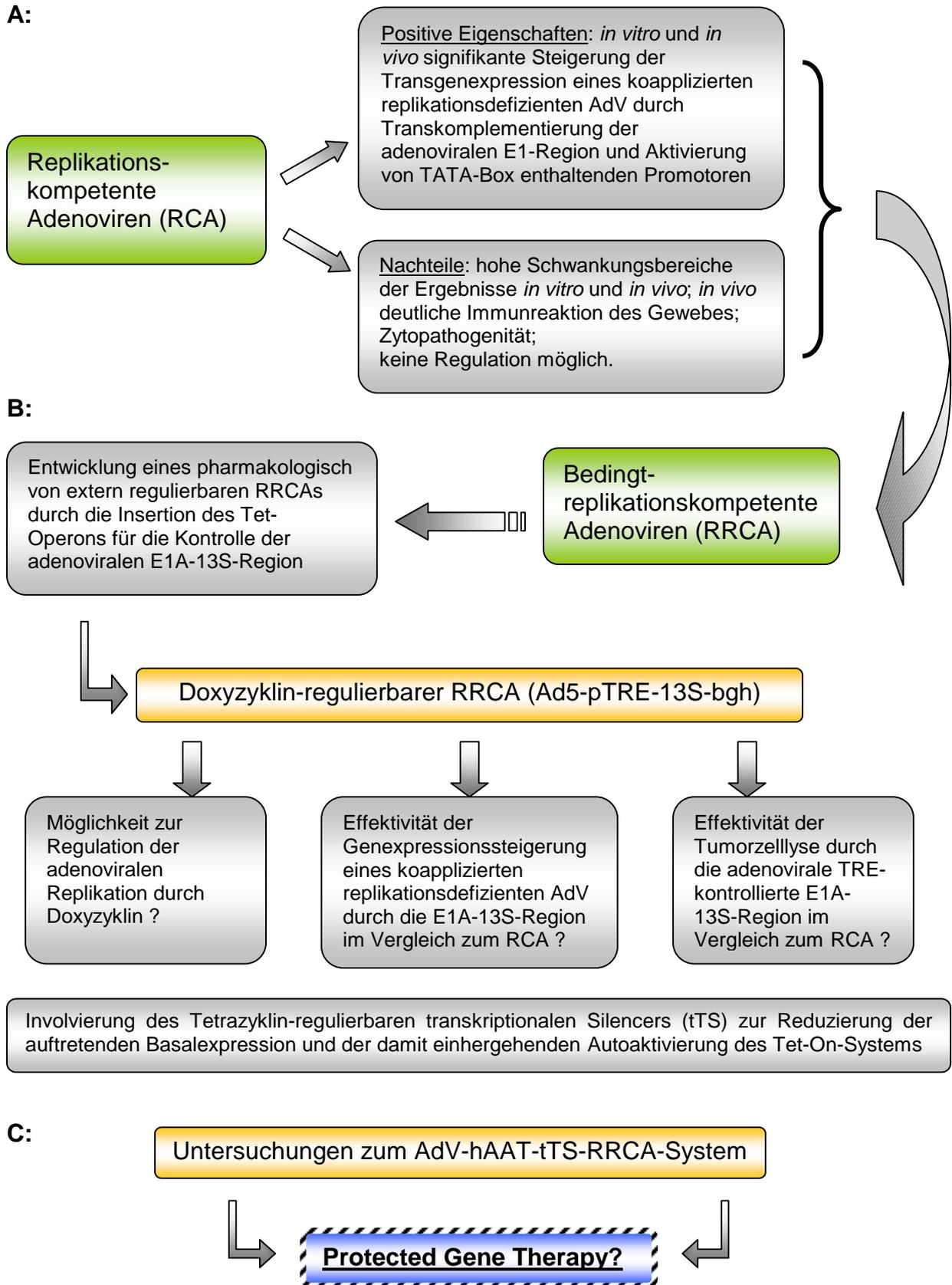


4. Ergebnisse

4.1. Übersicht über den Aufbau der Ergebnisfindung



4.2. Analyse der konstruierten AdV

4.2.1. Nachweis der spezifischen cDNAs und der RCA-Freiheit

Zum Nachweis auf das Vorhandensein des spezifischen Transgens und der RCA-Freiheit wurde ein PCR-screening der konstruierten AdV durchgeführt. Abb. 4.1. und 4.2. zeigen dies am Beispiel der neu generierten AdV Ad5hAAT-tTS und Ad5-pTRE-13S-bgh. Beide AdV weisen die korrekte Größe des Transgens und die RCA-Freiheit auf. Sämtliche weiterhin in den Untersuchungen eingesetzte AdV (Ad5CMV-Luc, Ad5TRE-Luc, Ad5CMV-GFP, Ad5CMVrtTA-M2, Ad5hAATrtTA-M2; Ad5CMV-TTP, Ad5CMV-tTS) wurden gleichermaßen überprüft und zeigten ebenso sowohl das Vorhandensein des spezifischen Transgens als auch die RCA-Freiheit.

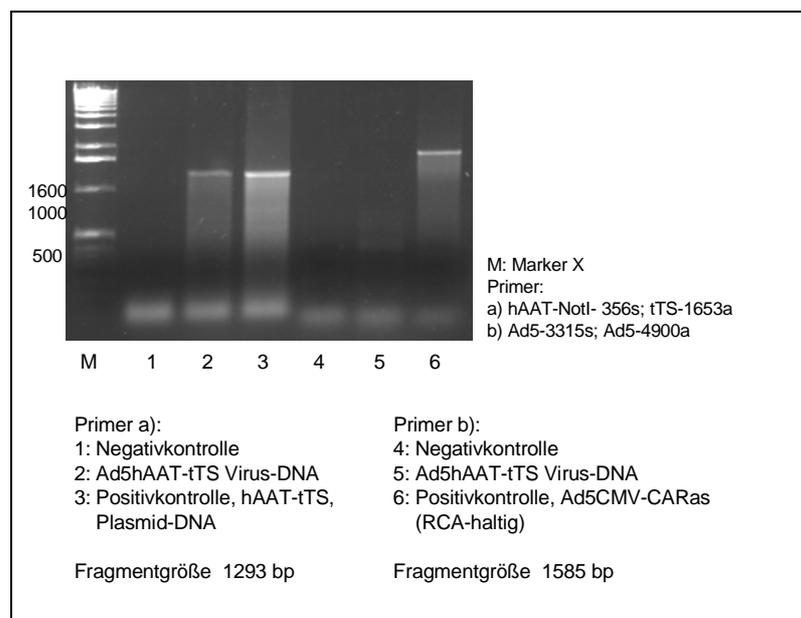


Abbildung 4.1.: PCR-screening des Ad5hAAT-tTS

2: Der Nachweis von hAAT-tTS im AdV zeigt die korrekte Bandengröße im Vergleich zur Positivkontrolle (3); 5: Das Fehlen einer Bande zeigt die RCA-Freiheit der Vektorpräparation im Vergleich zur Positivkontrolle (6)

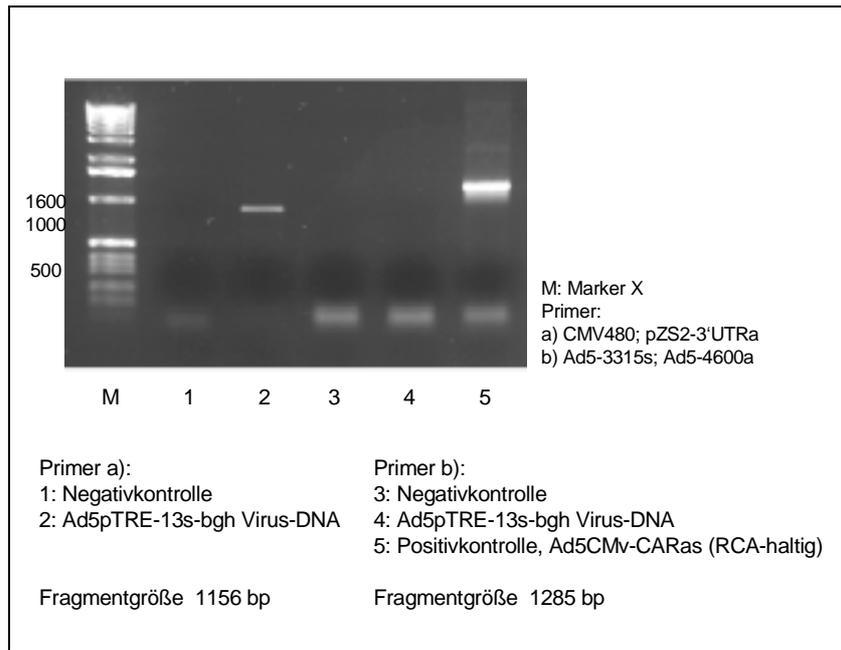


Abbildung 4.2.: PCR-screening des Ad5-pTRE-13S-bgh;

2: Der Nachweis von TRE-13S im AdV zeigt die korrekte Bandengröße von 1156 bp auf; 4: das Fehlen einer Bande zeigt die RCA-Freiheit der Vektorpräparation im Vergleich zur Positivkontrolle (5)

Des weiteren wurde eine Restriktionsfragmentanalyse aller AdV mittels einer *Hind III* Verdauung durchgeführt. Die Auftrennung der Banden in der Gelelektrophorese wies sowohl das spezifische Bandenmuster des AdV als auch die spezifische Bande des jeweiligen Transgens auf. Beispielhaft wird hier die Gelelektrophorese des Ad5hAAT-tTS gezeigt (Abb. 4.3.). Die Größe der spezifischen Bande beträgt hierbei 1733 bp.

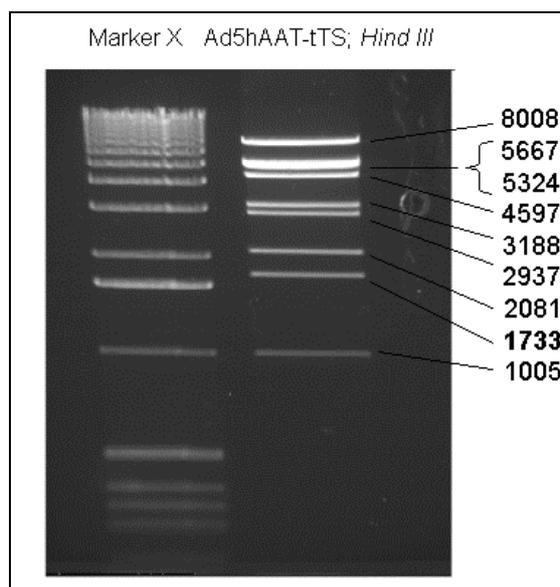


Abbildung 4.3.: Restriktionsfragmentanalyse des Ad5hAAT-tTS; die Bande mit der Größe von 1733 Basenpaaren stellt die spezifische Bande des Ad5hAAT-tTS dar.

