tumormasse bzw. mit multiplen kleinvolumigen Metastasen ist somit derzeit kritisch zu beurteilen. Die Ermöglichung einer systemischen Anwendung durch Optimierung der immunogenen Eigenschaften der verwendeten Adenoviren bleibt auch in Zukunft eine der Herausforderungen bei der Entwicklung optimierter onkolytischer Adenoviren. Erste Ergebnisse mit neuen Ansätzen wie beispielsweise dem Einsatz PEG geschützter Adenoviren<sup>122</sup> lassen die Probleme jedoch langfristig lösbar erscheinen.

## 5 Zusammenfassung

*Hintergrund:* Maligne Erkrankungen gehören heute zu den führenden Todesursachen. Im Jahr 2000 erlag in Deutschland jeder vierte Verstorbene einem Krebsleiden. Ein zentrales Problem der Tumorthherapie ist die Vielfach-Resistenz von Tumoren gegenüber diversen Zytostatika. Die durch das P-Glykoprotein, einen sogenannten ABC-Transporter, vermittelte Vielfach-Resistenz (MDR) korreliert mit einer verstärkten nukleären Lokalisation des humanen Transkriptionsfaktors YB-1. Die Beobachtung, dass replikationsinkompetente adenovirale Vektoren der ersten Generation in solchen MDR-Zellen *in vitro* effizient replizieren, hat zur Konstruktion des rekombinanten adenoviralen Vektors AdYB-1 geführt, welcher das Y-Box-bindende Protein 1 (YB-1) unter CMV-Promotor-Kontrolle exprimiert. Der Transkriptionsfaktor wird somit in der Wirtszelle überexprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde AdYB-1 in bezug auf die E1A-unabhängige Replikation, die Zellyse und Virusfreisetzung, den Einfluss von E1B-55K und E4orf6 sowie die Aktivierung der Promotoren der adenoviralen E2-Region untersucht.

*Material und Methoden:* A-549- (NSCLC), HeLa- (Zervixkarzinom) und U-2OS-Zellen (Osteosarkom) wurden mit AdYB-1 infiziert und diversen *in vitro*-Experimenten unterzogen. Als Vergleichsvektoren wurde das lediglich E1A-deletierte Adenovirus Ad312 und der Wildtyp des Adenovirus Typ 5 (WT-Ad5) eingesetzt.

*Ergebnisse:* Die Ergebnisse zeigen, dass AdYB-1 in diversen Tumorzellen unabhängig von zentralen Genprodukten der adenoviralen E1A-Region effizient repliziert. Entscheidend hierfür scheint insbesondere die E2-late-Promotoraktivierung zu sein. Darüber hinaus führt die Überexpression von YB-1 zu einer verstärkten adenoviralen Lyse der Wirtszelle. Durch die additive Expression von E1B-55K und E4orf6 erreicht die Partikelbildung durch AdYB-1 in A-549-Zellen nahezu Wildtypniveau.

*Schlussfolgerungen:* Die Überexpression von YB-1 im adenoviralen Vektor führt zu einer effizienten adenoviralen DNA-Replikation, Partikelbildung und Zellyse. Dadurch wird das onkolytische Potential von AdYB-1 signifikant erhöht. Durch die zusätzliche Expression der frühen adenoviralen Gene E1B-55K und E4orf6 *in trans* kann die Effizienz der Partikelbildung von AdYB-1 weiter gesteigert werden. Diese Erkenntnisse leisten nicht nur einen Beitrag zum Verständnis der adenoviralen Replikation, sondern bilden darüber hinaus die Grundlage für die Entwicklung effizienterer Adenoviren für einen additiven Einsatz in der Therapie maligner Erkrankungen. Einige Resultate der vorliegenden Arbeit wurden bereits in einem neuartigen onkolytischen Vektor umgesetzt.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Addison, C, Braciak, T, Ralston, R, Muller, W, Gauldie, J, Graham, F: Intratumoral injection of an adenovirus expressing IL-2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**:8522-8526 (1995)
- 2 Ahmed, CM, Sugarman, BJ, Johnson, DE, Bookstein, RE, Saha, DP, Nagabushan, TL Wills, KN: *In vivo* tumor suppression by adenovirus-mediated interferon alpha 2b gene delivery. *Hum. Gene Ther.* **10**:77-84 (1999)
- 3 Alemany, R, Balagué, C, Curiel, DT: Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat. Biotech.* **18**:723-727 (2000)
- 4 Anderson, M, Svante, P, Nilsson, T, Peterson, PA: Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenovirus to evade immune surveillance. *Cell.* **43**:215-222 (1985)
- 5 Babiss, LE, Ginsberg, HS, Darnell, JE: Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* **5**:2552-2558 (1985)
- 6 Bargou, RC, Jürchott, K, Wagener, C, Bergmann, S, Metzner, S, Bommert, K, Mapara, KY, Winzer KJ, Dietel, M, Dörken, B, Royer, HD: Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic *MDR1* gene expression. *Nat. Med.* **3**:447-450 (1997)
- 7 Bautista, D, Hitt, M, McGrory, J, Graham, FL: Isolation and characterisation of insertion mutants in E1A of Adenovirus Type 5. *Virology.* **182**:578-596 (1991)
- 8 Berk, AJ and Sharp, PA: Ultraviolet mapping of the adenovirus 2 early promoters. *Cell.* **12**:45-55 (1977)
- 9 Bhat, G, SivaRaman, L, Murthy, S, Domer, P, Thimmappaya, B: *In vivo* identification of multiple promoter domains of adenovirus E1A-late promoter. *EMBO J.* **6**:2045-2052 (1987)
- 10 Bischoff, JR, Kirn, DH, Williams, A, Heise, C, Horn, S, Muna, M, Nye, JA, Sampson, A, Fattaey, A, McCormick, F: An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* **274**:373-376 (1996)
- 11 Blagosklonny MV, Giannakakou, P, Wojtowicz, M, Romanova, LY, Ain, KB, Bates, SE, Fojo, T: Effects of p53-expressing adenovirus on the chemosensitivity and differentiation of anaplastic thyroid cancer cells. *J. Clin. Endocrin. Metab.*

