

Generierung und Charakterisierung tumorselektiv replizierender Adenoviren für die onkolytische Therapie p53-dysfunktioneller Tumore

Von der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biochem. Engin Gürlevik
geboren am 27.07.1978 in Bremen

2009

Für meine Frau Nurcan,
die mir alles bedeutet.

Tag der Promotionsprüfung: 05.01.2009

Vorsitzender: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Referenten: Prof. Dr. Rita Garardy-Schahn
Prof. Dr. Stefan Kubicka
Prof. Dr. Walter Müller

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
	Abstract	2
2	Einleitung	3
2.1	Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung.....	3
2.2	Adenovirale Tumorthherapie	4
2.2.1	p53 als Ziel onkolytischer Virotherapie	5
2.2.2	Humane Telomerase als Ziel onkolytischer Virotherapie.....	6
2.3	Genregulation	7
2.3.1	Translationelle Genregulation durch RNA-Interferenz.....	7
2.3.2	Transkriptionelle Genregulation durch Repressorproteine	9
2.4	Zielsetzung der Arbeit	10
3	Ergebnisse	12
3.1	Effektivitätsvergleich von shRNA und miRNA.....	13
3.1.1	Vergleich bei RNA-Polymerase III-abhängiger Expression.....	13
3.1.2	Vergleich bei RNA-Polymerase II-abhängiger Expression	14
3.2	Etablierung eines multiplen shRNA-Expressionssystems	16
3.2.1	Klonierungssystem zur Generierung multipler shRNA-Einheiten in konkatemerer Anordnung	16
3.2.2	Ausmaß der shRNA-Position auf die RNAi-Wirkung innerhalb eines multiplen shRNA-Transkripts.....	17
3.3	Untersuchung zur Wirkung adenoviraler VA I-RNA auf RNAi.....	18
3.4	Design eines antiviralen RNAi-Netzwerks	19
3.4.1	Ermittlung von Zielsequenzen gegen E1A und Validierung des psiCheck- Systems	20
3.4.2	Untersuchung der RNAi-Wirksamkeit durch Tandem-shRNA-Motive	21
3.4.3	Ermittlung von Zielsequenzen gegen E1B, E4, pTp und AdPol.....	22
3.5	p53-inhibierte, RNAi-kontrollierte Adenoviren (RNAi-Viren).....	24
3.5.1	Schematische Darstellung der erstellten Adenoviren.....	24
3.5.2	p53-selektive RNAi im adenoviralen Kontext.....	25
3.5.3	p53-abhängige Inhibition der adenoviralen Zielgenexpression mittels RNAi.	27
3.6	p53-Selektivität der RNAi-Viren	27
3.6.1	Replikationkinetiken in Gegenwart und Abwesenheit von aktivem p53.....	28
3.6.2	<i>in vitro</i> Onkolyse	29
3.6.3	DNA-Replikation in Fibroblasten	30
3.7	Virotherapie mittels RNAi-Viren.....	31
3.7.1	Belastung der Mausleber durch virale Infektion	31
3.7.2	<i>in vivo</i> Onkolyse.....	33
3.8	Konstruktion und Charakterisierung eines Gal4-reprimierbaren hTert-Promotors .	35
3.8.1	Schematische Darstellung des hTertgal-Promotors	35
3.8.2	Repression des rekombinanten hTertgal-Promotors	35
3.8.3	Repressionsvergleich mit weiteren durch Gal4-KRAB reprimierbaren Promotoren	36
3.9	Die Eigenschaften von E1B-55k und seiner alternativen Spleißvariante E1B-156R bezüglich der p53-Inhibition	37
3.10	p53-inhibierte und hTert-Promotor-kontrollierte Adenoviren (p53T-Viren).....	39
3.10.1	Schematische Darstellung der erstellten Adenoviren.....	39
3.10.2	p53-selektive Gal4-KRAB Expression im adenoviralen Kontext.....	40
3.10.3	p53-abhängige Inhibition der adenoviralen E1A-Expression	40
3.11	p53-Selektivität der p53T-Viren	41

3.11.1	Replikationsstärke in Gegenwart und Abwesenheit von aktivem p53.....	41
3.11.2	<i>in vitro</i> Onkolyse der p53T-Viren.....	43
3.11.3	<i>in vitro</i> Onkolyse im Vergleich mit weiteren onkolytischen Viren.....	43
3.12	Kombination der p53- und hTert-Selektivität <i>in vitro</i> mittels Fibroblasten.....	44
3.13	Virotherapie mittels p53T-Viren.....	46
3.13.1	Belastung der Mausleber durch virale Infektion.....	46
3.13.2	<i>in vivo</i> Onkolyse.....	47
4	Diskussion.....	49
4.1	Konstruktion der RNAi-Viren.....	49
4.2	VA I-RNA und RNAi.....	52
4.3	Charakterisierung der RNAi-Viren.....	53
4.4	RNAi-Viren im therapeutischen Modell.....	54
4.5	Konstruktion der p53T-Viren.....	55
4.6	Charakterisierung der p53T-Viren.....	56
4.7	Untersuchung zur therapeutischen Effizienz der p53T-Viren.....	58
4.8	Ausblick.....	58
5	Materialien und Methoden.....	61
5.1	Materialien.....	61
5.1.1	Eukaryontische Zelllinien.....	61
5.1.2	Bakterienstämme.....	61
5.1.3	Mausstämme.....	61
5.1.4	Plasmide.....	61
5.1.5	Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide.....	63
5.1.5.1	Klonierung von short hairpin RNA-Expressionsvektoren:.....	63
5.1.5.2	Klonierung von psiCHECK-Derivaten.....	66
5.1.5.3	Klonierung von Expressionsvektoren adenoviraler Proteine.....	67
5.1.5.4	Klonierung proviraler Shuttlevektoren.....	67
5.1.5.5	Klonierung adenoviraler Vektoren.....	68
5.1.6	Adenoviren.....	69
5.1.7	Im Rahmen dieser Arbeit generierte Adenoviren.....	69
5.1.8	Oligonukleotide.....	70
5.1.9	Antikörper.....	73
5.1.10	Chemikalien.....	73
5.1.11	Molekulargewichtsstandards.....	74
5.1.12	Enzyme.....	74
5.1.13	Kits.....	74
5.1.14	Sonstige Materialien und Geräte.....	75
5.1.15	Medien und Pufferlösungen.....	75
5.2	Zellbiologische Methoden.....	78
5.2.1	Zellkultur.....	78
5.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	78
5.2.3	Einfrieren von Zellen.....	78
5.2.4	Auftauen von Zellen.....	78
5.2.5	Transiente Transfektion durch Calciumphosphatpräzipitation.....	78
5.2.6	Transiente Transfektion mittels LipofectAmine™.....	79
5.3	Proteinbiochemische Methoden.....	79
5.3.1	Präparation von Proteinextrakten aus Zellkultur.....	79
5.3.2	Bradford-Proteinassay.....	79
5.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	80
5.3.4	Westernblotanalyse.....	80
5.3.5	Luciferaseassay.....	80

5.3.6	β-Galactosidase-Assay	81
5.3.7	Dual-Luciferase Assay	81
5.3.8	Gewinnung und Aufreinigung des rekombinanten CAR _{ex} TAT-Fusionsprotein..	81
5.4	Molekularbiologische Methoden.....	82
5.4.1	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	82
5.4.2	Phenol Chloroform-Isoamylalkohol Aufreinigung	82
5.4.3	Agarosegelelektrophorese	82
5.4.4	Vermehrung und Präparation von Plasmid-DNA	82
5.4.4.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	82
5.4.4.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	83
5.4.4.3	Transformation durch Elektroporation.....	83
5.4.4.4	Vermehrung transformierter Bakterien	83
5.4.4.5	Analytische Plasmidpräparation (Mini-präp).....	83
5.4.4.6	Präparative Plasmidpräparation (Maxi/Midi-Präp.).....	84
5.4.5	Rekombinante DNA-Techniken.....	84
5.4.5.1	Restriktionspaltung von DNA.....	84
5.4.5.2	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	85
5.4.5.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung bzw. PCR	85
5.4.5.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	85
5.4.5.5	Dephosphorylierung von DNA	86
5.4.5.6	Auffüllen von 5'-Überhängen bzw. Verdau von 3'-Überhängen durch Klenow-Polymerase	86
5.4.5.7	Ligation von DNA-Enden	86
5.4.6	PCR zur Einfügung von Restriktionsschnittstellen.....	87
5.4.7	PCR zur Generierung der shRNA-DNA-Fragmente.....	88
5.4.8	Quantitative PCR (qPCR)	88
5.4.9	Präparation von viraler DNA aus infiziertem Gewebe oder Zellkultur	89
5.4.10	RNA-Extraktion	89
5.4.11	Quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)	89
5.5	Virale Arbeitstechniken.....	90
5.5.1	Klonierung rekombinanter Adenoviren	90
5.5.1.1	DNA-Präparation zur Klonierung rekombinanter Adenoviren.....	90
5.5.1.2	<i>In vitro</i> Ligation adenoviraler Vektoren.....	90
5.5.1.3	Transformation und Präparation adenoviraler Plasmide.....	90
5.5.2	Herstellung infektiöser Viren aus Adenovirusplasmiden.....	91
5.5.3	Vermehrung und Präparation von Adenoviren	91
5.5.4	Bestimmung des infektiösen Titers von adenoviralen Präparationen	92
5.5.5	Dialyse der Adenoviren.....	92
5.5.6	Kristallviolett-Färbung zur Quantifizierung der Onkolyse	92
5.5.7	Infektion von IMR-90 Fibroblasten	92
5.6	Tierexperimentelle Methoden	93
5.6.1	Untersuchung der intrahepatischen, viralen DNA Replikation.....	93
5.6.2	<i>in vivo</i> Onkolyse.....	93
5.7	Statistische Auswertung	93
6	Literaturverzeichnis	94
7	Anhang.....	104
7.1	Abkürzungsverzeichnis	104
7.2	Lebenslauf	106
7.3	Publikationen.....	107

7.3.1	Wissenschaftliche Artikel	107
7.3.2	Posterpräsentationen.....	107
7.4	Danksagung.....	109
7.5	Erklärung zur Dissertation	110

1 Zusammenfassung

Bei der Generierung tumorselektiv replizierender Viren ist ein breites Anwendungsspektrum bei gleichzeitig hoher Tumorselektivität und therapeutischer Effizienz ein wesentliches Ziel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden selektiv replizierende und therapeutisch effiziente, onkolytische Adenoviren gegen Tumoren mit inaktiviertem p53 entwickelt, die somit ein sehr breites Anwendungsspektrum aufweisen. Die grundlegende Bedeutung des Funktionsverlusts des Tumorsuppressors p53 im Zuge der Onkogenese wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass weit mehr als 50 % aller humanen Tumore genetische und epigenetische Veränderungen aufweisen, die zu einem Funktionsverlust von p53 führen. In einem ersten Ansatz wurde die genregulatorische RNA-Interferenz (RNAi) zur Generierung eines p53-selektiven Virus verwendet. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass *short hairpin* RNAs (shRNA) und microRNAs p53-abhängig exprimiert werden. Auf der Grundlage dieses Befundes wurde ein p53-abhängig exprimierbares, antivirales Netzwerk in Form eines multiplen shRNA-Transkripts zur Repression der replikationsessentiellen Adenovirusgene (E1A, E1B, pTp, Adpol und E4) etabliert und das Virus Ad-iREP2 generiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikation von Ad-iREP-2 in p53-positiven Zellen deutlich inhibiert wurde. In einem Nacktmausmodell konnte *in vivo* die p53-Selektivität und die effiziente Onkolyse p53-inaktiver Tumore gezeigt werden. Ad-iREP-2 stellt einen vielversprechenden onkolytischen Vektor mit breitem Anwendungsspektrum dar. Zum ersten Mal konnte der Nachweis erbracht werden, dass RNAi zur gewebsspezifischen Kontrolle der adenoviralen Replikation genutzt werden kann. Neben der p53-Inaktivierung spielt auch die Reaktivierung der Telomerase (hTert)-Expression in der Tumorigenese eine herausragende Rolle, was durch eine Inzidenz von 90 % aller Tumore dokumentiert wird. Mit dem tumorselektiv replizierenden Adenovirus Ad-p53T wurde ein hochselektives onkolytisches Virus generiert, welches p53- und hTert-Selektivität kombiniert. In diesem Vektor wurde ein rekombinanter, Gal4-KRAB-reprimierbarer hTert-Promotor zur Kontrolle von E1A und der viralen Replikation eingesetzt. Eine natürliche Replikation und Zelllyse mittels Ad-p53T ist damit lediglich in Telomerase-aktiven Tumorzellen vorhanden. Eine Basalaktivität in gesundem Gewebe konnte durch die p53-abhängige Expression eines Gal4-KRAB-Repressors vollständig inhibiert werden. In humanen Fibroblasten konnte keine DNA-Replikationskompetenz nachgewiesen werden. Selektivität und effektive Onkolyse wurden *in vivo* im Nacktmausmodell gezeigt. Mit Ad-p53T und Ad-iREP-2 konnten daher im Rahmen dieser Arbeit therapeutisch effektive und tumorselektiv replizierende Adenoviren für die Therapie p53-dysfunktionaler Tumore generiert und charakterisiert werden.

Abstract

A broadly applicable vector with highly selective and efficient lysing of tumor cells is the important aim in generating oncolytic viruses. In this work oncolytic viruses of adenovirus serotype 5 were generated for highly selective recognition and destruction of p53-dysfunctional tumors.

In tumorigenesis alteration of the tumor suppressor p53 is a favourable step. The moiety of all human tumors has a deletion or inactivation of p53, thus a therapeutic virus for p53-dysfunctional tumors covers a broad variety of tumors. RNA-interference (RNAi) has become an important tool for highly specific downregulation of gene expression.

Therefore, we developed in the first part of this work the oncolytic adenovirus Ad-iREP-2, that contains a self-inhibitory RNAi-network consisting of multiple antiviral shRNAs, which are selectively transcribed in response to transcriptionally active p53.

In the context of this work short hairpin RNAs (shRNA) and microRNAs (miRNA) were expressed in response to active p53 within the adenoviral backbone. This p53-dependent RNAi was used for the coordination of RNAi-network by repression of genes essential for replication and therefore resulted in effective inhibition of viral propagation and oncolysis. In contrast, cells harboring either dysfunctional or deleted p53 were effectively lysed. ShRNAs against adenoviral genes from the early stage like E1A, E1B, E4, pT_p and Adp_{ol} were investigated. This RNAi-controlled adenovirus displayed significantly improved selectivity for p53-dysfunctions, leading to drastically reduced intrahepatic load of viral DNA and efficiently lysing of p53-inactive tumors in virotherapeutic settings *in vivo*. Thereby, vector-based antiviral RNAi-networks represent an efficient and versatile tool for targeted restriction of viral replication. Ad-iREP-2 demonstrates a promising oncolytic virus for broad spectrum of tumors. Also the human telomerase (hTert) plays a crucial role in tumorigenesis. In 90 % of all tumors hTert is active. Therefore, in the second part of this work an oncolytic virus, referred to Ad-p53T was established with the combined selectivity of hTert and p53. Ad-p53T includes the recombinant hTert_{gal}-promoter controlling E1A expression and consequently adenoviral replication in telomerase-active tumor cells. In human fibroblasts the hTert-promoter has a low basal activity, which is totally inhibited by the p53-selective expression of the Gal4-KRAB repressor in Ad-p53T. This p53- and hTert-controlled virus improves tumor selectivity successfully *in vivo*. With both in this work generated oncolytic viruses the spectrums of therapeutic vectors were extended for the majority tumors.

Schlagworte: Virotherapie, p53, RNAi

keywords: virotherapy, p53, RNAi

2 Einleitung

2.1 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung

Die Tumorigenese ist ein komplexer Vorgang und wird durch eine mehrstufige Aberration von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen sowie DNA-Reparaturgenen aufgrund genetischer oder epigenetischer Veränderungen beschrieben. Dabei wird die Transformation einer Zelle vor allem durch Fehlfunktionen der Zellproliferation, die Inhibition der replikativen Alterung und die Immortalisierung durch das Ausschalten der Apoptose verursacht.

Der Verlust der zelleigenen Wachstumskontrolle wird durch proliferationsfördernde Umwandlung eines Protoonkogens zu einem Onkogen begünstigt. Die Proteine der Protoonkogene haben eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Stimulation des Wachstums sowie der Zellteilung. Tumorassoziierte Alterationen können zu einer unkontrollierten und gesteigerten Aktivierung von Protoonkogenen und damit zu vermehrter Zellteilung und Wachstum führen. Die hyperaktive Genform wird als Onkogen bezeichnet. Bekannte Onkogene mit transformierenden Eigenschaften sind u.a. Ras oder Myc (57).

In somatischen Zellen kommt es zu einer replikativen Alterung durch Telomerverkürzung (71;72). Die Folge ist das Absterben der Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen (38). Die Umgehung dieser Seneszenz durch die Aktivierung der Telomerase, die für die Regeneration von Chromosomenenden verantwortlich ist, ist für die Transformation im Rahmen der Tumorigenese von großer Bedeutung. Dadurch kann die limitierte Zahl von Zellzyklen überwunden werden.

Tumorsuppressorgene stellen dagegen wichtige Kontrollpunkte dar, die einer unkontrollierten Vermehrung von Zellen entgegenwirken. Sie spielen eine zentrale Rolle in den Prozessen der Apoptose, der DNA-Reparatur und des Zellzyklus-Arrests. Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens führt zum Ausfall dieser Kontrollfunktion und zur Störung der Gewebshomöostase. Bekannte Tumorsuppressorgene sind u.a. p53 oder Rb (48;58).

Durch gezielte Inaktivierung dieser Proteine konnten primäre humane Fibroblasten in kanzerogene Zellen umgewandelt werden (35).

Ein Tumor entsteht dabei durch die klonale Expansion einer einzelnen transformierten Zelle (47). Für die Tumorprogression müssen aber viele Voraussetzungen durch aufeinander folgende Veränderungen erfüllt sein (107). Da auch Schutzmechanismen wie DNA-Reparatur und Apoptose einer Transformation entgegenwirken, entwickeln sich Tumore langsam durch

ein Mehrschritt-Modell, wodurch ein langer Zeitraum bis zur symptomatischen Manifestation einer Tumorerkrankung vergeht (66). Für die maligne Tumorprogression ist die Induktion einer immunologischen Toleranz, die Entdifferenzierung, die genetische Instabilität, die invasive Potenz und die Tendenz zur Metastasierung weitere wichtige Aspekte (36;108;109).

2.2 Adenovirale Tumorthherapie

Die Konstruktion und gezielte, genetische Programmierung von tumorspezifisch replizierenden, therapeutischen Viren ist ein attraktives Ziel der Tumorthherapie. Der Einsatz von Adenoviren bietet im Vergleich zu anderen Virusspezies z.T. erhebliche Vorteile. Das Adenovirus ist relativ gut erforscht und relativ wenig pathogen. Adenoviren können technisch in großer Zahl hergestellt und aufgereinigt werden (33). Durch das episomale Vorliegen des Erbguts in infizierten Zellen ist das Risiko einer Insertionsmutagenese als sehr gering einzuschätzen. Das DNA-Genom gewährleistet im Gegensatz zum Genom von RNA-Viren eine relative genetische Stabilität. Ein erheblicher Nachteil von Adenoviren ist jedoch die hohe Immunogenität und die damit verbundene rasche und effiziente Beseitigung durch das Immunsystem (114).

Aufgrund des Tropismus zu humanen und murinen Epithelien wurden Adenoviren zunächst in der Gentherapie häufig zur effizienten Übertragung heterologer Gene eingesetzt. Dazu wurden meist replikationsdefiziente Vektoren der „ersten Generation“ verwendet. Diese Vektoren sind E1- und E3-deletierte Viren des humanen Adenovirus Serotyp 5. Die E1-Deletion führt zu fehlender Replikationskompetenz, um eine unerwünschte Ausbreitung der Viren im Körper zu vermeiden. Erstmalig wurde ein adenoviraler Vektor in der Gentherapie der zystischen Fibrose eingesetzt. Die auftretende Vektorimmunität verhinderte jedoch eine allgemeine klinische Anwendung (117).

Bei der Behandlung von Tumoren mit onkolytischen Viren soll durch die gezielte Infektion des malignen Gewebes unter Schonung von gesundem Gewebe eine nebenwirkungsarme Therapie ermöglicht werden. Dabei stellt jedoch die mangelnde Selektivität für Tumorgewebe ein wesentliches Hindernis dar. Die gezielte Einschleusung von Adenoviren in Tumorzellen kann durch Manipulation der Oberflächenproteine des Virus (*transductional targeting*, (52)) erreicht werden. Durch tumorspezifisch aktive Promotoren (*transcriptional targeting*, (110)) kann eine intrazelluläre Selektivität erzielt werden. Gesundes Gewebe, welches ebenfalls befallen werden kann, soll durch diese Kontrollmechanismen weitgehend geschont werden.

Die ersten tumortherapeutischen Viruskonzepte wurden auch auf der Basis der replikationsinkompetenten Viren generiert. Diese Vektoren enthielten sog. Suizidgene wie die Herpes-Simplex Thymidinkinase (HSV-Tk (74)) oder die *E. coli* Cytosin-Desaminase, als eigentliches anti-Tumoragens. Mit diesen Vektoren konnte aufgrund der fehlenden Replikationskompetenz keine Ausbreitung der Viren innerhalb des Tumors erreicht werden. Eine komplette Transduktion des Tumorgewebes ist auch mit hohen Dosen dieser Viren nicht zu erreichen.

Die nicht-replikativen Adenoviren konnten die in sie gesetzte Hoffnung nicht erfüllen. Daraus resultierte das zurzeit viel versprechende Ziel tumorselektiv replizierende Adenoviren einzusetzen. Dabei soll das therapeutische Virus sich *in situ* tumorselektiv vermehren, entartete Zellen effektiv lysieren, umgebendes Tumorgewebe reinfizieren und den Tumor auf diese Weise effektiv zerstören können. Die Selektivität dieser Adenoviren beruht auf bekannte Onkogenaktivierung oder Inaktivierung zentraler Tumorsuppressorgene. Zwei Gene als Ziel tumorselektiv replizierender Adenoviren werden in den beiden folgenden Kapiteln näher erläutert.

2.2.1 p53 als Ziel onkolytischer Virotherapie

In den meisten Tumoren ist der Tumorsuppressor p53 mutiert, deletiert oder inaktiviert (42). Wodurch ein zentraler Kontrollpunkt der Zelle funktionsunfähig wird. P53 stellt somit das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren dar. Die bedeutendste Funktion von p53 ist die spezifische Transaktivierung von Genen, die den Zellzyklusarrest infolge DNA-Schädigung induzieren können. Tumorassoziierte Mutationen von p53 befinden sich zumeist in der DNA-Bindungsregion und führen zum Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit. Dies führt zum Ausfall der Expression wichtiger Gene der Zellzykluskontrolle sowie apoptoserelevanter Gene. Durch eine Inaktivierung von p53 kann die Koordination der DNA-Reparatur, -Rekombination und -Replikation sowie die Apoptoseinduktion infolge irreparabler DNA-Schäden nicht mehr gewährleistet werden. Der Verlust der Apoptosekontrolle führt zu weiterer genetischer Instabilität. In p53-mutierten Tumoren ist häufig eine hohe Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie zu verzeichnen, deren primäres Ziel es ist, durch DNA-Schädigung Apoptose zu induzieren. P53-Alterationen sind häufig mit einer schlechten Prognose der betroffenen Patienten assoziiert. Nach den heutigen Erkenntnissen ist eine wichtige Hürde bei der Tumorigenese die Deaktivierung der Apoptose.

Die Nutzung des p53-Funktionsausfalls als Therapiekonzept ist aufgrund der Vorkommnisse in vielen Tumoren sehr attraktiv. Das erste generierte, replikationskompetente und p53-selektive Adenovirus ist ONYX-015 (8). Bestimmte Viren, wie Papilloma- und Adenoviren inhibieren im Laufe ihrer Replikation p53, um einen wichtigen Abwehrmechanismus der Wirtszelle zu inaktivieren. Dabei ist in Adenoviren das E1B-55k-Gen für die Inhibition von p53 verantwortlich. Das zugrunde liegende Konzept von ONYX-015 war, dass durch die Deletion von E1B-55k p53 das Virus in normalen Zellen blockiert. In p53-negativen Zellen sollte sich das Virus vermehren können. Obwohl die p53-Selektivität stark umstritten ist (90), wurde ONYX-015 mittlerweile in klinischen Studien eingesetzt (29).

Eine weitere p53-abhängige Repression der Virusreplikation konnte durch die p53-selektive Expression eines E2F-Antagonisten gezeigt werden (87). Dabei führte die virale Expression des E2F-Antagonisten in p53-positiven Zellen zur Konkurrenz zellulärer E2F-abhängiger Prozesse, wodurch das Virus die Zellzyklusarretierung nicht überwinden konnte. Dies führte zur Replikationsinhibition in p53-positiven Zellen im Vergleich zu p53-dysfunktionaler Zellen.

Im Anschluss an ONYX-015 bekam jedoch das E1A-Gen für die Replikationskompetenz des Adenovirus die bedeutendste Rolle und wurde daher für die bis heute folgenden onkolytischen Vektorkonstrukteure das zu kontrollierende Gen der Wahl, um die Replikation tumorselektiv zu steuern (41). Im nächsten Kapitel soll ein Beispiel für die tumorselektive E1A-Genregulation erläutert werden.

2.2.2 Humane Telomerase als Ziel onkolytischer Virotherapie

Im Gegensatz zu gesunden, somatischen Zellen kann in 85 – 90 % aller Tumoren eine Telomeraseaktivität detektiert werden (46;94;95). Die Telomerase (hTert) ist hauptsächlich in hämatopoetischen Stammzellen und Zellen der Keimbahn aktiv. Zu ihrer Hauptfunktion gehört die Verlängerung der Telomersequenzen an den Chromosomen-Enden (10). Die Telomersequenz besteht aus vielen Tandemwiederholungen der kurzen Sequenz GGGTTA (beim Menschen). In den frühen Stadien der Zelldifferenzierung normaler, somatischer Zellen ist sie 5 – 15 kb lang. Diese werden pro Zellteilung um 50 - 200 bp verkürzt (37). Die Zellproliferation führt somit zur Telomerverkürzung, wodurch nach einer limitierten Anzahl an Zellteilung die replikative Zellseneszenz eingeleitet wird.

Die Überwindung der Seneszenz durch die Aktivierung der Telomerase ist im Rahmen der Onkogenese von großer Bedeutung, da hierdurch die limitierte Zahl an Zellteilungen aufgehoben wird.

Die Telomeraseaktivierung als therapeutisches Ziel ist aufgrund der weiten Verbreitung in vielen Tumoren ein attraktiver Ansatzpunkt. Die zugrunde liegende Theorie für ein entsprechendes Virotherapiekonzept basiert auf der Nutzung des hTert-Promotors, welcher ursprünglich die Transkription der Telomerase kontrolliert, für die virale Replikation. Durch die hohe Aktivität des hTert-Promotors in Telomerase-aktiven Zellen werden selektiv in diesen Zellen eine hohe Viruspropagation und Lyse eingeleitet.

Auch hier wurden zunächst replikationsdefiziente Viren zur Expression von Suizidgenen, wie beispielsweise Caspase-8 (50), BAX (34) und FADD (49) unter der Kontrolle des hTert-Promotors konstruiert. In weiterem Verlauf wurde dann durch die Bedeutung des E1A-Gens erfolgreich ein replikationskompetentes, hTert-abhängiges Adenovirus (hTert-Ad) generiert (110). Dieses Virus enthielt die für die Replikation essentiellen E1A-Gene unter der Kontrolle des hTert-Promotors und konnte somit nur in hTert-aktiven Zellen erfolgreich replizieren.

Weitere interessante, adenovirale Ansätze waren der Einsatz von Promotoren, die selektiv in gewebespezifischen Tumorzellen aktiv sind. Hierbei wurden der PSA-Promotor beim Prostata-Karzinom (89), der DF3/MUC1-Promotor bei Brustkarzinomen (55), der Surfactant Protein B-Promotor bei Bronchialkarzinomen (22) und der Growth factor midkine-Promotor bei Neuroblastomen (1) eingesetzt.

2.3 Genregulation

Bei der Generierung von onkolytischen Adenoviren ist die Kontrolle der selektiven Replikation dieser Viren von entscheidender Bedeutung. Die Regulation der viralen Genexpression durch zusätzliche Mechanismen, wie der RNA-Interferenz oder der transkriptionellen Repression kann die Selektivität eines onkolytischen Ansatzes deutlich steigern.

2.3.1 Translationelle Genregulation durch RNA-Interferenz

RNA-Moleküle haben vielseitige Funktionen. Eine besondere Form ist die Regulation der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi) mittels inhibitorisch wirkender, kurzer RNA-Moleküle. Diese RNA-Moleküle werden microRNA (miRNA) oder small interfering RNA

(siRNA) genannt. Dabei handelt es sich um 21 – 25 Basenpaar-lange doppelsträngige RNA. Die miRNAs sind die natürlich, in den Zellen vorkommenden, inhibitorischen RNA-Moleküle. Die siRNAs werden den Zellen künstlich von außen durch molekularbiologische Methoden zugefügt. Sowohl miRNA als auch siRNA können RNAi gleichermaßen induzieren. Wobei sich die Wirkung aus der komplementären Sequenz zwischen der mRNA und der miRNA bzw. siRNA entfaltet. Dadurch kann es zur Inhibition der Translation oder der Degradierung der mRNA kommen.

Der Prozess der RNAi (27) wurde zuerst im Fadenwurm *C. elegans* und später auch in höheren Eukaryoten beschrieben (12;23;60;88).

MiRNAs sind Produkte aus endogen transkribierter Vorläufer-RNAs, die in verschiedenen Schritten prozessiert werden (39). Das erste miRNA-Gen, *lin-4* wurde schon vor über 15 Jahren in *C. elegans* beschrieben (60). Man stellte fest, dass *lin-4* Sequenzhomologien zur 3'-UTR (3'untranslated region) der *lin-14*-mRNA aufweist. In den letzten Jahren wurden mit der Entdeckung der siRNA-Technik (25) auch verschiedene miRNAs sowohl in Zellen höherer Eukaryoten, als auch in DNA-Viren, wie z.B. dem Epstein Barr Virus identifiziert (83). Dabei wurde beobachtet, dass bestimmte miRNAs hohe Komplementarität zu den 3'-UTR diverser Ziel-mRNAs zugleich aufweisen (45).

Auch die transkriptionelle Regulation der miRNAs ist sehr vielseitig. Primäre miRNA-Transkripte können in den Introns Protein-codierender Gene lokalisiert sein und auch separat als einzelne (56) oder multiple (40) miRNA-Strukturen transkribiert werden. Somit können miRNA nach der Prozessierung aus einer Transkriptionseinheit koordinative Regulationsfunktionen aufweisen (99).

Das Primärtranskript eines für eine miRNA-Sequenz kodierenden Gens wird als pri-miRNA bezeichnet. Die RNase-III Droscha schneidet dann im Zellkern die pri-miRNA zu einem 65 bis 75 Nukleotide langen Vorläufer-miRNA-*hairpin*-Struktur, der Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) genannt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die pre-miRNA als Substrat für den Kernexport dient (62), wobei Exportin-5 und dem *Loop* des *hairpins* eine besondere Relevanz zukommen (115).

Während des weiteren miRNA-Reifungsprozesses wird die pre-miRNA im Cytosol durch die RNAsen-III Dicer erkannt und zu einer doppelsträngigen 21-25 Nukleotid langen miRNA prozessiert. Ein Strang dieser reifen miRNA wird dann in einen Mikroribonukleoproteinpartikel (miRNP) inkorporiert. Dieser miRNP-Komplex bindet bevorzugt in der 3'-UTR der Ziel-mRNA. Bei nicht vollständig komplementärer Bindung kommt es zu einer Inhibition der Translation und bei vollständiger Komplementarität folgt eine Degradierung der mRNA (21).

Der RNAi-Mechanismus, der bisher lediglich im Rahmen der posttranskriptionellen und translationellen Genregulation beschrieben wurde, spielt auch bei epigenetischen Veränderungen eine besondere Rolle. Dabei wurden kleine RNA-Moleküle als Bestandteil des RITS-Komplexes (*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*), welcher zur Zusammensetzung des Heterochromatins nötig ist, beobachtet (106). Weiterhin wurden RNAi-Mechanismen gezeigt, die zur Chromatin-Modifikation wie z.B. DNA-Methylierung führen (93).

Die Expression von RNA-Vorläufermolekülen mit Haarnadelstruktur, die *short hairpin RNAs* (shRNA) genannt werden, können RNAi induzieren. Diese shRNA-Expression ist eine direkte Weiterentwicklung der zuvor entdeckten miRNAs (118).

ShRNAs können nach der Prozessierung durch die RNase III Dicer im Cytosol als siRNA wirken und in den RISC-Komplex inkorporiert werden. Für eine ausreichende Genrepression spielt auch hier die Zielsequenz eine entscheidende Rolle. Um eine gute Repression zu erlangen werden verschiedene pri-miRNAs zur Transkription eingesetzt, wobei die natürliche Ziel-mRNA-Sequenz durch die gewünschte Sequenz ausgetauscht wird. Eine häufig verwendete Form ist z.B. die pri-miR30 (97) oder deren pre-miR30 (11) als künstliche shRNA analog zur miRNA. Auch natürliche polycistronische miRNA-Transkripte mit ausgetauschten Zielsequenzen werden verwendet, um erfolgreiches, multiples Targeting zu ermöglichen (64).

Der entscheidende Vorteil Vektor-basierter shRNA-Expression ist die Möglichkeit der Langzeitexpression bei Verwendung stabil integrierender Vektoren (63) und die potentielle Kontrolle der shRNA-Expression durch die Wahl entsprechender Promotoren (112).

Für onkolytische Viren sind ShRNAs dahingehend attraktiv, dass hier parallel virale und zelluläre Gene beeinflusst werden können und zudem eine geringe Immunogenität im Gegensatz zu regulatorischen Proteinen aufweisen. Aufgrund der geringen Größe von shRNA-Expressionskassetten können auch viele Gene zugleich reguliert und daraus vermutlich resultierende Synergismen zur Erhöhung der Selektivität genutzt werden. Die RNAi konnte auch erfolgreich für onkolytischen Viren eingesetzt werden (122).

2.3.2 Transkriptionelle Genregulation durch Repressorproteine

Zinkfinger-Proteine haben transkriptionell-regulatorische Funktionen und können an die Kontroll- oder Promotor-Region der DNA mithilfe einer stark konservierten Domäne binden.

Diese Domäne enthält mehrere Cysteine oder Histidine, von denen jeweils vier ein Zinkion komplexieren. Etwa ein Drittel dieser C₂H₂-Typ Zinkfinger-Proteine enthält eine evolutionär stark konservierte Region, die KRAB (*Krüppel-associated box*) genannt wird und einen hohen Anteil geladener Aminosäuren enthält. Sie kann in die Domänen A und B unterteilt werden. Diese Region ist weit verbreitet und spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation. Dabei ist die transkriptionelle Repressoraktivität dieser Proteine auf die KRAB A-Domäne zurückzuführen (111).

Die KRAB-abhängige Genrepression ist zumeist an Polymerase II-abhängigen Promotoren beobachtet worden (82). Doch auch RNA Polymerase III-abhängige Transkription konnte unter gewissen Umständen durch KRAB unterdrückt werden (75). KRAB ist somit ein starker Repressor auf Transkriptionsebene in Säugerzellen. Diese Eigenschaft führte durch Fusionierung der KRAB A-Domäne mit der DNA-Bindedomäne (DBD) von Transkriptionsfaktoren zur zielgerichteten Repression entsprechender Promotoren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Fusionierung von KRAB mit der DBD von c-Myb, einem proliferationsassoziierten Transkriptionsfaktor hämatopoetischer Zellen, zu einer spezifischen Inhibition des Wachstums hämatopoetischer Tumore führte (78).