Zusätzlich wurden die konstruierten AdV Ad5hAAT-tTS und Ad5-pTRE-13S-bgh auf das Vorhandensein des jeweiligen Transgens und des spezifischen Promotors in *sense*- und *antisense*-Richtung mit Hilfe der Primer hAAT-*NotI*-356s, tTS-1653a, E1A-560s und pZS2-3'UTRa sequenziert. Der Sequenzhomologievergleich zeigte die korrekte Platzierung des hAAT-Promotors anstelle des ursprünglichen CMV-Promotors in Ad5hAAT-tTS und die 13S-cDNA unter der Kontrolle der TRE/CMV_{min} Regulatoreinheit in Ad5-pTRE-13S-bgh.

4.2.2. Nachweis der spezifischen mRNA-Expression der Transgene

Die Northern-Blot Hybridisierung bestätigte sowohl in den neu generierten AdV Ad5hAAT-tTS und Ad5-pTRE-13S-bgh als auch in sämtlichen anderen hier eingesetzten AdV die Expression der spezifischen mRNA des jeweiligen Transgens. Eine Ausnahme bildete der Ad5CMV-rtTA, bei welchem trotz Bestätigung der korrekten Gensequenz keine rtTA-mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte. Dies erklärt die in Punkt 4.6.1.1. erwiesene Unfunktionalität dieses Transaktivators.

4.3. Molekulare Analyse der RCA-vermittelten *Trans*-Komplementierung replikationsdefizienter AdV *in vitro*

4.3.1. Untersuchungen zur Genexpressionssteigerung durch RCAs

Um die RCA-vermittelte Steigerung der Transgenexpression zu untersuchen, wurden die Zelllinien EA.hy926, OE-33 und Kyse140 mit unterschiedlichen Dosierungen eines RCA infiziert und nach 24, 48 und 72 h geerntet. Als Indikator für die Expressionssteigerung diente der AdV Ad5CMV-Luc, mit welchem die Zellen gleichzeitig mit unterschiedlichen RCA-Dosierungen kotransduziert wurden. Die RCA-Dosierungen betragen dabei 25, 50 bzw. 100 p/c. Folgendes Diagramm (Abb. 4.4.) demonstriert die Expressionssteigerung der Luciferase, die sowohl mit der Höhe der RCA-Dosierung als auch mit der längeren Inkubationsdauer in EA.hy926 mit einer bis zu 300-fachen, in OE-33 mit einer bis zu 12-fachen und in Kyse140 mit einer bis zu 104-fachen Steigerung einherging.

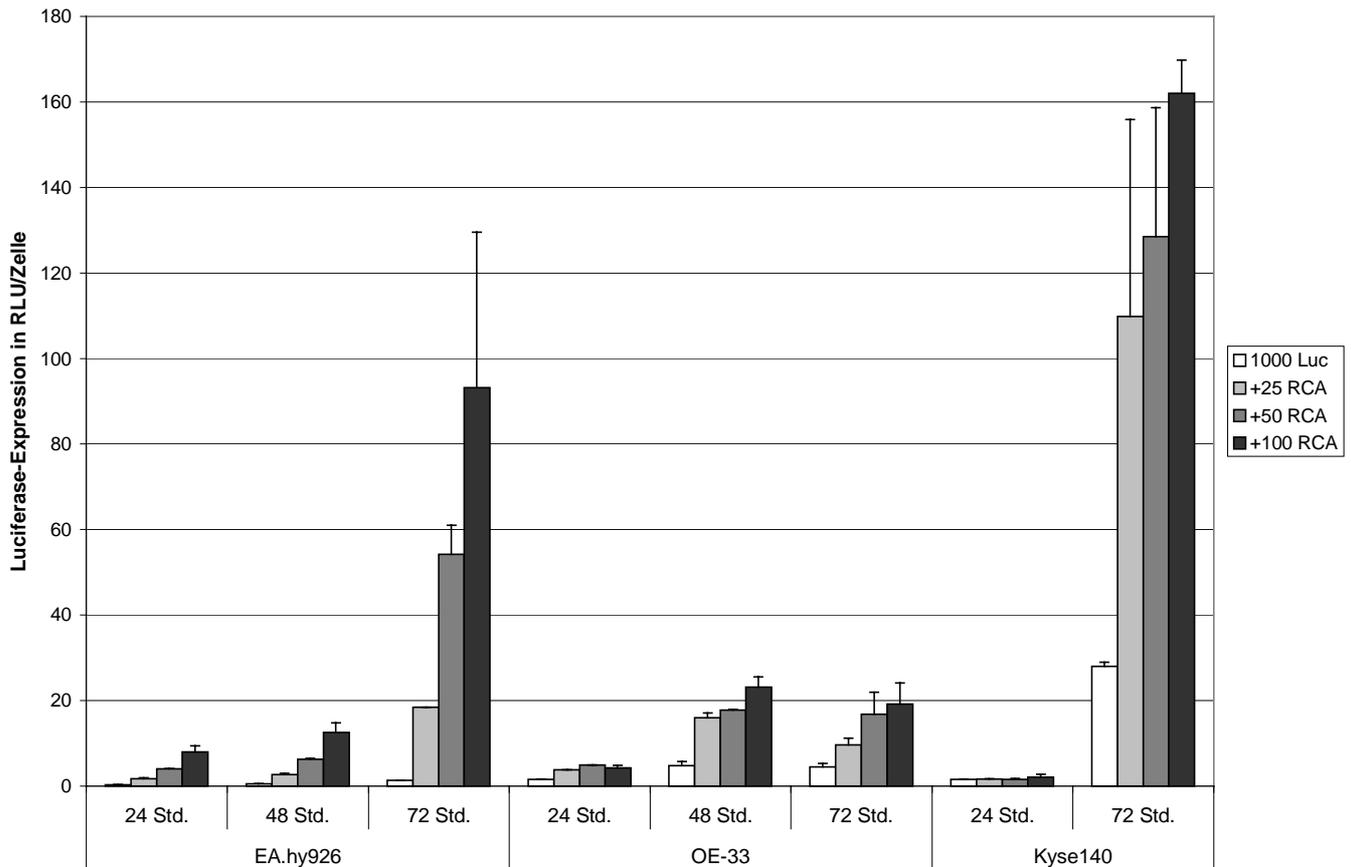


Abbildung 4.4.: Expressionssteigerung mittels unterschiedlicher RCA-Dosierungen im Zeitversuch

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc: 1×10^3 p/c; RCA: 25; 50; 100 p/c

		1000 Luc	+25 RCA	+50 RCA	+100 RCA
EA.hy926	24 h	0,31	1,69	3,96	7,96
	48 h	0,49	2,66	6,22	12,5
	72 h	1,29	18,35	54,13	93,17
OE-33	24 h	1,54	3,77	4,96	4,23
	48 h	4,73	15,94	17,69	23,16
	72 h	4,49	9,55	16,8	19,16
Kyse140	24 h	1,55	1,58	1,47	2,04
	72 h	28,01	109,86	128,5	161,99

Tabelle 4.1.: Expressionssteigerung mittels unterschiedlicher RCA-Dosierungen im Zeitversuch

Die Werte bezeichnen die Luciferase-Aktivität, die anhand des Luminometers (Berthold GmbH) ermittelt wurden und sind als Diagramm in Abb. 4.4. wiedergegeben

Gleichzeitig lässt sich aus der Wertetabelle (Tab. 4.1.) die unterschiedliche Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien ablesen, die in EA.hy926 im Gegensatz zu OE-33 und Kyse140, welche eine vergleichbare Transduktionseffizienz aufwiesen, um das 5-fache geringer war. Die Luciferase-Aktivität in EA.hy926 und OE-33 stieg innerhalb des gemessenen Zeitraumes ohne Hilfe des RCA nur gering

an (4- bzw. 3-fach) und erreichte in der Zelllinie OE-33 bereits nach 48 h eine Plateauphase. In der Zelllinie Kyse140 dagegen steigerte sich die Luciferase-Aktivität ohne Koinfektion des RCAs bereits um das 18-fache. Deutlich lassen sich sowohl die durch den RCA hervorgerufenen hohen Ergebnisschwankungen in den kotransfizierten Zellen als auch die unterschiedliche Effizienz der RCA-vermittelten Expressionssteigerung des koapplizierten Transgens in den verschiedenen Zelllinien ausmachen. In der Zelllinie EA.hy926 war die Steigerung am größten, in Kyse140 betrug sie im Vergleich dazu lediglich ein Drittel.

4.3.2. Nachweis der RCA-vermittelten AdV-Replikation

4.3.2.1. Evaluierung der Q-PCR

4.3.2.1.1. Analyse und Sequenzierung des konstruierten Längenstandards

Zur Überprüfung des konstruierten Luciferase-Längenstandards wurden jeweils das native (Luc 334-1071) und das aus der Overlap-PCR erhaltene und um 12 Basenpaare (bp) verkürzte Luciferase-Fragment (vLS-Luc) amplifiziert, wobei ein mit FAM markierter Primer (Luc426-F) zur Anwendung kam. Als sense-Primer wurde der Primer Luc334s gewählt. Das daraus entstandene markierte PCR-Fragment konnte somit zusätzlich im GeneScan ABIPrism 310 quantitativ analysiert werden.