- 83**:2516-2522 (1998)
- 12 Böcker, W, Höfler, H, Denk, H, Heitz, PU: Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker/Heitz/Denk, Pathologie, München, Urban&Schwarzenberg, 161-199 (1997)
  - 13 Bondesson, M, Öhmann, K, Mannervik, M, Fan, S, Akusjärvi, G: Adenovirus E4 open reading frame 4 protein autoregulates E4 transcription by inhibiting E1A transactivation of the E4 promoter. *J. Virol.* **70**:3844-3851 (1996)
  - 14 Boyer, JL, Rohleder, K, Ketner, G: Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology.* **263**:307-312 (1999)
  - 15 Boyer, TG, Berk, A: Functional interaction of adenovirus E1A with holo-TFIID. *Genes Dev.* **7**:1810-1823 (1993)
  - 16 Bridge, E, Hemström, C, Pettersson, U: Differential regulation of adenovirus late transcription units by the products of early region. *Virology.* **183**:260-266 (1991)
  - 17 Bridge, E, Mattsson, K, Aspegren, A, Sengupta, A: Adenovirus early region 4 promotes the localization of splicing factors and viral RNA in late-phase interchromatin granule clusters. *Virology.* **311**:40-50 (2003)
  - 18 Bridge, E, Pettersson, U: Nuclear organization of replication and gene expression in adenovirus-infected cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**:99-117 (1995)
  - 19 Burchenal, JH, Robinson, E, Johnston, SF: The induction of resistance to 4-amino-N<sup>10</sup>-methylpteroylglutamic acid in a strain of transmitted mouse leukemia. *Science.* **111**:116 (1950)
  - 20 Burgert, HG, Kvist, S: An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell.* **41**:998-998 (1985)
  - 21 Chen, SH, Shine, HD, Goodman, JC, Grossman RG, Woo, SLC: Gene therapy for brain tumors: regression of experimental glioma by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**:3045-3057 (1994)
  - 22 Cheng S, Alfonso-Jaume MA, Mertens PR, Lovett DH: Tumour metastasis suppressor, nm23- $\beta$ , inhibits gelatinase A transcription by interference with transactivator Y-box protein-1 (YB-1). *Biochem. J.* **366**:807-16. (2002)
  - 23 Chiocca, EA: Oncolytic viruses. *Nat. Rev. Cancer.* **2**:938-951 (2002)
  - 24 Chow, LT, Broker, TR, Lewis, JB: Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J. Mol. Biol.* **134**:265-303 (1979)
  - 25 Cirielli, C, Inyaku, K, Capogrossi, MC, Yuan, X, Williams, JA: Adenovirus



- mediated wt p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of experimental intracranial human malignant glioma. *J. Neurooncol.* **43**:99-108 (1999)
- 26 Curiel, DT: The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **6**:3395-3399 (2000)
- 27 Dano, K: Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **323**:466-483 (1973)
- 28 Didier, DK, Schiffenbauer, J, Woulfe, SL, Zacheis, M, Schwartz, BD: Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**:7322-7326 (1988)
- 29 Dobner, T, Horikoshi, N, Rubenwolf, S, Shenk, T: Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science.* **272**:470-473 (1996)
- 30 Doronin, K, Toth, K, Kuppaswamy, M, Ward, P, Tollefson, A, Wold, W: Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. *J. Virol.* **74**:6147-6155 (2000)
- 31 Dosch, T, Horn, F, Schneider, G, Krätzer, F, Dobner, T, Hauber, J, Stauber, RH: The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1-independent mechanism. *J. Virol.* **75**:5677-5683 (2001)
- 32 Dyson, N: The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev.* **12**:2245-2262 (1998)
- 33 Farley, DC, Brown JL, Leppard, KN: Activation of the early-late switch in adenovirus type 5 major late transcription unit expression by L4 gene products. *J. Virol.* **78**:1782-1791 (2004)
- 34 Fessler, SP, Young CSH: Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection. *J. Virol.* **72**:4049-4056 (1998)
- 35 Fessler, SP, Young CSH: The role of the L4 33K gene in adenovirus infection. *Virology.* **263**:507-516 (1999)
- 36 Fueyo, J, Gomez-Manzano, C, Alemany, R, Lee, PS, McDonnell, TJ, Mitlianga, P, Shi, YX, Levin, VA, Yung, WK, Kyritsis, AP: A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* **19**:2-12 (2000)

- 37 Ganly, I, Kim, YT, Hann, B, Balmain, A, Brown, R: Replication and cytolysis of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant ovarian tumour cells is associated with reduced apoptosis. *Gene Ther.* **8**:369-375 (2001)
- 38 Geisberg, JV, Lee, WS, Berk, A, Ricciardi, RP: The zinc finger region of the adenovirus E1A transactivating domain complexes with the TATA box binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**:2488-2492 (1994)
- 39 Georger, B, Grill, J, Opolon, P, Morizet, J, Aubert, G, Lecluse, Y, van Beusechem, VW, Gerritsen, WR, Kirn, DH, Vassal, G: Potentiation of radiation therapy by the oncolytic adenovirus dl1520 (ONYX-015) in human malignant glioma xenografts. *Br. J. Cancer.* **89**:577-84 (2003)
- 40 Gilardi, P, Perricaudet, M: The E4 promoter of adenovirus type 2 contains an E1A dependent cis-acting element. *Nucleic Acids. Res.* **24**:9035-9049 (1986)
- 41 Gimenez-Bonafe, P, Fedoruk, MN, Whitmore, TG, Akbari, M, Ralph, JL, Ettinger, S, Gleave, ME, Nelson, CC: YB-1 is upregulated during prostate cancer progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate.* **15**:337-349 (2004)
- 42 Glenn, GM and Ricciardi, RP: Adenovirus 5 early region 1A hodt range mutants hr3, hr4 and hr5 contain mutations which generate single amino acid substitutions. *J. Virol.* **56**:66-74 (1985)
- 43 Glenn, GM, Ricciardi, RP: Detailed kinetics of adenovirus type 5 steady-state transcripts during early infection. *Virus Res.* **9**:73-91 (1988)
- 44 Glotzer, JB, Saltik, M, Chiocca, S, Michou, A, Moseley, P, Cotton, M: Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. *Nature.* **407**:207-211 (2000)
- 45 Goodrum, FD, Ornelles, DA: p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J. Virol.* **72**:9479-9490 (1998)
- 46 Goodrum, FD, Ornelles, DA: Roles for the E4orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J. Virol.* **73**:7474-7488 (1999)
- 47 Graham, FL and Prevec, L: Manipulation of adenovirus vectors. In: *Methods in molecular biology*, 109-128, Ed: Murray, EJ, Clifton, NJ (1991)
- 48 Guilfoyle, R, Fontana, MR, Mora, M, Osterhoff, W, Rossini, M: Identification of the DNA sequences in the adenovirus E2A late promoter that are responsive to E1A repression. *Cancer Cells.* **4**:227-233 (1989)
- 49 Guilfoyle, R, Osterhoff, W, Rossini, M: Two functions encoded by the early