Durch die spezifische Insertion von Bindesequenzen für die DBD des Hefetranskriptionsfaktor Gal4 innerhalb einer Promotorregion, konnte dessen transkriptionelle Aktivität gezielt durch ein Fusionsprotein aus der DBD von Gal4 und der KRAB A-Domäne inhibiert werden (53). Auf dieser Grundlage konnte ein p53-selektives, onkolytisches Adenovirus etabliert werden (nicht publiziert).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Bei den bislang existierenden Konzepten zu tumorselektiv replizierenden Viren ist das Ziel einer hohen Onkolyse-Effizienz bei größtmöglicher Tumorselektivität mit breitem Anwendungsspektrum noch unzureichend gelöst. Modifikationen, wie die Deletion von adenoviralen Genen, führen meist zu einer Attenuierung des Virus und relativieren somit die Selektivität. Viele der bisher veröffentlichten Viren konnten ihre Selektivität teilweise nur *in vivo* mit geringer Viruslast verteidigen. Beispielsweise führt der Einsatz tumorselektiver Promotoren bei hoher Viruslast aufgrund einer Basalaktivität auch in gesundem Gewebe zur Replikation der Viren (7). Krebsassoziierte Promotoren wie der Prostata-spezifische Promotor sind zwar selektiv, weisen jedoch sehr geringe Aktivitäten auf (4).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, p53-selektive, onkolytische Adenoviren mittels neuartiger Mechanismen wie RNAi zu generieren sowie auf Selektivität und therapeutischen Einsatz *in vivo* im Nacktmausmodell zu untersuchen. Dabei sollte durch die p53-Selektivität ein breites Anwendungsspektrum mit einer hohen Lyseeffizienz verknüpft werden.

In unserem Ansatz p53-selektiver Viren sollten mittels p53-abhängiger Expression multipler shRNAs die virale Replikation hochspezifisch auf p53-negative Zellen beschränkt werden.

Das erste Ziel dabei ist die Etablierung einer p53-abhängigen shRNA-Expression und die Validierung multipler shRNAs in einem singulären Transkript. Anschließend sollten verschiedene Ziel-mRNAs ermittelt werden, deren Reprimierung die Aussicht auf Selektivität verspricht. Mit diesen Erkenntnissen sollte dann ein Virus generiert werden. Dabei sollte zunächst in Zellkultur auf die Wirkung der RNAi im viralen Umfeld mittels p53-positiven und -negativen Zellen getestet werden, um anschließend in humanen Fibroblasten und murinen Modellen auf Onkolyse und Selektivität analysiert zu werden.

In einem weiteren Ansatz sollte eine Erhöhung der Selektivität durch ein onkolytisches Virus, das hochselektiv auf die Kombination aus aktiviertem hTert und alteriertem p53 reagiert, erreicht werden kann. Zunächst sollte in diesem Ansatz ein rekombinanter hTertgal-Promotor konstruiert werden, welcher durch das Fusionsprotein Gal4-KRAB effizient reprimiert werden kann. Anschließend sollten auf dieser Basis Viren generiert werden. Dabei soll die Expression von Gal4-KRAB durch den p53-selektiven prMinRGC-Promotor gesteuert werden. Dieser kann dann die Expression des adenoviralen E1A-Gens, welcher unter der Kontrolle des rekombinanten hTertgal-Promotors steht, reprimieren. Auf diese Weise wird eine selektive Virusreplikation in p53-alterierten und hTert-aktiven Zellen ermöglicht. In gesundem Gewebe ist der hTert-Promotor gering aktiv und weist eine gewisse Selektivität auf. Diese Grundaktivität soll dann durch die zusätzliche Expression des Gal4-KRAB vollständig inhibiert werden. Die konstruierten Viren sollten zunächst in Zellkultur auf ihre p53-Selektivität mittels p53-positiver und -negativer Zellen untersucht werden. Bei den Zellen handelt es sich meistens um Tumorzellen, die zwar p53-positiv sein können, aber eine hTert-Aktivierung besitzen. Daher kann die kombinierte Selektivität in Fibroblasten analysiert werden. Anschließend sollte das Virus in murinen Modellen auf Onkolyse und Selektivität charakterisiert werden.

3 Ergebnisse

Zur Generierung von tumorselektiven Viren ist die zelltypspezifische Regulation von Genen, die für die Replikation des Virus essentiell sind, von großer Bedeutung. Für die Expressionsregulation von Genen können verschiedene Strategien in Betracht gezogen werden. Eine Möglichkeit ist die translationelle Kontrolle mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi). Weitere Möglichkeiten sind transkriptionelle Kontrollen über zelltypspezifische oder reprimierbare Promotoren sowie die Expression regulatorischer Gene.

In dieser Arbeit wurde im ersten Ansatz der RNAi-Mechanismus zur p53-selektiven Inhibition der Viruspropagation ausgenutzt. In unserem Ansatz p53-selektiver Viren sollten mittels p53-abhängiger Expression multipler shRNAs die virale Replikation hochspezifisch auf p53-negative Zellen beschränkt werden. Das zugrunde liegende Prinzip ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

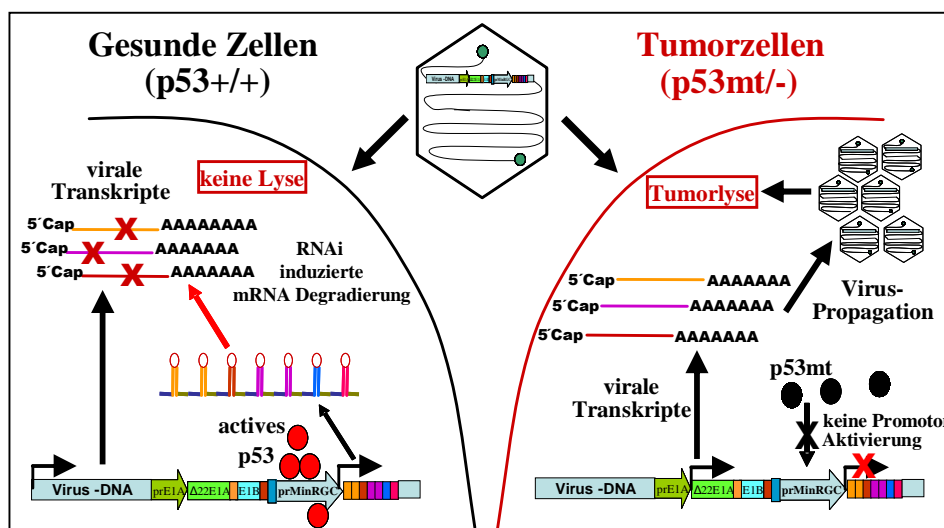


Abb. 1: Schematische Darstellung des RNAi-vermittelten, therapeutischen Ansatzes eines p53-selektiven, onkolytischen Virus. In gesundem Gewebe wird durch aktives p53 ein multiples shRNA-Transkript zur Reprimierung adenoviraler mRNAs exprimiert. Dies verhindert die Virus-Propagation, die in p53-negativen Tumoren zur Onkolyse führt.

In einem zweiten Ansatz werden Ergebnisse eines generierten, tumorselektiven Virus dargestellt, bei dem die Regulation des adenoviralen E1A-Gens und somit die Replikations- und Lysefähigkeit des Virus unter der transkriptionellen Kontrolle eines Gal4-reprimierbaren hTertgal-Promotors (rekombinantes humanes Telomerasepromotor) sowie der p53-abhängigen Expression des Fusionsproteins Gal4-KRAB gestellt wurde. Das zugrunde liegende Prinzip ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

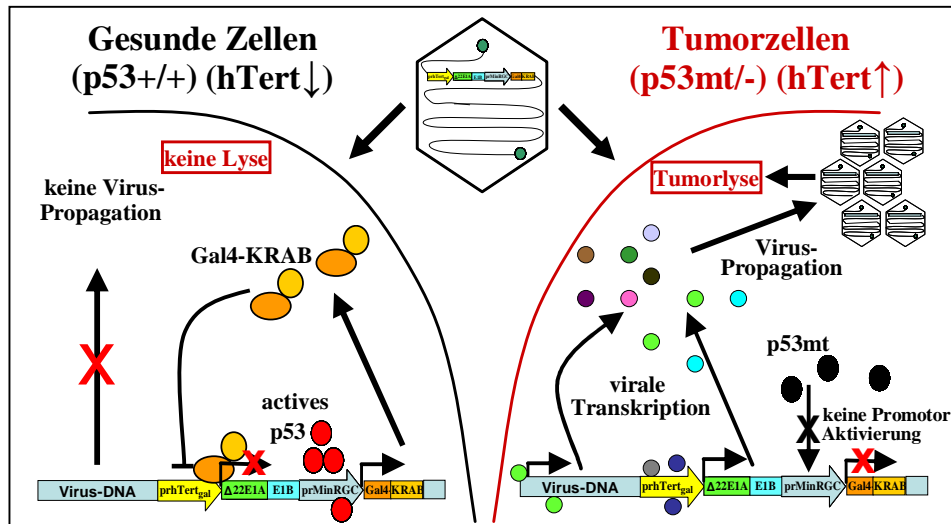


Abb. 2: Schematische Darstellung der Regulation eines tumorselektiven Adenovirus durch die Kombination tumorcharakteristischer Telomerase-Aktivierung und p53-Alteration. In gesundem Gewebe ist der hTertgal-Promotor zur Regulation der viralen Replikation sehr gering aktiv und wird zusätzlich durch die p53-vermittelte Expression des Gal4-KRAB-Repressors vollständig inhibiert. In Tumorgewebe ist der hTertgal-Promotor vollständig aktiv und führt durch die Expression der E1A-Gene zur Virus-Propagation und Tumorlyse.

3.1 Effektivitätsvergleich von shRNA und miRNA

Zur Induktion von RNAi mittels eines Expressionssystems können die *hairpin* Strukturen in Form eines *short hairpin*-RNA-Transkripts (shRNA) oder diese im Umfeld eines microRNA-Transkripts (miRNA) transkribiert werden. Es wurden verschiedene Formen von RNAi-induzierenden Transkripten beschrieben. In dieser Arbeit wurde das miR30-System verwendet. Dazu wurden die mRNA-Zielsequenzen mit dem miR30-Loop sowie kurzen flankierenden Sequenzen versehen und somit als ein shRNA-Transkript (= artifizielles pre-miRNA-Transkript) exprimiert. Alternativ wurde dieses Transkript auch im Umfeld des gesamten natürlichen miR30-Transkripts (= artifizielles pri-miRNA-Transkript) exprimiert. Somit wurde verglichen, ob die Expression eines *hairpins*, in einem natürlich vorkommenden miRNA-Umfeld oder in der verkürzten Version, eine verbesserte RNAi-Wirkung zeigt. Eine gezielte Prozessierung einer pri-miRNA könnte eventuell einen positiven Einfluss auf die Effizienz haben.

3.1.1 Vergleich bei RNA-Polymerase III-abhängiger Expression

RNA-Polymerase III-Promotoren wie der U6-, 7SK oder H1-Promotor werden im Allgemeinen für die Transkription von shRNA eingesetzt (5;63;81). Daher wurde für die Expression eines gegen die *firefly*-Luciferase gerichteten *hairpins* in Form einer shRNA

(shRfLuc) sowie einer miRNA (miRfLuc) zunächst der RNA-Polymerase III-abhängige U6-Promotor getestet. Die miRNA- und shRNA-Konstrukte wurden mittels Luciferaseassay und einer *scramble*-Kontrolle (shRScr) in HepG2- und Huh7-Zellen untersucht. Dazu wurden die *hairpin*-Expressionskonstrukte mit einem Luciferasevektor kotransfiziert. Das Ergebnis der Luciferase-Aktivitätsmessung ist in Abb. 3 dargestellt.

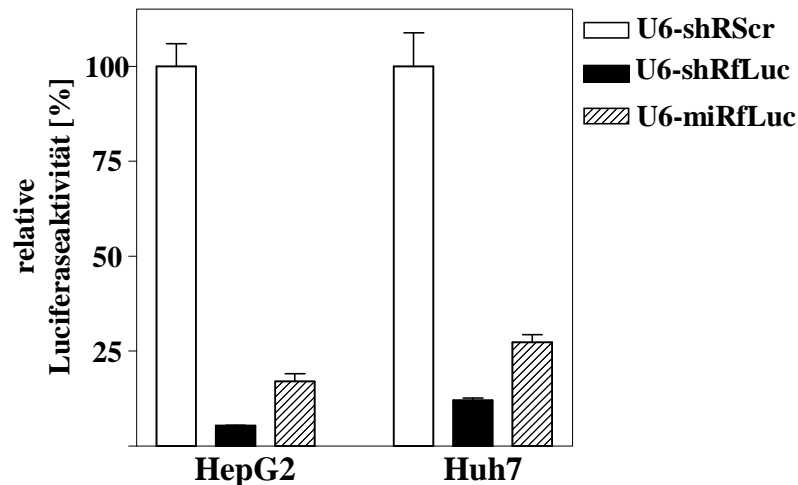


Abb. 3: Die RNAi-Effizienz einer RNA-Polymerase III-abhängigen shRNA-Expression ist effektiver als eine miRNA-Expression bei transienter Transfektion. Die U6-Promotor-abhängigen Expressionskonstrukte von shRScr, shRfLuc und miRfLuc wurden jeweils mit einem Luciferase-Expressionskonstrukt in den Zelllinien HepG2 und Huh7 kotransfiziert und mittels Aktivitätsmessung auf Repression der Luciferase untersucht. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Der Vergleich der Effizienz einer shRNA- und analoger miRNA-vermittelten RNAi zeigt eine deutlich bessere Wirkung der shRNA-Expression (Abb. 3). Durch die miRfLuc-Expression wird eine Repression der Luciferaseaktivität auf 15 % erreicht. Im Gegensatz dazu bewirkt die Expression des shRfLuc eine Repression auf etwa 5 % in HepG2-Zellen. In Huh7-Zellen ist die RNAi-Effizienz etwas abgeschwächt, zeigt aber eine entsprechende Tendenz.

Viele Publikationen weisen darauf hin, dass miRNAs Produkte aus Polymerase II-abhängiger Transkriptionen sind (17;40). Daher wurde im Folgenden der Vergleich shRNA/miRNA auch im Zusammenhang einer Polymerase II-abhängigen Expression untersucht.

3.1.2 Vergleich bei RNA-Polymerase II-abhängiger Expression

Für Untersuchungen p53-abhängiger RNAi wurden die shRfLuc- und miRfLuc-Konstrukte unter der Kontrolle des p53-sensitiven Promotors prMinRGC sowie des wildtyp CMV-Promotors generiert. Der CMV-Promotor ist ein konstitutiv aktiver RNA-Polymerase II-abhängiger Promotor und gilt somit als p53-unabhängige Vergleichskontrolle. Als

Negativkontrolle (prMinRGC-shRScr) wurde die Expression eines *nonsense hairpins* unter der Kontrolle des prMinRGC Promotors konstruiert. Die Wirkungen Pol II-abhängiger Expression von shRNA bzw. miRNA wurden mittels Luciferaseassay in p53-positiven HepG2-Zellen und p53-mutierten Huh7-Zellen untersucht. Dazu wurden die shRNA-Expressionskonstrukte mit einem Luciferase-Expressionskonstrukt kotransfiziert. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt.

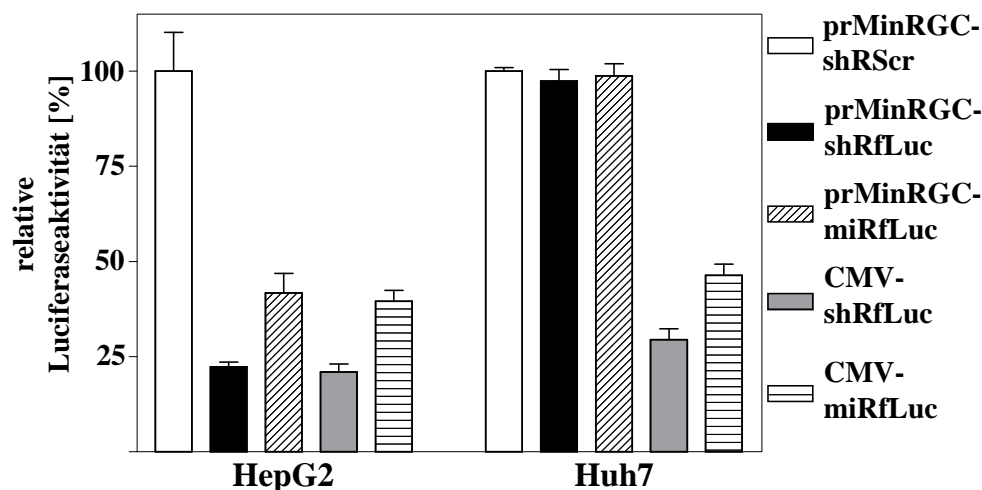


Abb. 4: Eine RNA-Polymerase II abhängige shRNA-Expression ist in der Repression des Luciferasegens effektiver als eine miRNA-Expression, sowohl unter der Kontrolle des p53-selektiven Promotors, prMinRGC als auch des konstitutiv aktiven CMV-Promotors. Die Expressionskonstrukte von shRScr, shRfLuc und miRfLuc wurden jeweils mit einem Luciferase-Expressionskonstrukt in den Zelllinien HepG2 (p53-positiv) und Huh7 (p53 220C-mut) transient kotransfiziert und mittels Aktivitätsmessung auf Repression der Luciferase untersucht. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Das Ergebnis der Untersuchung einer shRNA- und miRNA-Expression in einem Polymerase II-abhängigen Expressionssystem aus Abb. 4 zeigt, dass die prMinRGC-abhängige miRfLuc-Expression in HepG2-Zellen zu einer Repression der Luciferaseaktivität auf etwa 40% führte. Die Expression einer shRfLuc dagegen zeigte eine höhere Repression auf ca. 23%. In Huh7-Zellen (p53 mutiert) wurde mit den prMinRGC-Konstrukten keine Repression gemessen. Somit konnte gezeigt werden, dass RNAi p53-selektive induziert werden kann. Der wildtyp CMV-Promotor wirkt sich in HepG2-Zellen ähnlich wie der prMinRGC-Promotor aus und erzielt ebenfalls eine Repression auf etwa 22% (CMV-shRfLuc) bzw. 40% (CMV-miRfLuc). Eine CMV-Promotor abhängige Repression in Huh7-Zellen ist zwar deutlich, verläuft jedoch weniger effektiv als in HepG2-Zellen. In Huh7-Zellen wurde eine Reduktion der Luciferaseaktivität auf etwa 30% (CMV-shRfLuc) und 47% (CMV-miRfLuc) ermittelt. Ebenfalls war die Wirkung einer U6-Promotor-abhängigen Transkription in Huh7-Zellen schwächer als in HepG2-Zellen. Das Ausmaß der Repression ist durch den Einsatz von RNA-

Polymerase II-Promotoren nicht so stark wie mit einem U6-Promotor (s. Abb. 3). In beiden Systemen ist aber deutlich zu erkennen, dass eine shRNA-Expression eine effizientere Repression der Luciferasegenexpression aufweist als eine analoge miRNA-Expression. Somit wurden alle nachfolgenden Konstrukte auf der Basis einer shRNA mit einem miR30-Loop und kurzen flankierenden Sequenzen konstruiert.

3.2 Etablierung eines multiplen shRNA-Expressionssystems

Rekombinante Adenoviren haben eine begrenzte Kapazität heterologe DNA aufzunehmen. Daher ist der Einsatz von shRNAs mit ihren kurzen Längen äußerst attraktiv. Der Vorteil der Länge kann zur Verwendung eines RNAi-Netzwerkes mit mehreren shRNAs ausgenutzt werden. Somit können verschiedene Gene, die bei der Regulation der viralen Replikation eine wichtige Rolle spielen, synchron reprimiert werden. Dabei sollte ein singuläres Transkript mehrere shRNA-Einheiten in konkatermer Anordnung enthalten, die Expression auf einen Promotor zu reduzieren.

3.2.1 Klonierungssystem zur Generierung multipler shRNA-Einheiten in konkatermer Anordnung

Zur Expression von multiplen shRNA-Motiven auf einem singulären Transkript wurde ein Klonierungssystem erstellt. Dieses ist in Abb. 5 dargestellt.

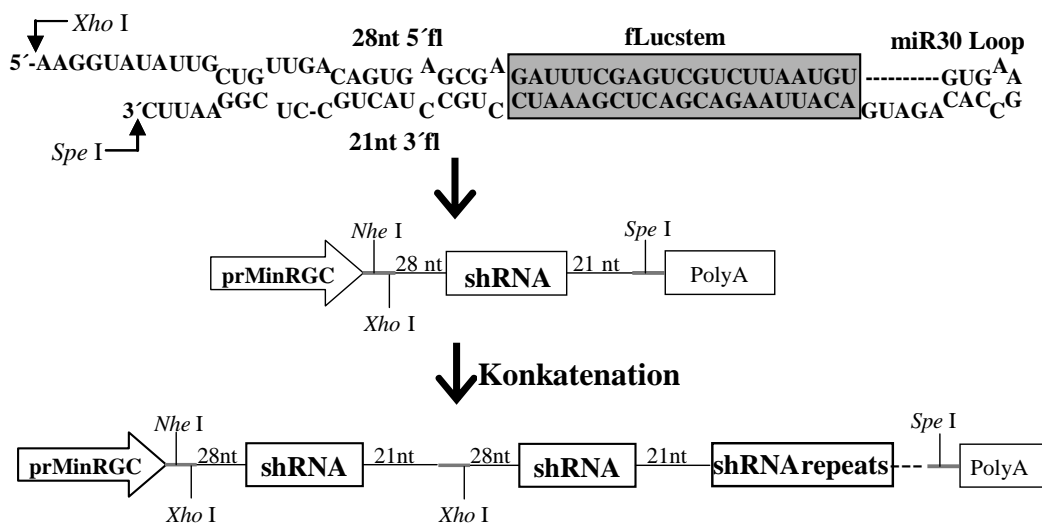


Abb. 5: Schematische Darstellung zur Verknüpfung von Einzel-shRNA-DNA-Motiven.

Das System basiert auf der Expression einer shRNA unter der Kontrolle des prMinRGC-Promotors. Dabei werden die shRNA-DNAs in die *Xho* I- und *Spe* I-Schnittstellen inseriert (s. 5.1.5.1, S. 63). Eine bestimmte shRNA-DNA-Einheit kann dann mittels *Nhe* I und *Spe* I isoliert werden und in die *Nhe* I- oder *Spe* I-Schnittstelle eines anderen shRNA-Expressionsvektors inseriert werden. Auf diese Weise konnten shRNA-DNA-Einheiten in beliebiger Reihenfolge verknüpft und angeordnet werden.

3.2.2 Ausmaß der shRNA-Position auf die RNAi-Wirkung innerhalb eines multiplen shRNA-Transkripts

Bei der Expression von verschiedenen shRNAs innerhalb eines singulären Transkripts ist es von Bedeutung, dass die Wirkung der shRNA aufgrund Position oder Länge des Transkripts nicht stark abgeschwächt wird. Daher wurden verschiedene shRNA-Konkatemere erstellt, wobei die Position der gegen die *firefly*-Luciferase gerichteten shRfLuc, umgeben von shRScr-Kontrollmotiven, variiert wurde. Die Konstrukte wurden mit einem Luciferasevektor kotransfiziert und mittels Luciferasemessung untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 6 dargestellt.

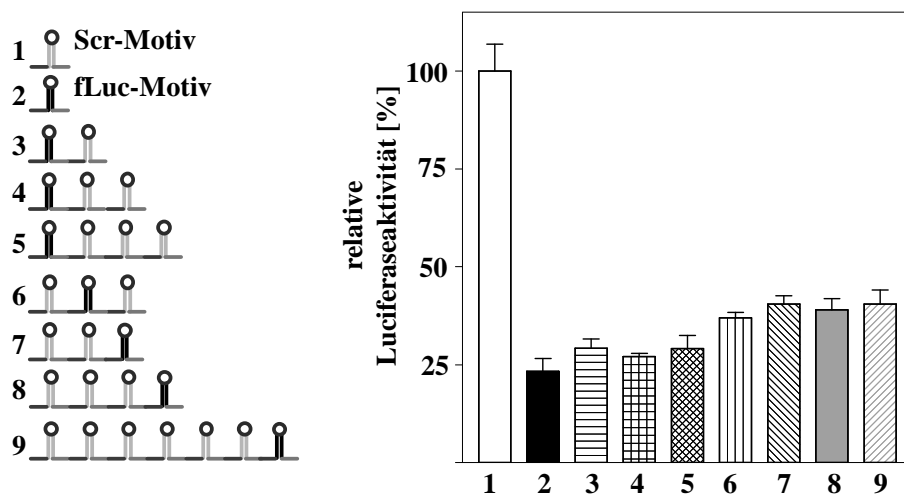


Abb. 6: Die Expression des shRfLuc-Motive in verschiedenen Positionen eines singulären Transkripts mit mehreren shRScr-Einheiten führt auch in langen Transkripten zur effektiven Repression der Luciferasegenexpression. Die entsprechenden shRNA-Expressionskonstrukte unter der Kontrolle des prMinRGC-Promotors wurden mit einem Luciferase-Expressionskonstrukt in HepG2-Zellen kotransfiziert und mittels Aktivitätsmessung der Luciferase auf Wirksamkeit der Repression untersucht. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Das Ergebnis zeigt, dass die Repression der Luciferase mit einem RNAi-Netzwerk-Transkript nicht wesentlich schwächer ist, als bei Expression eines einzelnen shRfLuc-Motivs, wenn die

shRNA sich in der ersten Position befindet. Ab der zweiten Position ist die Repressionseffizienz leicht abgeschwächt und wird weder durch die Länge des Transkripts noch durch die weitere Positionsverschiebung der shRfLuc beeinflusst. Diese Daten zeigen, dass eine p53-abhängige Expression eines komplexen RNAi-Transkripts die simultane Genregulation ermöglicht und das Konzept des RNAi-Netzwerkes mittels eines singulären Transkripts funktionsfähig ist.

3.3 Untersuchung zur Wirkung adenoviraler VA I-RNA auf RNAi

Verschiedene Studien (2;65) haben gezeigt, dass die Expression der adenoviralen VA I- und VA II-RNAs (Virus-assoziierte RNA) die RNAi inhibieren. Daher wurde untersucht, ob ein VA I-vermittelter Einfluss auf die RNAi in der frühen Infektionsphase zu beobachten ist. Für die p53-selektive Inhibition der Viren mittels RNAi ist die frühe Phase der Virusreplikation von Bedeutung. Die Messungen zur Untersuchung des Einflusses der VA I-RNA auf die RNAi erfolgten während der ersten 24 h nach der Virusinfektion. Dazu wurden A549-Zellen mit einem Luciferasevektor und einem U6-shRfLuc oder U6-shRScr kotransfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem wildtyp Adenovirus oder dem nichtreplikativen Ad-LacZ mit MOI 10 infiziert. Nach den angegebenen Zeiten wurde Gesamt-RNA zur Analyse der VA I-RNA-Niveaus (Abb. 7) und Proteine zur Analyse der Luciferaseaktivität (Abb. 8) isoliert.

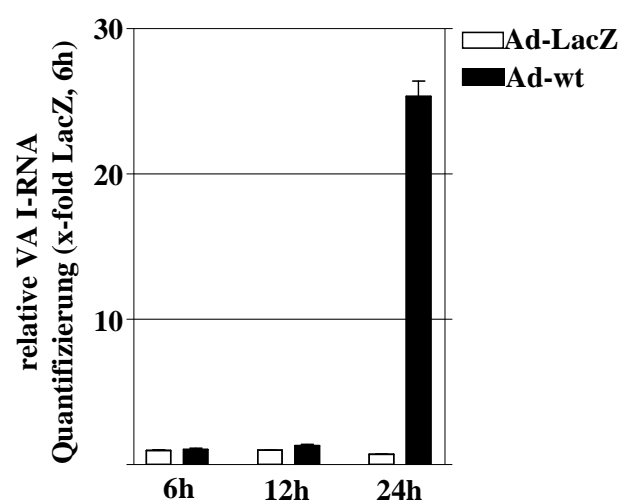


Abb. 7: Die Infektion der Zellen mit dem wildtyp Adenovirus zeigt, dass die VA I-RNA erst in der späten Phase (24 h) des adenoviralen Replikationszyklus stark ansteigt. A549-Zellen wurden mit den Viren Ad-LacZ und Ad-wt infiziert. Nach 6, 12 und 24 h wurde Gesamt-RNA isoliert und die VA I-RNA-Menge nach reverser Transkription mit spezifischem Primer über quantitative PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die Werte wurden mit der zellulären GAPDH-mRNA abgeglichen.

Abb. 7 zeigt das Expressionsverhalten von VA I-RNA während eines adenoviralen Infektionszyklus. Da Ad-LacZ ein nichtreplikatives Adenovirus ist, ist keine Zunahme der VA I-RNA zu messen. Somit ist die 25-fache Zunahme der VA I-RNA bei wildtyp Adenovirus auf die Replikation und Vermehrung des Genoms zurückzuführen. Zur Untersuchung, ob diese VA I-RNA einen Einfluss auf die RNAi-Effizienz hat, wurde eine entsprechende Luciferasemessung, dargestellt in Abb. 8, durchgeführt.

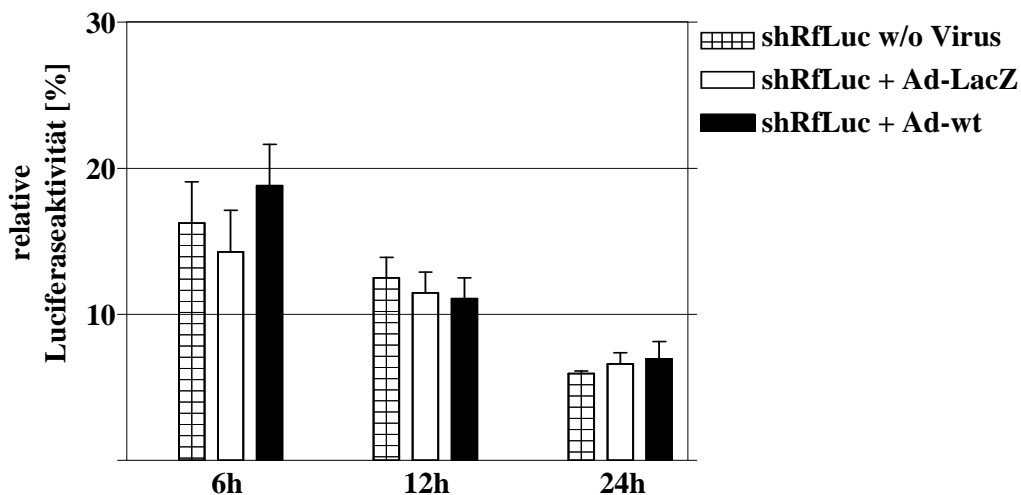


Abb. 8: Die Gegenwart von VA I-RNA hat keinen Einfluss auf die RNAi-Effizienz in der Infektionsfrühphase. A549-Zellen wurden mit einem Luciferase-Expressionskonstrukt und jeweils mit einem shRScr- oder shRfLuc-Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des U6-Promotors kotransfiziert. Anschließend wurden die Ansätze entweder ohne Virus, mit Ad-LacZ oder mit Ad-wt infiziert. 6, 12 und 24 h nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität gemessen und auf die shRScr-Kontrolltransfektion bezogen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde SV40-LacZ kotransfiziert.

Die Luciferasemessung zeigt, dass die VA I-RNA zumindest in der frühen Phase des Infektionszyklus die RNAi-Effizienz nicht beeinträchtigt. Die Repression der Luciferase ergibt in Gegenwart des Ad-wt, welches eine hohe VA I-RNA-Niveau zumindest nach 24 h nach der Infektion aufweist (s. Abb. 7), keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu nicht infizierten bzw. Ad-LacZ infizierten Zellen.

3.4 Design eines antiviralen RNAi-Netzwerks

Zur selektiven Inhibition des Virus müssen vor allem die Gene der frühen Phase p53-abhängig stark unterdrückt werden, da diese essentiell für den Übergang in die lytische Replikationsphase sind. Als geeignete Zielgene wurden E1A, E1B, E4, terminales Protein (pTp) und die adenovirale Polymerase (AdPol) in Betracht gezogen. Um effiziente shRNAs

gegen diese Zielgene zu ermitteln, müssen die ausgewählten Zielsequenzen repräsentativ durch Messungen auf ihre Wirkung getestet werden. Zur Ermittlung geeigneter shRNA-Motive wurde das psiCHECK-Messprinzip (s. 5.3.7, S. 81) angewandt. Dazu wurden die Zielsequenzen in die 3'-UTR der *renilla* Luciferase inseriert und diese mit den entsprechenden shRNA-Expressionskonstrukten kotransfiziert. Die Repression der *renilla* Luciferase gibt somit Auskunft über die RNAi-Effizienz der shRNA-Motive.

3.4.1 Ermittlung von Zielsequenzen gegen E1A und Validierung des psiCheck-Systems

Zunächst wurden shRNAs gegen E1A getestet. Dazu wurde die E1A-Sequenz in das 3'-UTR der *renilla* Luciferase kloniert und somit das psiCheck-E1A erstellt. Die Wirksequenzen wurden mit einem öffentlich zugänglichen shRNA-Designalgorithmus bestimmt und als shRE1A unter der Kontrolle des prMinRGC-Promotors kloniert. Die Zahlen hinter den shRNA-Motiven geben die 5'-Zielstartpositionen im adenoviralen Genom an. PsiCheck-E1A und die entsprechenden shRE1A-Expressionsvektoren wurden in HepG2-Zellen kotransfiziert. Die RNAi-Effizienzen verschiedener shRE1A-Konstrukte wurden über den Dual-Luciferase Assay bestimmt und sind in Abb. 9 dargestellt.

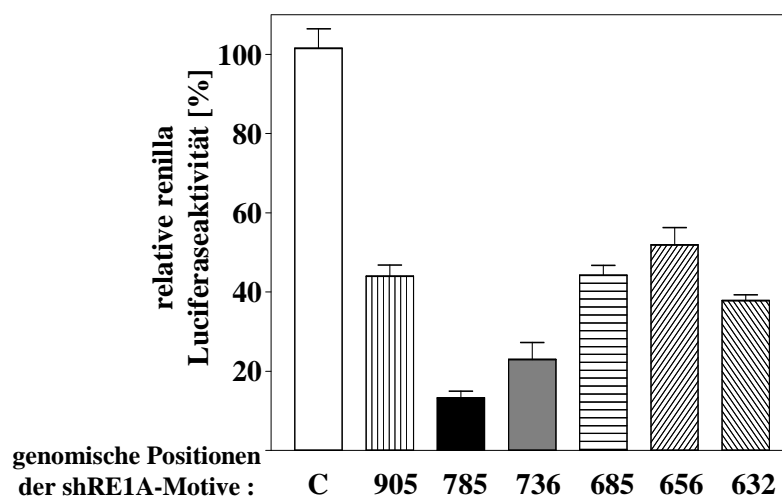


Abb. 9: Die shRE1A-785 und -736 reduzieren die E1A-*renilla* Luciferaseaktivität am stärksten. Das Konstrukt psiCheck-E1A wurde mit den shRE1A-Expressionskonstrukten unter der Kontrolle des prMinRGC-Promotors in HepG2-Zellen kotransfiziert. Die Effizienz der jeweiligen shRNAs wurde mittels Dual-Luciferase Assay durch den Vergleich der Kotransfektion mit dem shRScr-Konstrukt als Kontrolle (C) ermittelt.

Das Ergebnis der verschiedenen shRE1A-Konstrukte zeigt, dass die shRE1A mit den Zielsequenzen an den Startpositionen 785 und 736 im adenoviralen Genom die besten Repressionen der E1A-*renilla* Luciferasegenexpression erzielen.