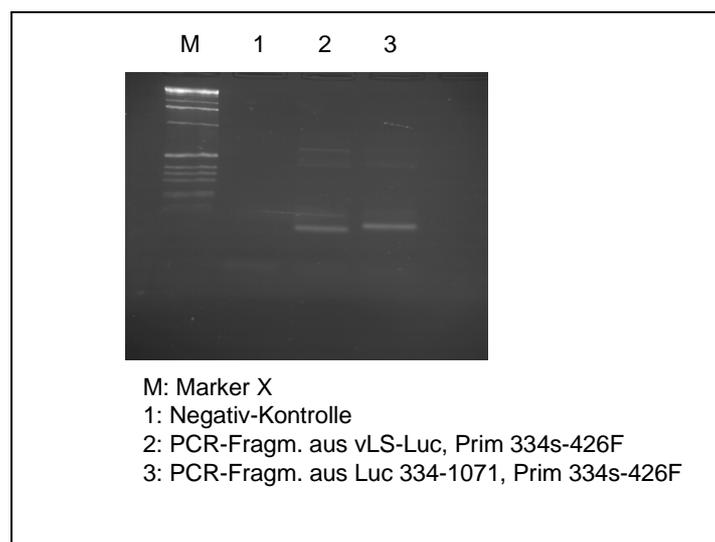


Abbildung 3.5.: Agarosegel-Elektrophorese des verkürzten Luciferase-Fragments im Vergleich zur nativen Luciferase

Der DNA-Längenstandard für die Luciferase wurde zusätzlich sequenziert und auf das Vorhandensein der 12 bp-Deletion überprüft. Der Sequenzhomologievergleich zeigte, dass die 12 bp-Deletion vorhanden war (Abb. 4.6.).

```
>gi|433045|gb|U03687.1|CVU03687 Photinus pyralis modified luciferase gene,
complete cds, and pUC18
      derived vector
      Length = 5411

Score = 127 bits (64), Expect = 1e-27
Identities = 81/93 (87%), Gaps = 12/93 (13%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1   ccggcgccattctatccgctagaggatggaaccgctggagagcaactgcataaggctatg 60
          |||
Sbjct: 820 ccggcgccattctatccgctagaggatggaaccgctggagagcaactgcataaggctatg 879

Query: 61   -----ctggttctggaacaattgct 81
          |||
Sbjct: 880 aagagatacgccctggttctggaacaattgct 912
```

Abbildung 4.6.: Sequenzhomologievergleich des verkürzten Längenstandards; ermittelt mit PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>; die Striche (-) kennzeichnen die Deletion im Längenstandard

Die Analyse im GeneScan (Abb. 4.7.) ergab eine deutliche Auftrennung des nativen und des verkürzten Fragments sowohl der Luciferase als auch des bereits im Labor etablierten GAPDH-Standards und ermöglichte so durch die Berechnung des Flächeninhalts der Peaks eine quantitative Analyse der amplifizierten Fragmente.

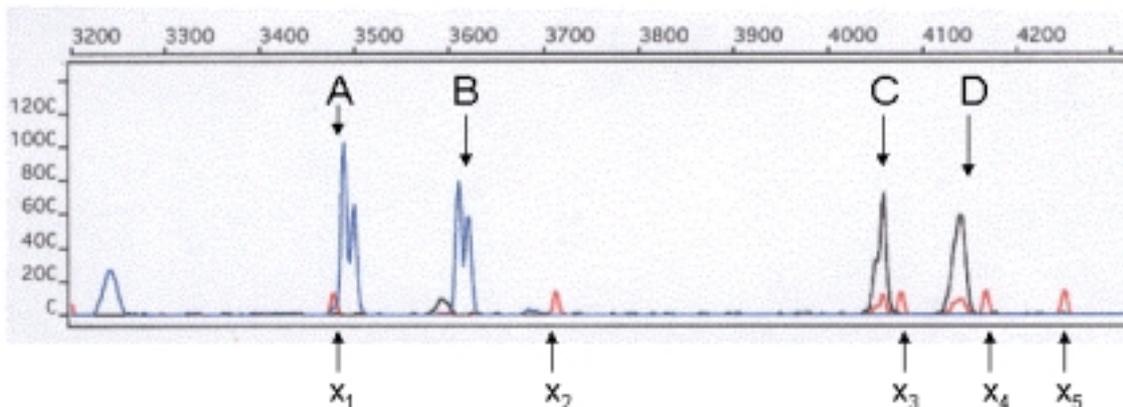


Abbildung 4.7.: Elektropherogramm der GeneScan-Analyse von Luciferase, internem GAPDH und dem jeweiligen Standard

A: Luciferase Standard (74 bp); B: native Luciferase (86 bp); C: GAPDH Standard (134 bp); D: natives GAPDH (144 bp); x_{1-5} : Größenmarker GS-350-Rox ($x_1 = 75$ bp; $x_2 = 100$ bp; $x_3 = 139$ bp; $x_4 = 150$ bp; $x_5 = 160$ bp)

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

Die Ermittlung der einzusetzenden Menge der jeweiligen Standards erfolgte durch Stichproben, von denen anzunehmen war, dass sie im mittleren Wertebereich der Versuchsreihe lagen. Es wurden hierzu 30 ng Gesamt-DNA der entsprechenden Probe zusammen mit jeweils 1 µl der unterschiedlichen Verdünnungsstufen (C1 bis C4) des Luciferase- bzw. GAPDH-Standards für die gemeinsame PCR eingesetzt.

Verwendete Verdünnungsstufen:

$C1 = 10^{-3} \text{ ng/}\mu\text{l}$
$C2 = 10^{-4} \text{ ng/}\mu\text{l}$
$C3 = 10^{-5} \text{ ng/}\mu\text{l}$
$C4 = 10^{-6} \text{ ng/}\mu\text{l}$

Nach PCR und GeneScan-Analyse wurde diejenige Verdünnungsstufe ausgewählt und für die Untersuchung der weiteren Proben eingesetzt, bei der die Peakflächen von nativem und Standard-PCR-Produkt annähernd gleich groß waren, d.h. der Quotient aus nativem und Standard-PCR-Produkt im Idealfall 1 ergab (Abb. 4.7.). Gegebenenfalls musste das einzusetzende Volumen der ausgewählten Verdünnungsstufe in einem zweiten Versuch genauer bestimmt werden, um dem optimalen Quotienten möglichst nahe zu kommen.

4.3.2.1.3. Ermittlung der optimalen Zykluszahl für die quantitative PCR

Die Auswahl der optimalen Zykluszahl der PCR erfolgte nach zwei Kriterien. Zum einen sollte sich die PCR möglichst im exponentiellen Bereich befinden, da in diesem Bereich die kompetitiven Mechanismen störungsfreier zum Tragen kommen und eine genauere Quantifizierung gestatten. Zum anderen müssen ausreichend PCR-Amplifikate vorliegen, um auswertbare Peaks (am günstigsten 1000 bis 10000 Einheiten) in der Fragmentanalyse zu erreichen.

Die Überprüfung des exponentiellen Bereiches erfolgte durch die Doppelbestimmung der Amplifikatmenge für die Luciferase und GAPDH mittels Fragmentanalyse nach 22, 24, 26, 28, 30 und 32 PCR-Zyklen, wobei überprüft wurde, bis zu welchem Bereich sich die Menge an PCR-Amplifikaten (entspricht der Peakfläche) annähernd

exponentiell vermehrt. Dieser Bereich lag für GAPDH bei maximal 26 Zyklen, für Luciferase bei 22 Zyklen.

4.3.2.2. Die RCA-vermittelte AdV-Replikation am Beispiel von EA.hy926

Um zusätzlich zur Transgenenexpressionssteigerung die RCA-vermittelte *Trans*-Komplementierung der adenoviralen E1A-13S-Region nachzuweisen, wurde die DNA der Zelllinie EA.hy926 aus vorangegangenen Versuch (siehe 4.3.1.) präpariert und beispielhaft ausgewertet (Abb. 4.8.).

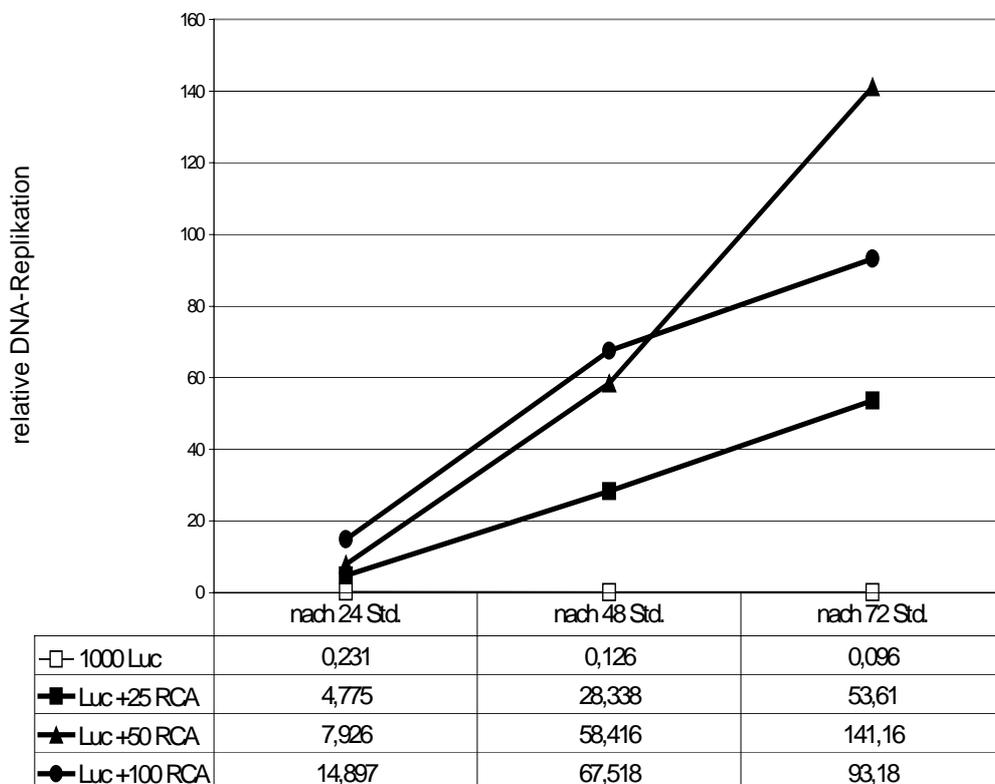


Abbildung 4.8.: RCA-vermittelte AdV-Replikation. Angegeben sind relative Werte, die mittels des zellinternen GAPDH standardisiert wurden.

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc (Luc): 1×10^3 p/c; RCA: 25; 50; 100 p/c

Das Ergebnis der relativen DNA-Replikation entsprach nach 24 und 48 h in der Tendenz der Untersuchung der RCA-vermittelten Genexpressionssteigerung (siehe 4.3.1.). Eine Abweichung der Ergebnisse zeigte sich nach 72 h bei einer RCA-Koinfektion von 100 p/c. Die nachweislich geringere DNA-Menge des AdV ist hierbei vermutlich auf die zelldestruktive Wirkung der viralen Replikation zurückzuführen,

wobei die messbare Aktivität der Luciferase zu diesem Zeitpunkt noch nicht beeinträchtigt wurde.