- region 1A are responsible for the activation and repression of the DNA-binding protein gene. *EMBO J.* **4**:707-713 (1985)
- 50 Gustin, KE, Imperiale, MJ: Encapsidation of viral DNA requires the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein. *J. Virol.* **72**:7860-7870 (1998)
- 51 Gyorffy S, Palmer K, Podor TJ, Hitt M, Gauldie J: Combined treatment of a murine breast cancer model with type 5 adenovirus vectors expressing murine angiostatin and IL-12: a role for combined anti-angiogenesis and immunotherapy. *J. Immunol.* **166**:6212-6217 (2001)
- 52 Halbert, DN, Cutt, JR, Shenk, T: Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression and host cell shutoff. *J. Virol.* **56**:250-257 (1985)
- 53 Hasson, TB, Ornelles, DA, Shenk, T: Adenovirus L1 52- and 55- kilodalton proteins are present within assembling virions and colocalize with nuclear structures distinct from replication centers. *J. Virol.* **66**:6133-6142 (1992)
- 54 Haviv, YS, Blackwell, JL, Li, H, Wang, M, Lei, X, Curiel, DT: Heat shock and heat shock protein 70i enhance the oncolytic effect of replicative adenovirus. *Cancer Res.* **61**:8361-8365 (2001)
- 55 Hawkins, LK, Hermiston TW: Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the ADP region. *Gene Ther.* **8**:1132-1141 (2001)
- 56 Hayes, BW, Telling, GC, Myat, MM, Williams, JF, Flint, SJ: The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species. *J. Virol.* **64**:2732-2742 (1990)
- 57 Heise, C, Lemmon, M, Kirn, D: Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clin. Cancer Res.* **6**:4908-4914 (2000)
- 58 Heise, C, Sampson-Johannes, A, Williams, A, McCormick, F, van Hoff, DD, Kirn, DH: ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemtherapeutic agents. *Nat. Med.* **3**:639-645 (1997)
- 59 Heise, C, Williams, AM, Xue, S, Propst, M, Kirn, DH: Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficiency. *Cancer Res.* **59**:2623-2628 (1999)
- 60 Hemminki, A, Wang, M, Desmond, RA, Strong, TV, Alvarez, RD, Curiel DT: Serum and ascites neutralizing antibodies in ovarian cancer patients treated with

- intraperitoneal adenoviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **13**:1505-1514 (2002)
- 61 Hemström, C, Virtanen, A, Bridge, E, Ketner, G, Pettersson, U: Adenovirus E4-dependent activation of the early E2 promoter is insufficient to promote the early-to-late-phase transition. *J. Virol.* **65**:1440-1449 (1991)
- 62 Holm, PS, Bergmann, S, Jütchott, K, Lage, H, Brand, K, Ladhoff, A, Mantwill, K, Curiel, DT, Dobbstein, M, Dietel M, Gänsbacher, B, Royer, HD: YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter. *J. Biol. Chem.* **277**:10427-10434 (2002)
- 63 Holm, PS, Lage, H, Bergmann, S, Jürchott, K, Glockzin, G, Bernshausen, A, Mantwill, K, Ladhoff, A, Wichert, A, Mymryk, JS, Ritter, T, Dietel, M, Gänsbacher, B, Royer, HD: Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: Impact for cancer gene therapy. *Cancer Res.* **64**:322-328 (2004)
- 64 Horwitz, MS: Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J. Gene Med.* **6**:172-183 (2004)
- 65 Huang, M, Hearing, P: Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J. Virol.* **63**:2605-2615 (1989)
- 66 Hubner, R and van Marck, E: Simian virus 40 regulatory region sequence, strain PML-1c (bp 1 to 336, linear DNA). NCBI GenBank: AJ430323.1 GI: 46937160. *Unpublished, direct submission.* (2002)
- 67 Ichikawa, T, Chiocca, EA: Comparative analyses of transgene delivery and expression in tumors inoculated with a replication-conditional or-defective viral vector. *Cancer Res.* **61**:5336-5339 (2001)
- 68 Imperiale, MJ, Akusjärvi, G, Leppard, KN: Posttranscriptional control of adenovirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol.* **199**:139-171 (1995)
- 69 Imperiale, MJ, Hart, RP, Nevins, JR: An enhancer-like element in the adenovirus E2 promoter contains sequences essential for uninduced and E1A-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**:381-385 (1985)
- 70 Imperiale, MJ, Kao, HT, Feldman, LT, Nevins, JR, Strickland, S: Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes: evidence for a cellular E1A-like activity. *Mol. Cell. Biol.* **4**:867-874 (1984)
- 71 Ito, Y, Yoshida, H, Shibahara, K, Uruno, T, Nakano, K, Takamura, Y, Miya, A, Kobayashi, K, Yokozawa, T, Matsuzuka, F, Uchimi, T, Kuwano, M, Miyoshi, E,