Ob diese Wirkung auch tatsächlich beim Einsatz des wildtyp E1A funktioniert, konnte mit einer Westernblot-Analyse untersucht werden. Dazu wurde das Konstrukt shRE1A-736 unter der Kontrolle eines U6-Promotors mit einem E1A-Expressionsvektors kotransfiziert. Anschließend wurden Proteine isoliert und eine E1A-Westernblot-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

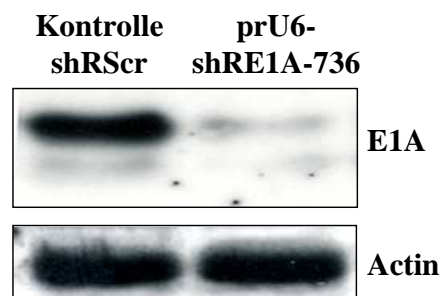


Abb. 10: Das shRE1A-736-Motiv konnte in der Westernblot-Analyse das E1A-Protein effizient herunterregulieren und somit das psiCheck-Messprinzip validieren. Huh7-Zellen wurden mit einem E1A-Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors mit dem prU6-shRE1A-736-Konstrukt oder der Kontrolle shRScr kotransfiziert. Anschließend wurden die Proteine nach einer SDS-PAGE mittels Westernblot nachgewiesen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Der Ergebnisse der Westernblot-Analyse zeigt, dass die mittels Dual-Luciferase Assay ermittelte shRE1A-736 ihre repressive Wirkung auch auf wildtyp E1A übertragen lässt. Somit konnte das psiCheck-System mit dem Dual-Luciferase Assay zur Detektion von effektiven shRNA-Zielsequenzen verwendet werden.

3.4.2 Untersuchung der RNAi-Wirksamkeit durch Tandem-shRNA-Motive

Als nächstes wurde untersucht, ob es in einem konkatemeren shRNA-Konstrukt beim Einsatz von shRNAs gegen dieselbe mRNA ergiebiger ist, ein stark repressives shRNA-Motiv 2 x hintereinander einzusetzen oder zwei verschiedene Motive zu verwenden. Dazu wurden drei verschiedene Tandem-shRE1A-Konstrukte aus shRE1A-785 und shRE1A-736 generiert. Diese wurden mit dem psiCheck-E1A-Vektor kotransfiziert und in einem Dual-Luciferase Assay, dargestellt in Abb. 11, analysiert.

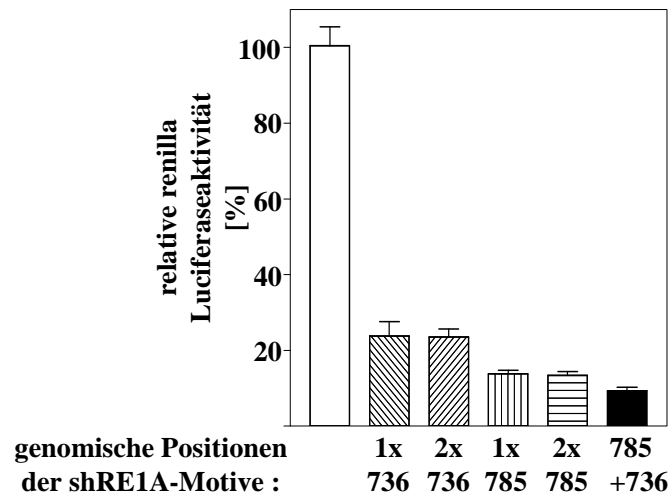


Abb. 11: Der Einsatz von zwei verschiedenen shRNA-Motiven gegen dieselbe mRNA ist effizienter als die Wiederholung des gleichen shRNA-Motivs. Die entsprechenden Tandem-shRE1A-Expressionskonstrukte wurden mit dem psiCheck-E1A-Konstrukt kotransfiziert und mittels Dual-Luciferase Assay die Effizienz ermittelt.

Das Ergebnis zeigt, dass in einem Tandem-shRNA-Konstrukt die RNAi-Effizienz zunimmt, wenn verschiedene Motive gegen eine mRNA gerichtet werden. Werden die verschiedenen Motive shRE1A-785 und shRE1A-736 kombiniert eingesetzt, so ist die Repression der Ziel-mRNA stärker, als beim Einsatz eines sich wiederholenden Motivs.

3.4.3 Ermittlung von Zielsequenzen gegen E1B, E4, pTp und AdPol

Zur Ermittlung von shRNAs gegen die adenoviralen Gene E1B, E4, pTp und AdPol wurden über den oben beschriebenen shRNA-Designalgorithmus die Zielsequenzen bestimmt und als shRNA unter der Kontrolle des p53-sensitiven Promotors prMinRGC kloniert. Diese wurden mittels des beschriebenen psiCheck-Systems auf ihre RNAi-Effizienz untersucht. Dazu wurden auch die verschiedenen psiCheck-Konstrukte mit den entsprechenden mRNA-Sequenzen in der 3'-UTR der *renilla* Luciferase generiert (s. 5.1.5.2, S. 66). Zur Durchführung wurden die shRNA-Vektoren mit den entsprechenden psiCheck-Vektoren in HepG2-Zellen kotransfiziert und die Luciferaseaktivität mittels Dual-Luciferase Assay ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

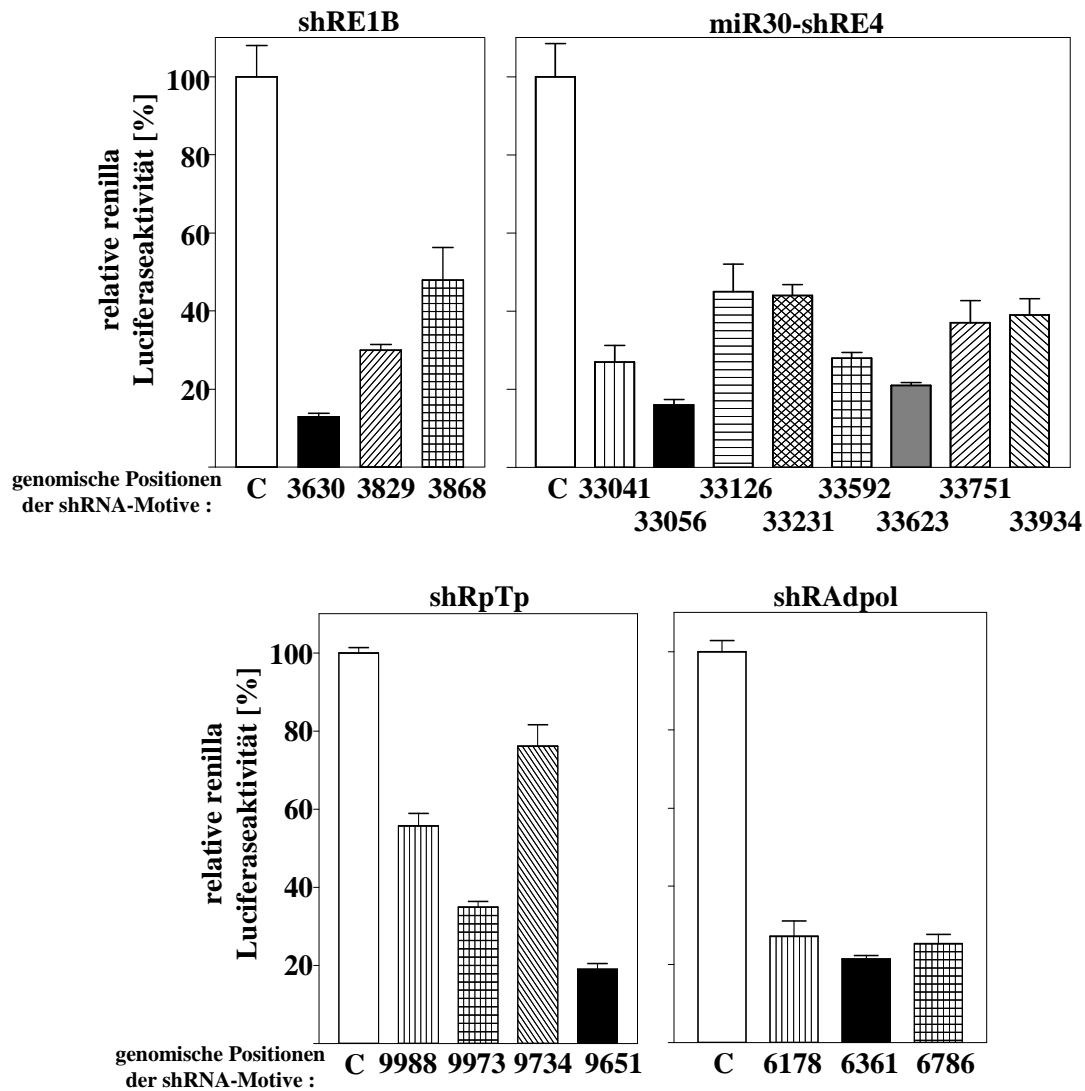


Abb. 12: RNAi-Effizienz diverser shRNAs gegen die Ziel-mRNAs von E1B, E4, pTp und AdPol. Die konstruierten shRNA wurden mit den entsprechenden psiCheck-Konstrukten kotransfiziert und die Effizienz der shRNA-Motive mittels Dual-Luciferase Assay gemessen. Die effizientesten shRNAs, die zur Virusgenerierung ausgewählt wurden, sind als schwarze Balken dargestellt.

Die effizientesten shRNAs, dargestellt als schwarze Balken (s. Abb. 12: shRE1B-3630, shRE4-33056, shRE4-33623, shRpTp-9651 und shRAdpol-6361), wurden zusammen mit den oben beschriebenen shRE1A-Konstrukten in konkatemerer Anordnung für das antivirale RNAi-Transkript kloniert.

3.5 p53-inhibierte, RNAi-kontrollierte Adenoviren (RNAi-Viren)

3.5.1 Schematische Darstellung der erstellten Adenoviren

Zur Klonierung von Adenoviren wurden zunächst entsprechende *Shuttle*-Vektoren generiert. Diese konnten dann im nächsten Schritt in den Adenovirusvektor (pAdHM4) inseriert werden. Der Aufbau der *Shuttle*-Vektoren ist schematisch in Abb. 13 dargestellt.

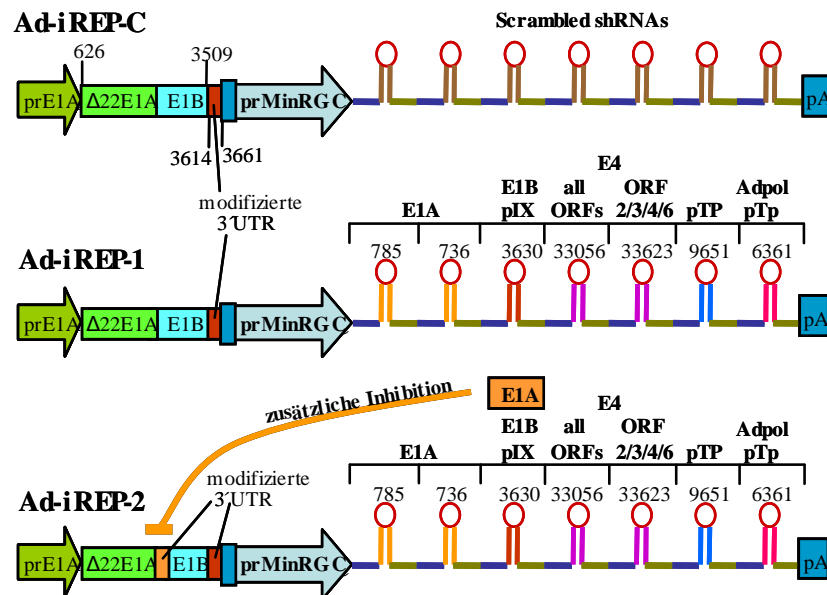


Abb. 13: Schematische Darstellung der p53-selektiven, RNAi-kontrollierten *Shuttle*-Vektoren. Die Vektoren bestehen aus den Einheiten der für die Replikation notwendigen rekombinanten E1-Region und der p53-selektiv-regulierten Transkription der shRNA-Kette. Das Kontrollvirus (Ad-iREP-C) enthält eine shScr-Kette unter der Kontrolle des Promotors prMinRG C. Die Viren Ad-iREP-1 und Ad-iREP-2 enthalten die inhibitorische RNAi-Transkriptionseinheit, wobei Ad-iREP-2 im 3'UTR des E1A eine zusätzliche Sequenz enthält, die durch die shRNAs shRE1A-785, shRE1A-736 und shRE1B-3630 additiv inhibiert werden kann.

Die Vektoren basieren auf zwei Einheiten. Da der eingesetzte Adenovirusvektor, pAdHM4 E1- und E3-Region deletiert ist, musste die E1-Region mit im *Shuttle*-Vektor übernommen werden, um die Replikationsfähigkeit des rekombinanten Virus zu ermöglichen. Als weitere Einheit wurde die p53-abhängige Transkriptionskassette des in 3.4 ermittelten RNAi-Netzwerks inseriert.

Die E1-Region wurde jedoch nicht in ihrer ursprünglichen Version kloniert. Das E1A-Gen wurde dahingehend verändert, dass N-terminal 22 Aminosäuren nach der Startaminosäure deletiert wurden, um eine negative Beeinflussung zwischen E1A und p53/p300 zu reduzieren. Diese Variante des E1A ($\Delta 22E1A$) ist noch in der Lage die Virusreplikation ähnlich stark wie wildtyp E1A zu induzieren. Desweiteren wurde das 3'-UTR des E1B-Transkripts mit der Adenovirussequenz von 3614 bis 3661 ergänzt. Die im RNAi-Netzwerk eingesetzte shRE1B

ist gegen die genomische Position 3630 gerichtet. Dieser Bereich ist im wildtyp Virus Bestandteil des E1B-3'-UTR. Durch die Klonierung von rekombinanten Adenoviren nach dem hier eingesetzten Klonierungssystem wird dieser Bereich ausgegrenzt und ist nicht mehr Bestandteil des 3'-UTR der E1B-Transkripte. Um jedoch mit shRE1B-3630 auch die Inhibition von pIX zu ermöglichen wurde die Zielsequenz mit der Position 3630 ausgewählt und in das 3'-UTR des hier klonierten E1B durch Oligonukleotide wieder ergänzt.

Diese generierte E1-Region gefolgt von einer p53-abhängigen *scramble-hairpin*-Kassette wurde zur Basis von Ad-iREP-C. Wurde stattdessen die gegen Adenovirus gerichtete RNAi-Kassette eingesetzt, so ergab sich Ad-iREP-1. Ad-iREP-2 wurde aus Ad-iREP-1 abgeleitet, indem weitere Zielsequenzen von shRE1A-785, shRE1A-736 und shRE1B-3630 in das 3'UTR des E1A-Transkripts über ein Oligonukleotid kloniert wurde, um eine weitere additive Repression mit den schon zur Verfügung stehenden shRNAs der RNAi-Kassette zu ermöglichen.

3.5.2 p53-selektive RNAi im adenoviralen Kontext

Die Funktion des RNAi-Netzwerkes wurde zunächst mittels E1A-Westernblot untersucht. Das Expressionsniveau von E1A ist ein wichtiger Indikator für den Status der Virusreplikation. Durch die Beeinflussung der E1A-Expression kann die Viruspropagation kontrolliert werden.

Zur Untersuchung wurden die Zelllinien HepG2, A549 (beide mit wildtyp p53-Status) und Huh7 (C220 p53-Mutante) mit den *Shuttle*-Vektoren transfiziert oder mit den daraus generierten Adenoviren infiziert. Anschließend wurden die Proteine isoliert und das E1A-Niveau mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Westernblot dargestellt. Das Ergebnis ist in Abb. 14 dargestellt.

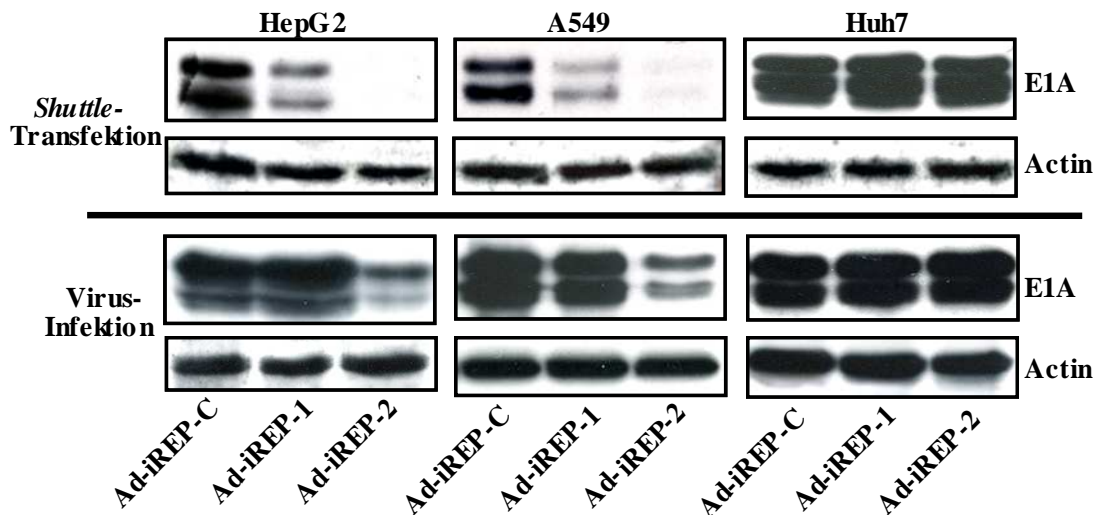


Abb. 14: Die E1A-Expression des Ad-iREP-2-Virus ist in p53-positiven Zellen selektiv inhibiert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden *Shuttle*-Vektoren oder den daraus abgeleiteten Viren infiziert. 24 h nach Transfektion bzw. Infektion wurden Proteine isoliert und nach einer Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Westernblot-Analyse mit Hilfe des E1A-Antikörpers nachgewiesen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Abb. 14 zeigt das Ergebnis des E1A-Westernblots nach Transfektion der *Shuttle*-Vektoren (oberer Teil) oder nach viraler Infektion (unterer Teil) von Ad-iREP-C, Ad-iREP-1 und Ad-iREP-2.

In p53-positiven Zellen ist deutlich zu erkennen, dass die E1A-Expression bei Transfektion der *Shuttle*-Vektoren von Ad-iREP-1 und -2 gegenüber der Kontrolle Ad-iREP-C reduziert ist. Die Transfektion des Ad-iREP-2 *Shuttle*-Vektors, mit den zusätzlichen Zielsequenzen im 3'-UTR der E1A-Transkripte, führte dabei zu einer höheren Repression. In p53-disfunktionalen Zellen, wie Huh7, ist dagegen kein Unterschied im E1A-Level zu verzeichnen.

Vergleicht man nun das E1A-Expressionsniveau nach viraler Infektion, so fällt gegenüber der Transfektionsuntersuchung auf, dass mit Ad-iREP-1 sowohl in p53-positiven, als auch in p53-mutierten Zellen kein Unterschied zu erkennen ist. Nur Ad-iREP-2 führte zu einer deutlichen Repression der E1A-Expression in p53-positiven HepG2- und A549-Zellen. Die Manipulation des 3'-UTR der E1A-Transkripte führte zu einer deutlich effizienteren RNAi. Somit konnte im viralen Kontext nur mit dem Virus Ad-iREP-2 eine erfolgreiche p53-selektive RNAi induziert werden.

3.5.3 p53-abhängige Inhibition der adenoviralen Zielgenexpression mittels RNAi

Weitere adenovirale Zielgene wurde auf ihre Repression mit den generierten Viren untersucht. Dazu wurden A549-Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert und RNA zur Detektion isoliert. Das Ergebnis der quantitativen Reversen Transkriptase PCR (qRT-PCR) ist in Abb. 15 dargestellt.

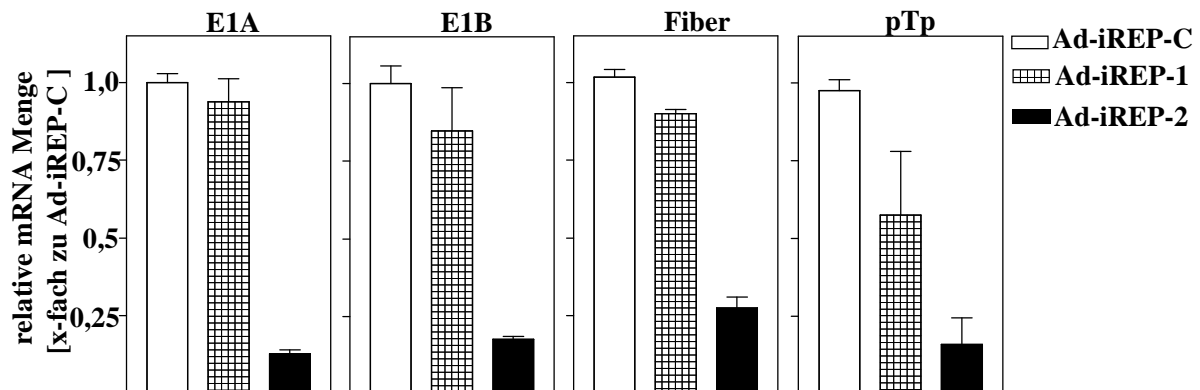


Abb. 15: Ad-iREP-2 inhibiert die Expression adenoviraler Gene in p53-positiven A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit den RNAi-Viren infiziert und nach 36 h die Gesamt-RNA isoliert. Die nachzuweisende mRNA wurde nach einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR mit spezifischen Primern ermittelt. Abgeglichen wurde über die zelluläre GAPDH-mRNA.

Das Ergebnis zeigt, dass die Expressionsniveaus der Zielgene, wie E1A, E1B und pTp bei Ad-iREP-2 deutlich reduziert sind. Zur Kontrolle wurde auch die Expression des nicht durch die shRNA-Kassette regulierten Fiber-Gens untersucht. Auch hier ist eine Reduktion mit Ad-iREP-2 gegenüber der Kontrolle Ad-iREP-C zu beobachten. Diese Reduktion ist auf die Inhibition der viralen DNA-Replikation als Folge der RNAi zurückzuführen, da eine verminderte DNA-Menge auch zur Reduktion viraler Genexpression führt. Jedoch ist zu erkennen, dass die Reduktion der Fiber-Genexpression im Vergleich zu der Reduktion der Zielgene (E1A, E1B, pTp) geringer ausfällt, was auf die funktionelle Rolle der entsprechenden *hairpins* der shRNA-Kassette hindeutet.

3.6 p53-Selektivität der RNAi-Viren

Nachdem beobachtet wurde, dass der RNAi-Mechanismus im adenoviralen Kontext zumindest mit Ad-iREP-2 funktioniert, wurde nun die p53-selektive Inhibition der Virusgenerierung in verschiedenen p53-positiven sowie -negativen Zelllinien untersucht.

3.6.1 Replikationkinetiken in Gegenwart und Abwesenheit von aktivem p53

Die p53-abhängige Inhibition der Propagation von viralen Partikeln wurde durch den Vergleich des viralen Titer nach Infektion von verschiedenen Zelllinien ermittelt. Dazu wurden die Zelllinien A549 (p53-positiv), Hep3B (p53-negativ) und Huh7 (p53-mutiert) infiziert und nach den angegebenen Zeiten der virale Titer bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Virusvermehrung in den jeweiligen Zelllinien ist in Abb. 16 dargestellt.

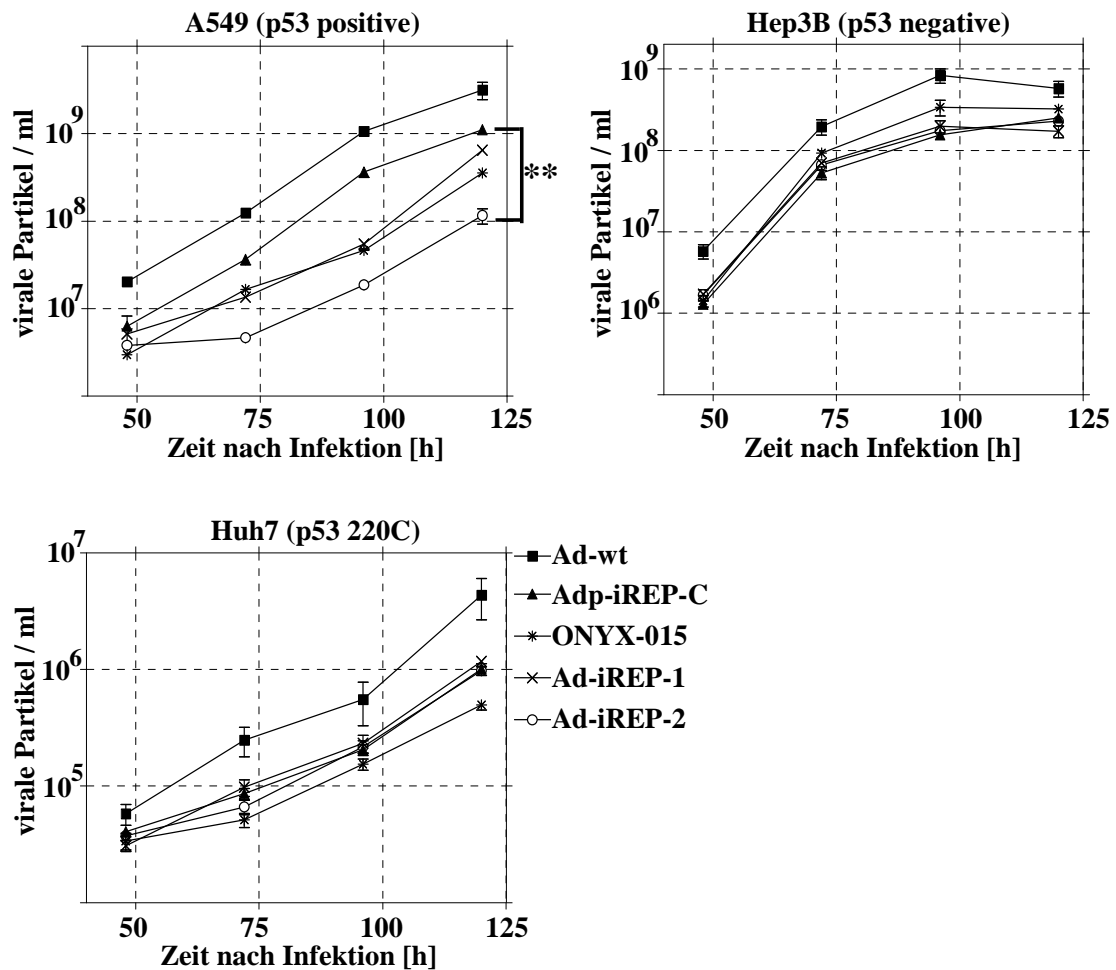


Abb. 16: Die Replikation des Virus Ad-iREP-2 ist nur in p53-positiven A549-Zellen inhibiert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Viren mit einer MOI von 0,01 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und nach drei Einfrier/Auftau-Zyklen der infektiöse Titer im Lysat bestimmt (** statistisch Signifikanz, $P = 0,0067$).

Das Ergebnis der Abb. 16 zeigt, dass die effizienteste Inhibition der viralen Replikation in Gegenwart von p53 (A549) durch Ad-iREP-2 erzielt werden konnte.

ONYX-015 und Ad-iREP-1 erreichen in A549 vergleichbare Titer, jedoch geringere im Vergleich zu Ad-wt oder der Kontrolle Ad-iREP-C. Ad-iREP-2 hat in A549-Zellen im Vergleich zu den beiden p53-selektiven Viren Ad-iREP-1 und ONYX-015 einen niedrigeren

Titer. Vergleicht man nun die Replikationskinetik in der p53-deletierten Zelllinie Hep3B, so zeigt sich, dass alle RNAi-Viren ungefähr gleich stark replizieren, jedoch schwächer sind als Ad-wt. Auch ONYX-015 repliziert in dieser Zelllinie sehr stark. Betrachtet man die Zelllinie Huh7, so wird deutlich, dass die Replikation von ONYX-015 im Vergleich zu den RNAi-Viren schwächer ist. Die starke Replikation in Hep3B-Zellen von ONYX-015 liegt in der Komplementation der E1B-55k-Deletion durch das HBx-Antigen, das diese Zelllinie aufgrund der viralen Transformation durch das Hepatitis B-Virus enthält. Bei nicht viral transformierten Zellen, wie Huh7 und A549 konnte eine p53-Selektivität nur in Bezug auf Ad-iREP-2 beobachtet werden.

3.6.2 *in vitro* Onkolyse

Genetische Manipulationen von Adenoviren können die Replikation stark beeinflussen. Daher wurde auch die Lysestärke der Viren miteinander verglichen. Zur Darstellung der Lysefähigkeit wurden die Zelllinien mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert. Nicht lysierte Zellen konnten anschließend mittels Kristallviolett gefärbt werden. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

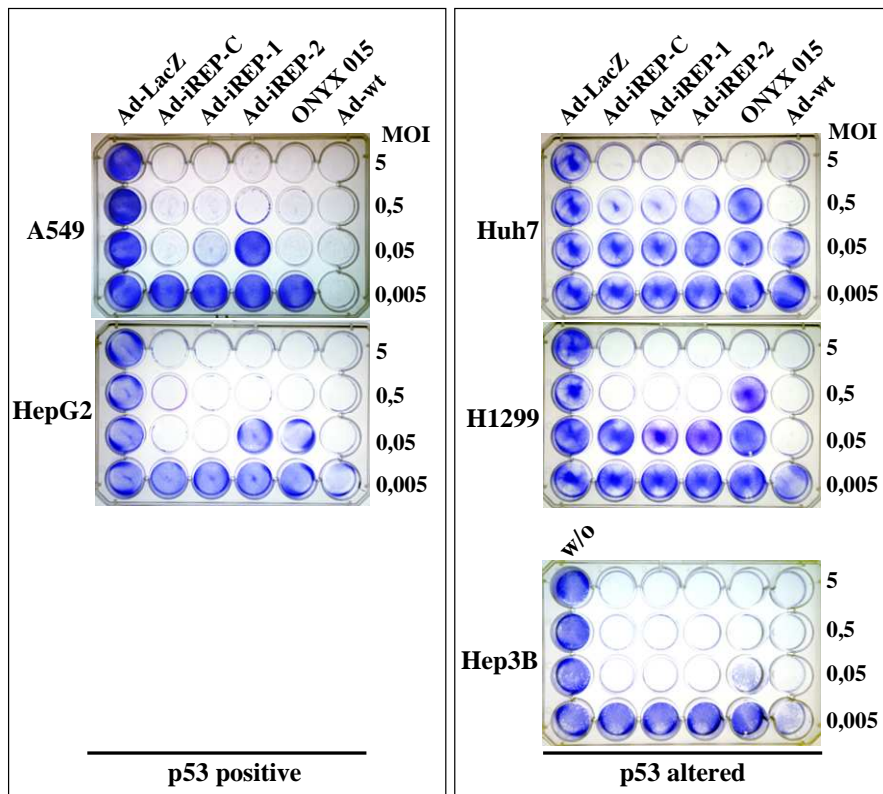


Abb. 17: Ad-iREP-2-vermittelte Zytolyse zeigt eine p53-Selektivität. Die verschiedenen Zellen wurden mit den angegebenen Viren und den jeweiligen Verdünnungen infiziert. 8 bis 10 Tage nach der Infektion konnten nicht lysierte Zellen mittels Kristallviolett angefärbt werden.

Die Abb. 17 zeigt die Onkolyse der verschiedenen Viren in Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status. Es ist zunächst zu erkennen, dass die Lyse durch Ad-iREP-2 in HepG2 und A549 gegenüber den Viren Ad-iREP-C, Ad-iREP-1 und ONYX-015 abgeschwächt ist. In p53-disfunktionalen Zellen ist die Lysestärke von Ad-iREP-2 dagegen vergleichbar mit Ad-iREP-C und Ad-iREP-1, sowie stärker als ONYX-015.

Obwohl Ad-iREP-1 und ONYX-015 einen geringeren viralen Titer in A549 aufwiesen (s. Abb. 16) als Ad-iREP-C, reichte dies nicht für eine p53-selektive Inhibition der Lyse.

Die Lyse der RNAi-Viren erreichte nicht die Stärke von Ad-wt, jedoch konnte gezeigt werden, dass die RNAi-Viren in p53-disfunktionalen Zelllinien Huh7 und H1299 eine höhere Lyse vorweisen als ONYX-015. Aufgrund der viralen Transformation von Hep3B-Zellen kann ONYX-015 nur in diesen Zellen eine vergleichbare Lyse wie die RNAi-Viren erzielen.

3.6.3 DNA-Replikation in Fibroblasten

Die Anwendung von Tumorzellen zur p53-selektiven Untersuchung reflektieren nicht die optimalen Bedingungen einer p53-Antwort von Primärzellen. Um bei der Untersuchung der p53-selektiven Replikation der Viren einem *in vivo* Modell näher zu kommen, wurde die

virale DNA-Replikation in humanen Lungenfibroblasten (IMR-90) untersucht. Da die Fibroblasten unter natürlichen Umständen nicht mit Adenoviren infizierbar sind, konnte in diesen Zellen keine Viruspropagation oder Onkolyse dargestellt werden. Für diese Experimente sind mehrere Infektionszyklen notwendig.

Zur Infektion der Fibroblasten wurden die Viruspartikel mit dem CAR_{ex}-TAT Fusionsprotein beladen. Dies ermöglicht eine rezeptorunabhängige Infektion. Nach der Infektion wurde zu bestimmten Zeiten DNA isoliert und die Virus-DNA mittels quantitativer PCR untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.

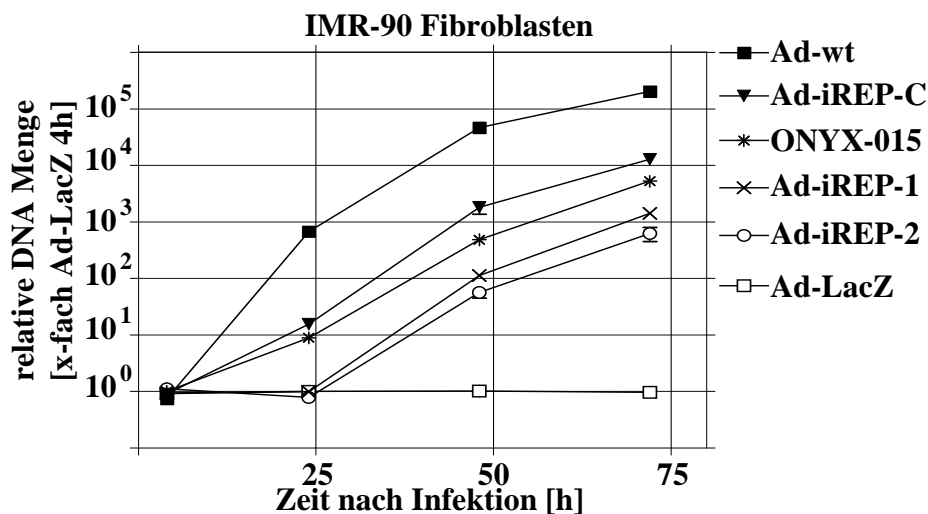


Abb. 18: In humanen Fibroblasten sind die Viren Ad-iREP-1 und Ad-iREP-2 deutlich inhibiert. IMR-90 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit CAR_{ex}-TAT beladenen Viren infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde die DNA isoliert und die virale DNA-Menge mittels quantitativer PCR über Hexon-spezifische Primer und Sonde bestimmt. Abgeglichen wurde mit der zellulären DNA über das Ubiquitin C-Gen.

Abb. 18 zeigt die virale DNA-Replikation in Abhängigkeit der Zeit in IMR-90-Fibroblasten. Die DNA-Replikation der RNAi-kontrollierten Viren Ad-iREP-1 und -2 sind gegenüber Ad-iREP-C und ONYX-015 blockiert. Die Inhibition der DNA-Replikation von Ad-iREP-1 gleicht Ad-iREP-2. Somit ist davon auszugehen, dass sich der RNAi-Mechanismus oder auch die p53-Antwort von primären Zellen und Tumorzellen unterscheiden.