Den größten nachweislichen Effekt auf die AdV-Replikation wies nach 72 h demnach die koapplizierte RCA-Menge von 50 p/c auf, bei der die 1470-fache DNA-Menge des AdVs, verglichen mit der Monotransduktion, ermittelt wurde.

Weiterhin zeigte sich in den Zellen, die lediglich mit dem Ad5CMV-Luc transduziert wurden, in dem untersuchten Zeitraum von 72 h bereits eine Reduzierung der AdV-DNA um das 2,4-fache, was die Proliferation der Tumorzellen und den dadurch geringer werdenden Anteil transduzierter Zellen in der Gesamtpopulation demonstriert.

4.4. Untersuchungen zur RCA-vermittelten Transgenexpressionssteigerung und den damit einhergehenden Pathomechanismus *in vivo*

4.4.1. Nachweis der Luciferase-Expression

Die Versuche in der Zellkultur zum Einsatz eines RCAs haben die ausgeprägte Potenz zur Expressionssteigerung eines koapplizierten Transgens demonstriert. Um zu untersuchen, ob vergleichbare Effekte ebenso *in vivo* erzielt werden können, wurden immunkompetente Mäuse (C57/BL6) mit dem Indikator-AdV Ad5CMV-Luc transfiziert und mit dem RCA in zwei unterschiedlichen Dosierungen koinfiziert.

Aus dem Experiment wurde ersichtlich, dass in der Leber bereits nach 24 h eine Steigerung der Transgenexpression um das 24-fache durch den koapplizierten RCA (1:10) erzielt wurde, was sich allerdings nach 7 Tagen auf die 2-fache Expressionssteigerung im Vergleich zur alleinigen Applikation des Ad5CMV-Luc relativierte. In Herz und Lunge dagegen war nach 24 h keine Transgenexpression nachweisbar. Nach 7 Tagen konnte in der Lunge ebenfalls durch den 1:50 konzentrierten RCA eine 4,4-fach verstärkte Expression nachgewiesen werden, wohingegen die Tiere, die mit dem RCA in einem Verhältnis von 1:10 koinfiziert waren, lediglich eine Steigerung um das 3,6-fache aufwiesen. Im Herz wurde ausschließlich in den RCA-koinfizierten (1:10) Tieren eine Luciferase-Expression messbar (Abb. 4.9.).

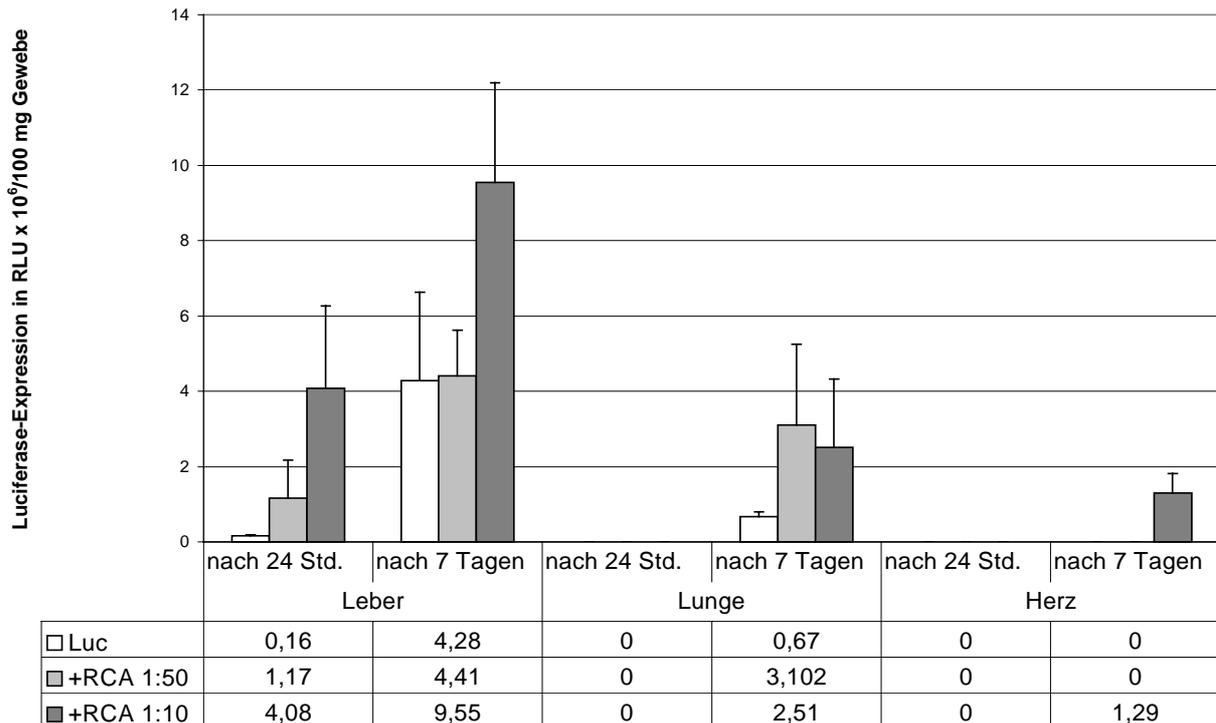


Abbildung 4.9.: Luciferase-Expression *in vivo*

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc (Luc): 2×10^{10} p/Tier; RCA (1:50): 4×10^8 p/Tier; RCA (1:10): 2×10^9 p/Tier

Aus diesen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass durch die Koinfektion mit einem RCA die Transgenexpression des koapplizierten AdV auch *in vivo* deutlich gesteigert werden kann und insbesondere im Herz eine Expression dadurch erst nachweislich wurde. Dabei wurde allerdings ein Abfall des *Trans*-Komplementierungs-Effekts bereits nach 7 Tagen erkennbar und ließ, auch aufgrund der Befunde in der Lunge, die durch die unterschiedlichen RCA-Dosierungen hervorgerufen wurden, die Ursache hierfür in der Immunantwort des Wirtsorganismus vermuten.

4.4.2. Untersuchungen auf Gewebsschädigung und Entzündungsreaktionen mit Hilfe histopathologischer Schnitte

Um die vermutete Immunreaktion auf die applizierten AdV nachzuweisen, wurden histopathologische Gewebsschnitte der untersuchten Organe angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt.

Die Auswertung der Schnitte zeigte das unveränderte Gewebe von Leber, Lunge und Herz bei den Kontrolltieren. Gleiches Ergebnis lieferten die Gewebe der Vektor-

infizierten Tiere, die bereits nach 24 h untersucht wurden. Herz und Lunge zeigten auch nach 7 Tagen keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion.

In der Leber hingegen konnten bei den Tieren, die den AdV und den RCA in einem Verhältnis von 1:10 erhielten, nach 7 Tagen die Anzeichen einer akuten Virus-Hepatitis nachgewiesen werden. Die Portalfelder zeigten sich ödematös und mit rundzelligen Infiltraten durchsetzt. Die zum Teil ausgeprägten periportalen Leberzellnekrosen waren von Lymphozyten umgeben und zeigten ein polymorphes Bild der Leberzellen mit einem Wechsel zwischen hydropischer Schwellung und eosinophiler Degeneration („Mottenfraß-Nekrose“). Die Zellkerne der Hepatozyten wiesen im Konsens deutliche Anzeichen der Apoptose, wie Karyopyknose, Kernwandhyperchromatose und eine bereits weit im Leberläppchen verbreitete Karyolyse auf (Abb. 4.10.).

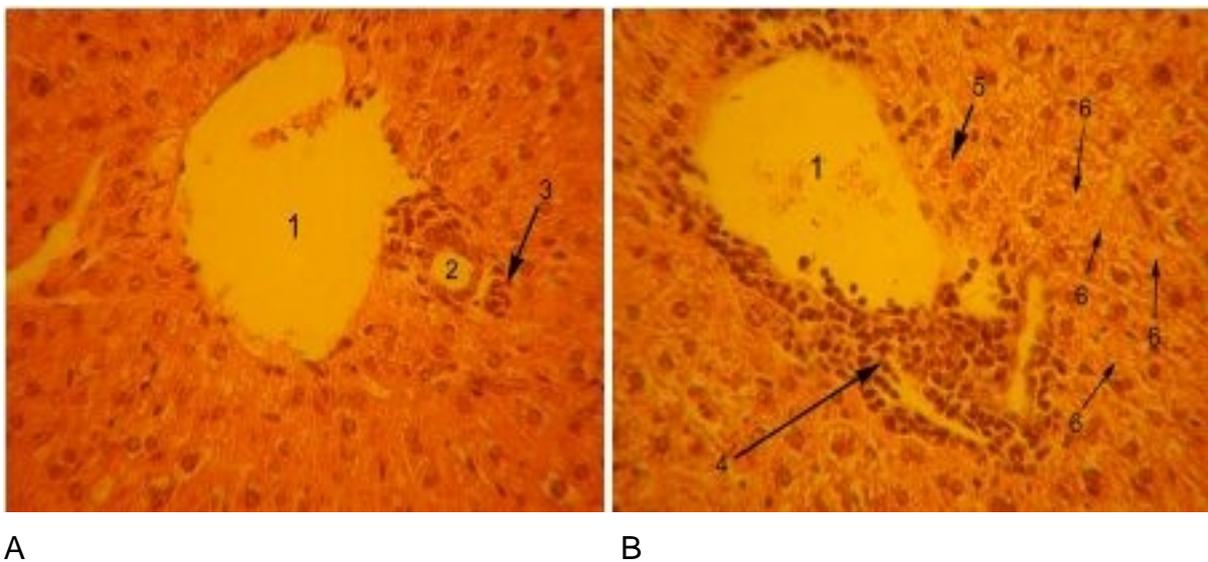


Abbildung 4.10.: Histologische Gewebsschnitte der Leber; HE (40x)

A: Kontrolle; B: Leber eines mit dem RCA koinfizierten (1:10) Tieres nach 7 Tagen; 1: Portalvene (V. interlobularis); 2: Gallengang (Ductus interlobularis biliferus); 3: Portalarterie (A. interlobularis); 4: rundzellige Infiltration (v.a. Lymphozyten) der Glissonschen Trias; 5: apoptotische Leberzelle mit Kernpyknose und Kernwandhyperchromatose; 6: apoptotische Leberzellen mit beginnender bzw. vollständiger Karyolyse und Auflösung der Zellstrukturen

Zusammenfassend zeigte hier der RCA eine deutliche Induzierung der lokalen immunologischen Abwehr und einen damit einhergehenden massiven Untergang der Leberzellen. Somit erscheint der Einsatz eines RCA in der Tumorgentherapie, trotz der initialen signifikanten Steigerung der Transgenexpression eines koapplizierten replikationsdefizienten AdV, in dieser Form obsolet.