- Matsuura, N, Kuma, K, Miyauchi, A: Y-box binding protein expression in thyroid neoplasms: its linkage with anaplastic transformation. *Pathol. Int.* **53**:429-33 (2003)
- 72 Izumi, H, Imamura, T, Nagatani, G, Ise, T, Murakami, T, Uramoto, H, Torigoe, T, Ishiguchi, H, Yoshida, Y, Nomoto, M, Okamoto, T, Uchiumi, T, Kuwano, M, Funo, K, Kohno, K: Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'->5' exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.* **29**:1200-1207 (2001)
- 73 Janz, M, Harbeck, N, Dettmar, P, Berger, U, Schmidt, A, Jürchott, K, Schmitt, M, Royer, HD: Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer.* **98**:278-282 (2002)
- 74 Jones, C, Lee KA: E1A-mediated activation of the adenovirus E4 promoter can occur independently of the cellular transcription factor E4F. *Mol. Cell Biol.* **11**:4298-4305 (1991)
- 75 Jones, N, Shenk, T: An adenovirus early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**:3665-3669 (1979)
- 76 Juliano, RL, Ling, V: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* **455**:152-162 (1976)
- 77 Jürchott, K, Bergmann, S, Stein, U, Walther, W, Janz, M, Manni, I, Piaggio, G, Fietzel, E, Dietel, M, Royer, HD: YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**:27998-27996 (2003)
- 78 Kamura, T, Yahata, H, Amada, S, Ogawa, S, Sonoda, T, Kobayashi, H, Mitsumoto, M, Kohno, K, Kuwano, M, Nakano, H: Is nuclear expression of Y-box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer.* **85**:2450-2454 (1999)
- 79 Ketner, G, Bridge, E, Virtanen, A, Hemström, C, Pettersson, U: Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids. *Nucl. Acids Res.* **17**:3037-3048 (1989)
- 80 Khuri, FR, Nemunaitis, J, Ganly, I, Arseneau, J, Tannock, IF, Romel, L, Gore, M, Ironside, J, MacDougall, RH, Heise, C, Randlev, B, Gillenwater, AM, Brusio, P, Kaye, SB, Hond, WK, Kirn, DH: A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil

- in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* **6**:879-885 (2001)
- 81 Kirn, D, Martuza, RL, Zwiebel, J : Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat. Med.* **7**:781-787 (2001)
- 82 Knox, JJ, Rebstein, PJ, Manoukian, A, Gronostajski, RM: In vivo stimulation of a chimeric promoter by binding sites for nuclear factor I. *Mol. Cell Biol.* **11**:2946-2951 (1991)
- 83 Kohno, K, Izumi, H, Uchiumi, T, Ashizuka, M, Kuwano, M: The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays.* **25**:691-699 (2003)
- 84 Koike, K, Uchiumi, T, Ohga, T, Toh, S, Wada, M, Kohno, K, Kuwano, M: Nuclear translocation of the Y-box binding protein bei ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.* **417**:390-394 (1997)
- 85 Kovesdi, I, Reichel, R, Nevins, JR: Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **84**:2180-2184 (1987)
- 86 Kusumoto M, Umeda S, Ikubo A, Aoki Y, Tawfik O, Oben R, Williamson S, Jewell W, Suzuki T: Phase 1 clinical trial of irradiated autologous melanoma cells adenovirally transduced with human GM-CSF gene *Cancer Immunol. Immunother.* **50**:373-81 (2001)
- 87 Kuwano, M, Uchiumi, T, Hayakawa, H, Ono, M, Wada, M, Izumi, H, Kohno, K: The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Science.* **94**:9-14 (2003)
- 88 La Thangue, NB, Rigby, PW: An adenovirus E1A-like transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell.* **49**:507-513 (1987)
- 89 Lodomery, M, Sommerville, J: A role for Y-box proteins in cell proliferation. *BioEssays.* **17**:9-11 (1995)
- 90 Lasham, A, Lindridge, E, Rudert, F, Onrust, R, Watson, J: Regulation of the human *fas* promoter by YB-1, Pur- $\alpha$  and AP-1 transcription factors. *Gene.* **252**:1-13 (2000)
- 91 Leppard, KN: E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeo-associated virus infections. *J. Gen. Virol.* **78**:2131-2138 (1997)
- 92 Li, Y, Yu, DC, Chen, Y, Amin, P, Zhang, H, Nguyen, N, Henderson, R: A

- hepatocellular carcinoma-specific adenovirus variant, CV890, eliminates distant human liver tumors in combination with doxorubicin. *Cancer Res.* **61**:6428-6436 (2001)
- 93 Lieber, A, He, C, Kirillova, I, Kay, MA: Recombinant adenoviruses with large deletions generated by cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **70**:8944-8960 (1996)
- 94 Liechtenstein DL, Toth, K, Doronin, K, Tollefson AE, Wold, WS: Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int. Rev. Immunol.* **23**:75-111 (2004)
- 95 Lillie, JW, Green, M, Green, MR: An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell.* **46**:1043-1051 (1986)
- 96 Lillie, JW, Green, MR: Transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Nature.* **338**:39-44 (1989)
- 97 Lillie, JW, Loewenstein, PM, Green, M, Green, MR: Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell.* **50**:1091-1100 (1987)
- 98 Lusky, M, Christ, M, Rittner, K, Dieterle, A, Dreyer, D, Mourot, B, Schultz, H, Stoeckel, F, Pavirani, A, Mehtali, M: *In vitro* and *in vivo* biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J. Virol.* **72**:2022-2032 (1998)
- 99 Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, Wang Z, Lebkowski JS, Vasserot AP: The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters. *Gene Ther.* **8**:568-78 (2001)
- 100 Mannervik, M, Fan, S, Ström, AC, Helin, K, Akusjärvi, G: Adenovirus E4 open reading frame 4-induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virology.* **256**:313-321 (1999)
- 101 Marcellus, RC, Chan, H, Paquette, D, Thirlwell, S, Boivin, D, Branton, PE: Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the B $\alpha$  subunit of protein phosphatase 2A. *J. Virol.* **74**:7869-7877 (2000)
- 102 Marcellus, RC, Lavoie, JN, Boivin, D, Shore, GC, Ketner, G, Branton, PE: The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent

- cell death by apoptosis. *J. Virol.* **72**:7144-7153 (1998)
- 103 Marcellus, RC, Teodoro, JG, Wu, T, Brough, DE, Ketner, G, Shore, GC, Branton, PE: Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J. Virol.* **70**:6207-6215 (1996)
- 104 Marenstein, DR, Ocampo, M, Chan, MK, Altamirano, A, Basu, AK, Boorstein, RJ, Cunningham, RP, Teebor, G: Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor. *J. Biol. Chem.* **276**:21242-21249 (2001)
- 105 Marienfeld, U, Haack, A, Thalheimer, P, Schneider-Rasp, S, Brackmann, H, Poller, W: 'Autoreplication' of the vector genome in recombinant adenoviral vectors with different E1 region deletions and transgenes. *Gene Ther.* **6**:1101-1113 (1999)
- 106 Marr, RA, Hitt, M, Muller, W, Gauldie, J, Graham, F: Tumor therapy in mice using adenovirus vectors expressing human TNF- $\alpha$ . *Int. J. Oncol.* **12**:509-515 (1998)
- 107 Martin, M, Berk A: Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* **72**:3146-3154 (1998)
- 108 Marton, MJ, Baim, SB, Ornelles, DA, Shenk, T: The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J. Virol.* **64**:2345-2359 (1990)
- 109 Mathis, DJ, Elkaim, R, Kédinger, C, Sassone-Corsi, P, Chambon, P: Specific *in vitro* initiation of transcription on the adenovirus type 2 early and late EII transcription units. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **78**:7383-7387 (1981)
- 110 Matsumoto, K, Wolffe, AP: Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* **8**:318-323 (1998)
- 111 McCormick, F: Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat. Rev. Cancer.* **1**:130-141 (2001)
- 112 McCormick, F: Interactions between adenovirus proteins and the p53 pathway: the development of ONYX-015. *Cancer Biol.* **10**:453-459 (2000)
- 113 Mechetner, E, Kyshtoobayeva, A, Zonis, S, Kim, H, Stroup, R, Garcia, R, Parker, RJ, Fruehauf, JP: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glykoprotein expression by human breast cancer correlate with *in vitro* resistance to taxol and doxorubicin, *Clin. Cancer Res.* **4**:389-399 (1998)



- 114 Medghalchi, S, Padmanabhan, R, Ketner, G: Early region 4 modulates adenovirus DNA replication by two genetically separable mechanisms. *Virology*. **236**:8-17 (1997)
- 115 Meier, O, Greber, UF: Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* **6**:152-163 (2004)
- 116 Mertens, PR, Alfonso-Jaume, MA, Steinmann, K, Lovett, DH: A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **273**:957-32965 (1998)
- 117 Mertens, PR, Harendza, S, Pollock, AS, Lovett, DH: Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J. Biol. Chem.* **272**:22905-22912 (1998)
- 118 Milas, M, Yu, D, Lang, A, Ge, T, Feig, B, El Naggar, AK, Pollock, RE: Adenovirus-mediated p53 gene therapy inhibits human sarcoma tumorigenicity. *Cancer Gene Ther.* **7**:422-429 (2000)
- 119 Miyasaki, M, Kohno, K, Uchiumi, T, Tanimura, H, Matsuo, K, Nasu, M, Kuwano, M: Activation of human multidrug resistance-1 gene promoter in response to heat shock stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **187**:677-684 (1992)
- 120 Mizuguchi, H, Nakagawa, T, Toyosawa, S, Nakanishi, M, Imazu, S, Nakanishi, T, Tsutsumi, Y, Nakagawa, S, Ijuhin, N, Mayumi, T: Tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated tumor regression by the *in vivo* transfer of genes into the artery that leads to tumors. *Cancer Res.* **58**:5725-5730 (1998)
- 121 Mohammadi, ES, Ketner, EA, Johns, DC, Ketner, G: Expression of the adenovirus E4 34k oncoprotein inhibits repair of double strand breaks in the cellular genome of a 293-based inducible cell line. *Nucl. Acids Res.* **32**:2652-2659 (2004)
- 122 Mok, H, Palmer, DJ, Ng, P, Barry, MA: Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune response. *Mol. Ther.* **11**:66-79 (2005)
- 123 Montell, C, Fisher, EF, Caruthers, MH, Berk, AJ: Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at a mRNA splice site. *Nature*. **295**:380-384 (1982)
- 124 Moran, E, Mathews, MB: Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. *Cell*. **48**:77-178 (1987)
- 125 Mullen, J, Tanabe, K: Viral Oncolysis. *Oncologist*. **7**:106-119 (2002)
- 126 Neill, SD, Hemstrom, C, Virtanen, A, Nevins, JR: An adenovirus E4 gene product trans-activates E2 transcription and stimulates stable E2F binding through a direct

- association with E2F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**:2008-2012 (1990)
- 127 Nelson, JE, Kay, MA: Persistence of recombinant adenovirus in vivo is not dependent on vector DNA replication. *J. Virol.* **71**:8902-8907 (1997)
- 128 Nettelbeck, DM, Rivera, AA, Balague, C, Alemany, R, Curiel, DT: Novel oncolytic adenoviruses targeted to melanoma: specific replication and cytolysis by expression of E1A mutants from the tyrosinase enhancer/promoter. *Cancer Res.* **62**:4663-4670 (2002)
- 129 Nevins, JR, Wilson, MR: regulation of adenovirus-2 gene expression at the level of transcriptional terminatin and RNA processing. *Nature.* **290**:13-118 (1981)
- 130 Nevins, JR, Winkler, JJ: Regulation of early adenovirus transcription: a protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **77**:1893-1898 (1980)
- 131 Nevins, JR: Adenovirus E1A: transcription regulation and alteration of cell growth control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**:25-32 (1995)
- 132 Nevins, JR: Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell.* **26**:213-220 (1981)
- 133 Nielsen, D, Maare, C, Eriksen, J, Litman, T, Skovsgaard, T: Expression of P-glykoprotein and multidrug resistance associated protein in Ehrlich ascites tumor cells after fractionated irradiation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **51**:1050-1057 (2001)
- 134 Nordqvist, K, Öhman, K, Akusjärvi, G: Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **14**:437-445 (1994)
- 135 O'Connor, RJ, Hearing, P: The E4-6/7 protein functionally compensates for the loss of E1A expression in adenovirus infection. *J. Virol.* **74**:5819-5824 (2000)
- 136 Oda, Y, Ohishi, Y, Saito, T, Hinoshita, E, Uchiumi, T, Kinukawa, N, Iwamoto, Y, Kohno, K, Kuwano, M, Tsuneyoshi, M: Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II $\alpha$  expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.* **199**:251-258 (2003)
- 137 Oda, Y, Sakamoto, A, Shinohara, N, Ohga, T, Uchiumi, T, Kohno, K, Tsuneyoshi, M, Kuwano, M, Iwamoto, Y: Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **4**:2273-2277 (1998)
- 138 Öhman, K, Nordqvist, K, Akusjärvi, G: Two adenovirus proteins with redundant