3.7 Virotherapie mittels RNAi-Viren

3.7.1 Belastung der Mausleber durch virale Infektion

Ziel einer onkolytischen Virotherapie ist die selektive Beschränkung der Viruspropagation auf den Tumor. Zur Untersuchung, ob Virus auch außerhalb des Tumors repliziert, wurde das

Lebergewebe der Maus auf virale DNA-Vermehrung untersucht. Die Selektivität ist dahingehend von Bedeutung, da durch adenovirale Virotherapie aus dem Tumor freigesetzten Viren nicht nur den Tumor reinfizieren. Ein großer Anteil der in den Tumor injizierten und später durch Onkolyse freigesetzten Viren führt zur Infektion der Hepatozyten. Daher ist es sehr wichtig, dass die Replikationskontrolle mittels p53-abhängiger RNAi in der Leber erfolgreich ist. Im Mausgewebe können humane Adenoviren zwar keine viralen Partikel generieren, jedoch die virale DNA-Replikation in Gang bringen. Die virale DNA-Menge wurde als Anhaltspunkt der Selektivität herangezogen. Dazu wurden zunächst Nacktmäuse mit den Viren intravenös injiziert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde die Leber entnommen und die DNA isoliert. Mittels quantitativer PCR konnte der Anteil viraler DNA detektiert werden. Das Ergebnis ist in Abb. 19 gezeigt.

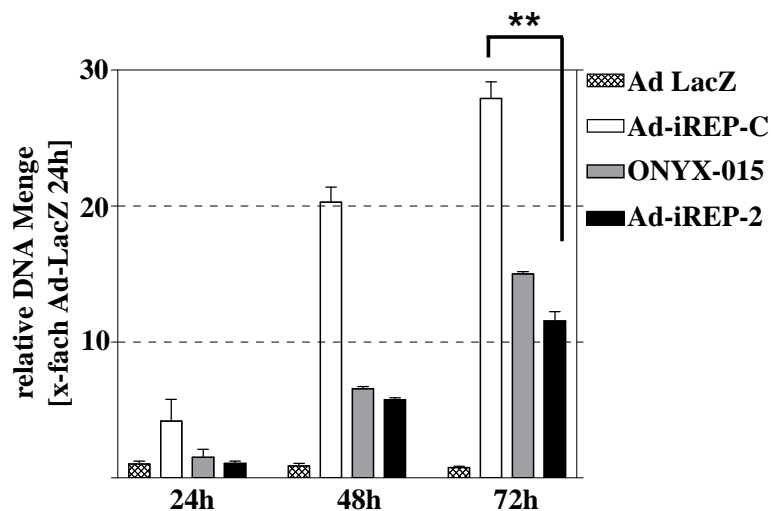


Abb. 19: Die Ad-iREP-2 DNA-Replikation ist in der Leber im Vergleich zur Kontrolle Ad-iREP-C inhibiert. Die angegebenen Viren wurden mit 1×10^7 PFU in NMRI-nu/nu Mäuse intravenös injiziert. Nach angegebenen Zeitwerten wurde die Leber entnommen und die DNA isoliert. Die virale DNA konnte dann mittels spezifischen Hexon-Primern und qPCR ermittelt werden. Dabei wurde mit dem zellulären Genom über das 18S-Gen abgeglichen (** statistisch Signifikanz, $P = 0,0037$).

Abb. 19 zeigt die virale DNA-Replikation der verschiedenen Viren in der Leber der Maus nach intravenöser Gabe. Dabei ist zu beobachten, dass Ad-iREP-2 zwar gegenüber der Kontrolle Ad-iREP-C eine signifikant geringere Replikation aufweist, jedoch die Inhibition nicht sehr stark ist. Bei intravenöser Gabe ist von einer ungleichmäßigen Infektion der Leber auszugehen. Dabei werden die mit großer Virusmenge in Berührung kommenden Leberzellen überdurchschnittlich hoch mit Viruspartikel beladen und eine gleichmäßige Infektion des Lebergewebes bleibt aus. Es entstehen Partialbereiche mit hoher Infektion und Bereiche ohne Infektion. Um die Untersuchung der Virusbeladung der Leber einem virotherapeutischem

Ansatz anzugleichen, wurden zunächst Hep3B-Zellen mit den jeweiligen Viren infiziert und diese dann der Maus intravenös injiziert. Diese Methodik hat den Vorteil, dass die Viren nicht gleichzeitig die Leber erreichen, sondern mit der Zeit aus den Hep3B-Zellen in das Blutsystem freigesetzt werden und somit das Lebergewebe gleichmäßig infizieren können. Nach den angegebenen Zeitpunkten nach Injektion wurde die Leber entnommen und die DNA isoliert. Mittels qPCR konnte der Anteil viraler DNA detektiert werden. Das Ergebnis ist in Abb. 20 gezeigt.

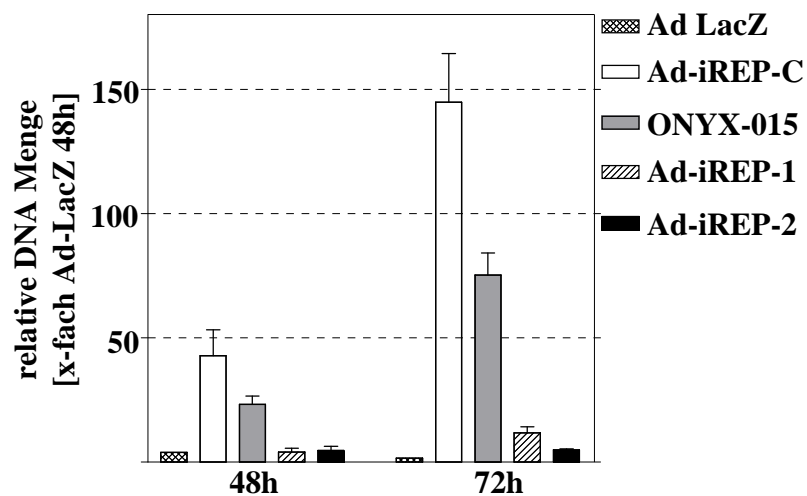


Abb. 20: Im virotherapeutischen Ansatz ist die DNA-Replikation der Viren, Ad-iREP-1 und Ad-iREP-2 in der Leber der Maus signifikant inhibiert. Mit den entsprechenden Viren infizierte Hep3B-Zellen wurden in NMRI-nu/nu Mäuse intravenös injiziert. Nach bestimmten Zeitwerten wurde die Leber entnommen und die DNA isoliert. Die virale DNA konnte dann mittels spezifischen Hexon-Primern und qPCR ermittelt werden. Dabei wurde mit dem zellulären Genom über das 18S-Gen abgeglichen.

Das Ergebnis zeigt eine deutliche Selektivität mittels RNAi von Ad-iREP-1 und Ad-iREP-2 gegenüber der Kontrolle Ad-iREP-C und ONYX-015 in Mausleber. 72 h nach der Gabe der infizierten Zellen beobachtet man jedoch, dass die Inhibition der Replikation von Ad-iREP-1 gegenüber Ad-iREP-2 oder einem nichtreplikativen Ad-LacZ langsam abnimmt.

3.7.2 *in vivo* Onkolyse

Zur Untersuchung, ob sich die generierten Viren zur Lyse von Tumoren eignen, wurde ein *in vivo* Onkolyse-Modell verwendet. Dazu wurden humane Tumorzellen in die linke Flanke der Maus xenotransplantiert. Nach Erreichen einer Tumorgröße von 200 mm³ wurde der Tumor virotherapeutisch behandelt. Zur Untersuchung wurde das in der p53-Selektivität beste Ergebnis liefernde Virus Ad-iREP-2 mit ONYX-015 verglichen. Es wurden die p53 negativen

Tumorzelllinien H1299 und Hep3B eingesetzt. Das Ergebnis der *in vivo* Onkolyse ist in Abb. 21 dargestellt.

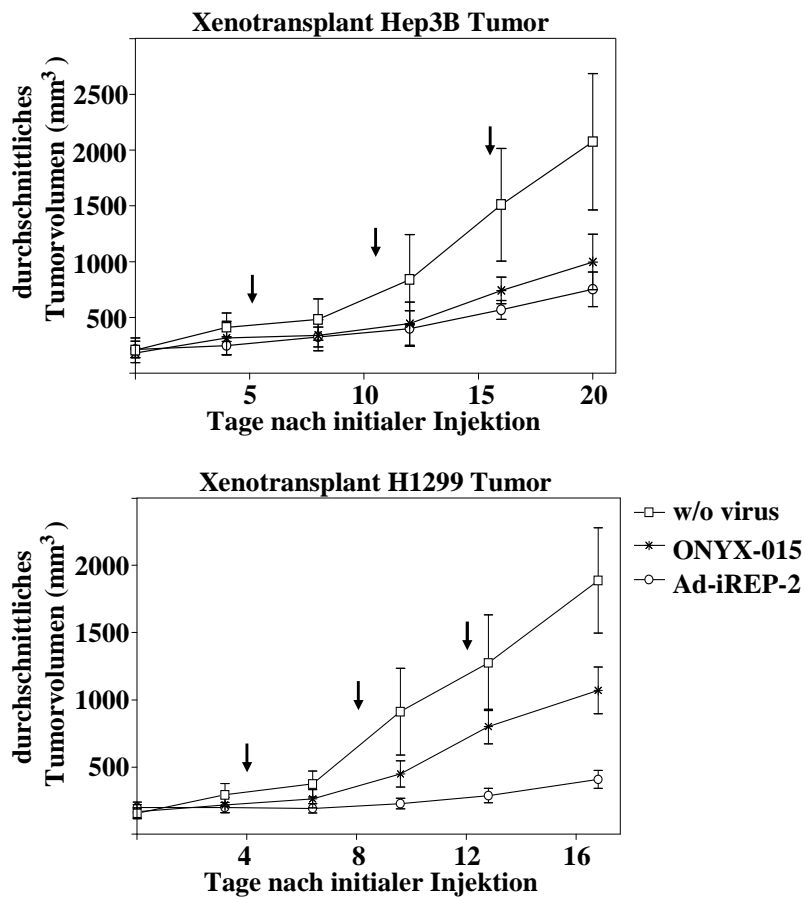


Abb. 21: Ad-iREP-2 kann xenotransplantierte Tumoren in ihrem Wachstum inhibieren. Hep3B bzw. H1299 Tumorzellen wurden in die linke Flanke der Maus s.c. injiziert. Nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 200 mm³ wurden die Tumoren mit den Viren (3×10^8 PFU) behandelt. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Virusinjektionen an.

Abb. 21 zeigt, dass Ad-iREP-2 und ONYX-015 das Wachstum von Hep3B-Tumoren stark inhibieren. Betrachtet man H1299-Tumoren so ist die Tumorlyse durch Ad-iREP-2 deutlich effektiver als durch den Einsatz von ONYX-015.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse zu den RNAi-Viren gezeigt, dass Ad-iREP-2 eine p53-Selektivität aufweist und für die Therapie p53-alerierter Tumoren in Rahmen der hier verwendeten Methoden verwendet werden kann.

3.8 Konstruktion und Charakterisierung eines Gal4-reprimierbaren hTert-Promotors

3.8.1 Schematische Darstellung des hTertgal-Promotors

Für den zweiten Ansatz zur Generierung tumorselektiver Adenoviren wurde zunächst ein Gal4-reprimierbarer hTert-Promotor konstruiert. Dazu wurde der hTert-Core-Promotor mit den Gal4-Bindesequenzen durch direkte Klonierung sowohl *upstream* als auch *downstream* versehen. Die so erstellte Promotor-Mutante hTertgal ist in Abb. 22 schematisch dargestellt.

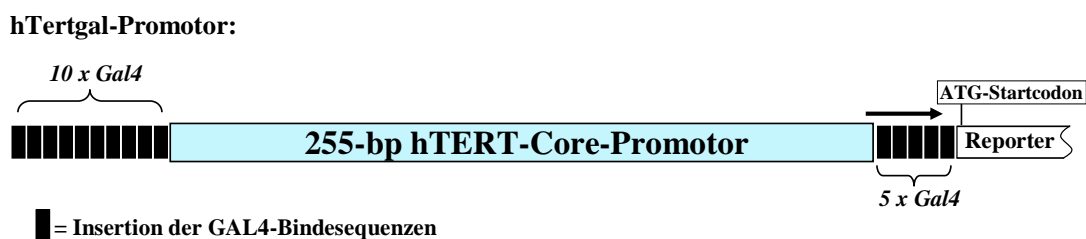


Abb. 22: Schematische Darstellung des hTertgal Promotors.

3.8.2 Repression des rekombinanten hTertgal-Promotors

Die konstruierte Promotormutante hTertgal konnte mittels eines Luciferasereporters auf Repression durch das Gal4-KRAB-Fusionsprotein untersucht werden. Dazu wurden HepG2-Zellen mit dem hTertgal-Luc-Konstrukt und dem Gal4-KRAB-Repressor kotransfiziert. Das Ergebnis der Luciferaseanalyse ist in Abb. 23 dargestellt.

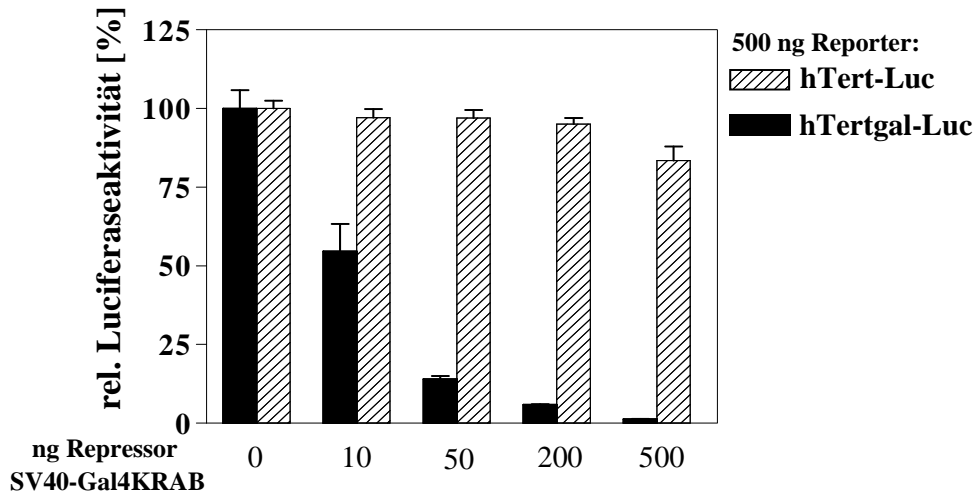


Abb. 23: Die hTertgal-Promotormutante ist sehr effektiv durch das Gal4-KRAB-Fusionsprotein reprimierbar. HepG2-Zellen wurden jeweils mit den Reportern hTert-Luc bzw. hTertgal-Luc und verschiedenen Mengen von dem SV40-Gal4KRAB-Konstrukt kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Abb. 23 zeigt die Stärke der Inhibition des hTertgal-Promotors in Abhängigkeit von der Repressorkonzentration. Durch die Zunahme des Repressors, Gal4-KRAB steigt auch die Repressionswirkung. Die deutliche Abnahme der Luciferaseaktivität ist nur mit der Promotor-Mutante hTertgal zu beobachten. Der naive hTert-Promotor ist nicht durch das Gal4-KRAB-Fusionsprotein reprimierbar. Wird das Gal4-KRAB-Expressionskonstrukt in der gleichen Menge wie der Reporter kotransfiziert (hier 500 ng) so erreicht man die wirksamste Repression.

3.8.3 Repressionsvergleich mit weiteren durch Gal4-KRAB reprimierbaren Promotoren

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Repressionswirkung von Gal4-KRAB auf den rekombinanten Promotor hTertgal und verschiedenen viralen Promotormutanten, die auch die Gal4-Bindesequenzen in gleicher Anordnung wie der hTertgal-Promotor enthalten, verglichen. Dazu wurden die Konstrukte mit dem Gal4-KRAB-Expressionskonstrukt in H1299- und HepG2-Zellen kotransfiziert und mittels Luciferaseassay untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt.

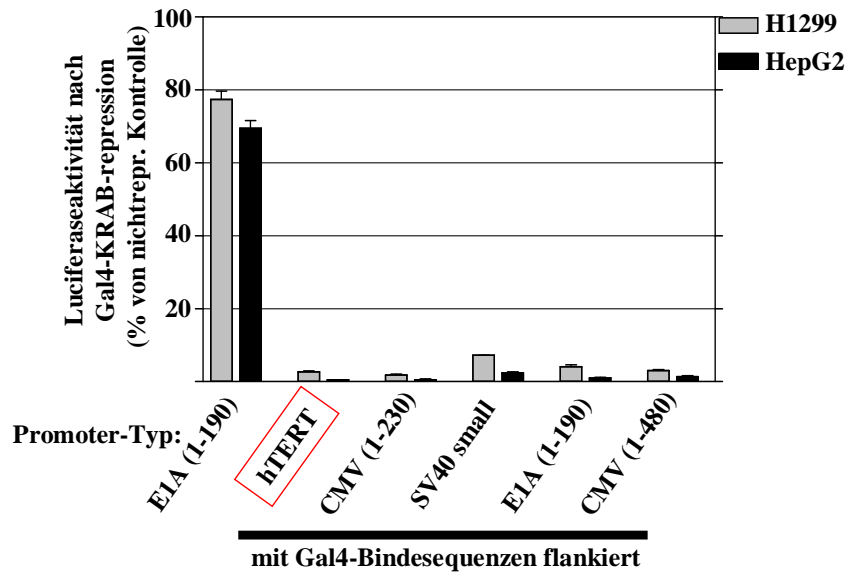


Abb. 24: Die Gal4-KRAB-abhängige Repression von verschiedenen Promotormutanten, die die Gal4-Bindesites enthalten, ist sehr effektiv. H1299- und HepG2-Zellen wurden jeweils mit den Konstrukten, die Gal4-Bindesequenzen flankierende Promotoren zur Expression der *firefly* Luciferase enthalten, und dem Gal4-KRAB-Expressionskonstrukt SV40-Gal4KRAB kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Das Ergebnis zeigt, dass die Inhibition des hTertgal-Promotors durch Gal4-KRAB vergleichbar mit der Repression des CMV_{230gal} Promotors ist. Im Vergleich mit den Promotoren SV40gal und E1Agal ist die repressive Wirkung auf hTertgal stärker und eignet sich somit gut für die Inhibition durch Gal4-KRAB.

3.9 Die Eigenschaften von E1B-55k und seiner alternativen Spleißvariante E1B-156R bezüglich der p53-Inhibition

Bei der Generierung p53-selektiver Adenoviren ist die p53-Degradation durch bestimmte Adenovirusgene, wie durch das E1B-55k, ein limitierender Faktor für den Einsatz der Viren in hohen Dosen. Daher ist dieses E1B-55k-Protein in dem onkolytischen Virus ONYX-015 deletiert. E1B-55k spielt eine aktive Rolle bei der Inaktivierung von p53. Die Folge ist in der Regel, dass die Infektion von p53-positiven Zellen mit einer hohen Viruslast zu einer Aufhebung der Selektivität führt. Daher wurde untersucht, ob eine alternative Spleißvariante, E1B-156R, statt des E1B-55k eingesetzt werden kann. E1B-156R beeinflusst nicht p53, kann aber die sonstigen Funktionen des E1B-55k, wie mRNA Transport und Transformation der infizierten Zellen, übernehmen (96). Dazu wurde zunächst untersucht, ob p53 in Gegenwart von E1B-156R transkriptionell aktiv bleibt. Adenovirale Protein-Expressionskonstrukte

wurden mit einem p53-selektiven Luciferase-Expressionskonstrukt kotransfiziert und mittels Luciferasemessung untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 25 dargestellt.

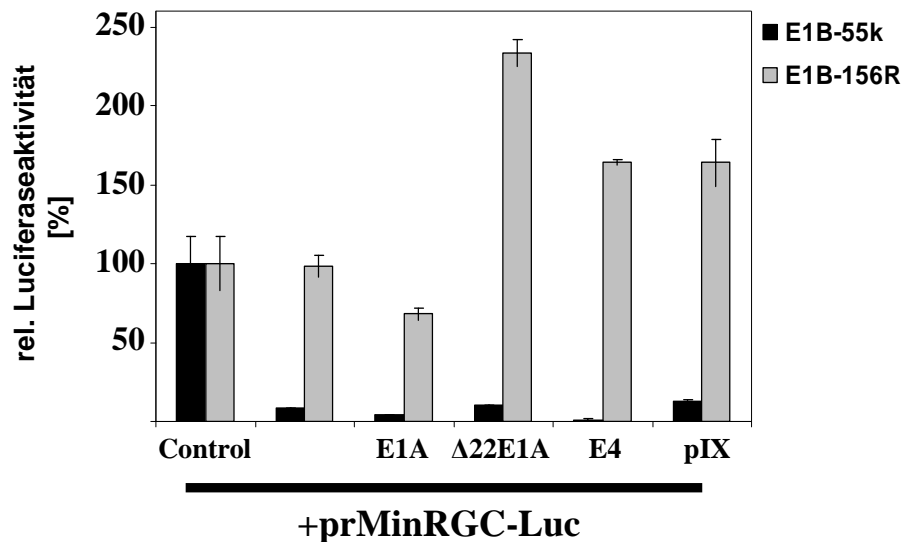


Abb. 25: Durch E1B-156R wird die transkriptionelle Aktivität von p53 auch in Gegenwart weiterer adenoviraler frühen Gene nicht beeinflusst. Die beiden E1B-Expressionskonstrukte E1B-55k und E1B-156R, wurden mit weiteren adenoviralen frühen Genexpressionskonstrukten und einem p53-selektiven Luciferasekonstrukt in A549-Zellen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde CMV-LacZ kotransfiziert.

Das Ergebnis der Abb. 25 zeigt, dass E1B-156R im Gegensatz zu E1B-55k keinen Einfluss auf die Aktivität von p53 in Bezug auf Transkription von p53-abhängigen Genen hat. E1B-55k entfaltet die wirksamste Inhibierung von p53 im Zusammenspiel mit E4. Δ22E1A und pIX haben keinen zusätzlichen Einfluss auf p53 bei Kotransfektion mit E1B-55k. Die adenoviralen frühen Genkonstrukte E4 und pIX beeinträchtigen zusammen mit E1B-156R nicht p53. Nur E1A kann mit E1B-156R noch p53 negativ beeinflussen. Setzt man stattdessen die N-Terminal deletierte Variante Δ22E1A ein, so zeigt sich eher eine Stabilisierung der p53-abhängigen Luciferaseexpression.

3.10 p53-inhibierte und hTert-Promotor-kontrollierte Adenoviren (p53T-Viren)

3.10.1 Schematische Darstellung der erstellten Adenoviren

Zur Klonierung der p53T-Adenoviren wurden *Shuttle*-Vektoren generiert. Aus diesen konnten die zu klonierenden Elemente weiter in den Adenovirusvektor insertiert werden. Die *Shuttle*-Vektoren der p53T-Viren sind schematisch in Abb. 26 dargestellt.

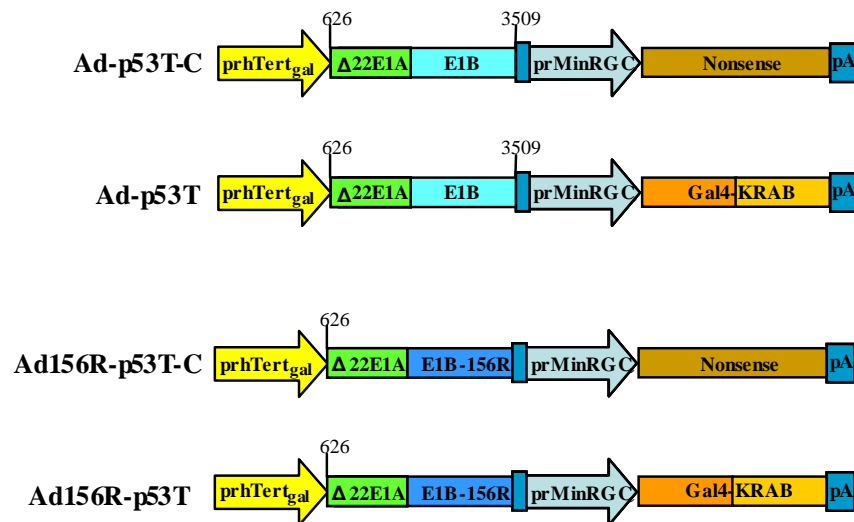


Abb. 26: Schematische Darstellung der p53T-Viren.

Die Vektoren wurden aus den Einheiten der Expressionskassette für die p53-selektive Transkription von Gal4-KRAB bzw. *Nonsense*-Transkripten (p53T-C) und einer rekombinanten E1-Region entworfen. Dabei sind die E1A-Gene 22 Aminosäuren N-Terminal deletiert und stehen unter der Kontrolle des hTertgal-Promotors. Für die E1B-Einheit wurden zwei verschiedene Basis-Vektoren kloniert. Zunächst wurde die E1B-Region in ihrer ursprünglichen Form beibehalten. Dazu gehören die beiden Viren Ad-p53T und die Kontrolle, Ad-p53T-C, die eine p53-abhängige Expressionskassette von *scramble*-shRNAs, wie in Ad-iREP-C enthält. Somit dient diese als Kontrolle zur Expression von *Nonsense*-Transkripten. Beim zweiten Basisvektor wurde der gesamte E1B-Transkriptom durch die alternative Spleißvariante E1B-156R ersetzt. Daraus wurden die Viren Ad156R-p53T und Ad156R-p53T-C abgeleitet.

3.10.2 p53-selektive Gal4-KRAB Expression im adenoviralen Kontext

Zur Untersuchung, ob die generierten Viren p53-selektiv Gal4-KRAB exprimieren, wurden p53-positive (A549) und p53-mutierte (Huh7) Zellen mit den entsprechenden Viren in Gegenwart und Abwesenheit von Doxorubicin infiziert und mittels Westernblot auf die Expression des Gal4-KRAB-Fusionproteins analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 27 dargestellt.

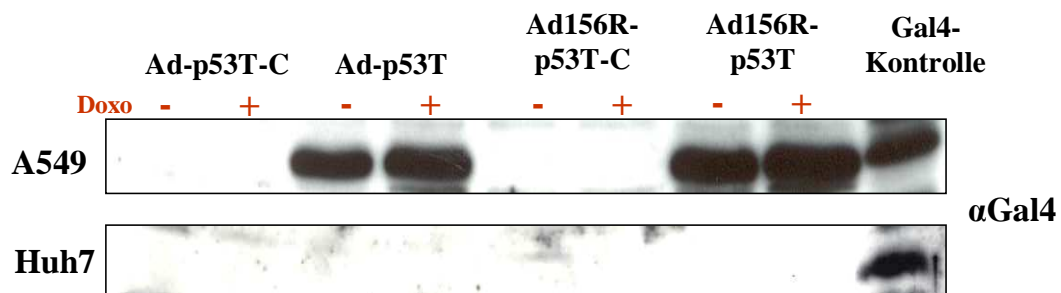


Abb. 27: In p53-positiven Zellen ist bei Ad-p53T und Ad156R-p53T eine Gal4-KRAB-Expression nachzuweisen. A549 und Huh7 Zellen wurden mit den jeweiligen Viren mit einer MOI von 5 infiziert. 36 h nach der Infektion wurden aus den Zellen Proteine zur hier dargestellten Westernblotanalyse gewonnen.

Das Ergebnis der Westernblotuntersuchung zeigt die p53-selektive Expression des Gal4-KRAB-Fusionproteins. Gal4-KRAB konnte nur in den p53-positiven A549-Zellen detektiert werden. Sowohl Ad-p53T als auch Ad156R-p53T konnten eine gute Expression aufweisen. Die Kontrollviren Ad-p53T-C und Ad156R-p53T-C enthalten kein Gal4-KRAB. In Huh7-Zellen konnte aufgrund der p53-Mutante, die transkriptionell inaktiv ist, keine Expression des Fusionproteins nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Doxorubicin, um die p53-Aktivität zu erhöhen, führt nicht zur Erhöhung der Gal4-KRAB-Expression.

3.10.3 p53-abhängige Inhibition der adenoviralen E1A-Expression

In der nachfolgenden Untersuchung sollte gezeigt werden, ob die p53-selektive Expression des Gal4-KRAB-Fusionproteins den rekombinanten hTertgal-Promotor blockieren kann, um somit die E1A-Expression in p53-positiven Zellen zu inhibieren. Dazu wurden Zellen mit unterschiedlichem p53-Status mit den entsprechenden p53T-Viren infiziert und mittels Westernblot auf ihr E1A-Niveau hin analysiert. Das Ergebnis des Westernblots ist in Abb. 28 dargestellt.

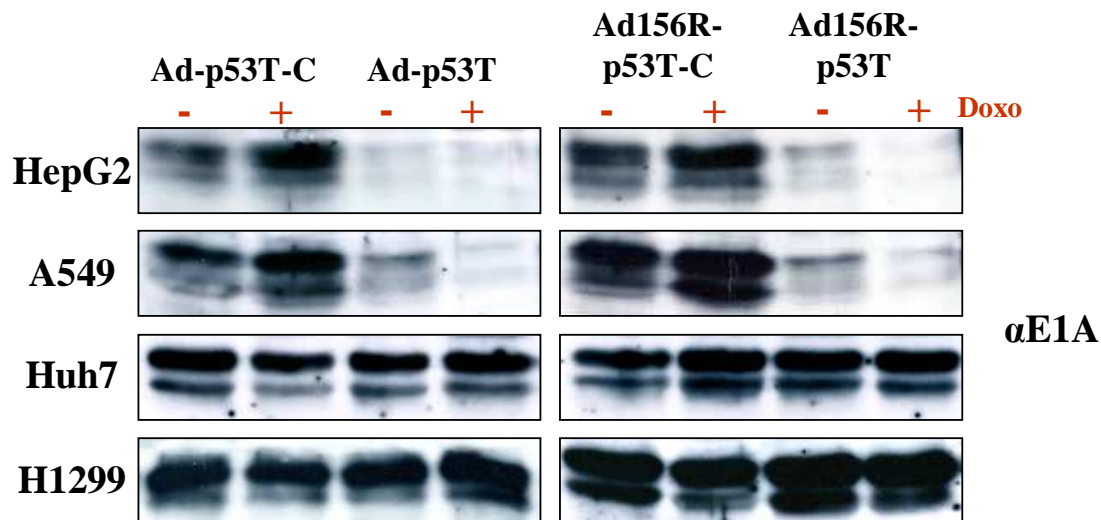


Abb. 28: Die E1A-Expression ist selektiv in p53-positive Zellen inhibiert. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit den entsprechenden Viren mit einer MOI 0,1 infiziert. 24 h nach der Infektion wurde aus den Zellen Proteine zur hier dargestellten Westernblotanalyse gewonnen.

Abb. 28 zeigt, dass die E1A-Inhibition p53-selektiv erfolgt. Eine Reduktion des E1A-Niveaus konnte nur in den p53-positiven Zellen (HepG2 und A549) und mit den Gal4-KRAB-exprimierenden Viren Ad-p53T und Ad156R-p53T nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Doxorubicin, um die p53-Aktivität zu erhöhen, führt nicht zu einer stärkeren Repression des E1A-Niveaus.

3.11 p53-Selektivität der p53T-Viren

Nachdem beobachtet werden konnte, dass die Viren Ad-p53T und Ad156R-p53T in der frühen Phase des adenoviralen Replikationszyklus p53-selektiv Gal4-KRAB exprimieren und somit die E1A-Expression im Vergleich zu ihren Kontrollen Ad-p53T-C und Ad156R-p53T-C inhibieren, wurde nun untersucht, wie sich dies auf die Partikelbildung und Lysefähigkeit auswirkt.

3.11.1 Replikationsstärke in Gegenwart und Abwesenheit von aktivem p53

Zunächst wurde in den Zelllinien A549 und Huh7 die Bildung von viralen Partikeln gemessen, wobei verschiedene onkolytischen Viren verglichen wurden. Dazu wurden die Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert und 96 h nach der Infektion wurden die gebildeten Viren detektiert. Eingesetzt wurden die oben dargestellten p53T-Viren, das wildtyp Adenovirus (Ad-wt), das onkolytische Virus ONYX-015 und Adp53sensor, der ähnlich wie

Ad-p53T (s. 3.10.1) aufgebaut ist, nur statt eines hTertgal-Promotors ein CMVgal-Promotor (s. 3.8.3) enthält. Das Ergebnis der viralen Titer aus verschiedenen Zelllinien ist in Abb. 29 dargestellt.

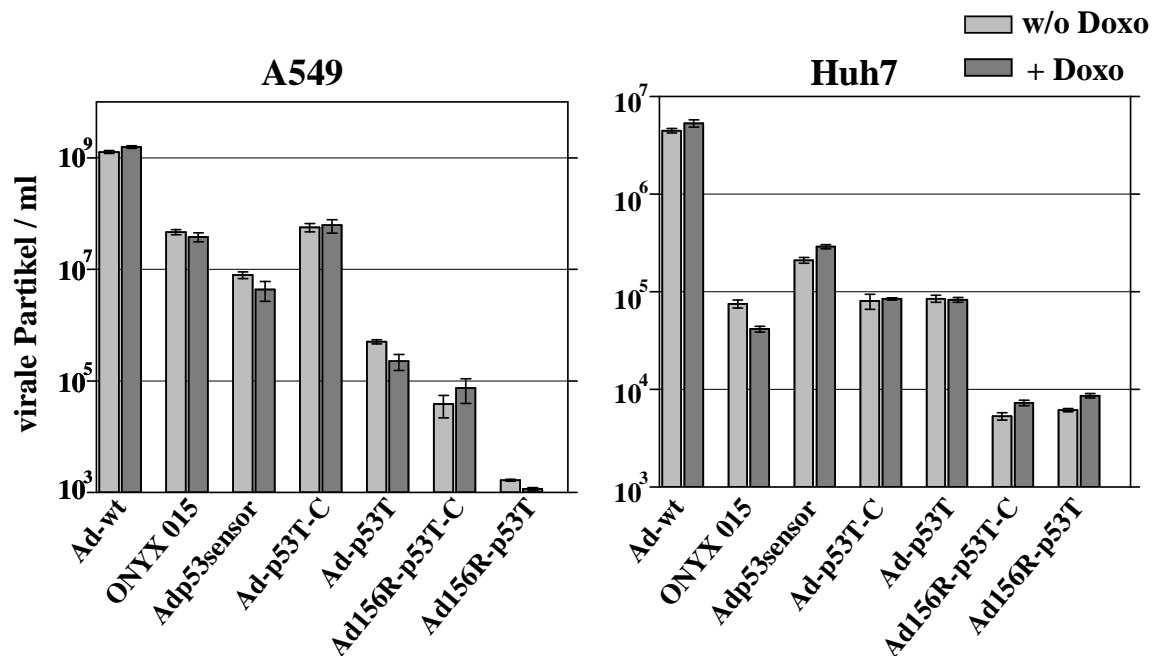


Abb. 29: Die p53T-Viren sind in p53-positiven A549-Zellen signifikant abgeschwächt. A549- und Huh7-Zellen wurden mit einer MOI 0,005 infiziert. 96 h nach der Infektion wurden die Zellen durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren lysiert. Anschließend wurde der infektiöse Titer ermittelt.