4.5. Funktionalität des Ad5-pTRE-13S-bgh im Vergleich zum RCA

Wie ich im Laufe meiner Untersuchungen feststellte, kommt es im Ad5-pTRE-13S-bgh zur Autoaktivierung des CMV_{min} -Promotors und somit zur E1A-13S-Expression (s. 4.6.2.1.). Dies ermöglichte den Vergleich zwischen RCA-vermittelter E1A-13S-Expression und der E1A-13S-Expression des E1B-deletierten Ad5-pTRE-13S-bgh.

4.5.1. Expression der E1A-13S-mRNA in verschiedenen Zelllinien

Für den Nachweis der 13S-mRNA in verschiedenen Zelllinien wurden EA.hy926, Kyse140, HT-29, Colo320, LS174-T und HepG2 Zellen jeweils mit 5×10^3 p/c Ad5-pTRE-13S-bgh infiziert und die RNA nach 24 h präpariert. Zum Vergleich wurde parallel die RNA der gleichen Zelllinien, infiziert mit 5×10^3 p/c RCA, aufgetragen. Deutlich lässt sich hierbei die Auftrennung der 12S- und 13S-mRNA der RCA infizierten, und daneben die 13S-mRNA der Ad5-pTRE-13S-bgh infizierten Zellen erkennen (Abb. 4.11.).

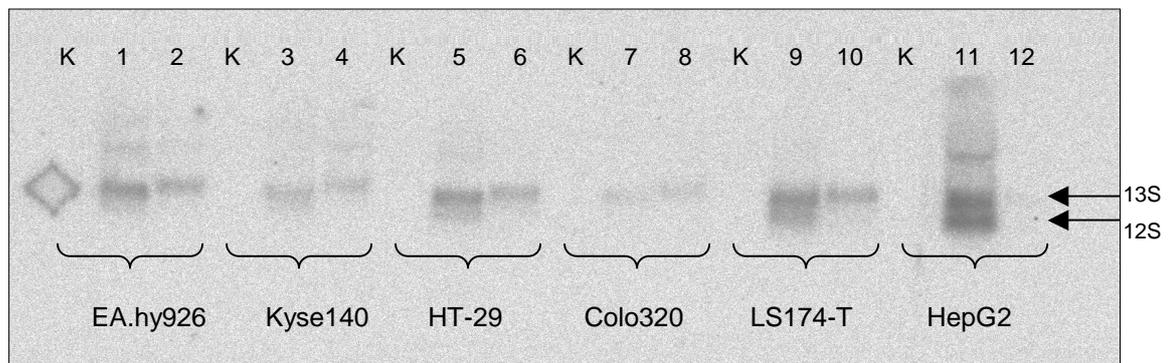


Abbildung 4.11.: Northern-Blot Analyse der 13S-mRNA in verschiedenen Zelllinien

Eingesetzte Vektoren: RCA: 5×10^3 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh: 5×10^3 p/c

Line 1; 3; 5; 7; 9; 11: RCA-infizierte Zellen; Line 2; 4; 6; 8; 10; 12: Ad5pTRE-13S-infizierte Zellen; K = Kontrolle

	EA.hy926	Kyse140	HT-29	Colo320	LS174T	HepG2
Kontrolle	0,96	0,2	0,36	0,27	0,15	0,1
+RCA	6,68	1,61	11,01	0,32	10,81	12,14
+13S	1,96	0,37	5,77	0,45	2,98	0,48

Tabelle 4.2.: Expression der 13S-mRNA in verschiedenen Zelllinien; die Werte wurden anhand der BasReader Software 2.21 ermittelt und zelllinienintern mittels GAPDH standardisiert

Die Auswertung mittels der BASReader Software 2.21 (Tab. 4.2.) zeigte deutlich die Expression der 13S-mRNA in den transduzierten Zellen. Zugleich wurde die stärkere Expression der 13S-mRNA in den RCA infizierten Zellen ersichtlich, wobei die Zelllinie Colo320 hierbei eine Ausnahme bildete. Die RCA-vermittelte Expression der 13S-mRNA betrug in EA.hy926 das 3,4-fache, in Kyse140 das 4,3-fache, in HT-29 das 1,9-fache, in LS174-T das 3,6-fache und in HepG2 das 25,3-fache der mRNA-Expression der Ad5pTRE-13S-transduzierten Zellen. In Colo320 war die 13S-mRNA kaum nachweisbar und zeigte vergleichbare Werte zwischen den RCA- und den 13S-infizierten Zellen auf.

Das Resultat dieses Experiments weist somit die in Abhängigkeit von der Zelllinie 1,9- bis 25,3-fach stärkere Expression der E1A-13S mRNA der RCA-infizierten Zellen auf. Da jedoch, laut Berk et. al. (1998) und wie auch bereits in 4.3.1. gezeigt, selbst geringe Mengen des E1A-Proteins genügen, koapplizierte replikationsdefiziente AdV in *trans* zu komplementieren, galt es an dieser Stelle, die Effektivität des Ad5-pTRE-13S-bgh hinsichtlich der Genexpressionssteigerung zu untersuchen.

4.5.2. Vergleich der Transgenexpressionssteigerung zwischen der Koinfektion des Ad5-pTRE-13S-bgh und einem RCAs in verschiedenen Zelllinien

In folgendem Experiment wurde die Transgenexpressionssteigerung eines replikationsdefizienten AdV durch den RCA, die E1A-13S-Region und diejenige, welche durch den gleichzeitigen Einsatz beider Vektoren erzielbar ist, in Dosisgleichheit verglichen. Es wurde daraus ersichtlich, dass die Transgenexpression des koapplizierten AdV Ad5CMV-Luc nach 48 h durch den RCA effektiver gesteigert werden konnte als durch die Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh. Eine Dreifach-Infektion (AdV, RCA, E1A-13S) hingegen resultierte in den meisten Zelllinien in eine additive Steigerung der Transgenexpression. Kein additiver Effekt des 13S-Vektors auf den RCA ließ sich in OE-33, HT-29 und LS174-T nachweisen. Für eine mögliche Erklärung wird an dieser Stelle auf die Diskussion (s. 5.2.) verwiesen.

Auffällig zeigt sich in diesem Versuch die Reaktion der Zelllinie OE-33, die im Gegensatz zu sämtlichen anderen hier untersuchten Zelllinien keinerlei Expressionssteigerung des koapplizierten AdV durch die Infektion mit dem RRCA Ad5-pTRE-13S-bgh aufzeigt (Abb. 4.12. und Tab. 4.3.).

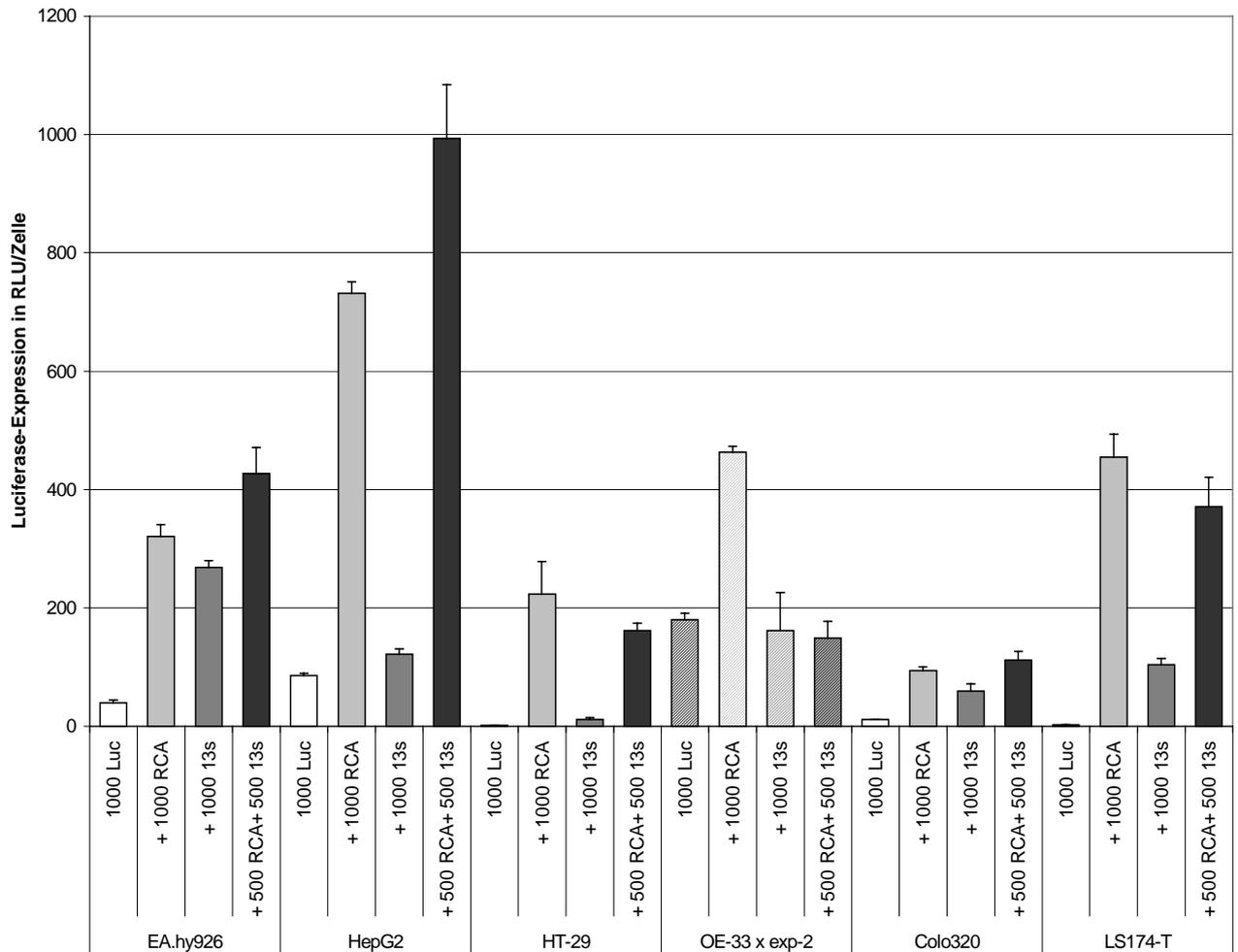


Abbildung 4.12.: Transgenexpressionssteigerung durch einen RCA und Ad5-pTRE-13S-bgh (nach 48 h); dosisgleich