- activities in virus growth facilitate tripartite leader mRNA accumulation. *Virology*. **194**:50-58 (1993)
- 139 Okamoto, T, Izumi, H, Imamura, T, Takano, H, Ise, T, Uchiumi, T, Kuwano, M, Kohno, K: Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of the human gene expression. *Oncogene*. **19**:6194-6202 (2000)
- 140 Ornelles, DA, Shenk, T: Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: Association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J. Virol.* **65**:424-439 (1991)
- 141 Osterman JV, Waddell A, Aposhian HV: DNA and gene therapy: uncoating of polyoma pseudovirus in mouse embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **67**:37-40 (1970)
- 142 Patterson, LJ, Prince, GA, Richardson, E, Alvord, WG, Kalyan, N, Robert-Guroff, M: Insertion of HIV-1 genes into Ad4ΔE3 vector abrogates increased pathogenesis in cotton rats due to E3 deletion. *Virology*. **292**:107-113 (2002)
- 143 Pfeifer, A, Verma, IM: Gene therapy: Promises and problems. *Annu. Rev. Gen. Hum. Genet.* **2**:177-211 (2001)
- 144 Phelps, WC, Yee, CL, Munger, K, Howley, PM: The human papillomavirus type 16 E7 encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus. *Cell*. **53**, 539-547 (1988)
- 145 Pirollo KF, Hao, Z, Rait, A, Jang, YJ, Fee, WE jr, Ryan, P, Chiang, Y, Chang, EH: p53 mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy. *Oncogene*. **14**:1735-1746 (1997)
- 146 Putzer, BM, Bramson, JL, Addison, CL, Hitt, M, Siegel, PM, Muller, WJ, Graham, JL: Combination therapy with interleukin-2 and wt p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer. *Hum. Gene Ther.* **9**:707-718 (1998)
- 147 Querido, E, Morison, MR, Chu-Pham-Dang, H, Thirlwell, H, Boivin, D, Branton, PE: Identification of three functions of the adenovirus E4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J. Virol.* **75**:699-709 (2001)
- 148 Reichel, R, Kovesdi, I, Nevins, JR: Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product. *Cell*. **48**:501-506 (1987)
- 149 Ricciardi, RP, Jones, RL, Cepko, CL, Sharp, PA, Roberts, BE: Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U S A.* **78**:6121-6125 (1981)
- 150 Robert, J, Jarry, C: Multidrug resistance reversal agents. *J. Med. Chem.* **46**:4805-4817 (2003)
- 151 Rodriguez, R, Schuur, ER, Lim, HY, Henderson, GA, Simons, JW, Henderson, DR: Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN 706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* **57**:2559-2563 (1997)
- 152 Rogulski, KR, Freytag, SO, Zhang, K, Gilbert, JD, Paielle, DL, Kim, JH, Heis, CC, Kirn, DH: *In vivo* antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Res.* **60**:1193-1196 (2000)
- 153 Rooney, RJ, Raychaudhuri, P, Nevins, JR: E4F and ATF, two transcription factors that recognize the same site, can be distinguished both physically and functionally: a role for E4F in E1A trans activation. *Mol. Cell Biol.* **10**:5138-5149 (1990)
- 154 Rothmann, T, Hengstermann, A, Whitaker, NJ, Scheffner, M, Hausen, H: Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* **72**:9470-9478 (1998)
- 155 Russell, WC: Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**:2573-2604 (2000)
- 156 Sassone-Corsi, P, Dougherty, JP, Wasylyk, B, Chambon, P: Stimulation of *in vitro* transcription from heterologous promoters by the simian virus 40 enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**:308-312 (1984)
- 157 Schneider-Gadicke, A, Schwarz, E: Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* **5**:2285-2292 (1986)
- 158 Shaley, J, O'Connor, RJ, Taylor, LJ, Bar-Sagi, D, Hearing, P: Induction of the cellular E2F-1 promoter by the adenovirus E4orf6/7 protein. *J. Virol.* **74**:2084-2093 (2000)
- 159 Shen, Y, Kitzes, G, Nye, JA, Fattaey, A, Hermiston, T: Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J. Virol.* **75**:4298-4307 (2001)
- 160 Shenk, T: Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, 3<sup>rd</sup> edition, 2111-2147 (1996)
- 161 Shibahara, K, Sugio, K, Osaki, T, Uchiumi, T, Maehara, Y, Kohno, K, Yasumoto, K, Sugimachi, K, Kuwano, M: Nuclear expression of the Y-box binding protein,

- YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**:3151-3155 (2001)
- 162 Shibao, K, Takano, H, Nakayama, Y, Okazaki, K, Nagata, N, Izumi, H, Uchiumi, T, Kuwano, M, Kohno, K, Itoh, H: Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II $\alpha$  genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer.* **83**:732-737 (1999)
- 163 Smith, R, Huebner, RJ, Rowe, WP, Schatten, WF, Thomas, LB: Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* **9**:2111-1218 (1956)
- 164 Sreenath, T, Matrisian, LM, Stelter-Stevenson, W, Gattoni-Celli, S, Pozzatti, RO: Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res.* **52**:4942-4947 (1992)
- 165 Stein, U, Juerchott, K, Walther, W, Bergmann, S, Schlag, PM, Royer, HD: Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC-transporters. *J. Biol. Chem.* **276**:28562-28569 (2001)
- 166 Steinwaerder, DS, Carlson, CA, Lieber, A: DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum. Gene Ther.* **11**:1933-1948 (2000)
- 167 Steinwaerder, DS, Carlson, CA, Otto, DL, Zong-Yi Li, Shaoheng Ni, Lieber, A: Tumor-specific gene expression in hepatic metastases by a replication-activated adenovirus vector. *Nature Med.* **7**:240-243 (2001)
- 168 Stenina, O, Shaneyfelt, KM, DiCorletto, PE: Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: A mechanism of transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**:7277-7282 (2001)
- 169 Stephens, C, Harlow, E: Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J.* **6**:2027-2035 (1987)
- 170 Sunamura, M: Mutant adenoviruses selectively replication-competent in tumor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **465**:65-71 (1998)
- 171 Swaminathan, S, Thimmapaya, B: Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**:177-194 (1995)
- 172 Tanaka, F, Abe, M, Akiyoshi, T, Normura, T, Sugimachi, K, Kishimoto, T, Suzuki, T, Okada, M: The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res.* **57**:1335-1343 (1997)

- 173 Tang, WJ, Berger, SL, Triezenberg, SJ, Folk, WR: Nucleotides in the polyomavirus enhancer that control viral transcription and DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **7**:1681-1690 (1987)
- 174 Teodoro, JG, Branton, PE: Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* **71**:3620-3627 (1997)
- 175 Teodoro, JG, Shore, GC, Branton, PE: Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene.* **11**:467-474 (1995)
- 176 Tollefson, A, Scaria, A, Hermiston, TW, Ryerse, JS, Wold, LJ, Wold, WS: The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* **70**:2296-2306 (1996)
- 177 Toloza, E, Hunt, K, Swisher, S, McBride, W, Lau, R, Pang, S, Rhoades, K, Drake, T, Belldegrun, A, Economou, J: *In vivo* cancer gene therapy with a recombinant interleukin 2 adenovirus vector. *Cancer Gene Ther.* **3**:11-17 (1996)
- 178 Toth, K, Tarakanova, V, Doronin, K, Ward, P, Kuppaswamy, M, Locke, JE, Dawson, JE, Kim, HJ, Wold, WS: Radiation increases the activity of oncolytic adenovirus cancer gene therapy vectors that overexpress the ADP (E3-11.6K) protein. *Cancer Gene Ther.* **10**:193-200 (2003)
- 179 Toth, K, Djeha, H, Ying, B, Tollefson, AE, Kuppaswamy, M, Doronin, K, Krajcsi, P, Lipinski, K, Wrighton, CJ, Wold, W: An oncolytic adenovirus vector combining enhanced cell-to-cell spreading mediated by the ADP cytolytic protein with selective replication in cancer cells with deregulated *wnt* signaling. *Cancer Res.* **64**:3638-3644 (2004)
- 180 Treisman, R, Green, MR, Maniatis T: *Cis* and *trans* activation of globin gene transcription in transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **80**:7428-7432 (1983)
- 181 Turnell, AS, Grand, RJ, Gallimore PH: The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J. Virol.* **73**:2074-2083 (1999)
- 182 Ueda, K, Clark, DP, Chen, CJ, Roninson, IB, Gottesman, MM, Pastan, I: The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J. Biol. Chem.* **262**:505-508 (1987)

- 183 Vilquin, JT, Guerette, B, Kinoshita, I, Roy, B, Goulet, M, Gravel, C, Roy, R, tremblay, JP: FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **6**:1391-1401 (1995)
- 184 Vollmer, CM, Ribas, A, Butterfield, LH, Dissette, VB, Andrews, KJ, Eilber, FC, Montejo, LD, Chen, AY, Hu, B, Glaspy, JA, McBride, WH, Economou, JS: p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **59**:4369-4374 (1999)
- 185 Watanabe, H, Imai, T, Sharp, PA, Handa, H : Identification of two transcription factors that bind to specific elements in the promotor of the adenovirus early-region 4. *Mol. Cell Biol.* **8**:1290-1300 (1988)
- 186 Weiden, MD, Ginsberg, HS: Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* **91**:153-157 (1994)
- 187 Weinberg, DH, Ketner, G: Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J. Virol.* **57**:833-838 (1986)
- 188 Whyte, P, Buchkovish, K, Horowitz, JM, Friend, SH, Raybuck, M, Weinberg, RA, Harlow, E: Association between an oncogene and an antioncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature.* **334**:124-129 (1988)
- 189 Wienzek, S, Roth, J, Dobbstein, M: E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J. Virol.* **74**:193-202 (2000)
- 190 Wong, HK, Ziff, EB: Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate Adenovirus Serotype 5 early promoters. *J. Virol.* **68**:4910-4920 (1994)
- 191 Xu, Z; Mizuguchi, H, Ishii-Watabe, A, Uschida, E, Mayumi, T, Hayakawa, T: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J. Control. Release.* **81**:155-163 (2002)
- 192 Yu, DC, Chen, Y, Dilley, J, Li, Y, Embry, M, Zhang, H, Nguyen, N, Amin, P, Oh, J, Henderson, DR: Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res.* **61**:517-525 (2001)
- 193 Yu, DC, Chen, Y, Seng, M, Dilley, J, Henderson, DR: The addition of Adenovirus Type 5 region E3 enables Calydon Virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* **59**:4200-4203 (1999)