Abb. 29 zeigt, dass die Viren, Ad-p53T und Ad156R-p53T gegenüber ihren Kontrollen, Ad-p53T-C bzw. Ad156R-p53T-C eine p53-Selektivität beim Vergleich zwischen den Zelllinien Huh7 und A549 aufweisen. Die Selektivität ist beim Ad156R-p53T in A549 deutlicher zu erkennen, jedoch ist auch die dazugehörige Kontrolle Ad156R-p53T-C in dieser Zelllinie stark abgeschwächt. Auch beim Vergleich in Huh7 ist erkennbar, dass die Ad156R-Viren in der Ausbildung von Partikeln eindeutig beeinträchtigt sind. Ad-p53T ist in A549 um 2 Log-Stufen schwächer als die Kontrolle Ad-p53T-C und in Huh7 bilden beide entsprechende Titer. Adp53sensor ist zwar in A549 in seiner Replikation nicht so stark inhibiert wie Ad-p53T, zeigt aber in Huh7-Zellen deutlich höhere Titer. ONYX-015 ist sowohl in A549, als auch in Huh7 abgeschwächt und eine Tendenz zur p53-Selektivität bezüglich des Vergleichs in den Zelllinien A549 und Huh7 ist nicht zu erkennen. Ad-wt ist in beiden Zelllinien mit Abstand am effektivsten, was auf eine generelle Abschwächung der rekombinanten Viren durch gentechnische Manipulation hinweist. Durch Doxorubicin wird eine p53-Aktivierung

verstärkt. Dies scheint jedoch in den A549-Zellen keine besondere Rolle bezüglich einer stärkeren Inhibition der viralen Replikation zu spielen.

3.11.2 *in vitro* Onkolyse der p53T-Viren

Die Lysewirkung der Viren ist ein weiteres Indiz für die Selektivität und Potenz. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Virusverdünnungen infiziert. Die nicht lysierten Zellen konnten dann mit Kristallviolett gefärbt und dargestellt werden. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt.

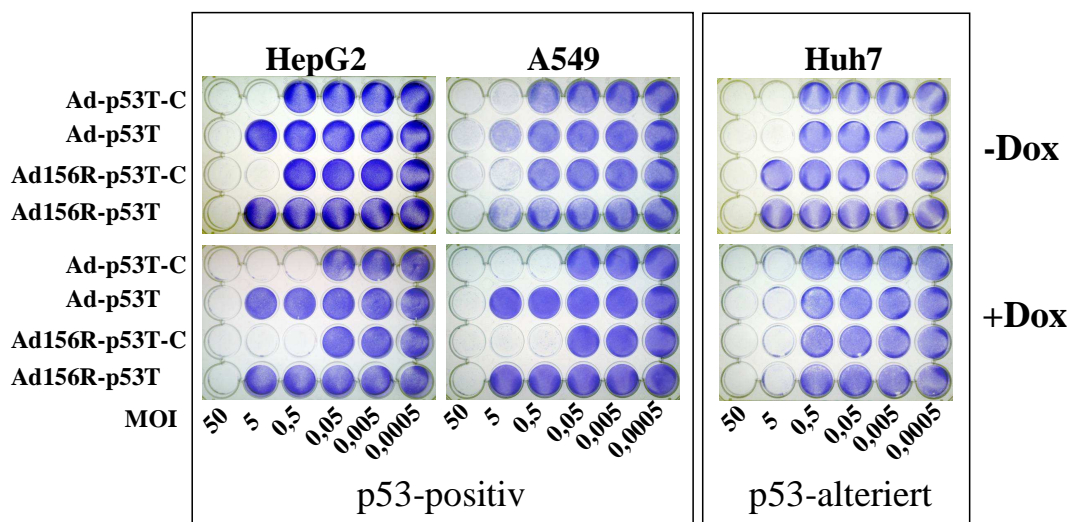


Abb. 30: Ad-p53T und Ad156R-p53T zeigen in der Onkolyse gegenüber ihren Kontrollen ein selektives Verhalten für p53-alterierte Zellen. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit den angegebenen Viren und den jeweiligen Verdünnungen infiziert. Die Doxorubicin-Behandlung erfolgte 8 h vor Virusgabe. Die Zellen wurden 8 bis 10 Tage nach Virusgabe mittels Kristallviolett angefärbt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den p53-positiven Zelllinien HepG2 und A549 eine signifikante Beeinträchtigung der Lyse durch die Viren Ad-p53T und Ad156R-p53T im Vergleich zu ihren Kontrollen erfolgt. Durch die Behandlung der Zellen mit Doxorubicin wurde der Unterschied offensichtlicher. Die Ad156R-Viren lysieren Huh7-Zellen sehr schwach. Mit Doxorubicinbehandlung können sie erst die Lysestärke von Ad-p53T erreichen.

3.11.3 *in vitro* Onkolyse im Vergleich mit weiteren onkolytischen Viren

In einem weiteren Ansatz wurden die Viren in ihrer Lysefähigkeit mit anderen onkolytischen Viren verglichen. Eingesetzt wurden die selektiven Viren Ad-p53T, Ad156R-p53T, ONYX-015 und Adp53sensor. P53-positive (A549, HepG2) und p53-alterierte (Huh7, H1299) Zellen

wurden mit unterschiedlichen Virusverdünnungen infiziert und nach Auftreten der Lyse mittels Kristallviolett gefärbt. Das Ergebnis ist in Abb. 31 dargestellt.

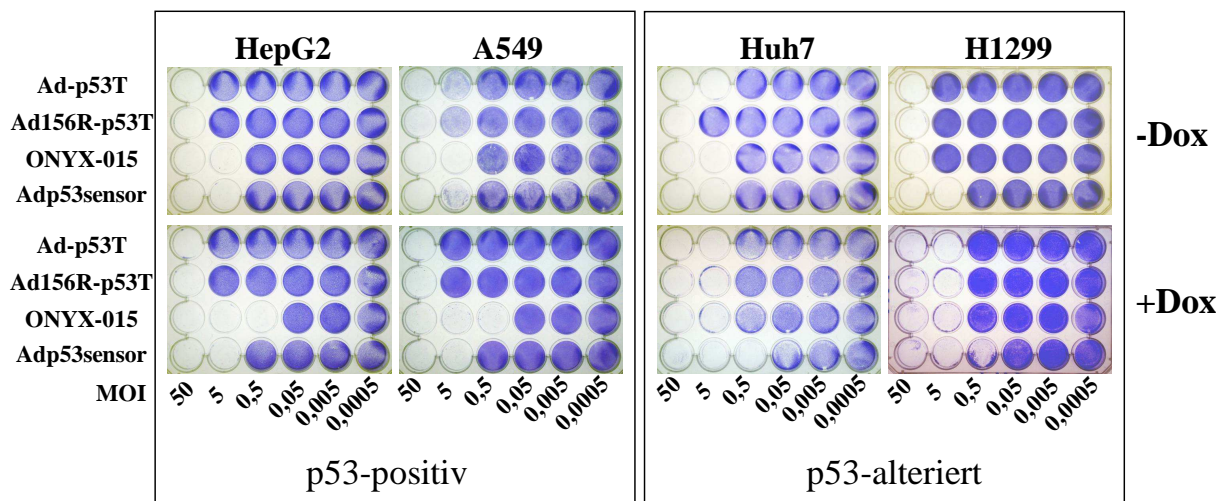


Abb. 31: Ad-p53T erreicht die Lysestärke von ONYX-015 in p53-alterierten Zellen und ist gleichzeitig signifikant stärker inhibiert in p53-positiven Zellen. Die verschiedenen Zelllinien wurden mit den angegebenen Viren und den jeweiligen Verdünnungen infiziert. Die Doxorubicin-Behandlung erfolgte 8 h vor Virusgabe. Die Zellen wurden 8 bis 10 Tage nach Virusgabe mittels Kristallviolett angefärbt.

Abb. 31 zeigt die Kristallviolett-Färbung des Vergleichs verschiedener p53-onkolytischer Viren in den entsprechenden Zelllinien. Zunächst ist zu erkennen, dass die p53T-Viren in den p53-positiven Zelllinien in ihrer Lysefähigkeit schwächer sind, als die Viren Adp53sensor und ONYX-015. Beim Betrachten der p53-alterierten Zelllinien erreichen jedoch die p53T-Viren die Lysepotenz von zumindest ONYX-015. Somit ist die Selektivität der p53T-Viren in diesen Zelllinien gegenüber ONYX-015 erhöht. Adp53sensor ist in p53-positiven, aber auch in p53-alterierten Zelllinien stärker lytisch als die p53T-Viren. Daher ist die Selektivität der p53T-Viren gegenüber Adp53sensor in diesen hier verwendeten Zelllinien nicht höher.

3.12 Kombination der p53- und hTert-Selektivität in vitro mittels Fibroblasten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die p53T-Viren p53-selektiv lysieren und gegenüber Adp53sensor aufgrund des schwächeren hTert-Promotors gegenüber dem CMV-Promotor zwar in ihrer Lysefähigkeit alterniert, aber in ihrer Selektivität gleich sind, wurde nun der Einfluss der Kombination der p53-Regulation mit dem hTert-Promotor in p53-positiven und hTert-negativen Zellen untersucht. Da in den bisher verwendeten Tumorzelllinien der hTert-Promotor aktiv ist, konnte nur die p53-Selektivität der Viren untersucht werden. Für die

Kombinationsuntersuchung wurden IMR-90-Fibroblasten eingesetzt. Diese Zelllinie hat eine begrenzte Passagierate von 40 bis 50 Zellzyklen. Da sie jedoch mit Adenoviren nicht infizierbar sind, wurden die Viren vor dem Einsatz mit dem Fusionsprotein CAR_{ex}TAT beladen. CAR_{ex}TAT kann eine unspezifische, hohe Infektion vieler Zelltypen bewirken. Die aus den infizierten Zellen gebildeten Viren können keine Reinfektion weiterer Zellen bewirken. Daher konnte in dieser Zelllinie nur die frühe Phase der Virusreplikation, und somit die DNA-Vermehrung, als Indiz für die selektive Inhibition der viralen Vermehrung, untersucht werden. Dazu wurde aus den infizierten Zellen nach 4, 24, 48 und 72 h die DNA gewonnen und auf Virus-DNA mittels quantitativer PCR untersucht. Da nach 4 h die DNA-Replikation noch nicht initiiert wird, ist dieser Wert der Vergleichskontrollwert für den Einsatz äquivalenter Virusgabe. Das Ergebnis der quantitativen DNA-Messung ist in Abb. 32 dargestellt.

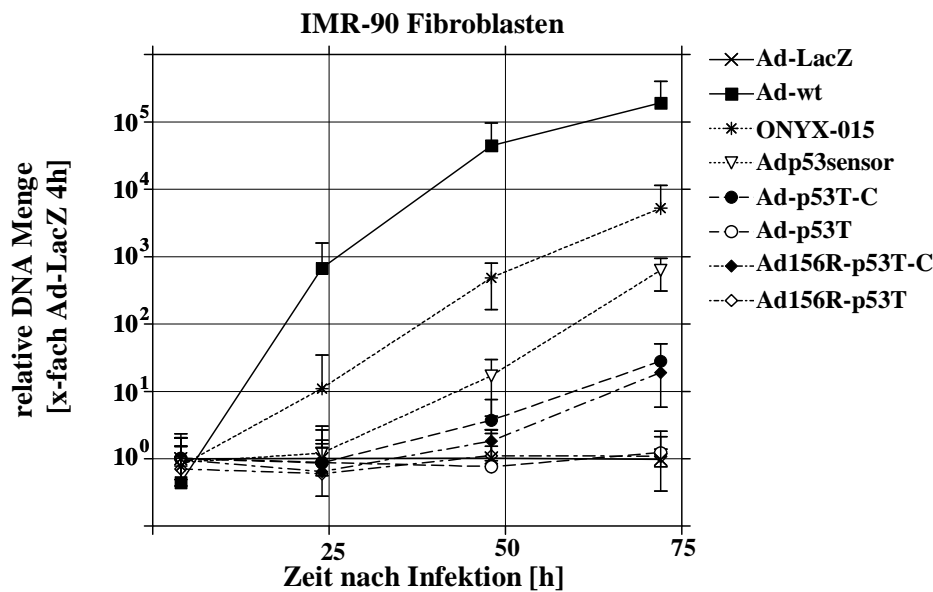


Abb. 32: Die Kombination von aktivem p53 und abwesendem hTert führt zu einer effektiven Replikationsinhibition des Ad-p53T Virus. IMR-90 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit CAR_{ex}TAT beladenen Viren infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurde die DNA isoliert und die virale DNA-Menge mittels qPCR über Hexon-spezifische Primer und Sonde bestimmt sowie mit der zellulären DNA über das Ubiquitin C-Gen abgeglichen.

Das Ergebnis der quantitativen PCR der Virus-DNA-Replikation in IMR-90 Fibroblasten zeigt eine hohe Selektivität der p53T-Viren. Das wildtyp Adenovirus weist eine hohe Replikationsrate auf. Es ist erkennbar, dass auch ONYX-015 stark repliziert. Etwas abgeschwächer ist das p53-selektive Adp53sensor, worauf die beiden nur hTert-selektiven Viren, Ad-p53T-C und Ad156R-p53T-C folgen. Die beiden Viren Ad-p53T und Ad156R-

p53T zeigen innerhalb der ersten 72 h nach Infektion keine Replikation. Die Inhibition erreicht das Verhalten eines replikations defizienten Ad-LacZ.

3.13 Virotherapie mittels p53T-Viren

3.13.1 Belastung der Mausleber durch virale Infektion

Zur Untersuchung der Selektivität der Viren *in vivo* wurde die Virus-Replikation in der Leber der Maus untersucht. Bei einer viralen Tumorthherapie ist es unumgänglich, dass ein großer Anteil an injizierten sowie freigesetzten Viren sich nicht nur auf den Tumor beschränkt, sondern auch anderes Gewebe infiziert. Die Leber spielt beim Auffangen der aus dem Tumor freiwerden Viren eine große Rolle. Um die Untersuchung einem virotherapeutischem Ansatz zu entsprechen und eine gleichmäßige Infektion der Leber zu ermöglichen, wurden zunächst H1299-Tumorzellen mit den entsprechenden Viren infiziert und diese dann Nacktmäusen intravenös injiziert. Dieses System hat den Vorteil, dass die Viren nicht gleichzeitig die Leber erreichen, sondern mit der Zeit aus den Tumorzellen in das Blutsystem freigesetzt werden und somit das Lebergewebe gleichmäßig infizieren können.

Nach bestimmten Zeitpunkten nach der Injektion wurde die Leber entnommen und die DNA isoliert. Mittels qPCR konnte der Anteil viraler DNA detektiert werden. Das Ergebnis ist in Abb. 33 gezeigt.

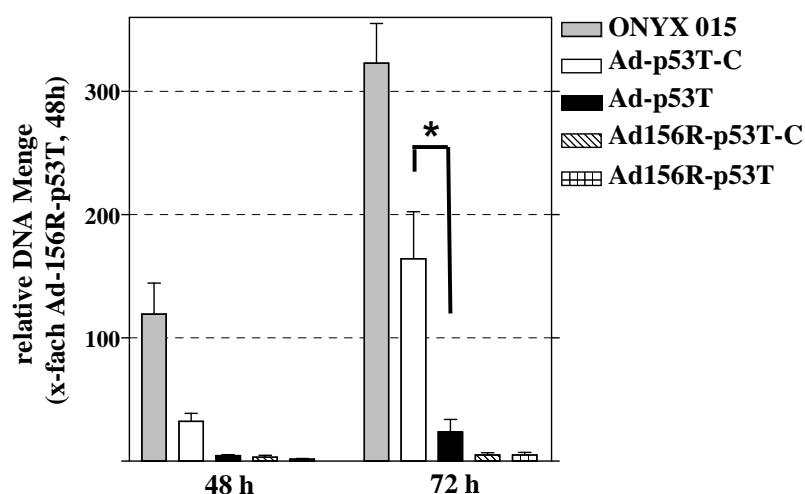


Abb. 33: Die Ad-p53T-Replikation ist in der Mausleber inhibiert. Mit den entsprechenden Viren infizierte H1299-Zellen wurden in NMRI-nu/nu Mäuse intravenös injiziert. Nach den angegebenen Zeitwerten wurde die Leber entnommen und die DNA isoliert. Die virale DNA konnte dann mittels spezifischer Hexon-Primer und qPCR ermittelt werden. Dabei wurde mit dem zellulären Genom über das 18S-Gen abgeglichen(* statistisch Signifikanz, P = 0,0375).

Das Ergebnis der intrahepatischen viralen DNA-Replikation zeigt eine p53-Regulation des Ad-p53T gegenüber Ad-p53T-C und eine hTert-Selektivität dieser gegenüber ONYX-015. Jedoch ist mit Ad-p53T-C eine schwache Replikation vorhanden, da in der Mausleber mTert gering aktiv ist. Ad156R-Viren sind kaum nachzuweisen. Auch nach 72 h ist die Replikation sehr gering, was allerdings auf die schwache Potenz dieser Viren zurückzuführen ist, als auf die Replikationskontrolle durch aktive p53-Regulation und geringem mTert.

3.13.2 *in vivo* Onkolyse

Zur Untersuchung, ob sich das generierte Ad-p53T-Virus zur Lyse von Tumoren eignet, wurde ein *in vivo* Onkolyse-Modell verwendet. Dazu wurde die humane H1299-Tumorzelllinie in die linke Flanke der Mäuse xenotransplantiert. Nach Erreichen einer bestimmten Tumorgröße konnte der Tumor virotherapeutisch behandelt werden. Zur Untersuchung wurde das Virus Ad-p53T mit ONYX-015 und dem nicht lytischen Ad-LacZ verglichen. In einem weiteren Ansatz wurden H1299-Tumoren mit Ad-p53T und Doxorubicin behandelt, als Kombination aus Chemo- und Virotherapie. Die Virus Ad156R-p53T wurde für diese Untersuchung nicht mehr mit einbezogen, da dieses Virus zwar sehr selektiv ist, aber eine zu geringe lytische Potenz aufweist, die für eine adenovirale Tumorthherapie essentiell ist, um den Tumor effektiv zu dezimieren. Das Ergebnis der *in vivo* Onkolyse ist in Abb. 34 dargestellt.

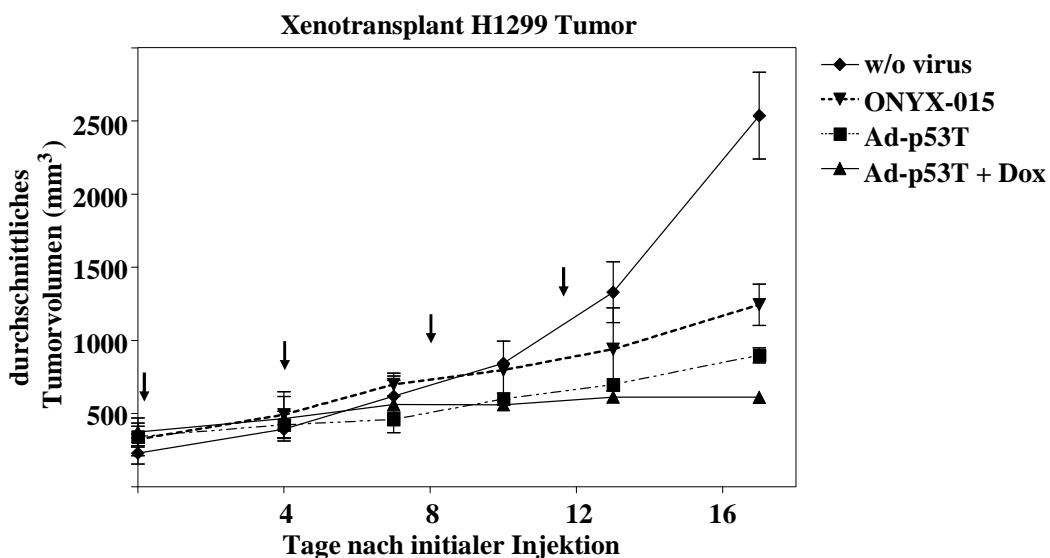


Abb. 34: Ad-p53T kann xenotransplantierte H1299-Tumoren effektiv inhibieren. H1299 Tumorzellen wurden in die linke Flanke der Maus s.c. injiziert. Nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 200 mm³ wurden die Tumoren mit den Viren behandelt. Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Virusinjektion an.

Die Abb. 34 zeigt, dass Ad-p53T und ONYX-015 das Wachstum von H1299-Tumoren stark einschränken können, wobei Ad-p53T effizienter die Tumoren lysiert. Setzt man zur Therapie die Kombination aus Chemo- und Ad-p53T-Virotherapie ein, so ist die Tumorlyse effizienter.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der p53T-Viren gezeigt, dass Ad-p53T eine p53-Regulation aufweist und zusätzlich in Telomerase-negativen Zellen abgeschwächt ist. Somit kann dieses Virus für die Therapie p53-alterierter sowie hTert-aktiver Tumoren verwendet werden kann.

4 Diskussion

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden verschiedene p53-selektive onkolytische Viren mit unterschiedlichen Regulationsmechanismen entworfen und getestet.

Das Besondere an onkolytischen Therapien mittels Viren ist die gezielte, tumorselektive Vermehrung des therapeutischen Reagenz. Dadurch sollen wiederholte Gaben des Therapeutikums und hohe Nebenwirkungen vermieden werden. Der effektive, therapeutische Einsatz von tumorselektiven Viren ist, aufgrund der fehlenden, immunologischen Modelle und der geringen Zahl klinischer Studien zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung, noch ungewiss. Die Hoffnung liegt auf der starken Lenkung des Immunsystems auf den Tumor durch die selektive Propagation therapeutischer Viren nur im Tumormilieu und die daraus folgende Induktion eines immunogenen Tumors.

Dabei müssen die Viren außerhalb des Tumors in gesundem Gewebe selektiv, stark inhibiert werden. Hierbei ist die Replikationkontrolle dieser Viren durch effektive Regulationsmechanismen wie RNAi oder Protein-vermittelte Genrepression aussichtsreich.

Die onkolytischen Viren dieser Arbeit sind für p53-dysfunktionale Tumore generiert. Dabei wird ein p53-selektiver Promotor eingesetzt, welcher bei positivem p53-Status ein Transkript erstellt, das seinerseits die Viruspropagation blockiert.

Im ersten Ansatz wurden Viren generiert, die p53-abhängig eine RNAi-Kassette initiieren, die die Virusreplikation inhibiert. Im zweiten Ansatz wurde p53-abhängig das Fusionsprotein Gal4-KRAB exprimiert, welches einen rekombinanten hTert-Promotor (hTertgal) blockiert, um die E1A-Expression zu verhindern und somit die Viruspropagation zu blockieren.

4.1 Konstruktion der RNAi-Viren

Das miR30-System wird sehr häufig für die Expression von sowohl miRNAs (97) als auch für die daraus abgeleiteten shRNAs (120) verwendet. Die miR30-RNA wurde ursprünglich aus der humanen HeLa-Zelllinie isoliert (56). Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sich die Verwendung eines miR30-Rückgrats zur Integration einer bekannten siRNA eignet, um gezielt mRNA zu degradieren (119). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Verwendung von shRNAs, die nur den miR30-Loop anstelle eines artifiziellen Loops enthalten, die Effizienz der RNAi steigern (11). Auch in dieser Arbeit wurde das miR30-System verwendet. Da die genomische Kapazität von Viren aufgrund der definierten Größe der Kapside begrenzt ist, ist der Einsatz von kurzen shRNA- bzw. pre-miRNA-Transkriptionseinheiten gegenüber einer

pri-miRNA-Transkription, die erst in langen Vorläuferformen exprimiert wird, ein großer Vorteil. In der Literatur wird die Effizienz der aus den beiden miR30-Expressionssystemen, abgeleiteten miRNA gleich stark in transienten Transfektionsstudien dargestellt (61;124). Dabei wurde die miRNA entweder aus einer pri-miRNA (hier als miRNA bezeichnet), welches an einer naiven Form und Funktionsweise der eukaryotischen RNAi ansetzt oder aus einer verkürzten pre-miRNA (hier als shRNA bezeichnet) abgeleitet.

Der hier vorgestellte Ansatz zielt auf eine p53-selektive und somit Polymerase II-abhängige Transkription. Daher musste zunächst validiert werden, welche der beiden Expressionsmöglichkeiten in unserem Ansatz eine höhere Effizienz bezüglich der Regulation eines bestimmten Zielgens aufweist. Als Reporter wurde dazu die *firefly* Luciferase verwendet. Das Sequenzmotiv der Luciferase für die RNAi wurde dann als Transkriptionseinheit für eine lange pri-miRNA (miRfLuc) oder für die daraus abgeleitete, analoge, kürzere pre-miRNA (shRfLuc) kloniert. Die Expression erfolgte zunächst unter der Kontrolle eines Polymerase III-abhängigen Promotors (U6), da in der Literatur häufig dieser Promotor für die Transkription von shRNA bzw. miRNA verwendet wurde. Wie in Abb. 3 (S. 14) gezeigt wurde, ist die Expression von shRfLuc im Vergleich zur miRfLuc effizienter. Der eingesetzte U6-Promotor ist in seiner natürlichen Form für die Transkription von sehr kurzer RNA vorgesehen. Die RNA-Polymerase III transkribiert RNA-Untereinheiten von RNAsen und Telomerasen, in Spleißosomen inkorporierte *small nuclear* RNAs und t-RNAs. Diese RNA-Moleküle sind in der Regel nicht größer als 150 Nukleotide. Es ist anzunehmen, dass die Polymerase III größere Transkripte, wie eine pri-miRNA ineffizienter transkribiert, als eine shRNA, die eine analoge Größe zu natürlichen Polymerase III-Transkripten aufweist. Daher könnte die geringere Effizienz der miRfLuc durch eine benachteiligte Expression, aufgrund der Länge, die Folge sein.

Der p53-abhängige Promotor prMinRGC ist ein Polymerase II-Promotor, wodurch die Länge der Transkriptionseinheit keine besondere Rolle spielen sollte. Der Vergleich von shRfLuc und miRfLuc bei Polymerase II-abhängiger Transkription zeigt auch, dass die shRfLuc-Expression effektiver ist (s. Abb. 4, S. 14). Sowohl mit dem prMinRGC als auch mit dem konstitutiv aktiven CMV-Promotor führt die Expression einer shRfLuc zu einer stärkeren Inhibition der Luciferasegenregulation. Die hier bezeichnete shRfLuc ist, wie oben beschrieben, eine artifizielle pre-miRNA. Dadurch wird der Prozessierungsschritt einer pri-miRNA durch Drosha übersprungen und somit kann vermutlich die Verwendung einer shRNA schneller in den abschließenden RNAi-Prozess zur Degradierung der Ziel-mRNA rekrutiert werden.

Die U6-abhängige Expression von shRfLuc führt zu einer stärkeren Zielgenrepression als die Expression mit den hier verwendeten Polymerase II-abhängigen Promotoren (124). Dabei exprimiert der U6-Promotor 15 bis 30mal mehr shRNAs als ein CMV-Promotor (64). Dies ist möglicherweise auf die Spezialisierung von Pol III-Promotoren auf kurze Transkripte ähnlicher Art zurückzuführen. Der Nachteil von Pol III-abhängigen Promotoren ist jedoch die fehlende gewebespezifische Regulation und einer begrenzten Transkriptionslänge, wodurch die Verwendung eines polycistronischen RNAi-Transkripts (17) nicht möglich ist.

Beim weiteren Betrachten von Huh7-Zellen wurde ersichtlich, dass die Expression der shRNA p53-abhängig reguliert werden konnte.

Eine RNAi-abhängige Regulation eines Zielgens zeigt aber auch, dass eine vollständige Inhibition nicht möglich ist. Meistens bewegt sich eine erfolgreiche Regulation auf ca. 5 bis 20 % herunter. Mit dieser Art der Repression ist eine hinreichende Selektivität mit therapeutischen Viren nicht zu erreichen (103). Um eine starke Inhibition der Zielgene trotzdem zu ermöglichen, wurde ein polycistronisches Transkript generiert, welches mehrere shRNA-Motive enthält, die wiederum unterschiedliche frühe Gene des onkolytischen Adenovirus p53-abhängig herunter regulieren. Tandemerisierte shRNA-Transkripte wurden bereits beschrieben (17;101;113), jedoch fehlte in diesen Studien die Untersuchung der Effizienz bezüglich der Positionen in einem multiplen shRNA-Transkript sowie der additive Effekt bei Einsatz verschiedener shRNA-Motive gegen eine Ziel-mRNA. Auch natürliche polycistronische miRNA-Transkripte wurden bereits isoliert (40) und ein daraus abgeleitetes und modifiziertes multiplex-miRNA-Transkript wurde gegen das HI-Virus gerichtet, um multiple mRNA-Inhibition erfolgreich zu zeigen (64).

In dieser Arbeit wurde ein Klonierungssystem entwickelt (s. Abb. 5, S. 16), womit eine Transkriptionseinheit mit multiplen shRNA-Motiven generiert werden konnte. Zunächst wurden verschiedene Expressionskonstrukte generiert, die Transkripte mit multiplen shRNA-Motiven exprimieren. Die Position der gegen die *firefly* Luciferase gerichteten shRfLuc wurde dabei variiert (s. Abb. 6, S. 14). Die shRfLuc-Motive wurden mit *scrambled-hairpins* als inaktive Kontrollmotive kombiniert. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigte, dass ein langes Transkript mit multiplen shRNA-Motiven generell aus den verschiedenen Positionen innerhalb des Transkripts funktionsfähige shRNAs herausbildet. Die erste Position eines Transkripts mit konkatemerer shRNA-Anordnung zeigt zwar die effektivste Wirkung, aber auch aus den verschiedenen anderen Positionen konnten effiziente shRNAs gewonnen werden. Des Weiteren konnte mit einem Tandem-shRNA-Transkript gezeigt werden, dass der Einsatz zweier verschiedener shRNA-Motive gegen dieselbe mRNA deutlich erfolgreicher in

der Inhibition der Ziel-mRNA ist, als die Tandemanordnung des gleichen shRNA-Motivs (s. Abb. 11, S. 22).

4.2 VA I-RNA und RNAi

Bei der Ausnutzung des RNAi-Mechanismus zur Regulation onkolytischer Viren ist es von großer Bedeutung, dass die Viren den RNAi-Mechanismus nicht blockieren. In der Literatur wird die RNAi meist in Zusammenhang mit antiviralem Schutz des Wirts erwähnt (31). Jedoch ist der Zusammenhang zwischen Viren und RNAi vielseitiger als bisher angenommen (91). Die Viren können mittels RNAi sowohl eigene Gene beeinflussen, wie bei Herpes- oder SV40-Viren, um latente Phasen zu induzieren (13;92), als auch zelluläre Gene regulieren, um der Wirtsabwehr zu entkommen (100). Da die RNAi sich als ein wirksamer und vielseitiger Regulationsmechanismus bewährt hat, haben sich verschiedene Viren entwickelt. Einige nutzen die RNAi für sich aus und andere wiederum inhibieren sie. Ob Adenoviren auch zu den Viren gehören die den RNAi-Mechanismus inhibieren, ist in der Fachliteratur noch umstritten. Gezeigt worden sind, dass durch Adenoviren mittels der VA I- und VA II-RNAs in der lytischen Phase die RNAi blockiert wird (2;65). Dagegen gibt es jedoch viele Studien, die zeigen, dass die Nutzung von RNAi mittels replikativer und nicht-replikativer Adenoviren erfolgreich eingesetzt werden kann (14;16;43). In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass Adenoviren selbst den RNAi-Mechanismus zur Regulation der Virusvermehrung ausnutzen (3). Daher wurde im Rahmen des hier verwendeten Ansatzes noch untersucht, ob Adenovirus die RNAi in der frühen Phase der adenoviralen Replikation inhibiert. Bei onkolytischen Viren ist die frühe Phase für die Replikationskontrolle sehr wichtig. Ab einem bestimmten Grad der Initiation der viralen Replikation ist eine Kontrolle nicht mehr zu gewährleisten, da auch p53 viral inhibiert wird.

Bei der Untersuchung bezüglich der Auswirkung des adenoviralen VA I-RNAs und der adenoviralen Replikation auf die RNAi konnte deutlich gezeigt werden, dass das humane Adenovirus Typ 5 den RNAi-Mechanismus in der Frühphase der Infektion nicht inhibiert (s. Abb. 7, S. 18 und Abb. 8, S. 19).

Die antivirale RNAi könnte biologisch betrachtet meist die Folge einer Infektion durch RNA-Viren sein, da RNA-Viren meist eine komplexe Struktur ihres RNA-Genoms aufweisen und diese sich somit als gutes Substrat für Dicer eignen könnte. So können RNA-Viren aufgrund ihres RNA-Genoms mittels RNAi degradiert werden. Daher ist auch in der Literatur die Inhibition von RNAi mittels RNA-Viren gut erforscht und beschrieben (30;59). Man müsste

auch in Betracht ziehen, dass gerade Viren, die durch RNAi angreifbar sind auch eine hohe Abwehrfunktion zur Inhibition der RNAi aufweisen werden, als DNA-Viren wie beispielsweise Adenoviren.

4.3 Charakterisierung der RNAi-Viren

Nachdem beobachtet wurde, dass ein polycistronisches shRNA-Transkript wirksam ist und dass Adenoviren in der frühen Infektionsphase die RNAi nicht blockieren (s. 3.3, S.18), wurde ein RNAi-Netzwerk generiert, das gegen essentielle adenovirale mRNAs gerichtet war. Dazu wurde in einem etablierten Luciferase-Messsystem verschiedene wirksame shRNA-Motive ermittelt (s. Abb. 9 bis Abb. 12, S. 20 - 23). Diese wurden dann hintereinander kloniert und das Transkript unter der Kontrolle des p53-abhängigen Promotors prMinRGC exprimiert. Dabei wurde das Virus Ad-iREP-C (als Kontrolle) und die beiden p53-sensitiven Viren Ad-iREP-1 und -2 generiert (s. Abb. 13, S. 24).

Zunächst wurden die generierten RNAi-Viren in Zellkultur auf p53-Selektivität untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass nur Ad-iREP-2 die E1A-Expression (s. Abb. 14, S. 26) und damit weitere adenovirale frühen Gene, wie E1B und pTp (s. Abb. 15, S. 27) p53-selektiv inhibiert. In Transfektionsuntersuchungen konnte aber auch der Ad-iREP-1-Ansatz die E1A-Expression signifikant inhibieren. Eine zuvor ungenügende Inhibition von E1A hat starke fördernde Wirkung auf die nachfolgende Expression weiterer adenoviraler Gene. Diese, wie z. B. E1B-55k zusammen mit E4-Orf6, können dann p53-Niveau und -Funktion stark herabsetzen (86) und somit die Expression der RNAi-Kassette beeinträchtigen. Weiterhin kann über die RNAi-Effizienz aus transienten Transfektionsversuchen nicht auf die Wirkung durch virale Infektion oder stabile Transfektion geschlossen werden (103). Die Ergebnisse zeigen, dass eine drastische Inhibition von Nöten ist, um die virale Replikation erfolgreich zu blockieren.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde dargelegt, dass sowohl die Lysefähigkeit als auch die Viruspropagation von Ad-iREP-2 selektiv in p53-positiven Zellen inhibiert ist und p53-alterierte Zellen effizient lysiert werden. Im direkten Vergleich hatte Ad-iREP-2 eine höhere Selektivität als das klinisch eingesetzte Virus ONYX-015 (s. Abb. 16 und Abb. 17, S. 28 bis 30). ONYX-015 wurde als Vergleichsvirus eingesetzt, da es ursprünglich als ein selektives Virus für p53-alterierte Zellen generiert und beschrieben wurde (9). Seitdem ist die p53-Selektivität des Virus stark umstritten (24;32;79).

In Hep3B-Zellen weist ONYX-015 jedoch eine ähnliche lytische Potenz wie die RNAi-Viren auf. Diese Zellen sind Hepatitis B-Virus transformiert und können durch die endogene Expression des HB-X-Proteins die E1B-55k-Deletion und die daraus resultierende Abschwächung von ONYX-015 transkomplementieren.

Die bessere Selektivität von Ad-iREP-2 gegenüber Ad-iREP-1 zeigt wie wichtig die Funktion von E1A für die virale Replikation ist. Durch die zusätzlichen Zielsequenzen im 3'-UTR des E1A in Ad-iREP-2 wurde die Inhibition und damit auch die Selektivität effektiver. In einer Studie zur Therapie von Adenoviren konnte gezeigt werden, dass durch Transfektionen von siRNA nur gegen E1A die virale Replikation inhibiert werden kann (18).