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc (Luc): 1×10^3 p/c; RCA: 1×10^3 bzw. bei Koinfektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh 500 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 1×10^3 bzw. bei Koinfektion mit dem RCA 500 p/c

EA.hy926	1000 Luc	39,71	HepG2	1000 Luc	85,93
	+ 1000 RCA	x 8,1		+ 1000 RCA	x 8,5
	+ 1000 13S	x 6,7		+ 1000 13S	x 1,4
	+ 500 RCA+ 500 13S	x 10,7		+ 500 RCA+ 500 13S	x 11,5
HT-29	1000 Luc	0,99	OE-33	1000 Luc	1,79
	+ 1000 RCA	x 226,1		+ 1000 RCA	x 2,6
	+ 1000 13S	x 11,6		+ 1000 13S	x 0,9
	+ 500 RCA+ 500 13S	x 163,3		+ 500 RCA+ 500 13S	x 0,8
Colo320	1000 Luc	10,92	LS174-T	1000 Luc	2,51
	+ 1000 RCA	x 8,6		+ 1000 RCA	x 181,2
	+ 1000 13S	x 5,4		+ 1000 13S	x 41,3
	+ 500 RCA+ 500 13S	x 10,2		+ 500 RCA+ 500 13S	x 147,8

Tabelle 4.3: Transgenexpressionssteigerung durch RCA und Ad5-pTRE-13S (nach 48 h); dosisgleich

Zusammenfassend zeigen die Resultate jedoch in den meisten Zelllinien eine deutliche Steigerung der Transgenexpression auch durch den E1B-deletierten Ad5-pTRE-13S-bgh unter der Kontrolle der TRE-Enhancer-Einheit. Die Expression erreicht hierbei Werte zwischen dem 1,4- (HepG2) und dem 41,3-fachen (LS174-T) im Vergleich zu den monotransduzierten Zellen (OE-33 ausgenommen).

In einem weiteren Experiment wurde die Transgenexpressionssteigerung untersucht, welche durch eine Überexpression der E1A-13S-Region erreicht werden kann. Zusätzlich wurde hier der Ad5CMVrtTA-M2 in die Zellen transduziert und diese zum einen mit und zum anderen ohne Dox inkubiert. Zum Vergleich erfolgte die Infektion der Zellen mit 250 p/c RCA, und als Indikator für die *Trans*-Komplementierung diente sowohl in den RCA- als auch in den Ad5-pTRE-13S-bgh-transfizierten Zellen der Ad5CMV-Luc. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 h später bestimmt und wies die in Abb. 4.13. wiedergegebenen Werte auf.

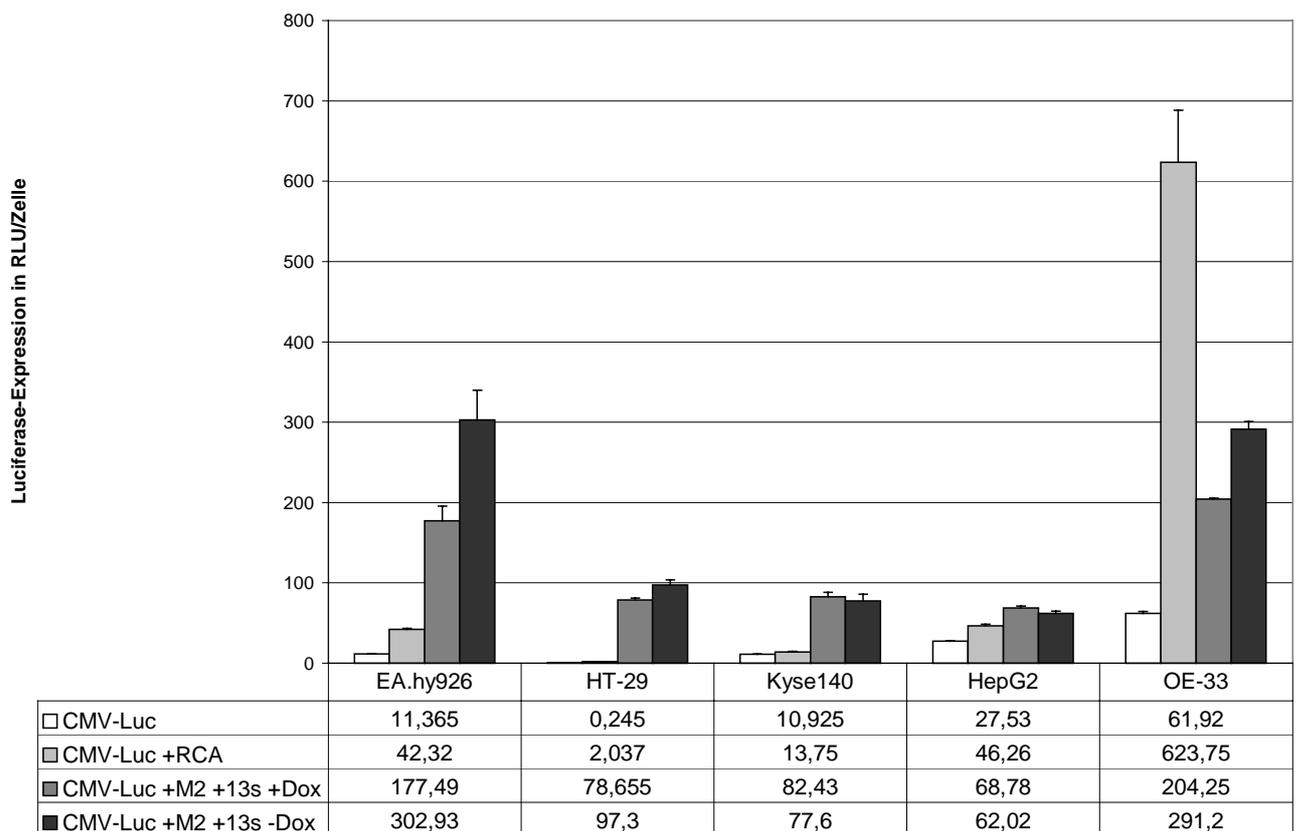


Abbildung 4.13.: Transgenexpressionssteigerung durch einen RCA und E1A-13S im Tet-On-System (s. 4.6.) nach 24 h

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-Luc (Luc): 500 p/c; RCA: 500 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): 1×10^4 p/c; Ad5CMVrtTA-M2 (M2): 5×10^3 p/c; Dox 300 ng/ml

Die Überexpression des E1A-13S-Proteins zeigte in den meisten Zelllinien eine deutliche Steigerung gegenüber der reinen RCA-Infektion. Eine Ausnahme bildete hierbei abermals die Zelllinie OE-33, in der die Expressionssteigerung durch den RCA 2- bis 3-fach höher lag als durch Ad5-pTRE-13S-bgh. Allerdings konnte im Gegensatz zu vorangegangenem Versuch hier eine Expressionssteigerung des koapplizierten Transgens durch E1A-13S um das 3,2- bzw. 4,7-fache erreicht werden, was wahrscheinlich auf die 10-fache Dosierung des Ad5-pTRE-13S-bgh zurückgeführt werden kann (vgl. Abb. 4.12.).

Eine Regulierbarkeit des Ad5-pTRE-13S-bgh war allerdings in sämtlichen Zelllinien durch die Applikation oder das Fortlassen von Dox nicht möglich. Dieser Sachverhalt wird nachfolgend unter 4.6.2.1. abgehandelt.

4.5.3. E1A-13S-vermittelte Induktion der Zelllyse

Für die Bestimmung der Effektivität der Tumorzelllyse mittels des RRCA Ad5-pTRE-13S-bgh wurden verschiedene Zelllinien mit dem RCA allein, und zum Vergleich mit dem RCA in Kombination mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh in jeweils zwei unterschiedlichen Dosierungen infiziert. Auf eine Dosisgleichheit wurde geachtet und falls notwendig mit dem inerten AdV Ad5CMV-TTP ausgeglichen. Die Zellkulturplatten wurden nach 5 Tagen ausgewertet.

Beispielhaft wird folgend das Cell-Killing-Assay der Zelllinie EA.hy926 und das von primären Ratten-Kardiomyozyten gezeigt (Abb. 4.14.).

Aus Abbildung 4.14. wird ersichtlich, dass in EA.hy926 durch die Infektion mit einem RCA eine Zellyse induziert wird. Die zusätzliche Infektion mit dem Ad5-pTRE-13S-bgh zeigt eine deutliche Verstärkung des zytopathogenen Effekts, der mit der Erhöhung der 13S-Konzentration signifikant zunimmt. In der primären Kardiomyozytenkultur hingegen wird eine Zytopathogenität des RCAs kaum sichtbar, und auch die Koinfektion mit Ad5-pTRE-13S-bgh in einer Konzentration von 5×10^3 p/c lässt hierbei kaum eine verstärkte Zellyse erkennen. Allerdings wird bei starker Überexpression der E1A-13S Region ($+1,5 \times 10^4$ p/c Ad5-pTRE-13S-bgh) auch hier durch die eindeutig auftretende Zellyse eine Virusreplikation offensichtlich, wenngleich diese auch schwächer ausgeprägt ist als in den folgend untersuchten Tumorzelllinien.