- 
- 194 Zajchowski, DA, Boeuf, H, Kédinger, C: E1a inducibility of the adenoviral early E2a promoter is determined by specific combination of sequence elements. *Gene* **58**:243-256 (1987)
- 195 Zhang W, Imperiale MJ: Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *J. Virol.* **77**:3586-3594 (2003)
- 196 Zhang, J, Hu, C, Geng, Y, Blatt, L, Taylor, M: Gene therapy with an adenovirus carrying an interferon gene results in tumor growth suppression and regression. *Cancer Gene Ther.* **3**:31-38 (1996)
- 197 Zhang, YF, Homer, C, Edwards, SJ, Hananeia, L, Lasham, A, Royds, J, Sheard, P, Braithwaite, AW: Nuclear localization of Y-box factor YB-1 requires wild-type p53. *Oncogene.* **22**:2782-2794 (2003)



## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Schematische Darstellung eines Adenovirus
Abbildung 2	Transkriptionskarte des Ad5-Genoms (Schema)
Abbildung 3	CAR-vermittelte Endozytose von Ad2 und Ad5 (Schema)
Abbildung 4	Adenovirale DNA-Replikation (Schema)
Abbildung 5	E1A-Region des Adenovirus Typ 5 (Schema)
Abbildung 6	Funktionen der E1B-Region (Schema)
Abbildung 7	Ad5 E4-Gen mit offenen Leserahmen (Schema)
Abbildung 8	Transaktivierung des E2-early-Promotors durch E1A (Schema)
Abbildung 9	E2-early-Promotor-Konstrukt (Schema)
Abbildung 10	Replikationsanalyse mit Hilfe methylierter Viren (Schema)
Abbildung 11	Expressionskarte der adenoviralen E3-Region (Schema)
Abbildung 12	Überprüfung der Vektoren auf E1A
Abbildung 13	pCMV-E4orf6 (Schema)
Abbildung 14	pGL3-Enhancer-Vektoren (Schema)
Abbildung 15	Infektionseffizienz mit AdCMV-GFP, A-549-Zellen
Abbildung 16	Infektionseffizienz mit AdCMV-GFP, U-2OS-Zellen
Abbildung 17	Infektionseffizienz mit AdCMV-GFP, HeLa-Zellen
Abbildung 18	Adenovirale Replikation des methylierten Vektors AdYB-1
Abbildung 19	Virale DNA-Replikation in A-549 und U-2OS-Zellen
Abbildung 20	PCR der verwendeten DNA-Sonden
Abbildung 21	Northern-Blot-Analyse der E1A-Region
Abbildung 22	Northern-Blot-Analyse der E1B-Region (E1B-55K)
Abbildung 23	E2-early-, E2-late-Sonde (Schema)
Abbildung 24	Northern-Blot-Analyse der E2-Region (E2-early, E2-late)
Abbildung 25	Northern-Blot-Analyse der E3-Region (E3-14,7K)
Abbildung 26	Northern-Blot-Analyse der E4-Region (E4-orf6)
Abbildung 27	Northern-Blot-Analyse der L4-Region (späte virale Gene)
Abbildung 28	Plaque-bildende Einheiten (pfu/ml), A-549
Abbildung 29	Plaque-bildende Einheiten (pfu/ml), U-2OS
Abbildung 30	Plaque-bildende Einheiten von Ad312, 200 pfu/cell
Abbildung 31	Kinetik von AdYB-1 und Ad312, 100 pfu/cell, A-549
Abbildung 32	Kinetik von AdYB-1 und Ad312, 100 pfu/cell, U-2OS

---

Abbildung 33	Kristallviolett-färbung von AdYB-1 und Ad312, A-549
Abbildung 34	Kristallviolett-färbung von AdYB-1 und Ad312, HeLa
Abbildung 35	Freisetzung Plaque-bildender Einheiten
Abbildung 36	Substitution E1B-55K/E4orf6, Transfektionseffizienz
Abbildung 37	Substitution E1B-55K/E4orf6, Durchlichtmikroskopie
Abbildung 38	Substitution E1B-55K/E4orf6, Plaqueassay
Abbildung 39	E2-early/E2-late-Promotor-Aktivierung, Northern Blot
Abbildung 40	E2-early/E2-late-Promotor-Aktivierung, 100/500 pfu/cell
Abbildung 41	pGL3-Enh-E2e-GFP (Schema)
Abbildung 42	Kontroll-PCR von pGL3-Enh-E2e-GFP
Abbildung 43	FACS-Analyse der pGL3-Enhancer-Plasmide, Auswertung
Abbildung 44	FACS-Analyse der pGL3-Enhancer-Plasmide, Daten
Abbildung 45	FACS-Analyse von pGL3-Enh-E2l-GFP, Auswertung
Abbildung 46	FACS-Analyse von pGL3-Enh-E2l-GFP, Daten
Abbildung 47	pGL3-GFP-Plasmide ohne SV40-Enhancer (Schema)
Abbildung 48	Kontrolle der pGL3-GFP-Plasmide ohne SV40-Enhancer
Abbildung 49	FACS-Analyse der pGL3-Plasmide, Auswertung/Daten
Abbildung 50	FACS-Analyse von pGL3-E2e-GFP, Daten
Abbildung 51	FACS-Analyse von pGL3-E2e-GFP, Auswertung
Abbildung 52	pGL3-Luziferase-Plasmide ohne Enhancer (Schema)
Abbildung 53	Auswertung der Luziferase-Expression, U-2OS
Abbildung 54	Schematische Darstellung von AdYB-1 und Ad312
Abbildung 55	Regulation der E2-Gen-Expression (Schema)
Abbildung 56	Nukleäre Akkumulation von YB-1, Immunfluoreszenz

## 8 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Unterstützung meiner Forschungsarbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München danke ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Per Sonne Holm für die konsequente wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und seine Unterstützung in wissenschaftlichen und technischen Fragen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Dr. Per Sonne Holm, insbesondere Frau Alexandra Bernshausen für ihre praktische und ideelle Unterstützung, Herrn Klaus Mantwill für viele hilfreiche Gespräche und Diskussionen und die Überlassung seines E2-late-Plasmid-Konstruktes sowie Frau Tanja Dravits für die Durchführung der FACS-Analyse.

Den weiteren Arbeitsgruppenleitern des Instituts Frau Dr. Martina Anton, Herrn PD Dr. Achim Krüger und Herrn Dr. Christian Plank und deren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danke ich für die reibungslose Zusammenarbeit.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.