Um mit den Untersuchungen zur Selektivität einem *in vivo* Modell näher zu kommen, wurde die Replikationseigenschaft der verschiedenen Viren in humanen Lungenfibroblasten (IMR-90) untersucht (s. Abb. 18, S. 31). Auch dabei konnte bei Ad-iREP-2 die Blockierung der viralen Replikation mittels der eingesetzten, multiplen RNAi-Kassette, die p53-abhängig reguliert wird, beobachtet werden. In dieser Zelllinie wurde festgestellt, dass auch Ad-iREP-1 unter diesen Bedingungen Selektivität aufweist. Somit ist die RNAi-Wirkung in Fibroblasten auch bei Ad-iREP-1 ausreichend. Möglicherweise sind in Tumorzellen, die zuvor zur Untersuchung der p53-Selektivität eingesetzt worden sind, der RNAi-Mechanismus und die p53-Antwort im Allgemeinen abgeschwächt und spiegeln nicht die tatsächliche *in vivo* Eigenschaft wider.

4.4 RNAi-Viren im therapeutischen Modell

Nach der erfolgreichen Ermittlung der stärkeren Replikationskompetenz des Ad-iREP-2 in p53-dysfunktionalen Zellen, wurden die RNAi-Viren auch in *in vivo* Modellen auf ihre Lysefähigkeit und Selektivität hin untersucht.

Während einer Behandlung eines Tumors mit Viren, werden die freigesetzten Viren aus den lysierten Tumorzellen nicht nur das benachbarte Tumorgewebe infizieren, sondern aufgrund der guten Durchblutung von Tumoren über das Blutssystem von der Leber aufgefangen. Daher ist die Replikationskontrolle in diesen Geweben von großer Bedeutung.

Zunächst wurden Nacktmäuse mit den Viren intravenös injiziert. Die humanen Adenoviren infizieren dabei hauptsächlich die Mausleber, wobei in infizierten Mausem Geweben zwar kaum infektiöse Viren entstehen (116), aber virale Gene exprimiert und DNA-Replikation aktiviert werden. Die Replikation des Virusgenoms wurde im Anschluss an die Injektion in der Leber. Dabei zeigte Ad-iREP-2 im Vergleich zur Kontrolle Ad-iREP-C zwar eine geringere DNA-

Replikation, aber die Inhibition der viralen Replikation war mit diesem Versuchsaufbau nicht effizient genug (s. Abb. 19, S. 32). Bei der intravenösen Injektion der Viren besteht die Problematik, dass eine hohe Infektionseinheit gleichzeitig von den Leberzellen aufgefangen wird und diese somit ungleichmäßig infiziert wird. Bestimmte Bereiche werden dabei überinfiziert und ein großer Teil bleibt nicht infiziert. Bei hoher Viruslast kann auch mit Ad-iREP-2 keine hinreichende Selektivität beobachtet werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden mit den Viren infizierte Tumorzellen injiziert. Hiermit sollte sich einem virotherapeutischen Modell angenähert werden. Dabei setzen die infizierten lytischen Tumorzellen, die Viren nach und nach frei, so dass eine gleichmäßige Infektion der Leber erreicht werden kann. Es konnte beobachtet werden, dass in diesem Ansatz die Inhibition der viralen DNA-Replikation mittels der p53-abhängigen, multiplen shRNA-Transkripts erfolgt. Dies konnte sowohl mit Ad-iREP-1 als auch mit Ad-iREP-2 ermittelt werden. Auch 72 h nach der Infektion konnte keine Erhöhung der viralen DNA bei Ad-iREP-2 und nur eine geringe Zunahme bei Ad-iREP-1 beobachtet werden. Die starke Replikationskontrolle von Ad-iREP-1 *in vivo* im Vergleich zu p53-positiven Tumorzellen deutete sich bereits bei der Untersuchung in Fibroblasten an.

Zum Abschluss der Testreihe mit den RNAi-Viren wurde mit Ad-iREP-2 untersucht, ob es auch ein *in vivo*-Tumor erfolgreich am Wachstum hindern kann. Hierzu wurde den Mäusen jeweils die beiden p53-negativen Tumorzellen H1299 und Hep3B xenotransplantiert. Ad-iREP-2 konnte in beiden Modellen ein Tumorwachstum effizient inhibieren. Während im Vergleich ONYX-015 nur bezüglich des Hep3B-Tumormodells Wirkung aufwies. In diesem Tumor hat das E1B-abgeschwächte ONYX-015 zusätzliche Unterstützungen aufgrund der viralen Transformation dieser Tumorzelllinie. Somit ist ONYX-015 nicht generell für p53-disfunktionale Tumoren, sondern für viral-transformierte Tumoren besonders geeignet und damit auch eingebeschränkt.

Durch die p53-Selektivität von Ad-iREP-2 repräsentiert dieses Virus einen onkolytischen Vektor für einen großen Teil von humanen Tumoren.

4.5 Konstruktion der p53T-Viren

In einem weiteren Ansatz wurden in dieser Arbeit zwei onkolytische Vektorkonzepte kombiniert, um eine höhere Selektivität zu gewährleisten als beim Einsatz der Einzelkonzepte. Dabei wurde untersucht, ob eine additive Selektion erreicht werden kann, wenn das Konzept des Vektors, welches nur in hTert aktiven Zellen repliziert (110), mit dem

Konzept der p53-abhängigen Repression des E1A-regulierenden Promotors (53) in einem Vektor kombiniert wird.

Hierzu wurde ein rekombinanter hTertgal-Promotor generiert (s. Abb. 22, S. 35). Dieser kann durch das Fusionsprotein Gal4-KRAB, aufgrund der flankierenden Gal4-Bindesequenzen, effizient in der transkriptionellen Aktivierung reprimiert werden (s. Abb. 23, S. 36). Wird die Expression von Gal4-KRAB unter die Kontrolle des prMinRGC-Promotors gestellt, so erreicht man eine Repression selektiv in p53-positive Zellen.

Der Nachteil von Adenoviren, die p53-selektiv inhibiert werden, ist die Blockierung und Degradierung von p53 durch adenovirale Gene. Die Hauptfunktion hierbei spielt das E1B-55k-Protein (86). E1B-55k hat neben der Funktion einer p53-Inhibition noch viele weitere Aufgaben, wie Transport der viralen mRNA, Cyclin E Expression, Transformation der Zellen sowie Blockierung der Wirtspoteinexpression (28;123). Da jedoch die Deletion dieses Gens eine starke Beeinträchtigung der viralen Potenz bedeutet, wurde eine alternative Variante des E1B-55k-Proteins eingesetzt. Dabei wurde die beschriebene, alternative Spleißvariante, E1B-156R (96), die viele Aufgaben des E1B-55k-Proteins wie mRNA-Transport und Transformation der Wirtszellen übernehmen kann, aber die p53-Regulation nicht beeinträchtigt (s. Abb. 25, S. 38), ausgewählt. Jedoch wurde diese alternative Spleißvariante bislang nicht im Kontext eines Virusvektors durchgeführt.

Daher wurden die hTert- und p53-selektiven, onkolytischen Vektoren sowohl mit dem wildtyp E1B-Gen (Ad-p53T) als auch mit der E1B-156R-Variante (Ad156R-p53T), anstatt der gesamten E1B-Transkription Region, generiert (s. Abb. 26, S. 39).

4.6 Charakterisierung der p53T-Viren

Bei der Untersuchung der p53-abhängigen Expression von Gal4-KRAB konnte beobachtet werden, dass nur mit Ad-p53T oder Ad156R-p53T infizierte p53-positiven Zellen das Fusionsprotein exprimieren (s. Abb. 27, S. 40) und somit den rekombinanten hTertgal Promotor effizient inhibieren, um die E1A-Expression zu blockieren (s. Abb. 28, S. 41). In den p53-disfunktionalen Zellen Huh7 und H1299 waren die E1A-Expressionsniveaus entsprechend den Kontrollen (Ad-p53T-C und Ad156R-p53T-C), da diese Viren statt des Gal4-KRAB-Gens *Nonsense*-Sequenzen enthalten. Da die Untersuchungen in den frühen Phasen der viralen Replikationen durchgeführt wurden, konnten noch keine Unterschiede bezüglich der beiden Virustypen Ad-p53T und Ad156R-p53T beobachtet werden.

Bei weiteren Untersuchungen bezüglich der Viruspropagation konnte dann beobachtet werden, dass die p53T-Viren im Vergleich zu ihren Kontrollen und den beiden weiteren onkolytischen Viren Adp53sensor und ONYX-015 stärker p53-abhängig inhibiert sind (s. Abb. 29, S. 42). Jedoch sind die generierten p53T-Viren aufgrund des hTertgal-Promotors in Huh7-Zellen auch schwächer, da der Einsatz eines hTert-Promotors im Gegensatz zu einem E1A- oder CMV-Promotor die Potenz der Virusreplikation stark beeinträchtigt. Die Titer des Ad156R-p53T sind sowohl in p53-alterierten als auch in p53-positiven Zellen sehr gering. Zwar kann man im Vergleich zur Kontrolle eine hohe Selektivität in den p53-positiven A549 nachweisen, jedoch scheint die Potenz der Ausbildung von viralen Partikeln grundsätzlich durch den Ersatz von E1B-55k durch E1B-156R eine erhebliche Beeinträchtigung der viralen Replikation zu bedeuten. Dies spiegelt die große Bedeutung der E1B-Region wider.

Generell wird aber auch beim Vergleich mit dem wildtyp Adenovirus ersichtlich, dass die rekombinanten Viren abgeschwächt sind. Offenbar führt die gentechnische Manipulation der Viren zu einer Attenuierung.

Die Onkolyse-Versuche verdeutlichen nochmals die hohe p53-Selektivität der p53T-Viren (s. Abb. 31, S. 44). Bei diesen Untersuchungen scheint jedoch auch das Ad156R-p53T Virus so lytisch zu sein wie Ad-p53T, zumindest nach Doxorubicinbehandlung. Die durch die Kristallviolett-färbung sichtbare, effektivere Lyse der doxorubicinbehandelten Zellen bei den Kontroll-Viren in den p53-positiven Zellen ist vermutlich auf verstärkte Apoptoseinitiierung zurückzuführen, als auf die Ausbildung höherer Partikelzahl, die durch Doxorubicin nicht wesentlich zunimmt, wie in Abb. 29 dargestellt. Die Apoptose wird erkennbar durch das Betrachten der doxorubicin- und virusbehandelten Zellen unter dem Mikroskop. Die Zellen sehen dabei nicht typisch zytopathisch, sondern eher apoptotisch aus. Der morphologische Unterschied zwischen lytischen und apoptotischen Zellen ist beim Betrachten durch ein Mikroskop deutlich erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die mit Doxorubicin behandelten Zellen haben durch die damit induzierte Erhöhung des p53-Niveaus eine erhöhte Apoptoseanfälligkeit. Dies führt dann durch die Infektion der Viren, falls keine Replikationskontrolle stattfindet, zu einer schnelleren Apoptose der Zellen als ohne Doxorubicin. Die Ad156R-p53T-Viren enthalten im Gegensatz zu den Ad-p53T-Viren kein E1B-19k, welches auch eine Rolle in der Inhibition des mitochondrialen Apoptosewegs spielt. Durch diese Deletion und Doxorubicinbehandlung steigt in Huh7-Zellen die Apoptose-Induktion mit den Ad156R-Viren. Beim Vergleich der Partikelbildung in Abb. 29 wird deutlich, dass Doxorubicin nicht die Partikelzahl und somit die Selektivität erhöht bzw. beeinträchtigt.

Bei der Charakterisierung der Viren in Tumorzelllinien konnte nur die p53-Selektivität betrachtet werden, da in diesen Zellen hTert aktiv ist. Um auch die hTert-Selektivität mit einbeziehen zu können, wurde das Verhalten der Virusreplikation in Fibroblasten untersucht. Diese Zellen überdauern nur eine limitierte Passagenzahl. Innerhalb dieser ist hTert nicht exprimiert und p53 aktiv. Dies ist eine gute Voraussetzung für die kombinierte Untersuchung. Hierzu wurde die DNA-Replikation der Viren in dieser Zelllinie untersucht. Ad-p53T war so stark inhibiert, dass nach 72 h keine Aktivierung der Replikation detektiert werden konnte. Die additive und daraus resultierende hohe Tumorselektivität durch die Kombination der beiden onkolytischen Vektorkonzepte verdeutlicht die Notwendigkeit der Vereinigung mehrerer unterschiedlicher Strategien, wie tumorselektive Promotoren, Inhibition der Transkription oder Inhibition der Translation, um die Virusreplikation sicher zu beeinflussen.

4.7 Untersuchung zur therapeutischen Effizienz der p53T-Viren

Die Viren wurden nun hinsichtlich ihrer Selektivität und Lysefähigkeit im Mausmodell untersucht. Hierzu wurde zunächst die selektive Inhibition der Viren im infizierten Lebergewebe untersucht. Ad-p53T wies dabei eine hohe Inhibition bezüglich der DNA-Replikation auf. Auch die Kontrolle Ad-p53T-C hat eine geringere Replikation im Vergleich zu ONYX-015. Ad-p53T-C enthält nur eine hTert-Selektivität und keine zusätzliche p53-abhängige Repression, wie bei Ad-p53T. Da die murine Telomerase (mTert) in Mausgeweben wie Milz, Leber und Hoden (68) gering aktiv ist, findet auch eine geringe adenovirale Genexpression mit Ad-p53T-C statt. Das Ad156R-p53T Virus ist aufgrund der E1B-Substitution zu stark abgeschwächt, um einen Tumor effektiv lysieren zu können.

Bei der Untersuchung der Tumorlyse konnte beobachtet werden, dass Ad-p53T schwer therapierbare H1299-Tumoren effizient lysiert und in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin das Tumorstadium inhibiert.

4.8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Adenoviren generiert, die eine selektive Replikation in Zellen mit verändertem p53-Status aufweisen. Diese Viren könnten sich somit gut als Therapeutikum p53-alterierter Tumoren eignen.

In den Untersuchungen mittels dualer Replikationskontrolle mit dem Virus Ad-p53T konnte gezeigt werden, dass additive Effekte sich positiv auf die Selektivität auswirken können. Daher könnte man weiterführend mehrere Kontrollelemente kombinieren, wie auch die Zusammenführung der beiden Mechanismen aus den Viren Ad-iREP-2 und Ad-p53T, um die Spezifität zu optimieren. Weitere Möglichkeiten sind der Einsatz von regulierbaren Promotoren für andere frühe Genregionen, wie E1B (121) oder E4 (54) sowie die 3'-UTR-Veränderung dieser Gentranskripte, um die Reprimierung mittels RNAi zu optimieren. Jedoch sollte dabei beachtet werden, dass die Onkolyse nicht stark abgeschwächt wird.

In der Literatur gibt es zahlreiche onkolytische Adenoviren, die bestimmte Eigenschaften der Tumoren selektiv erkennen, wie z. B. aktiviertes Ras, defektes pRb, einen defekten Wnt-Signalweg und diese selektiv in ihrem Wachstum inhibieren (15;44;104).

Ein großes Problem virotherapeutischer Vektoren ist die heute noch relativ geringe Kenntnis über das Zusammenspiel zwischen onkolytischen Viren, dem Tumor und dem Immunsystem in einem humanen System. Viren sind Parasiten, die vom Immunsystem hoch effizient erkannt und eliminiert werden können. Die Mausmodelle, die zurzeit zur Verfügung stehen und während dieser Arbeit auch verwendet wurden, stellen ein sehr eingeschränktes und damit ein unvollständiges Bild der Therapie dar. Dabei stellen die geringen zur Verfügung stehenden Modelle das Hindernis. Zahlreiche generierte onkolytischen Viren werden bisher in immundefizienten Nackmausmodellen mit xenotransplantierten Tumoren getestet. Dabei werden jedoch die immunologischen Aspekte der Virotherapie außer Acht gelassen. Dazu müssen neuere, natürliche Modelle entwickelt und entdeckt werden. Daher ist das klinische Potential von onkolytischen Vektoren zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung noch unklar. Die Hoffnung liegt auf der starken Lenkung des Immunsystems auf den Tumor durch die selektive Propagation dieser Viren nur im Tumormilieu und die daraus folgende Induktion eines immunogenen Tumors. Dabei muss das Immunsystem jedoch auch durch unterstützende Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. mittels dendritischer Zellvakzinierung (102), da sonst eine hohe Präferenz viraler Antigene vorliegt. Die Theorie entspricht dabei einer Viroimmunkrebstherapie. Im Laufe der Tumorentstehung induziert der Tumor eine Toleranz. Die durch dendritische Zellen aufgenommenen Tumorantigene in Form abgestorbener Tumorzellen führen dann nicht zu einer Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. Durch eine Virotherapie werden als Folge der viralen Onkolyse viele Tumorantigene aber auch virale Antigene präsentiert. Die resultierende Inflammation im Tumor führt zu einer Abschwächung der Tumortoleranz, worauf eine schwache antitumorale und eine starke antivirale Immunantwort folgt. Die antitumorale Immunantwort kann durch eine dendritische

Zellvakzinierung synergistisch verstärkt werden. Dabei werden *ex vivo* generierte dendritische Zellen (DC) mit Tumorantigenen beladen und aktiviert. Diesen fehlen im Gegensatz zu den *in vivo* DCs virotherapeutisch behandelte Tiere die viralen Antigene. Dies führt zu einer Fokussierung der Immunreaktion gegen Tumorantigene. Die gleichzeitige Eliminierung des Tumors sowie des onkolytischen Vektors mittels *ex vivo* und *in vivo* DCs relativiert die hohe Präferenz viraler Antigene (Dissertation von Norman Woller, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover).

Eine weitere Optimierung der viralen Infektion von Tumorgewebe könnte durch die spezifische Führung der Viren zum Tumor erfolgen. Damit könnte auch eine gewisse Toxizität durch Infektion von Fremdgewebe minimiert werden. In der Literatur gibt es viele Studien darüber, die Infektion mittels Veränderung der Oberflächenrezeptoren der Viren gezielt auf bestimmte Gewebetypen zu beschränken (6;51). Eine neuere und viel versprechende Möglichkeit ist die spezifische Leitung der Viren mittels Trägerzellen. Dabei wurden schon tumorspezifische T-Zellen (85), Stammzellen (98) und Tumorzellen (20) eingesetzt. Auch T-regulatorische Zellen könnten sich als Trägerzellen eignen. Die Theorie entspricht dabei einer Zell-vermittelten Viroimmunkrebstherapie. Bei dieser Art des zellvermittelten Virustransfers konnte auch beobachtet werden, dass die Wirtsimmunantwort gegen das Virus umgangen werden konnte (84).

Die vorexistierende Immunität vieler verwendeter onkolytischer Viren erschwert zudem den Einsatz für die Virotherapie. Der Einsatz von Immunsuppressiva könnte die Virotherapie unterstützen. Weitere Möglichkeiten zur Umgehung der präexistierenden Vektor-Immunität ist die Verwendung von wenig verbreiteten Subtypen eines onkolytischen Virus.

Der alleinige virotherapeutische Ansatz erscheint zurzeit noch nicht für eine vollständige Eradikation eines Tumors klinisch verwendbar, wenn man die Heterogenität von Tumoren in Einzelpatienten betrachtet. Ein erfolgversprechender Ansatz könnte auch die Kombination verschiedenen onkolytischen Virusarten, wie Adenovirus, Vesicular-Stomatitis-Virus (80), Herpes Simplex Virus (69), Vaccinia Virus (70), Reovirus (19), Masernvirus (77) und Parvovirus (67) sein. Durch den Einsatz verschiedener Virusarten kann die spezifische Immunantwort gegen den Tumor immer wieder erneut induziert und möglicherweise auch amplifiziert werden. Die spezifische Immunantwort gegen die Viren sollte dann eingeschränkt sein.

Die klinische Relevanz eines onkolytischen Virus wird sich somit nur innerhalb eines multiplen Krebstherapieansatzes mittels Kombinationen aus Strahlen-, Chemo-, Gen-, Zell- und / oder Immuntherapien bewähren können.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Eukaryontische Zelllinien

- 293 : Humane, embryonale Nierenzelllinie (ATCC: CRL 1573). Da diese Zelllinie durch die stabile Integration der adenoviralen E1 Region transformiert ist, wird sie insbesondere zur Herstellung von replikationsdefizienten Adenoviren eingesetzt.
- A549 : Humane Lungenepithelkarzinomzelllinie (ATCC: CCL-185). Die Zelllinie weist p53 wt Status auf.
- H1299 : Humane Lungenkarzinomzelllinie (ATCC: CRL-5803). Bei dieser Zelllinie ist p53 deletiert.
- Hep3B : Humane, hepatozelluläre Karzinomzelllinie (ATCC: HB-8064). Die Zelllinie weist homozygote p53-Deletion auf.
- HepG2 : Hochdifferenzierte, humane Hepatomzelllinie (ATCC: HB-8065). Die Zelllinie exprimiert p53wt.
- Huh7 : Humane Hepatomzelllinie. Die Zelllinie exprimiert die transkriptionell inaktive p53-Mutante 220C (76).
- IMR-90 : Humane Lungenfibroblasten (ATCC: CCL-186).

5.1.2 Bakterienstämme

- JM109 : Ein modifizierter *E. coli* Stamm, der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde. Sie wurde sowohl zu chemisch kompetente als auch zu elektrokompetente Bakterien verarbeitet. Genotyp: F- traD36 lacIq Δ (lacZ)M15 proA+B+ /e14-(McrA-) Δ (lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17(rK-, mK+) relA1 supE44 recA1 (Gibco).

5.1.3 Mausstämme

- NMRI-nu/nu : Männliche, pathogenfreie Nacktmäuse des Inzuchtstammes NMRI-nu/nu im Alter von 4 bis 8 Wochen aus dem zentralen Tierlabor der MHH. Das Gewicht betrug ca. 15-20 g

5.1.4 Plasmide (Zahlen in Klammern stellen Laborinterne Bezeichnung dar)

- pBlueScript KS+ (pBS) I- : Klonierungsvektor mit T3- und T7-Promotor (Fa. Stratagene). Das Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit als Klonierungsvektor und als Nonsens-DNA zum Auffüllen von Transfektionsansätzen verwendet.
- CMV-LacZ : Der Expressionsvektor enthält das β -Galactosidase-Gen unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Er wurde zum Abgleich der Transfektionseffizienz eingesetzt.
- Gal4KRAB (2337) : Enthält die cDNA für ein Fusionsprotein aus Gal4 und KRAB unter der Kontrolle des p53-abhängigen Promotors prMin-RGC in pBS.
- prMinRGC-Luc : Enthält ein Luciferasegen unter der Kontrolle des p53-abhängigen Promotors prMin-

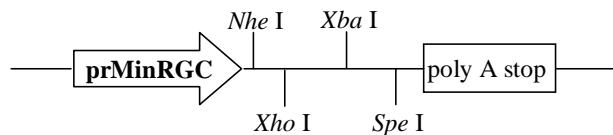
- (1738) RGC in pGL2-Basic (Fa. Promega).
- prCMV_{wt}-Luc (203) : Enthält ein Luciferasegen unter der Kontrolle des wildtyp CMV-Promotors in pGL2-Basic (Fa. Promega).
- psiCHECKTM-2 : Bizistronischer Vektor zur Bestimmung der Wirksamkeit von RNAi (Fa. Promega). Enthält die beiden Luciferasegene, *renilla* und *firefly*. Das 3'-UTR der *renilla* Luciferase kann dabei gentechnisch so modifiziert werden, dass sie als Zielsequenz für shRNAs fungiert. Die *firefly* Luciferase dient als Transfektionseffizienzabgleich.
- Δ22E1A/E1B (6402) : Enthält die für ein replikatives Adenovirus essentielle rekombinante E1-Region von der genetischen Position 626 bis 3510 ohne den E1A-Promotor in reverser Orientierung in pHM3. E1A ist 22 AS N-terminal deletiert. Der Vektor diente als Zwischenvektor zur Generierung von DNA-Abschnitten, die über die Restriktionssites *I-Ceu I* und *Pi-Sce I* in das Adenovirus-Backbone kloniert wurden.
- pAdHM4 : Enthält das Adenovirus-*Backbone* des humanen Serotyp-5-Derivats der Mutante dI309. Es weist eine Deletion im Bereich der E3- sowie der E1-Region auf. Über die sites *I-Ceu I* und *Pi-Sce I* kann in die ehemalige E1-Region kloniert werden.
- Adp53sensor : Adenovirusvektor mit einer E1-Region unter der Kontrolle eines Gal4-KRAB reprimierbaren CMV-Promotors, einem IRES-GFP-Anhang an die E1B-Region und einer Gal4-KRAB-Expressionskassette unter der Kontrolle des prMinRGC-Promotors.
- K93 : *Shuttle*-Vektor mit einer E1-Region unter der Kontrolle eines hTert-Promotors und einem IRES-GFP-Anhang an die E1B-Region.
- siScr : Enthält eine *short hairpin Nonsense*-Sequenz unter der Kontrolle eines U6-Promotors in pSR. Mit freundlicher Überlassung von Dr. Mortimor Korf.
- U6-shRfLuc : Expressionskonstrukte einer *short hairpin* RNA gegen *firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines U6-Promotors in pBS. Die shRNA enthält einen miR30-Loop und ist gegen die *firefly* Sequenz GAUUUCGAGUCGUCUAAAUGU (105) gerichtet.
- CMV-shRfLuc : Expressionskonstrukte einer *short hairpin* RNA gegen *firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors in pBS (s. U6-shRfLuc).
- prMinRGC-shRfLuc : Expressionskonstrukte einer *short hairpin* RNA gegen *firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines prMinRGC-Promotors in pBS (s. U6-shRfLuc).
- U6-miRfLuc : Expressionskonstrukte einer *micro* RNA gegen *firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines U6-Promotors in pBS. Die miRNA enthält die miR30-5'- und -3'-flankierenden Bereiche aus pShagMagic (Fa. OpenBiosystems) mit einer gegen *firefly* Luciferase gerichteten Sequenz (s. U6-shRfLuc) und einem miR30-Loop.
- CMV-miRfLuc : Expressionskonstrukte einer *micro* RNA gegen *firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors in pBS. Die miRNA enthält die miR30-5'- und -3'-flankierenden Bereiche aus pShagMagic (Fa. OpenBiosystems) mit einer gegen *firefly* Luciferase gerichteten Sequenz (s. U6-shRfLuc) und einem miR30-Loop.
- prMinRGC-miRfLuc : Expressionskonstrukte einer *micro* RNA gegen *firefly* Luciferase unter der Kontrolle eines prMinRGC-Promotors in pBS. Die miRNA enthält die miR30-5'- und 3'-flankierenden Bereiche aus pShagMagic (Fa. OpenBiosystems) mit einer gegen *firefly* Luciferase gerichteten Sequenz (s. U6-shRfLuc) und einem miR30-Loop.
- prE1A (5744) : Enthält den E1A-Promotor (Vektorsequenz 1 bis 541) in pBS.
- hTertgal (6597) : Enthält den Gal4 reprimierbaren hTert-Promotor in pBS.
- hTert-Luc (102) : Enthält das *firefly* Luciferasegen unter der Kontrolle des hTert-Core-Promotors in pGL2.

hTertgal-Luc	: Enthält das <i>firefly</i> Luciferasegen unter der Kontrolle des rekombinanten hTertgal-Promotors in pGL2
E1Agal-Luc	: Enthält das <i>firefly</i> Luciferasegen unter der Kontrolle des Gal4-KRAB reprimierbaren E1A Promotors in pGL2.
CMV ₂₃₀ gal-Luc	: Enthält das <i>firefly</i> Luciferasegen unter der Kontrolle des Gal4-KRAB reprimierbaren CMV ₂₃₀ -Promotors in pGL2.
CMV ₄₈₀ gal-Luc	: Enthält das <i>firefly</i> Luciferasegen unter der Kontrolle des Gal4-KRAB reprimierbaren CMV ₄₈₀ -Promotors in pGL2.
SV40gal-Luc	: Enthält das <i>firefly</i> Luciferasegen unter der Kontrolle des Gal4-KRAB reprimierbaren SV40-Promotors in pGL2.
EF1 α (NW3455)	: Enthält den EF1 α -Promotor mit einer MCS und einem polyA-Stoppsignal in pBS. Dient zur Klonierung von Expressionskonstrukten.
pIX (NW 5425)	: Enthält das adenovirale Protein pIX unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors.
SV40-Gal4KRAB	: Expressionskonstrukt des rekombinanten Gal4-KRAB Fusionsproteins unter der Kontrolle des SV40 Promotors.
Δ 22E1A (NW5022)	: Expressionskonstrukt der adenoviralen E1A-Proteine, bei denen N-Terminal 22 Aminosäuren deletiert sind, unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors.
CAR _{ex} TAT	: Expressionskonstrukt des rekombinanten CAR-TAT-Fusionsproteins unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

5.1.5 Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide (Zahlen in Klammern stellen Laborinterne Bezeichnung dar)

5.1.5.1 Klonierung von short hairpin RNA-Expressionsvektoren:

prMinRGC (1833) : Enthält den p53-abhängigen Promotor prMinRGC mit einer MCS und einem polyA-Stoppsignal in pBS. Der Vektor wurde als Basis für die PCR generierte shRNA Klonierungen. verwendet.



Die in dieser Arbeit im folgenden bezeichneten shRNAs enthalten eine mRNA-Zielsequenz von etwa 21 bis 23 nt mit einem miR30-Loop und die 28 nt 5' sowie die 21 nt 3' flankierenden Sequenzen des miR30-Systems.

Die shRNA-DNAs wurden als Oligonukleotide von der Fa. MWG bestellt und per PCR aufgefüllt. Anschließend wurde die vollständige shRNA-DNA über die Restriktionsschnittstellen *Xho* I und *Spe* I in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids prMinRGC kloniert. Alle nachfolgenden shRNAs erhalten Zielgenamen und die Sequenzposition.

Mit diesem Klonierungssystem konnten die so klonierten shRNA-DNAs über die *sites Nhe* I und *Spe* I isoliert und in die *Nhe* I bzw. *Spe* I *site* eines weiteren shRNA-Expressionskonstrukts kloniert werden. Damit konnten Konkatemere von hintereinander folgenden shRNAs erreicht werden. Bei den folgenden Konstrukten werden die shRNAs mit ihren Positionen im Expressionssystem, sowie ihrer Zielgenesequenz angegeben. Auf die Einzelheiten der Klonierung werden nicht weiter eingegangen. Die Oligosequenzen sind unter 5.1.8 zu finden. Falls nicht erläutert steht die shRNA-Expression unter der Kontrolle des p53-abhängigen Promotors prMinRGC.

shRScr-Kontroll Konstrukt

shRScr (1944) : Expressionskonstrukt einer Nonsense shRNA (shRScr) unter der Kontrolle eines prMinRGC-Promotors in pBS. Die shRScr-DNA wurde aus dem Konstrukt siScr mit den Restriktionssites Spe I und Xba I in die Xba I-site des Vektors prMinRGC kloniert.

shRfluc Konstrukte

p2260 : Expressionskonstrukt von drei hintereinander folgenden shRScr.
 p2299 : Expressionskonstrukt einer shRScr und upstream shRfLuc.
 p2317 : Expressionskonstrukt einer shRfLuc und upstream shRScr.
 p2343 : Expressionskonstrukt von drei shRScr und upstream shRfLuc
 p2379 : Expressionskonstrukt einer shRfLuc und upstream drei shRScr.
 p2424 : Expressionskonstrukt einer shRfLuc zwischen zwei shRScr.
 p2429 : Expressionskonstrukt zweier shRScr und upstream shRfLuc.
 p2443 : Expressionskonstrukt einer shRfLuc und upstream von zwei shRScr.
 p2343 : Expressionskonstrukt von drei shRScr und upstream shRfLuc.
 p2993 : Expressionskonstrukt von 6 hintereinander folgenden shRScr und einem shRfLuc.
 7xshRScr : Expressionskonstrukt von 7 hintereinander folgenden shRScr.

shRE1A-Konstrukte:

shRE1A-632 (2590) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenz GAAGAGGTAAGTGGCTGATAAT
 shRE1A-656 (3056) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenz CCACCTCCTAGCCATTTGAA
 shRE1A-685 (2241) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenz CCTTCACGAACTGTATGATTT
 shRE1A-736 (2577) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenz GGAGGCGGTTTCGCAGATTTT
 shRE1A-785 (3310) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenz GAAGGGATTGACTTACTCACTTTT
 shRE1A-905 (3396) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenz GTACCGGAGGTGATCGATCTT
 U6-shRE1A-736 (7259) : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenzposition 736 unter der Kontrolle des humanen U6-Promotors. Der U6-Promotor wurde aus dem Konstrukt U6-shRfLuc über die *sites Sma I* und *Spe I* isoliert und in die *Sma I*- und *Nhe I*-sites des Vektors shRE1A-736 (2577) kloniert.

shRE4-Konstrukte:

- shRE4-33041 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen alle E4-mRNAs mit der Zielsequenz (2960) GGAATATAACACCTAAGAATA
- shRE4-33056 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen alle E4-mRNAs mit der Zielsequenz (3478) GACAGGAAACCGTGTGGAATA
- shRE4-33126 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen alle E4-mRNAs mit der Zielsequenz (5587) CTGGACAGCGACATGAACTTAA
- shRE4-33231 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E4-mRNAs ORF 2,3,4 und 6 mit der Zielsequenz (2863) CCTATCCTGATGCACGATTAT
- shRE4-33592 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E4-mRNAs ORF 2,3,4 und 6 mit der Zielsequenz (5531) GGAGGTGGTGAATTACAACAT
- shRE4-33623 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E4-mRNAs ORF 2,3,4 und 6 mit der Zielsequenz (5558) CCATGTTTAATCAGAGGTTTATA
- shRE4-33751 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E4-mRNAs ORF 2,3,4 und 6 mit der Zielsequenz (2884) GAGCATGATGATCCATGGTTA
- shRE4-33934 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen alle E4-mRNAs mit der Zielsequenz (2898) CGAATGTAACACTTTGACAAT

shRE1B-Konstrukte:

- shRE1B-3630 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1B- und pIX-mRNA mit der Zielsequenz (6352) GGAAGCATTGTGAGCTCATAT
- shRE1B-3829 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1B- und pIX-mRNA mit der Zielsequenz (6053) GGATTGTGACTGACTTTGCTTT
- shRE1B-3868 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die E1B- und pIX-mRNA mit der Zielsequenz (6064) GCAGTGCAGCTTCCCGTTCAT

shRpTp-Konstrukte:

- shRpTp-9651 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp-mRNA mit der Zielsequenz (6242) CGGAGTACCTACACAACAATT
- shRpTp-9734 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp-mRNA mit der Zielsequenz (6254) CCTTGCGACTGTGACTGGTTA
- shRpTp-9963 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp-mRNA mit der Zielsequenz (6265) GGTAGAAAGGCTCATGCAAGA
- shRpTp-9988 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp-mRNA mit der Zielsequenz (6384) CAAGAGGAAGGAGAAGAAGAA

shRAdpol-Konstrukte:

- shRAdpol-6178 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp- und Adpol-mRNA mit der Zielsequenz (4348) CGGGCCAGGTGAATATCAAAT
- shRAdpol-6361 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp- und Adpol-mRNA mit der Zielsequenz (4358) GCGAATACGTGCAGCTAAACAT
- shRAdpol-6786 : Expressionskonstrukt einer shRNA gegen die pTp- und Adpol-mRNA mit der Zielsequenz (4384) CTACCCTACATATCTTGAATA

Expressionsvektoren von mehrfach shRNA gegen adenovirale mRNAs

- shRE1A-2x736 : Expressionskonstrukt zwei hintereinander klonierter shRNAs gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenzposition 736.
- shRE1A-2x788 : Expressionskonstrukt zwei hintereinander klonierter shRNAs gegen die E1A-mRNA mit der Zielsequenzposition 785.
- KF26 : Expressionskonstrukt zwei hintereinander klonierter shRNAs gegen die E1A-mRNA mit den Zielsequenzpositionen 785 und 736.
- KF46 : Expressionskonstrukt zwei hintereinander klonierter shRNAs gegen die E4-mRNA mit den Zielsequenzpositionen 33056 und 33623.
- KF54 : Expressionskonstrukt zwei hintereinander klonierter shRNA gegen die pTp- und Adpol-mRNA mit den Zielsequenzpositionen 9651 und 6361.
- KF92 : Expressionskonstrukt drei hintereinander klonierter shRNAs gegen die E1A- und E1B-mRNA mit den Zielsequenzpositionen 785, 736 und 3630.
- KF104 : Expressionskonstrukt vier hintereinander klonierter shRNAs gegen die E4-, pTp- und Adpol-mRNA mit den Zielsequenzpositionen 33056, 33623, 9651 und 6361.
- KF127 : Expressionskonstrukt 7 hintereinander klonierter shRNAs gegen die E1A-, E1B-, pIX-, E4-, pTp- und Adpol-mRNA mit den Zielsequenzpositionen 785, 736, 3630, 33056, 33623, 9651 und 6361.