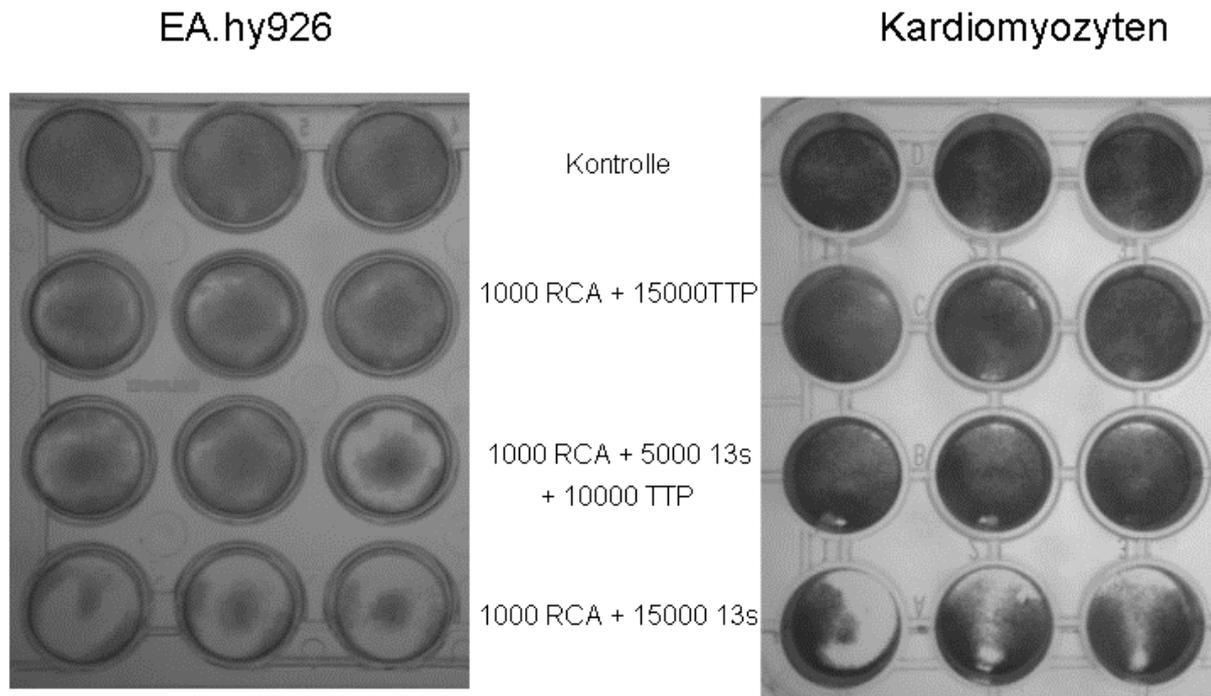


Abbildung 4.14.: Cell-Killing-Assay EA.hy926 und primäre Ratten-Kardiomyozyten

Eingesetzte Vektoren: RCA : 1×10^3 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): $5 \times 10^3/1,5 \times 10^4$ p/c; der AdV Ad5CMV-TTP (TTP) wurde für den Dosisausgleich in den jeweils notwendigen Dosierungen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen.

Das Cell-Killing-Assay wurde in den Tumorzelllinien Colo320, HT-29, HepG2, OE-33 und LS174-T Zellen gleichermaßen durchgeführt (Tab. 4.4.) und zeigte, dass durch die Überexpression der E1A-13S Region eine deutliche Verstärkung des zytopathogenen Effekts auf die Tumorzellen erzielt werden konnte, und lediglich in der Zelllinie OE-33 kaum ein additiver Effekt durch den Ad5pTRE-13S-bgh ersichtlich wurde (vgl. auch 4.5.2.).

Zelllinie	Kontrolle	+1000 RCA	+1000 RCA +5000 13S	+1000 RCA +15000 13S
Colo320	100%	54,7%	53,2%	43,6%
HT-29	100%	100%	79,6%	58,8%
HepG2	100%	23,8%	9,5%	0%
OE-33	100%	37,5%	40%	35%
LS174-T	100%	73,9%	62,4%	28,1%

Tabelle 4.4.: Vitalitätstest; Nachweis der überlebenden Zellen nach Infektion mit dem RCA und Ad5-pTRE-13S-bgh in verschiedenen Zelllinien

Die Zellzahl der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Angegeben wird die Anzahl überlebender Zellen in Prozent, die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen.

Eingesetzte Vektoren: RCA: 1×10^3 p/c; Ad5-pTRE-13S-bgh (13S): $5 \times 10^3/1,5 \times 10^4$ p/c; der AdV Ad5CMV-TTP (TTP) wurde für den Dosisausgleich in den jeweils notwendigen Dosierungen eingesetzt.

Gleichzeitig wird aus Tabelle 4.4. die unterschiedliche Sensibilität der verschiedenen Zelllinien gegenüber der Virusinfektion deutlich, wobei sich die Zelllinie HT-29 als relativ refraktär (58,8% überlebende Zellen) im Vergleich zu HepG2 (0% überlebende Zellen) oder LS174-T (28,1% überlebende Zellen) zeigte.

4.6. Tet-regulierbare adenovirale Genexpressions- und Replikationssysteme

4.6.1. Das AdV-rtTA-System

4.6.1.1. Mechanismus der Transgenexpression

Im AdV-rtTA-System bindet der reverse Transaktivator (rtTA) in Anwesenheit von Doxyzyklin (Dox) an das Tet-Operon und vermittelt durch die Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren die Expression eines Transgens, das stromabwärts des CMV_{min}-Promotors positioniert ist. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen mangelnden Funktionalität des ursprünglichen rtTA (Massie et al., 1998; Mizuguchi and Hayakawa, 2001) wurde in sämtlichen Untersuchungen dieser Arbeit der modifizierte rtTA-M2 eingesetzt (Urlinger et al., 2000).

Der Vergleich der beiden Transaktivatoren erbrachte in EA.hy926 Zellen die in Abb. 4.15. wiedergegebenen Resultate. Der ursprüngliche rtTA zeigte hierbei sowohl mit als auch ohne Dox keinerlei Effekte auf die Transgenexpression, während der rtTA-M2 bei Dox-Applikation die Expression der Luciferase induzierte. Der Nachweis der spezifischen rtTA-mRNA im Northern-Blot zeigte hierzu, dass die mRNA-Expression im herkömmlichen Transaktivator ausblieb, nicht dagegen im rtTA-M2 (siehe 4.2.2.). Dox selbst hatte keinen Einfluss auf die TRE-kontrollierte Expression der Luciferase. Aus dem Diagramm geht zusätzlich hervor, dass sich die Basalexpression der TRE-Luc auch bei Koapplikation des rtTA-M2 in EA.hy926 Zellen nicht erhöhte, und erst durch Zugabe von Dox eine Steigerung der Transgenexpression um das 23-fache erzielt wurde.

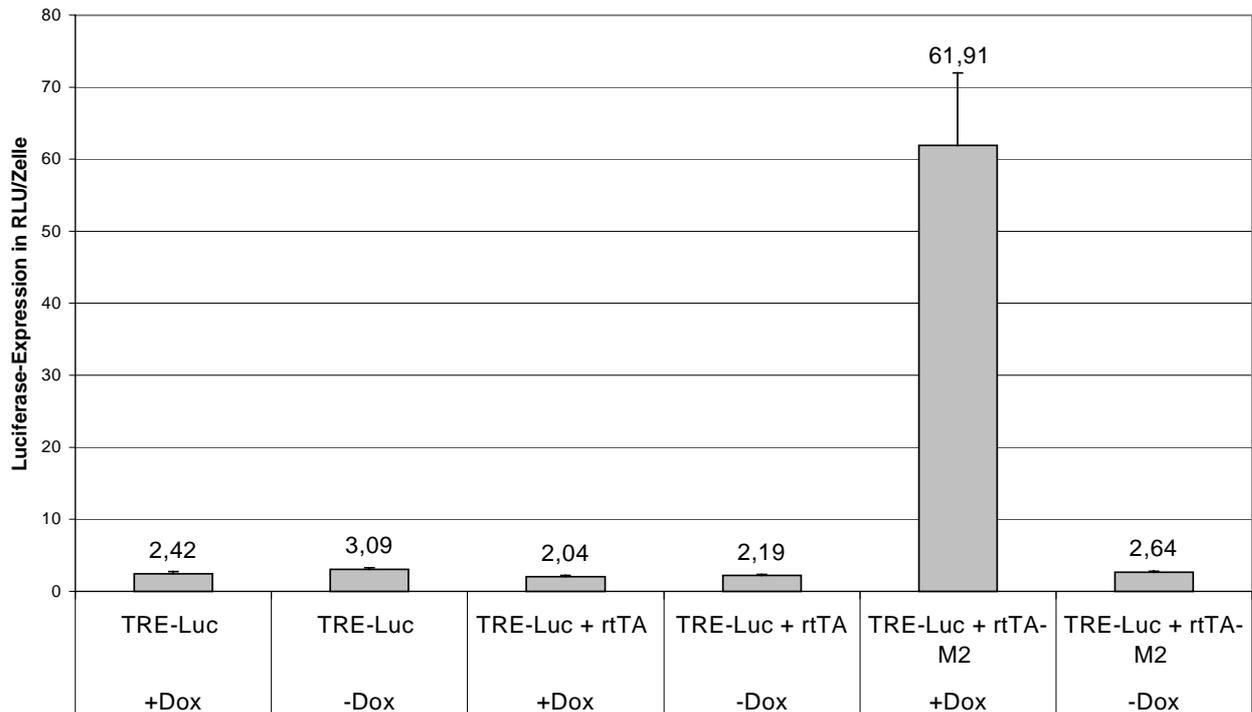


Abbildung 4.15.: Vergleich zwischen den Tansaktivatoren rtTA und rtTA-M2; EA.hy926

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMV-rtTA/rtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Dox 100 ng/ml

4.6.1.2. Dosis- und zellspezifische Regulierbarkeit der Transgenexpression

Um die graduirbare Regulierbarkeit der Transgenexpression zu demonstrieren, wurden unterschiedliche Dosierungen von Dox eingesetzt und untersucht. Dafür wurden verschiedene Zelllinien mit dem Ad5CMVrtTA-M2 und dem Ad5TRE-Luc kotransduziert und die Aktivität der Luciferase 24 h später gemessen. Hieraus wurde ersichtlich, dass die Induktion der Luciferase-Expression abhängig von der Dox-Dosierung war, allerdings hohe Variabilitäten zwischen den verschiedenen Zelllinien aufwies. Dabei fiel die Induktion des AdV-rtTA-Systems bei einer Dosierung von Dox von 300 ng/ml in allen untersuchten Zelllinien am größten aus und erreichte Werte zwischen 23- (EA.hy926) und 413-facher (HT-29) Steigerung der Transgenexpression. Die gemessenen Werte der Luciferase-Aktivität im nicht-induzierten System wurden gleich 1 gesetzt (Tab. 4.5.).