5.1.5.2 Klonierung von psiCHECK-Derivaten

- psiCheck-E1A : Expressionskonstrukt einer *renilla* Luciferase, die im 3'-UTR Bereich das Adenovirusgenomfragment des Sequenzbereichs 541 bis 926 enthält. Dazu wurde das Fragment durch PCR mit den Primern Fw-Xho I-E1A-541 und Rev-Not I-E1A-926 aus dem Adenovirusvektor Adp53sensor regeneriert. Über die auf diese Weise erhaltenen *Xho* I- und *Not* I-Restriktionsschnittstellen an den Termini des PCR-Fragments konnte eine Klonierung in die entsprechenden *sites* des Vektors psiCHECK erfolgen.
- psiCheck-E1B : Expressionskonstrukt einer *renilla* Luciferase, die im 3'-UTR Bereich ein Adenovirusgenom fragment des Sequenzbereichs 3608 bis 4070 enthält. Verfahren analog zu psiCheck-E1A bei Verwendung des Primerpaares Fw-Xho I-E1B-3608 und Rev-Not I-E1B-3470.
- psiCheck-E4-1 : Expressionskonstrukt einer *renilla* Luciferase, die im 3'-UTR Bereich den Adenovirusgenomfragment des Sequenzbereichs 33400 bis 32881 *antisense* enthält. Verfahren analog zu psiCheck-E1A bei Verwendung des Primerpaares Fw-Xho I-E4-33400 und Rev-Not I-E4-32881.
- psiCheck-E4-2 : Expressionskonstrukt einer *renilla* Luciferase, die im 3'-UTR Bereich den Adenovirusgenomfragment des Sequenzbereichs 34097 bis 33381 *antisense* enthält. Verfahren analog zu psiCheck-E1A bei Verwendung des Primerpaares Fw-Xho I-E4-34097 und Rev-Not I-E4-33381.
- psiCheck-pTp : Expressionskonstrukt einer *renilla* Luciferase, die im 3'-UTR Bereich den Adenovirusgenomfragment des Sequenzbereichs 10214 bis 9365 *antisense* enthält. Verfahren analog zu psiCheck-E1A bei Verwendung des Primerpaares Fw-Xho I AdpTP-10214 und Rev-Not I AdpTP-9365.
- psiCheck-Adpol : Expressionskonstrukt einer *renilla* Luciferase, die im 3'-UTR Bereich den Adenovirusgenomfragment des Sequenzbereichs 6809 bis 6106 *antisense* enthält. Verfahren analog zu psiCheck-E1A bei Verwendung des Primerpaares Fw-Xho I-AdPol-6809 und Rev-Not I-AdPol-6106.

5.1.5.3 Klonierung von Expressionsvektoren adenoviraler Proteine

- E1A (S7) : Expressionskonstrukt der adenoviralen E1A-Proteine unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors. Dazu wurde das E1A-Fragment durch PCR mit den Primern Fw-Spe I-E1A und Rev-Not I-E1A aus dem Adenovirusvektor Adp53sensor regeneriert und in die entsprechenden *sites* des Vektors EF1 α kloniert.
- E1B-55K (S1) : Expressionskonstrukt der adenoviralen E1B-Proteine unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors. Dazu wurde das E1A-Fragment durch PCR mit den Primern Fw-Spe I-E1B und Rev-Not I-E1B aus dem Adenovirusvektor Adp53sensor regeneriert und in die entsprechenden *sites* des Vektors EF1 α kloniert.
- E1B-156R (S8) : Expressionskonstrukt des adenoviralen E1B156R-Proteins unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors. Dazu wurde das Fragment durch PCR mit den Primern Fw-Spe I-E1B und Rev-Not I-E1B aus cDNA aus der Zelllinie 293 durch Gelextraktion der entsprechenden Spleißvariante gewonnen und in die entsprechenden *sites* des Vektors EF1 α kloniert.
- E4 (S3) : Expressionskonstrukt des adenoviralen E4-ORF6-Proteins unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors. Dazu wurde das Fragment durch PCR mit den Primern Fw-Spe I-E4 und Rev-Not I-E4 aus dem Adenovirusvektor Adp53sensor regeneriert und in die entsprechenden *sites* des Vektors EF1 α kloniert.

5.1.5.4 Klonierung proviraler Shuttlevektoren

- p7606 : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des hTert-Promotors. Die E1B-mRNA-Sequenz wurde im 3'-UTR mit der adenoviralen Vektorsequenz von 3614 bis 3661 ergänzt, um eine shRE1B-3630-abhängige Reprimierung zu ermöglichen. Dazu wurden die Oligonucleotide 3'-UTR E1B-s und 3'-UTR E1B-as annealt und über *EcoR* I und *Not* I in den Vektor K93 anstelle des IRES-GFP-Fragments kloniert.
- prE1A- Δ 22E1A/E1B : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des E1A-Promotors. Der Promotor wurde aus dem Plasmid prE1A (5744) über *Xba* I und *Xho* I in die *Nhe* I und *Xho* I des Plasmids Δ 22E1A/E1B kloniert.
- prE1A- Δ 22E1A/E1B3' : Enthält die rekombinante E1-Region unter der Kontrolle des E1A-Promotors mit erweiterter DNA-Sequenz im 3'-UTR der E1B-Region. Mit der Erweiterung des 3'UTRs im E1B-Gen, um eine shRE1B-3630-abhängige Reprimierung zu ermöglichen. Dazu wurde das DNA-Fragment mit *EcoR* I und *Mlu* I aus p7606 isoliert und in die entsprechenden *sites* des Vektors prE1A- Δ 22E1A/E1B kloniert.
- prE1A- Δ 22E1A3'/E1B3' : Enthält die rekombinante E1-Region unter der Kontrolle des E1A-Promotors mit erweitertem E1B- und E1A- 3'-UTR. Zur Erhöhung der RNAi-Effizienz wurde das 3'-UTR im E1A-Gen mit den Zielsequenzen für shRE1A-785, shRE1A-785 und shRE1B-3630 versetzt. Dazu wurden die partial überlappenden Oligonucleotide 3'-UTR E1A-s und 3'-UTR E1A-as annealt und mit der Herculase DNA-Polymerase aufgefüllt. Das so generierte DNA-Fragment wurde anschließend über die *sites* *Sma* I und *Hpa* I in die *Hpa* I-site des Vektors prE1A- Δ 22E1A/E1B3' kloniert.
- prhTertgal- Δ 22E1A/E1B : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des Gal4 reprimierbaren hTert-Promotors (hTertgal). Der Promotor wurde aus dem Plasmid hTertgal (6597) über *Spe* I und *Xho* I in die *Nhe* I und *Xho* I des Plasmids Δ 22E1A/E1B kloniert.
- prhTertgal- Δ 22E1A/E1B-156R : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des hTertgal-Promotors, wobei die E1B-Region nur aus der Expression der E1B156R-Spleißvariante besteht. Das DNA-Fragment wurde aus dem Konstrukt E1B-156R (S8) über *Nco* I und *Not* I isoliert und in die entsprechenden *sites* des Konstrukts prhTertgal- Δ 22E1A/E1B einkloniert.

- Shuttle-iREP-C : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region mit erweitertem E1B-3'-UTR unter der Kontrolle des E1A-Promotors und einer p53-abhängigen shRScr-Expressionskassette. Die shRScr-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt 7xshRScr mit *Sma* I und *EcoR* V isoliert und in die *Mlu* I mit anschließendem Klenow-*fill-in* des Vektors prE1A-Δ22E1A/E1B3' über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.
- Shuttle-iREP-1 : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region mit erweitertem E1B-3'-UTR unter der Kontrolle des E1A-Promotors und einer p53-abhängigen shRNA-Expressionskassette gegen adenovirale mRNAs. Die shRNA-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt KF127 mit *Sma* I und *EcoR* V isoliert und in die *Mlu* I mit anschließendem Klenow-*fill-in* des Vektors prE1A-Δ22E1A/E1B3' über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.
- Shuttle-iREP-2 : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region mit erweitertem E1A- und E1B-3'-UTR unter der Kontrolle des E1A-Promotors und einer p53-abhängigen shRNA-Expressionskassette gegen adenovirale mRNAs. Die shRNA-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt KF127 mit *Sma* I und *EcoR* V isoliert und in die *Mlu* I mit anschließendem Klenow-*fill-in* des Vektors prE1A-Δ22E1A3'/E1B3' über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.
- Shuttle-p53T-C : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des Gal4 reprimierbaren hTert-Promotors (hTertgal) und einer p53-abhängigen shRScr-Expressionskassette. Die shRScr-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt 7xshRScr mit *Sma* I und *EcoR* V isoliert und in die *EcoR* V des Vektors prhTertgal-Δ22E1A/E1B über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.
- Shuttle-p53T : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des Gal4 reprimierbaren hTert-Promotors (hTertgal) und einer p53-abhängigen Gal4-KRAB-Expressionskassette. Die Gal4-KRAB-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt p2337 mit *Kpn* I und *Sac* I isoliert und nach anschließendem Klenow-*fill-in* in die *EcoR* V-*site* des Vektors prhTertgal-Δ22E1A/E1B über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.
- Shuttle-p53T-156R-C : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des Gal4 reprimierbaren hTert-Promotors (hTertgal) und einer p53-abhängigen shRScr-Expressionskassette. Die shRScr-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt 7xshRScr mit *Sma* I und *EcoR* V isoliert und in die *EcoR* V des Vektors prhTertgal-Δ22E1A/E1B-156R über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.
- Shuttle-p53T-156R : Enthält die rekombinante adenovirale E1-Region unter der Kontrolle des Gal4 reprimierbaren hTert-Promotors (hTertgal) und einer p53-abhängigen Gal4-KRAB-Expressionskassette. Die Gal4-KRAB-Expressionseinheit wurde aus dem Konstrukt p2337 mit *Kpn* I und *Sac* I isoliert und nach anschließendem Klenow-*fill-in* in die *EcoR* V-*site* des Vektors prhTertgal-Δ22E1A/E1B-156R über eine *blunt-end*-Ligation inkloniert.

5.1.5.5 Klonierung adenoviraler Vektoren

- pAd-iREP-C (EG8166) : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids Shuttle-iREP-C. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce* I und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.
- pAd-iREP-1 (EG8202) : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids Shuttle-iREP-1. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce* I und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.
- pAd-iREP-2 (EG9427) : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids Shuttle-iREP-2. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce* I und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.
- pAd-p53T-C : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids

- (EG8241) Shuttle-p53T-C. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce I* und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.
- pAd-p53T (EG8311) : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids Shuttle-p53T. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce I* und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.
- pAd156R-p53T-C (EG8822) : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids Shuttle-p53T-156R-C. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce I* und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.
- pAd156R-p53T (EG8917) : Dieses rekombinante Adenovirusplasmid enthält die Expressionseinheiten des Plasmids Shuttle-p53T-156R. Die Klonierung erfolgte über Restriktion mit *I-Ceu* und *PI-Sce I* und Ligation mit dem Vektor pAdHM4.

5.1.6 Adenoviren

- Ad-LacZ : Enthält das Gen der β -Galactosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Das hierbei verwendete replikationsdefiziente Adenovirus des humanen Serotyps-5 ist ein Derivat der Mutante dl309 und weist eine Deletion im Bereich der E3- sowie der E1-Region auf. Die E1-Deletion ist entscheidend für die Replikationsdefizienz. Dieses Virus ist für die Propagation auf die permissive Zelllinie 293 angewiesen. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. D. Brenner und Dr. K. Streetz überlassen. Bei diesem Virus wurde durch homologe Rekombination mit einem pacCMV-Vector das LacZ-Transgen in das virale Genom eingeführt.
- ONYX-015 : Adenovirusderivat der Mutante dl309 mit einer weiteren Deletion des E1B-55K-Proteins.
- Ad-wt : Adenovirus des humanen Serotyps-5.
- Adp53sensor (3) : Enthält den Repressor GAL4-KRAB unter der Kontrolle des p53-abhängigen prMin-RGC-Promotors. Rekombinantes Adenovirus des humanen Serotyp 5. Die E3-Region ist deletiert und die E1-Region steht unter der Kontrolle des Gal4 reprimierbaren Promotors CMVgal.
- Ad-CAR_{ex}-TAT (5091) : Ein nicht-replikatives Adenovirus mit der Expressionkassette des Fusionsproteins CAR_{ex}-TAT unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

5.1.7 Im Rahmen dieser Arbeit generierte Adenoviren

- Ad-iREP-C : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige shRScr-Expressionkassette enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd-iREP-C (EG8166) generiert.
- Ad-iREP-1 : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige shRNA-Expressionkassette gegen adenovirale mRNAs enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd-iREP-1 (EG8202) generiert.
- Ad-iREP-2 : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige shRNA-Expressionkassette gegen adenovirale mRNAs enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd-iREP-2 (EG9427) generiert.
- Ad-p53T-C : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige shRScr-Expressionkassette enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd-p53T-C (EG8241) generiert.
- Ad-p53T : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige Gal4-KRAB-Expressionkassette enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd-p53T (EG8311) generiert.

- Ad156R-p53T-C : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige shRScr-Expressionskassette enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd156R-p53T-C (EG8822) generiert.
- Ad156R-p53T : Replikatives Adenovirus, welches eine p53-abhängige Gal4-KRAB-Expressionskassette enthält. Wurde aus dem Plasmid pAd156R-p53T (EG8311) generiert.

5.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG, Ebersberg bezogen. Die Sequenzangabe ist stets in 5'-3'-Richtung dargestellt.

Oligonukleotide zur shRNA generierung

fwXhoshR	TTCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG
revSpeshR	AAAAC TAGTGAATTCCGAGGCAGTAGGCA
shRfLuc774-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGAUUUCGAGUCGUCUAAUGUG TGAAGCCACAGATGAC
shRfLuc774-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGAUUUCGAGUCGUCUAAUGUCATCT GTGGCTTCACACATTAAGA
shRE1A-632-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGAAGAGGTTACTGGCTGATAATG TGAAGCCACAGATGAT
shRE1A-632-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGAAGAGGTTACTGGCTGATAATCATCTG TGGCTTCACATTATCAGC
shRE1A-656-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACCACCTCCTAGCCATTTTGAAGT GAAGCCACAGATGTT
shRE1A-656-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACCCACCTCCTAGCCATTTTGAACATCTGT GGCTTCACTTCAAAATG
shRE1A-685-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACCTTCACGAACTGTATGATTTGT GAAGCCACAGATGAA
shRE1A-685-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACCCCTTCACGAACTGTATGATTTTCATCTGT GGCTTCACAAATCATAAC
shRE1A-736-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGGAGGCGGTTTCGCAGATTTTGT GAAGCCACAGATGAA
shRE1A-736-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGGAGGCGGTTTCGCAGATTTTCATCTGT GGCTTCACAAATCTGC
shRE1A-785-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGAAGGGATTGACTTACTCATCTT TGTGAAGCCACAGATGAA
shRE1A-785-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGAAGGGATTGACTTACTCATCTTTTCATC TGTGGCTTCACAAAGATGAG
shRE1A-905-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGTACCGGAGGTGATCGATCTTGT GAAGCCACAGATGAA
shRE1A-905-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGTACCGGAGGTGATCGATCTTCATCTGT GGCTTCACAAGATCGAT
shRE4-33041-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGGAATATAACACCTAAGAATAG TGAAGCCACAGATGTA
shRE4-33041-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGGAATATAACACCTAAGAATACATCTG TGGCTTCACTATTCTTAG
shRE4-33056-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGACAGGAAACCGTGTGGAATAG TGAAGCCACAGATGTA
shRE4-33056-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACGACAGGAAACCGTGTGGAATACATCTG TGGCTTCACTATTCCACA
shRE4-33126-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGGACAGCGACATGAACTTAA GTGAAGCCACAGATGTT
shRE4-33126-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACCTGGACAGCGACATGAACTTAACATCT GTGGCTTCACTTAAGTTCA
shRE4-33231-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACCTATCCTGATGCACGATTATGT GAAGCCACAGATGAT
shRE4-33231-rev	GAATTCGAGGCAGTAGGCACCCCTATCCTGATGCACGATTATCATCTGT GGCTTCACATAATCGTG

shRE4-33592-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGGAGGTGGTGAATTACAACATG TGAAGCCACAGATGAT
shRE4-33592-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGGAGGTGGTGAATTACAACATCATCTG TGGCTTCACATGTTGTAA
shRE4-33623-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACCATGTTTAATCAGAGGTTTATA GTGAAGCCACAGATGTA
shRE4-33623-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCCATGTTTAATCAGAGGTTTATACATCT GTGGCTTCACTATAAACCT
shRE4-33751-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGAGCATGATGATCCATGGTTAGT GAAGCCACAGATGTA
shRE4-33751-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGAGCATGATGATCCATGGTTACATCTGT GGCTTCACTAACCATGG
shRE4-33934-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACGAATGTAACACTTTGACAATGT GAAGCCACAGATGTA
shRE4-33934-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCGAATGTAACACTTTGACAATCATCTGT GGCTTCACTTGTCAAA
shRE1B-3630-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGGAAGCATTGTGAGCTCATATGT GAAGCCACAGATGAT
shRE1B-3630-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGGAAGCATTGTGAGCTCATATCATCTGT GGCTTCACTATGAGCT
shRE1B-3829-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGGATTGTGACTGACTTTGCTTTG TGAAGCCACAGATGAA
shRE1B-3829-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGGATTGTGACTGACTTTGCTTTCATCTG TGGCTTCACAAAGCTTAG
shRE1B-3868-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGCAGTGCAGCTTCCCGTTCATGT GAAGCCACAGATGAT
shRE1B-3868-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGCAGTGCAGCTTCCCGTTCATCATCTGT GGCTTCACTGAACGGG
shRpTp-9651-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACGGAGTACCTACACAACAATTGT GAAGCCACAGATGAA
shRpTp-9651-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCGGAGTACCTACACAACAATTCATCTG TGGCTTCACAATTGTTGT
shRpTp-9734-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACCTTGGCGACTGTGACTGGTTAGT GAAGCCACAGATGTA
shRpTp-9734-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCCCTTGGCGACTGTGACTGGTTACATCTGT GGCTTCACTAACCATGC
shRpTp-9963-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGGTAGAAAGGCTCATGCAAGAG TGAAGCCACAGATGTC
shRpTp-9963-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGGTAGAAAGGCTCATGCAAGACATCTG TGGCTTCACTCTTGCATG
shRpTp-9988-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGAGGAAGGAGAAGAAGAA GTGAAGCCACAGATGTT
shRpTp-9988-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCAAGAGGAAGGAGAAGAAGAACATCT GTGGCTTCACTTCTTCTTC
shRAdpol-6178-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACGGGCCAGGTGAATATCAAATG TGAAGCCACAGATGAT
shRAdpol-6178-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCGGGCCAGGTGAATATCAAATCATCTG TGGCTTCACTTTGATAT
shRAdpol-6361-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGAGCGAATACGTGCAGCTAAACAT GTGAAGCCACAGATGAT
shRAdpol-6361-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACGCGAATACGTGCAGCTAAACATCATCT GTGGCTTCACTGTTTAGC
shRAdpol-6786-fw	GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTACCCTACATATCTTGAATAG TGAAGCCACAGATGTA
shRAdpol-6786-rev	GAATTCCGAGGCAGTAGGCACCTACCCTACATATCTTGAATACATCTG TGGCTTCACTATTCCAAG

Oligonukleotide zur Generierung von psiCHECKTM-2-Derivate

Fw-Xho I-E1A-541	CCCCTCGAGTCCGACACCGGGACTGAA
Rev-Not I-E1A-926	GGGCGGCCGCTAAGATCGATCACCTCCG
Fw-Xho I-E1B-3608	CCCTCGAGCATGAGCACCAACTCGTTTGATGG

Rev-Not I-E1B-4070	GGGCGGCCGCGATCCAAATCCAAACAGAGTCTGG
Fw-Xho I-E4-33400	CCCTCGAGCTGTGCTGATTTAAGTGAGA
Rev-Not I-E4-32881	GGGCGGCCGCGAGATCACCGTACCATAATCA
Fw-Xho I-E4-34097	CCCTCGAGCTGGTTTTGCTTCAGGAAAT
Rev-Not I-E4-33381	GGGCGGCCGCTCTCACTTAAATCAGCACAG
Fw-Xho I AdpTP-10214	CCCTCGAG ACTTAC ACC ATC AAC ACG GGC GCA
Rev-Not I AdpTP-9365	GGGCGGCCGCTTCAATCTCTCTTCCATAAGGG
Fw-Xho I-AdPol-6809	CCCCTCGAGCAGCATCCGCGGTGGAAGATG
Rev-Not I-AdPol-6106	GGGCGGCCGCAAGCGGGCATGACTTCTGCGC

Oligonukleotide zur Generierung von Expressionsvektoren von adenoviralen Proteinen

Fw-Spe I-E1A	GGGACTAGTAAAATGAGACATATTATCTGCCACGG
Rev-Not I-E1A	AAGCGGCCGCTTATGGCCTGGGGCGTTTACA
Fw-Spe I-E1B	GGGACTAGTATGGAGCGAAGAAACCCATCT
Rev-Not I-E1B	AAGCGGCCGCTCAATCTGTATCTTCATCGCTAGA
Fw-Spe I-E4	GGGACTAGTATGACTACGTCCGGCGTTCCA
Rev-Not I-E4	AAGCGGCCGCTACATGGGGGTAGAGTCATA

Oligonukleotide zur 3'-UTR-Klonierung

3'UTR E1B-s	GGGGAATTCACCAACTCGTTTGATGGAAGCATTGTGAGCTCATATTTGA CAACGCGCGGCCGCC
3'UTR E1B-as	GGGGCGGCCGCGCGTTGTCAAATATGAGCTCACAATGCTTCCATCAAA CGAGTTGGTGAATTCCCC
3'UTR E1A-s	GGGTAAACACACAGGAGGCGGTTTCGCAGATTTTTACACACAGAAGGG ATTGACTTACTCATC
3'UTR E1A-as	CCCCCGGTCTCATATGAGCTCACAATGCTTCTGTGTGTAAGATGAG TAAGTCAATCCCTTC

Oligonukleotide zur quantitativen PCR adenoviraler DNA

Hex-fw	TGCCTTTACGCCACCTTCTTC
Hex-rev	CGGGTATAGGGTAGAGCATGTTG
Hex-Sonde (FAM/BHQ)	CCACAACACCGCCTCCACGCTTGA

Oligonukleotide zur reversen Transkription

Oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTTTT/A/T/C
E1A-rev	CGTCGTCACTGGGTGGAAA
E1B-rev	GTCCAGGCTTCCACACAGGTA
pTp-rev	TGCACCTGCGTGAGGGTAG
Fiber-rev	CAAGTATTTGACTGCCACATTTTGT
VA I-rev	GGTCGTCCGCCATGATACC

Oligonukleotide zur quantitativen PCR von cDNA

GAPDH-fw	TGGGCTACACTGAGCACCAG
GAPDH-rev	GGGTGTCGCTGTTGAAGTCA
E1A-fw	GCCGGAGCAGAGAGCCTT
E1A-rev	CGTCGTCACTGGGTGGAAA
E1B-fw	GGCCCCAATTTTAGCGGTAC
E1B-rev	GTCCAGGCTTCCACACAGGTA
Fiber-fw	TTTGTGGACCACACCAGCTC
Fiber-rev	CAAGTATTTGACTGCCACATTTTGT
pTp-fw	AACTGGTCCGTTATGGCCAA
pTp-rev	TGCACCTGCGTGAGGGTAG
VA I-fw	CTCTTCCGTGGTCTGGTGGGA
VA I-rev	GGTCGTCCGCCATGATACC

Sequenzierprimer pBluescript KS-Derivate

T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG

Sequenzierprimer für psiCHECKTM-2-Derivate

rLuc3'UTR	CAGCCAGGAGGACGCTCCAGA
E1B-3331-fw	TCTGGAAGGTGCTGAGGTACGATG

5.1.9 Antikörper

Rabbit Anti-E1A (polyklonal)	Santa Cruz
Rabbit Anti-GAL4-DBD X	Santa Cruz
Anti-Rabbit IgG (HRP-linked)	Cell Signaling

5.1.10 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Gibco
Agarose (Electrophoresis grade)	Gibco
Ammoniumacetat	AppliChem
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
ATP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Agar noble	Gibco
Hefeextrakt	Gibco
Bacto-Tryptone	Gibco
BES (N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2 aminoethansulfonsäure)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva
Calciumchlorid	Merck
Carbenicillin	Serva
Cäsiumchlorid	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	Appllichem
DMEM with Glutamax-I	Gibco
EDTA (N,N',N',N'-Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Serva
Glycylglycin	Sigma
Glycin	AppliChem
Hepes(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure)	ICN
Isopropanol	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Lipofectamine TM	Invitrogen
Luciferin-Natriumsalz	AppliChem
Lysozym	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Magermilchpulver	Serva
Methanol.	J.T.Baker
MOPS (3-(N-Morpholin)propansulfonsäure)	Sigma
Natriumhydroxid	Merck
Natriumacetat	AppliChem

Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Natriumfluorid	Merck
Natriumvanadat	Merck
Nonidet-P-40 (NP-40)	Sigma
ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid)	Sigma
PBS (phosphate buffered saline)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC)	Pharmacia
Polyethylenglycol 8000 (PEG-8000)	Sigma
Roti-Blue	Roth
Rotiphenol/Chloroform	Roth
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel-de-Häen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
TLCK (N-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon)	Sigma
TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem
Triton-X-100	Sigma
Trypsin	Seromed
Tryptose phosphate broth	Gibco
Tween 20	Serva
X-gal (5-Bromo 4-chloro 3-indolyl-Galactosid)	Sigma
Xylencyanol	Merck

5.1.11 Molekulargewichtsstandards

1kb+ DNA-Leiter	Gibco
peqGOLD Protein-Marker IV	peQLab

5.1.12 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEB
Herculase TM Hotstart DNA Polymerase	Stratagene
Klenow Polymerase	NEB
Lysozym	Sigma
RNAse A, DNase frei	Boehringer
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Pharmacia
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-Polynukleotidkinase	NEB
Reverse Transkriptase	Qiagen
Proteinase K	Sigma

5.1.13 Kits

Qiagen Endofree Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Qiagen RNeasy Kit	Qiagen
QIAamp-DNA-Mini Kit	Qiagen
ECL-Detection Kit	Amersham
Adeno-X Rapid-Titer Kit	Clonetech
Vivapure Adenopack 20 Kit	Vivascience
Herculase PCR Kit	Stratagene
RNAse freies DNase Kit	Promega
peqGOLD RNAPure	PeQLab

SYBR-Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan™ Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
qPCR™ Mastermix Plus	Eurogentec
Ubiquitin C Control Kit	Eurogentec
18S Genomic Control Kit	Eurogentec

5.1.14 Sonstige Materialien und Geräte

ABI 7300 RealTime PCR System Gerät	Applied Biosystems
Bakterienschüttler	Bühler
BioRad Protein Assay	Biorad
Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus
Centrifuge-Tubes, Ultra-Clear™	Beckmann
Cryostat Microm HM 500 OM	Omega
Dialyseschläuche, Typ 8/32	Roth
Dialysekassetten	Pierce
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Greiner
Filterpapier 3MM	Whatman
Filmkassetten	Kodak
Fotofilm Ektachrom 400/100	Kodak
Grundausrüstung für die Tieroperation	MHH
Heizblock	Eppendorf
Hybond Membrane	Millipore
Kulturschalen	Greiner
Kühlzentrifugen J2-21, Avanti™ J-25	Beckman
Kryoröhrchen	Nunc
Lumat	Berthold
Mikrotiterplatten-Spektralphotometer	MWG
Neubauer-Zählkammer	Brand
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen	Fa. Beckman
Rotoren (JA 10, JA 20, SW-28i, SW 32)	Beckman
Röntgenfilme	Amersham
Spektralphotometer	MWG
Sterican® 0,8 x 4 mm Kanülen	B.Braun
Sterilfilter (0,2 µm)	Millipore
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Vortexer	Scientific Industries
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml steril	Greiner
Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen	Greiner

5.1.15 Medien und Pufferlösungen

Nährmedien für die Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in DMEM + Glutamax (Fa. Gibco BRL), versetzt mit 10 % (v/v) FCS (Fa. Gibco BRL) sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Seromed) zur antibakteriellen Prophylaxe, kultiviert.

Nährmedien für Bakterien

LB-Medium:

10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid wurden auf 1000 ml mit dest. H₂O aufgefüllt und autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zur plasmidspezifischen Selektion erfolgte unmittelbar vor Inkulturnahme.

LB-Agarplatten:

1 l LB-Medium wurde mit 15 g Agar versetzt und autoklaviert. Zur Selektion plasmidpositiver Klone wurde das erforderliche Antibiotikum nach Abkühlung auf unter 60°C zugefügt und der Ansatz in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

SOC-Medium:

2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 0,05 g Natriumchlorid und 0,4 g Glucose wurden mit 1 ml 1 M Magnesiumchlorid und 1 ml 1 M Magnesiumsulfat versetzt und mit dest. H₂O auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Das Medium wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Pufferlösungen

1 x PBS	: 10 mM Natriumphosphat pH 7,4 150 mM NaCl
1 x TAE	: 40 mM Tris/Acetat pH 8,5 2 mM EDTA
TE pH 8,0	: 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
2 x BBS-Puffer pH 6,95	: 280 mM NaCl 50 mM BES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
Dialysepuffer	: 10 mM Tris pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl
RIPA-Puffer	: 9% Nonidet P-40 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS PBS vor Gebrauch 5µl Proteaseinhibitor/10 ml frisch dazugeben
5 x Extraktions-Puffer (Dieses 5 x Konzentrat wurde bei 4°C angesetzt und gelagert, da bei RT Trübung auftritt)	: 125 mM Tris/phosphat, pH 7,8 10 mM EDTA, pH 8,0 10 mM DTT (frisch) 50 % Glycerol 5 % Triton-X 100
Luciferase-Messpuffer	: 25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO ₄ 5 mM ATP (frisch)
β-Galactosidase- Reaktionslösung	: 1 mg/ml ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, frisch) 2 mM DTT (frisch) 1 mM MgSO ₄ 10 mM KCl 60 mM Na ₂ HPO ₄
10 x DNA-Ladepuffer	: 20 % (w/v) Ficoll400 0,1 M EDTA, pH 8,0 1 % SDS 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylencyanol FF (w/v)
5 x SDS Protein-Ladepuffer	: 150 mM Tris/HCl, pH 6,8 6 % SDS 15 mM DTT 0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol

Titrationpuffer	:	100 mM CaCl ₂ 70 mM MgCl ₂ 40 mM Natriumacetat, pH 5,5
STET-Puffer	:	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 5 % Triton X-100
Transferpuffer, pH 8,3	:	39 mM Glycine 48 mM Tris-HCl 0,037 % SDS 20 % Methanol
Waschpuffer (TBS-Tween) pH 7,6	:	20 mM Tris-HCl 137 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Stripping-Puffer, pH 6,7	:	65,5 mM Tris-HCl 2 % SDS 100 mM 2-Mercaptoethanol
10 x SDS-Laufpuffer (add 1000ml)	:	250 mM Tris 1,92 M Glycine 1 % SDS
10 x Bindepuffer	:	500 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 8.0) 1,5 M NaCl
Protein-Waschpuffer	:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Protein-Elutionspuffer	:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 100 mM L-Histidine

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in 250 ml Gewebekulturflaschen mit 12,5 ml Kulturmedium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplementiert mit 10 % FCS (v/v), Penicillin und Streptomycin (0,1 mg/ml) und bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die verschiedenen Zelllinien wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 90 % umgesetzt. Da die HepG2-Zellen zur Aggregation neigen, wurden sie bei der Passagierung durch eine 0,4 mm-Kanüle gezogen, um die Zellen zu vereinzeln.

Bei Erreichen der Konfluenz des Zellrasens wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert. Dazu wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben (2 ml / 250 ml-Flasche) und kurz geschwenkt. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst hat. Die Inkubation dauerte etwa 5 min mit 1 x Trypsinlösung (0,5% Trypsin in PBS). HepG2-Zellen mussten mit 3 x Trypsin behandelt werden. 293- und Huh7-Zellen konnten auch bei Raumtemperatur mit 1 x Trypsinlösung inkubiert werden.

Nachdem sich die Zellen abgerundet und vom Flaschenboden gelöst hatten (durch Klopfen unterstützt), wurden sie in frischem Medium resuspendiert. Durch das FCS im Medium wird Trypsin inaktiviert. Aus dieser Zellsuspension wurden die Zellen mit frischem DMEM-Medium verdünnt und weiter kultiviert.

5.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zunächst wurden Zellen trypsinisiert und zur Vereinzelung mehrmals auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension wurde sorgfältig gemischt und 80 µl zu 20 µl einer Trypanblau-Lösung pipettiert, um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können. Das Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt und anschließend wurden 1-2 Tropfen gegeben. Das Zählfeld besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils aus 16 kleinen Quadraten aufgebaut sind. Gezählt wurden zwei große Quadrate. Der erhaltene Mittelwert multipliziert mit dem Faktor $1,25 \times 10^4$ entspricht der Zellzahl/ml.

5.2.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden nach der Trypsinierung mit Medium aufgenommen und bei 200 x g (10 min, RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (DMEM mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert und bei -80°C mit einem Temperaturgradienten von -1°C / min vorgefroren. Nach 24 h wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2.4 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden schnell per Hand oder bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden unter der Sterilbank mit 10-facher Menge (~10 ml) Kulturmedium aufgenommen und bei 200 x g, 10 min bei 4°C zentrifugiert. Unter der Sterilbank wurde das Pellet in 12,5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in 250 ml Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Adhäsion kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt.

5.2.5 Transiente Transfektion durch Calciumphosphatpräzipitation

Zur Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen wurde die Transiente Transfektion durch Calciumphosphatpräzipitation durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein DNA-Calciumphosphat-Präzipitat gebildet und durch Endocytose in die Zellen unter Schockbedingungen aufgenommen. Diese Transfektionsmethode eignete sich besonders gut für die Zelllinien HepG2, Huh7 und 293.

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit 1×10^6 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Zellen zur Transfektion verwendet werden.

In einem Reaktionsgefäß wurden pro Transfektionsansatz 5 µg DNA-Mischung (1 µg Reporter, 1 µg Repressor, 0,3 µg CMV-LacZ (Transfektionseffizienzkontrolle) und 2,7 µg pBS (Nonsens-DNA) zunächst mit 150 µl 0,25 M CaCl₂-Lösung (stets frisch hergestellt) bei Raumtemperatur vermischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl 2 x BBS-Puffer pH 6,95 (s. 5.1.15, S. 75). Der Ansatz wurde vorsichtig gevortext und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur zur Bildung der DNA-Calciumphosphat-Präzipitate inkubiert. Der gesamte Ansatz (~300 µl je Transfektionsansatz) wurde unter leichtem Schwenken der Kulturschale auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mindestens für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS und der Zugabe von frischem DMEM-Medium wurden die Zellen bis zur Ernte nach 40 bis 48 h weiter inkubiert.