Doxyzyklin-Dosierung									
	- Dox	0,5 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml	300 ng/ml
EA.hy926	1	0,98	1,14	1,73	n.d.	3,79	14,65	19,4	23,37
Kyse140	1	1,52	1,37	3	n.d.	9,27	26,45	34,54	48,09
OE-33	1	1,35	3,04	n.d.	29,69	n.d.	118,56	n.d.	225,42
HT-29	1	3,13	2,85	n.d.	40,83	n.d.	174,88	n.d.	413,74

Tabelle 4.5.: Wirkung der Dox-Dosierung auf die Transgenexpression; n.d.: nicht durchgeführt

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMVrtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Dox in unterschiedlichen Dosierungen (0-300 ng/ml)

An Kyse140 Zellen (Abb. 4.16.) konnte gezeigt werden, dass sich die Transgenexpression des TRE-kontrollierten Indikator-AdV auch mit steigender Dosierung des rtTA-M2 erhöhte. Die Zellen wurden hierzu mit 500 p/c Ad5TRE-Luc und unterschiedlichen Dosierungen des Ad5CMVrtTA-M2 koinfiziert und mit 300 ng/ml Dox für 24 h inkubiert.

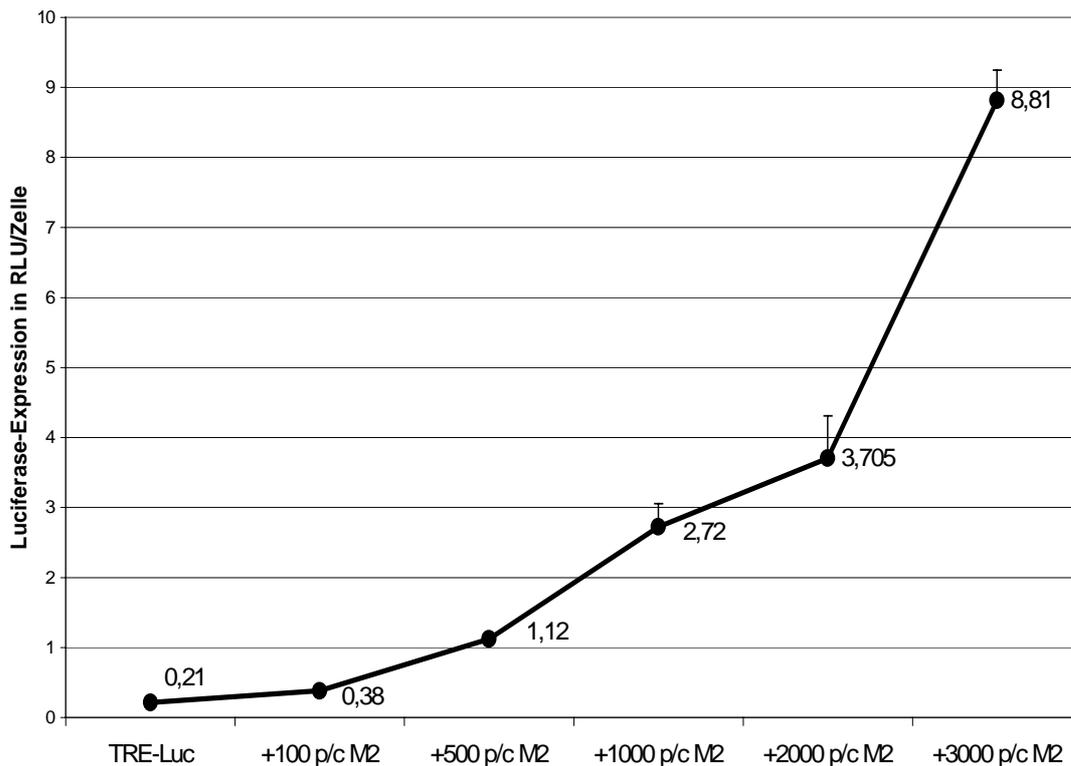


Abbildung 4.16.: Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der rtTA-M2-Dosierung; Kyse140

Eingesetzte Vektoren: Ad5TRE-Luc: 500 p/c; Ad5CMVrtTA-M2 (M2): $100-3 \times 10^3$ p/c; Dox 300 ng/ml

Zusammenfassend wurde aus diesen Experimenten deutlich, dass sowohl durch die unterschiedliche Dosierung von Dox als auch durch die des rtTA-M2 eine Graduierung der Transgenexpression erzielbar ist.

4.6.1.3. ON-OFF-Mechanismus im AdV-rtTA-System

Um die Reversibilität der Systeminduktion zu untersuchen, wurde einem weiteren Experiment die Entwicklung der Luciferase-Expression über einen Zeitraum von 3 Tagen sowohl mit Dox als auch ohne Dox untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transgens nach anfänglicher Induktion bereits nach 48 h nur noch ein Drittel des ursprünglichen Wertes aufwies, wenn die Dox-Applikation unterbrochen wurde. Bei fortwährender Applikation dagegen konnte die Expression weiter gesteigert werden (Abb. 4.17.).

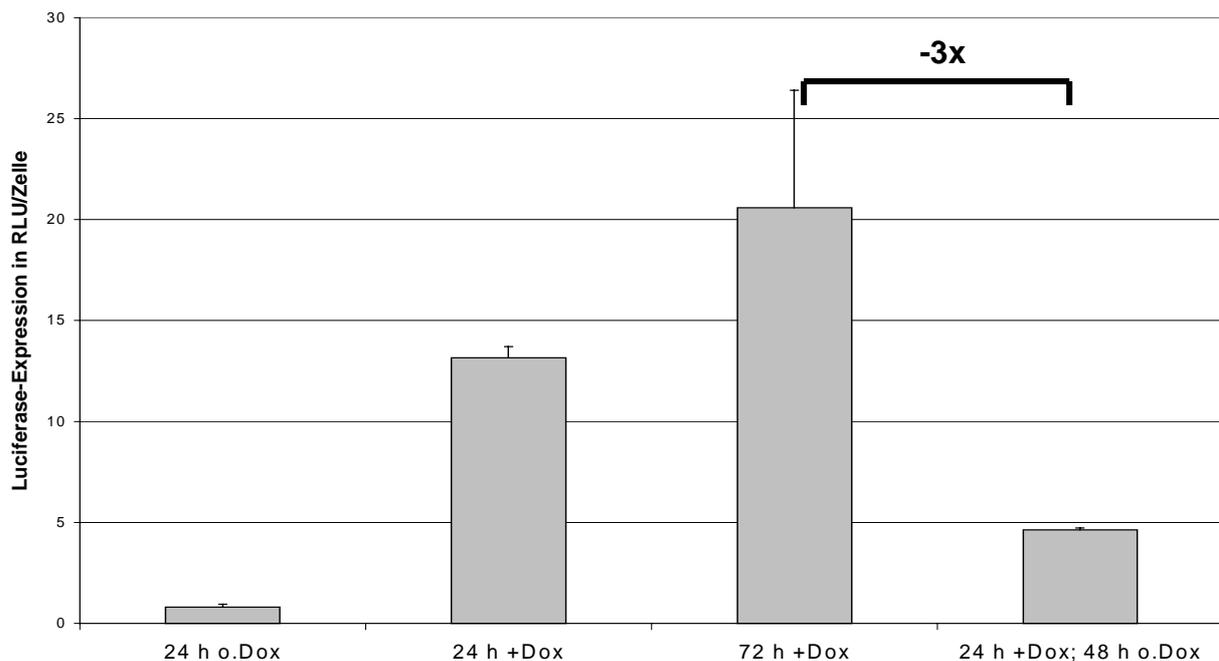


Abbildung 4.17.: Induktion der Transgenexpression und Reversibilität der Induktion innerhalb eines Zeitraumes von 72 h; EA.hy926

Eingesetzte Vektoren: Ad5CMVrtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5TRE-Luc: 500 p/c; das Medium wurde täglich gewechselt und gegebenenfalls mit 100 ng/ml Dox versehen.

4.6.1.4. Untersuchung zur Basalinduktion des AdV-Tet-On Systems

Für die Untersuchung der Basalinduktion im Tet-On-System wurden für die Transduktion der verschiedenen Zelllinien die AdV Ad5TRE-Luc und Ad5CMVrtTA-M2 eingesetzt und die Zellen mit bzw. ohne Dox für 24 h inkubiert.

Aus Tabelle 4.6. wird die Luciferase-Expression unter der Kontrolle des CMV_{min}-Promotors erkennbar und zeigt, dass im nicht-induzierten System in Abwesenheit von rtTA-M2 eine deutliche Basalexpression vorhanden ist („leaky system“). Zusätzlich wird in einigen Zelllinien eine geringfügig erhöhte Basalinduktion durch die Zugabe des Ad5CMVrtTA-M2 in Abwesenheit von Dox ersichtlich. Die Aktivität der Luciferase erhöhte sich hierbei in der Zelllinie Kyse140 um das 1,46-fache, in der Zelllinie OE-33 um das 1,59-fache und in HepG2 um das 1,35-fache.

	Basal	TRE-Luc	TRE-Luc+rtTA-M2 -Dox	TRE-Luc+rtTA-M2 +Dox
EA.hy926	1	39,82	33,44	1074,04
Kyse140	1	17,82	25,3	1254,28
HT-29	1	7,46	6,64	2959,6
OE-33	1	10,98	17,45	3934,79
HepG2	1	5,3	7,15	2775,08

Tabelle 4.6.: Regulierbarkeit der Transgenexpression im Tet-On-System; in RLU/Zelle

Die Luciferase-Expression nicht-transduzierter Zellen diente als Basalwert und wurde gleich 1 gesetzt. Eingesetzte Vektoren: Ad5CMVrtTA-M2: 5×10^3 p/c; Ad5TRE-Luc 500: p/c; Dox 300 ng/ml

4.6.1.5. Vergleich von CMV-Promotor- und Tet-On-vermittelter Genexpression

Um die CMV-Promotor- mit der TRE-vermittelten Transgenexpression zu vergleichen, wurden verschiedene Zelllinien zum einen mit dem AdV Ad5CMV-Luc und zum anderen mit den AdV Ad5TRE-Luc und Ad5CMVrtTA-M2 transduziert. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Dox-Applikation von 300 ng/ml in allen untersuchten Zelllinien mindestens eine mit der CMV-vermittelten vergleichbare Expression erzielt werden konnte. In der Zelllinie EA.hy926 überstieg die TRE-vermittelte Expression die der CMV-vermittelten um das 3-fache und in HT-29 sogar um das 140-fache (Tab. 4.7.).