5.2.6 Transiente Transfektion mittels LipofectAmine™

Als Transfektionsreagenz wurde ein LipofectAmine (26) Reagenz für Zelllinien (A549 und H1299), die unzureichend mit der Calciumphosphat-Transfektionsmethode transfiziert werden können, verwendet. Die LipofectAmine-Transfektion bewirkt auf Liposomenbasis eine Komplexbildung und Endozytose der Vektor-DNA.

Das LipofectAmine Reagenz besteht aus positiv geladenen Liposomen (ca. 2500 Moleküle), die durch eine Ultraschallbehandlung von kationischen Lipidmolekülen in wässriger Lösung entstehen. Diese Liposomen haben dann einen amphiphilen Charakter und besitzen Grenzflächenaktivität. Sie können die DNA umschließen und nach Adsorption an der Zelloberfläche mit der Plasmamembran fusionieren. Dabei wird die DNA direkt in das Zytoplasma transferiert. LipofectAmine-Reagenz wirkt auf manche Zelltypen toxisch.

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit 1×10^6 Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten diese Zellen zur Transfektion verwendet werden.

In einem Reaktionsgefäß wurden pro Transfektionsansatz 4 µg DNA-Mischung (1µg je Expressionsvektor, 0,5µg CMVLacZ (Transfektionseffizienzkontrolle) und Auffüllung mit pBS (Nonsens-DNA) zunächst einmal mit 200 µl OptiMEM gemischt und anschließend mit einer vorbereiteten Mischung aus 10 µl LipofectAmine und 200 µl OptiMEM versetzt, gevortext und mindestens 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen 1 x mit PBS-Puffer und 1 x mit OptiMEM gewaschen und mit 2,5 ml OptiMEM abgedeckt. Die Zellen wurden für 15 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bevor das vorbereitete DNA/LipofectAminemisch (~400 µl je Transfektionsansatz) auf die Zellen pipettiert und für 4 h bei 37°C inkubiert wurde. Nach der Transfektion wurden die Zellen 2 x mit PBS-Puffer gewaschen und mit DMEM Kulturmedium versetzt.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Präparation von Proteinextrakten aus Zellkultur

Zur Extraktion von Proteinen wurden die Zellen, die in 6 cm-Schalen kultiviert wurden, 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in Reagiergefäße überführt und bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die SDS-PAGE nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Proteinassays eingesetzt.

5.3.2 Bradford-Proteinassay

Der Proteinassay basiert auf der Veränderung der Farbabsorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, die nach Bindung an Proteine erfolgt.

Die Proteinkonzentrationen der Extrakte aus Zellkultur wurden durch dieses Verfahren ermittelt. 2 µl der Extrakte wurden mit 798 µl Wasser vermischt und mit 200 µl Biorad-Dye-Reagent-Concentrate (Fa. Biorad) versetzt. Die Proben wurden mit dem Vortexer gut durchgemischt. Die Blaufärbung der Probe wurde bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen und die Proteinkonzentration über eine BSA-Eichreihe (0,5-12 µg), die in dem entsprechenden Lysepuffer angesetzt wurde, berechnet.

5.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine werden in SDS-Probenpuffer denaturiert und in Polyanionen überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch Elektrophorese in denaturierenden SDS-Gelen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. Sie werden durch Coomassie-Färbung oder Westernblot als Proteinbanden dargestellt. Die Größe der Proteine wird im Vergleich mit einem definierten Molekulargewichtsstandard bestimmt.

10 - 20 µg Proteinlösung wurden mit H₂O auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt, mit 5 x SDS-Protein-Ladepuffer versetzt und bei 95°C 5 min aufgeköcht. Diese Probenansätze und 10 µl eines Molekulargewichtsstandards (Fa. peQLab) wurden, soweit nicht anders beschrieben, auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA im Sammel- bzw. 60 mA im Trenngel solange, bis die blaue Bromphenolblau-Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte.

10 %-iges Trenngel (add 30 ml)

10 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bis

7,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

12,2 ml H₂O

150 µl 10 %-ige APS-Lsg.

15 µl TEMED

5 %-iges Sammelgel (add 5 ml)

0,85 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bis

0,625 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8

7,5 ml H₂O (+50 µl Bromphenolblau)

50 µl 10 %-ige APS-Lsg.

5 µl TEMED

5.3.4 Westernblotanalyse

Der Westernblot dient dem Nachweis spezifischer Proteine. Damit wird die Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon[®], Millipore) nach Anlegen einer elektrischen Spannung beschrieben. Auf der Membran können die transferierten Proteine spezifisch detektiert werden. Dazu werden diese mit Hilfe spezifischer primärer Antikörper markiert, die wiederum von sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörpern erkannt werden. Mithilfe der gekoppelten Peroxidaseaktivität lässt sich das gesuchte Protein durch Belichtung eines Röntgenfilms detektieren.

Zur Durchführung wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran über eine Semidry-Blotting Apparatur (Fastblot, Fa. Biometra) transferiert. Der Proteintransfer wurde im Transferpuffer bei 30 Volt, 300 mA und 30 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran durch eine 2-stündige Inkubation in 5 %-iger Magermilchlösung in TBS-Tween abgesättigt, um den Anteil an unspezifischer Proteinbindung zu verringern. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen primären Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller in Waschpuffer verdünnt. Nach 3-maligem Waschen wurde die Membran über einen Zeitraum von einer Stunde mit einer 1:10.000 Verdünnung des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde der Blot abschließend mit dem Substratansatz gemäß den Angaben des Herstellers (ECL-Western-Blot-analysis System-Enhanced Chemiluminescence, Fa. Amersham) entwickelt. Die durch die Peroxidase-Reaktion emittierte Chemilumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm dargestellt.

5.3.5 Luciferaseassay

Die Luciferase-Messung basiert auf der durch die *firefly* Luciferase katalysierten Oxidation von Luciferin und der durch diese Reaktion hervorgerufene Photonenemission. Das emittierte Licht kann mit einem Luminometer quantifiziert werden.

Für die Untersuchung der Luciferaseaktivität muss diese zunächst durch die Lyse der Zellen gewonnen werden. Hierzu wurden die transfizierten Zellen nach der für die Transfektion und Expression der Luciferase nötigen Zeit 2 x mit PBS gewaschen und vollständig abgesaugt. Anschließend wurde die Zellen mit 350 µl Extraktionspuffer 10 min bei RT inkubiert. Das Zellysate wurde abgeschabt und 5 min in der Tischzentrifuge bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und bis zur Messung seiner Aktivität auf Eis gelagert.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 50 µl Zellysate mit 300 µl Luciferase-Messpuffer (s. Pufferlösungen 5.1.15, S. 75) vermischt. Die Lumineszenz wurde im Luminometer (Lumat, Fa. Berthold) durch die Injektion von 100 µl Luciferininjektionslösung, bei einer Messzeit von 10 sec ermittelt. In den Abbildungen der Versuchsergebnisse wird die relative Luciferaseaktivität, d. h. der Quotient aus der jeweiligen Luciferaseaktivität und der β-Galactosidaseaktivität als internen Abgleich, dargestellt.

5.3.6 β -Galactosidase-Assay

Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde der β -Galactosidase-Assay verwendet. Die Expression des β -Galactosidase-Gens steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors und wird deshalb als Korrekturgröße bei Transfektionsexperimenten verwendet.

Über eine Farbreaktion, bei der β -Galactosidase das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) umsetzt, kann die Aktivität der β -Galactosidase spektrophotometrisch gemessen werden.

Es wurden pro Transfektionsansatz von 5 μ g DNA 0,3 μ g CMV- β -Galactosidasevektor zugesetzt. Die Menge an zugesetztem β -Galactosidasevektor hängt von der beabsichtigten Expressionsdauer bzw. vom Zelltyp und der Transfektionseffizienz ab. Der Anteil sollte dahingehend optimiert werden, daß die Reaktionszeit mindestens 10 min bei RT beträgt, aber möglichst 1 h bei 37°C nicht überschreitet. 10 μ l der für die Luciferase-Messung gewonnenen Zellextrakte wurden mit 100 μ l β -Galactosidase-Reaktionslösung (s. Pufferlösungen) in einer 96-well-Platte bis zu einer leichten Gelbfärbung bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 50 μ l 1 M Natriumcarbonat wurde der Ansatz noch etwa 30 min im Dunkeln aufbewahrt und im Anschluss die Färbung bei 405 nm im Photometer gegen einen Leerwert (pBS transfizierte Kontrolle) gemessen. Der lineare Bereich reicht von 0,2 bis 0,8 OD₄₀₅.

5.3.7 Dual-Luciferase Assay

Zur Untersuchung der Effektivität der klonierten shRNA-Konstrukte, die mittels eines RNAi-Designalgorithmus (97) ermittelt sowie über <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> gegen humanes Genom abgeglichenen wurden, wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Fa. Promega) verwendet.

PsiCHECK™-2 (Fa. Promega) ist ein *firefly* / *renilla* Luciferase Dual-Reportersystem. Zur Messung wird ein Vektor, der die zu reprimierende mRNA-Sequenz im 3'-UTR der *renilla* Luciferase enthält, mit den dazugehörigen shRNA-Konstrukten kotransfiziert. Die *firefly* Luciferase dient dabei als Transfektionsabgleich und die Regulation der *renilla* Luciferase soll der Wirkung auf die tatsächliche Ziel-mRNA entsprechen. Zur Generierung der psiCHECK-Konstrukte wurden die Zielsequenzen mittels PCR aus cDNA amplifiziert und über die *Xho* I- und *Not* I-sites in das 3'-UTR der *renilla* Luciferase des psiCHECK™-2 Vektors (s.5.1.5) kloniert. Diese psiCHECK-Derivate wurden mit den dazugehörigen shRNA-Konstrukten in HepG2 Zellen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und auf *firefly* sowie *renilla* Luciferaseaktivität hin untersucht. Die Messungen wurden nach Protokollanleitung des Messkits (Fa. Promega) durchgeführt. Die Aktivität der *renilla* Luciferase konnte somit Auskunft über die Wirksamkeit der eingesetzten shRNA geben.

5.3.8 Gewinnung und Aufreinigung des rekombinanten CAR_{ex}TAT-Fusionsprotein

Geringe Mengen des Fusionsproteins wurden aus transfizierten 293-Zellen gewonnen. Dazu wurden 1 x 10⁶ Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und mittels Calciumphosphat-Präzipitation mit dem CAR_{ex}TAT-Expressionsvektor transfiziert. 36 h später wurde aus dem Überstand der transfizierten Zellen das rekombinante Protein gewonnen. Dazu wurde der Überstand zentrifugiert, um mitentnommene Zellen abzutrennen, und mit den zu infizierenden Viren vermischt. Zur Detektion der Transfektionseffizienz wurde ein Luciferase-Expressionskonstrukt kotransfiziert und die Luciferaseaktivität wurde aus dem Zellextrakt gemessen.

Größere Mengen des rekombinanten Proteins wurden mittels Ni-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Dazu wurden 293-Zellen mit einer MOI 25 mit dem rekombinanten Virus AdCAR_{ex}-Tat infiziert und in 2%igem FCS DMEM für 36 h inkubiert. Der Überstand wurde abzentrifugiert, durch ein 0,2 μ m Filter gefiltert und mit 10 x Bindepuffer vermischt. Anschließend wurden 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) nach gründlichem vortexen dazugegeben und 4 h inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch wiederholte Zentrifugation (1000 x g) und Aufnahme mit Protein-Waschpuffer (15 min) gewaschen. Das rekombinante Protein wurde mit dem Elutionspuffer (30 min) durch Wiederholung der Elution in verschiedenen Fraktionen gewonnen. Die Konzentration des CAR_{ex}-Tats konnte über ein Bradford-Proteinassay ermittelt werden. Das Eluat wurde auf Qualität mit Hilfe des SDS-PAGE und der Westernblotanalyse untersucht. Anschließend wurde das Protein gegen DMEM dialysiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wird durch die Messung der Extinktion der Probe im UV-Bereich bei 260 und 280 nm durchgeführt. Dabei wird die gemessene Extinktion bei 260 nm nach der Regel, dass eine OD von 1,0 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht, umgerechnet (für einzelsträngige DNA gilt 37 µg/ml und für RNA gilt 40 µg/ml für eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm).

Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung, die hauptsächlich durch Proteine gestört wird, konnte bei zusätzlicher Messung der Extinktion bei 280 nm getroffen werden. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} liegt bei geringen Verunreinigungen von DNA bei 1,7-1,9 und für RNA zwischen 1,9-2,1. Die Proben wurden für die Messung mit TE pH 8,0 verdünnt und gegen diesen Puffer als Nullwert abgeglichen.

Sehr geringe DNA-Konzentrationen wurden im Agarosegel durch Vergleich mit der 1,6 kB-Bande der 1 kB-Leiter (Fa. Gibco) abgeschätzt. Dies entspricht etwa einer Menge von 50 ng DNA bei Auftragen von 10 µl einer 1:20 Verdünnung.

5.4.2 Phenol Chloroform-Isoamylalkohol Aufreinigung

Zur Extraktion wurden die wässrigen DNA-Proben mit dem gleichen Volumen Roti-Phenol versetzt, gründlich gevortext und zur Phasentrennung zentrifugiert (15.000 x g, RT, 2 min). Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 4 Vol. Ethanol (100 %) gefällt, wobei die Präzipitation für mindestens 30 min bei -20°C erfolgte. Bei geringen DNA-Mengen wurde 1 µg Glycogen als Präzipitationshilfe zugegeben. Nach einer Zentrifugation (20.000 x g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand abgesaugt und die pelletierte DNA mit 100 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut zentrifugiert (20.000 x g, 4°C, 10 min). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet ca. 5 min und in Tris pH 8,0 aufgenommen.

5.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese mit Agarosegelen dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Diese können aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld gerichtet bewegt und ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Wobei die Wanderungsgeschwindigkeit linearisierter, doppelsträngiger DNA-Fragmente umgekehrt proportional zum \log_{10} ihrer Molekulargewichte ist.

Die so aufgetrennten Nukleinsäurefragmente können durch das fluoreszierende und interkalierende Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht (254 nm oder 366 nm) visualisiert werden

In dieser Arbeit wurden, sowohl für analytische, als auch für präparative Agarosegelelektrophoresen, Horizontal-Elektrophoresen mit 1 bis 2 %igen Gelen in TAE-Puffer mit 0,00005 Vol. Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) eingesetzt.

Die Agarose wurde durch Erhitzen im TAE-Puffer gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurde Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel gegossen.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0,1 Vol. 10 x Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Feldstärke von 5 V/cm mit TAE als Laufpuffer.

5.4.4 Vermehrung und Präparation von Plasmid-DNA

5.4.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die chemische Transformation von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm JM109 (Fa. Invitrogen) verwendet. Die Bakterien wurden in 25 ml LB-Medium bei 37°C und 225 rpm über Nacht angereichert. Am nächsten Tag wurde in einem 1 l Kolben 5 ml dieser Kultur mit 500 ml LB-Medium verdünnt, zu je 250 ml portioniert und bis zu einer OD_{600} von 0,45-0,55 bei 37°C und 225 rpm angereichert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis für 2 h inkubiert und 20 min bei 4°C und 3800 rpm (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA-10) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem Titrationspuffer resuspendiert und auf 500 ml mit Titrationspuffer aufgefüllt.

Nach einer Inkubation von 45 min auf Eis wurden die Bakterien 10 min bei 4°C und 3.200 rpm (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA-10) zentrifugiert. Das Pellet wurde diesmal in 50 ml eiskaltem Titrationspuffer (s. Pufferlösungen) aufgenommen und unter Rühren tropfenweise mit 80 %igem Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 15 % versetzt. Die Bakterien wurden zu 250 µl aliquotiert und in fl. Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Bakterien bei -80°C gelagert.

5.4.4.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl kompetente Bakterien (JM109) wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Diese wurden mit 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 10-50 ng Ligationsansatz vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien/DNA-Mischung wurden nach einem Hitzeschock (90 sek / 42°C im Wasserbad) für 2 min auf Eis regeneriert und mit 900 µl SOC-Medium (s. Pufferlösungen) versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C und 225 rpm im Heizblock wurden 100 µl (10%) davon auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die restlichen 900 µl (90%) wurden für 10 sek bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. 800 µl Überstand wurden verworfen und das Pellet in den restlichen 100 µl resuspendiert. Diese Suspension wurde ebenfalls auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden umgedreht über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

5.4.4.3 Transformation durch Elektroporation

Durch die Elektroporation kann man eine deutlich höhere Transformationseffizienz erreichen, vor allem wenn man mit großen Plasmiden, wie z. B. Adenovirusplasmide, arbeitet.

1 bis 2 µl der gereinigten Plasmid-DNA (5-100 ng in H₂O) wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 40 µl der auf Eis aufgetauten elektrokompenten *E. coli* (JM109) durch einmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach 1 min wurde die Bakterien/DNA-Mischung in eine im Eisbad vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand überführt. Anschließend wurden die Bakterien mit 1,8 kV bei 200 Ω und 25 µF gepulst. Diese transformierten Bakterien wurden mit 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl (10%) davon auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

5.4.4.4 Vermehrung transformierter Bakterien

Klone auf Agarplatten wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum als Vorkultur bei 37°C über Nacht im Bakterienrührer bei 225 rpm inkubiert. Mit 1,5 ml der entstandenen Bakteriensuspension konnte eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt werden.

Für eine Maxi- bzw. Midi-Plasmidpräparation wurde die Vorkultur auf ein Volumen von 250 bis 400 ml (je nach Replikationsrate) mit LB-Medium (+Antibiotikum) aufgefüllt und über Nacht bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. Während dieser Arbeit wurde ausschließlich das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) verwendet.

5.4.4.5 Analytische Plasmidpräparation (Mini-präp)

Bei der analytischen Plasmidpräparation geht es um die schnelle Untersuchung der transformierten Bakterienklone auf die Richtigkeit der Plasmide durch Restriktionsverdau. Ist das Ergebnis der Restriktionsverdauanalyse positiv, so kann, da auf diese Weise die isolierte DNA relativ stark verunreinigt ist, für die weitere Arbeit eine Maxi/Midi-Präparation erfolgen, um Sequenzierungen und weitere Klonierungen durchführen zu können.

Für eine Mini-Präparation wurden 3 ml LB-Medium (+Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C (225 rpm) inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Bis auf einen geringen Rest wurde der Überstand dekantiert und das Pellet resuspendiert. Die Suspension wurde mit 300 µl STET-Puffer (s. Pufferlösungen) und 10 µl Lysozym versetzt, gut durchmischt und 90 s bei 95°C im Rührer erhitzt.

Die Probe wurde dann 20 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt, der Überstand mit 400 µl Isopropanol versetzt und gevortext, um die DNA zu fällen. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 20.000 x g, 4°C) pelletiert und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (s. o.) wurde die Waschflüssigkeit abgenommen und in 30 bis 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die erhaltene DNA wurde zur Restriktionsanalyse verwendet.

Für eine höhere Reinheit wurden die Plasmide mit einem Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert. Eine höhere Reinheitsstufe war beispielsweise für nachfolgende Sequenzierungen erforderlich. Zur Aufreinigung wurde eine 5 ml Übernachtkultur 1 min bei 10.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und mit 250 µl P2-Puffer versetzt. Nach Vortexen wurden 350 µl P3-Puffer dazu gegeben und 10 min in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep spin Säule gegeben und 30 s zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die DNA wurde dann nach einer 1-minütigen Inkubation mit 30 µl EB-Puffer eluiert. Mit diesem Kit konnten bis zu 20 µg DNA isoliert werden.

5.4.4.6 Präparative Plasmidpräparation (Maxi/Midi-Präp.)

Nachdem die transformierten Bakterien mit einem Mini-präp und einem Restriktionverdau auf die Richtigkeit der Plasmide untersucht wurden, wurde für eine höhere Reinheit und Ausbeute der Plasmide eine Plasmid-Maxi bzw. -Midi Kit (für den Einsatz von weiteren Klonierungsschritten) bzw. dem EndoFree Buffer Set (zum Erhalt von endotoxinfreier DNA für die Transfektion von eukaryotischen Zellen) der Firma Qiagen mit einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Verwendung endotoxinfreier DNA erhöht bei Transfektionsexperimenten die Effizienz des Transfers erheblich.

Die transformierten Bakterien wurden in 200 bzw. 400 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und für 12–16 h bei 37°C vermehrt. Diese Übernachtkultur wurde bei 3.800 x g und 4°C pelletiert und das Pellet in 10 bzw. 4 ml P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 bzw. 4 ml P2 (1% SDS, 0,2 M NaOH) erfolgte die Lyse durch mehrmaliges Kippen des Zentrifugenröhrchens und anschließender Inkubation für 5 min bei RT. Danach wurde mit 10 bzw. 4 ml P3 (3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Der Ansatz wurde wie oben beschrieben gemischt, 20 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 4°C und 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Gaze in ein steriles 50 ml Blue-Cap gefiltert, mit 2,5 bzw. 1 ml ER-Puffer versetzt und geschüttelt. Danach wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Zugabe von ER-Puffer kann für Plasmide, die lediglich für Klonierungen eingesetzt werden, ausgelassen werden. Die Plasmidlösung wurde auf eine mit 10 bzw. 4 ml QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol, 0,15% (v/v) Triton X-100) äquilibrierte Qiagen tip-500 bzw. tip-100 Säule aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit 30 bzw. 10 ml QC (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 bzw. 5 ml QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15% Ethanol) eluiert. Das Eluat (15 bzw. 5 ml) wurde mit 10,5 bzw. 3,5 ml Isopropanol versetzt, gemischt und sofort 30 min bei 20.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 5 bzw. 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde an der Luft maximal 30 min getrocknet und anschließend in 500 bzw. 100 µl TE aufgenommen.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA liegt bei dieser Aufarbeitungsmethode zwischen 200-1000 µg bzw. 50-200 µg und wurde photometrisch bestimmt.

5.4.5 Rekombinante DNA-Techniken

5.4.5.1 Restriktionspaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen führen an definierten, meist palindromischen Erkennungssequenzen oder in deren Nähe Doppelstrangbrüche in DNA ein. Dabei entstehen entweder stumpfe (*blunt*) oder 5'- bzw. 3'-überhängende (kohäsive) Enden, die anschließend durch eine DNA-Ligase (s. 5.4.5.7, S. 86) spezifisch wieder miteinander verbunden werden können. Restriktionsendonukleasen stellen somit nützliche Werkzeuge zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle dar.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen und die Restriktionenzymspaltungen wurden unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Es wurden für den Verdau 1 bis 5 Einheiten (Units) Enzym/µg DNA für mindestens 2 h (bis 4 h) bei der vorgeschriebenen Temperatur und Pufferlösung eingesetzt. Als Grundlage gilt hierbei: 1 U eines Enzyms schneidet 1 µg Plasmid-DNA in 1 h. Das Enzym sollte in 3- bis 4-fachem Überschuß vorliegen. Wichtig dabei ist, dass das Volumen der zugegebenen Restriktionsendonuklease nicht mehr als 1/10 des gesamten Reaktionsansatzes ausmacht. Die Enzyme werden in einem Glycerin-haltigen Puffer aufbewahrt. Glycerin wirkt bei zu hoher Konzentration störend auf die Reaktion.

5.4.5.2 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Gleiche Mengen komplementärer DNA-Einzelstränge (jeweils 10 µg ~ 10 µl) wurden mit gleichem Volumen (10 µl) TE-Puffer pH 8,0 versetzt. Nach 5-minütigem Erhitzen auf 95°C, erfolgte das Zusammenlagern der beiden Einzelstränge während des langsamen Abkühlens auf 50°C. Der Ansatz wurde bei -20°C gelagert.

5.4.5.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung bzw. PCR

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden Aufreinigungs-Kits der Firma Qiagen verwendet. Aufgereinigt wurde mit dem QIAquick PCR Purification (100 bp bis 10 kb große Fragmente) bzw. dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (17 bis 100 bp große Fragmente). Mit diesen Kits konnten schnell bis zu 10 µg DNA in relativ hoher Reinheit aufgereinigt werden.

QIAquick PCR Purification-Kit: Zu 1 Vol. DNA-Lösung wurden 5 Vol. Puffer PB (PCR-Purification) hinzugefügt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Die Säule wurde für 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säule. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer für 1 min bei 13.000 rpm gewaschen. Nach einer Trockenzentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge wurden 30 µl EB Puffer (Elution Buffer, Tris pH 8,5) auf die Säule gegeben und 1 min inkubiert. Die Säule wurde dann bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert das DNA-haltige Eluat in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

QIAquick Nucleotide Removal Kit: Zu 1 Vol. DNA-Lösung wurden 10 Vol. Puffer PN (Nucleotid Removal) hinzugefügt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Die Säule wurde für 1 min. bei 6.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säule. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer für 1 min. bei 6.000 rpm gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge wurden 30 µl EB Puffer (Elution Buffer, Tris pH 8,5) auf die Säule gegeben und 1 min. inkubiert. Die DNA-Lösung wurde dann bei 13.000 rpm 1 min. abzentrifugiert und das DNA-haltige Eluat in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

5.4.5.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Restriktionsspaltung erhaltenen DNA-Fragmente wurden über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel je nach Größe des zu isolierenden DNA-Fragments mit verschiedenen Gel Extraction Kits der Firma Qiagen aufgereinigt:

QIAEX II Gel Extraction Kit: Für 70 bis 300 bp große Fragmente wurde das QiaexII Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Für die Extraktion wurde das herausgeschnittene Gelstück mit 400 µl QX1-Puffer / 100 mg Gelstück versetzt und mit 15 µl gut gevortexter QIAEX II Matrix 10 min bei 50°C bis zur Auflösung des Gelstücks inkubiert. Anschließend wurde die Probe 30 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl QX1-Puffer resuspendiert und nochmals 30 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert. Diesmal wurde das Pellet zum Waschen in PE-Puffer resuspendiert und nochmals 30 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurde die Matrix in 20 µl EB-Puffer resuspendiert und 20 min inkubiert. Nach einem 30 sek Zentrifugationsschritt wurde der DNA-haltige Überstand entnommen. Mit diesem Kit können bis zu 5 µg DNA / 10 µl QIAEX II Matrix aufgereinigt werden.

MinElute Gel Extraction Kit: Für 400 bis 900 bp große Fragmente wurde das MinElute Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Dieses Kit hat zum Vorteil gegenüber dem QIAquick Gel Extraction Kit, dass man die DNA mit 10 µl EB-Puffer aus der Säule eluieren kann. Dadurch kann man bei kleinen Fragmenten eine höhere Konzentration erreichen. Für die Extraktion wurde das herausgeschnittene Gelstück mit 300 µl QG-Puffer / 100 mg Gelstück versetzt und für 10 min bei 50°C bis zur vollständigen Auflösung des Gelstücks inkubiert. Die Lösung wurde dann mit einem Gelvolumen an Isopropanol versetzt, auf die MinElute Säule gegeben und 1 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die DNA wurde dann nach einer 1-minütigen Inkubation mit 30 µl EB-Puffer eluiert.

QIAquick Gel Extraction Kit: Bei 1 bis 10 kb großen Fragmenten wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde das herausgeschnittene Gelstück mit 300 µl QG-Puffer / 100 mg Gelstück versetzt und für 10 min bei 50°C bis zur vollständigen Auflösung des Gelstückchens inkubiert. Die Lösung wurde dann nach Versetzen mit einem Gelvolumen Isopropanol auf die QIAquick spin Säule gegeben und 1 min.

bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die DNA wurde dann nach einer 1-minütigen Inkubation mit 30 µl EB-Puffer eluiert.

5.4.5.5 Dephosphorylierung von DNA

Um bei Ligationsreaktionen zu verhindern, dass linearisierte bzw. restringierte Vektoren inter- oder intramolekulare Reaktionen mit sich selbst eingehen, wurde die Vektor-DNA im Anschluss an den Restriktionsverdau vor der Ligation mit Alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase* (SAP)) behandelt.

1 µg linearisierter Vektor wurden mit 1 Unit SAP für 60 min bei 37°C dephosphoryliert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 75°C.

5.4.5.6 Auffüllen von 5'-Überhängen bzw. Verdau von 3'-Überhängen durch Klenow-Polymerase

Das Auffüllen überstehender 5'-Enden von DNA-Fragmenten erfolgte durch Inkubation mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (aus *E. coli*). Dieses Enzym besitzt die Fähigkeit, 5'-Überhänge aufzufüllen und 3'-Überhänge abzubauen, es besitzt jedoch keine 5'→3'-Exonucleaseaktivität. Nach einem Restriktionsverdau erhaltene 5'-DNA-Überhänge wurden durch Inkubation von 1 µg linearisierter Plasmid-DNA bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml mit 2 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in Gegenwart von dNTPs (je 50 µM) für 20 min bei 28°C in Klenow-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 µg/ml BSA) aufgefüllt. Während der Inkubation erfolgt auch ein Abbau von 3'-Überhängen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA abgestoppt und die Polymerase durch 15minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert. Die auf diese Weise präparierten stumpfen (*blunt*) Enden können für die Ligation bei nichtkompatiblen Enden eingesetzt werden.

5.4.5.7 Ligation von DNA-Enden

Zur Herstellung rekombinanter DNA können unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (NEB) die kompatiblen homolog-überhängenden (*sticky ends*) oder stumpfen Enden (*blunt ends*) doppelsträngiger DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden.

Obwohl das Enzym am effektivsten homolog-kohäsive Enden verbindet, ist es unter bestimmten Bedingungen in der Lage, stumpfe Enden miteinander zu verknüpfen. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 37 °C, dennoch wird es für Ligationen bei niedrigeren Temperaturen (14°C) eingesetzt, um die Anlagerung der DNA-Fragmente aneinander zu erleichtern.

Alle Ligationen wurden in T4-DNA-Ligase Puffer (NEB) unter Zusatz von 1 µl 10 mM ATP und einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt. Die Ligation kohäsiver Enden erfolgte unter Zusatz von T4-DNA-Ligase durch eine mindestens fünfstündige Inkubation.

Vektor und Insert-DNA sollten dabei in einem molaren Verhältnis zwischen 1:6 und 1:50 (falls Insert kleiner 100 bp) angesetzt werden. Die einzusetzende Menge an Insert-DNA kann folgendermaßen abgeschätzt werden:

$$\frac{\text{Vektormenge}(ng) \cdot \text{Insertgröße}(bp)}{\text{Vektorgröße}(bp)} \cdot \text{Mengenverhältnisfaktor} \left(\frac{X}{1} \right) = \text{Insertmenge}(ng)$$

Eine DNA-Gesamtmenge von 400 bis 600 ng bei kohäsiven Ligationen war hierbei anzustreben. Die Identifikation rekombinanter Plasmide erfolgte durch Transformation von kompetenten Bakterien und nachfolgende Antibiotikaselektion, sowie analytische Plasmidpräparationen und deren Analyse durch DNA-Restriktionsverdau.

5.4.6 PCR zur Einfügung von Restriktionsschnittstellen

DNA kann mit PCR-Technik durch eine thermostabile DNA-Polymerase spezifisch amplifiziert sowie gezielt verändert werden. Die PCR-Technik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Anhängen von Restriktionsschnittstellen unter Verwendung degenerierter Primer eingesetzt. Zur Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen wurde die Herculase™ Hotstart DNA Polymerase der Firma Stratagene verwendet. Diese Polymerase ist eine Mischung, die hauptsächlich aus Pfu-Polymerase besteht und die darüber hinaus noch Faktoren zur Verbesserung der PCR und Taq 200™ Polymerase enthält.

Für einen PCR-Ansatz wurden 20 ng Plasmid-DNA mit je 100 pmol Primer, 10 U Herculase™ und je 100 µM dNTPs in einem Volumen von 100 µl in PCR-Puffer (Stratagene) vermischt. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt (Zyklusparameter für die Polymerase: Aktivierung bei 95°C für 3 min, dann 30 s 95°C Denaturierung, 30 s Hybridisierung, 60 s Polymerisation bei 72°C mit Verlängerung im letzten Zyklus auf 10 min). Die Hybridisierungs-Temperatur wurde so gewählt, dass sie 2°C unter der errechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer lag. Aufgrund der Verwendung degenerierter Primer zum Anhängen von Restriktionsschnittstellen an ein DNA-Fragment wurden 5 Zyklen mit einer dem homologen Teil entsprechenden Hybridisierungstemperatur (X°C) vorgeschaltet. Anschließend erfolgten 30 Zyklen bei einer dem gesamten Primerbereich entsprechenden Hybridisierungstemperatur (Y°C).

Reaktionsansatz:

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
95	180	1
95	30	5
X	30	
72	60	
95	30	30
Y	30	
72	60	
72	600	1
4		

Die Berechnung der Schmelztemperatur von Primern ≤20 bp erfolgte nach der Formel

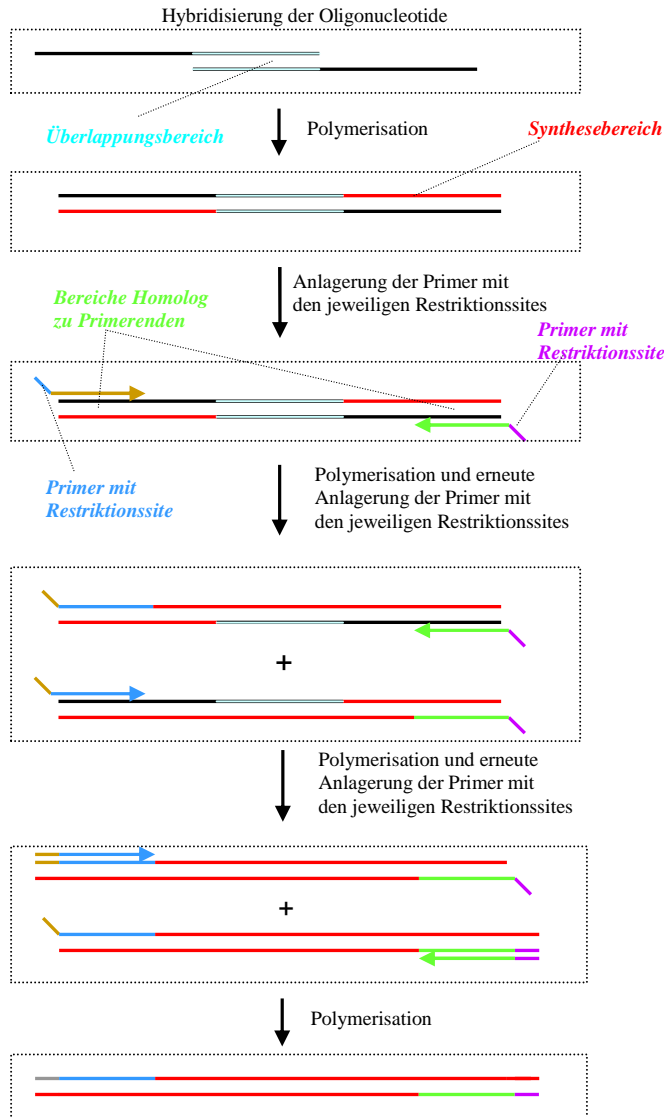
$$T_M = 2^\circ\text{C} \times (\text{AT}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{GC})$$

und für Primer ≥ 20 bp: $T_M = 59,9^\circ\text{C} + 0,41(\% \text{GC}) - 600/N$ (N = Primerlänge in bp)

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem PCR-Purification Kit der Fa. Qiagen aufgereinigt (s. 5.4.5.3, S. 85).

5.4.7 PCR zur Generierung der shRNA-DNA-Fragmente

Die shRNA Sequenzen wurden über eine PCR generiert. Dazu wurde die gesamte shRNA-DNA-Sequenz, aufgrund ihrer Größe (116 bp) in vier Teilsequenzen aufgespalten und als synthetische Oligonucleotide bezogen. Zur Amplifizierung wurde die Herculase™ Hotstart DNA Polymerase der Firma Stratagene verwendet.



PCR-Zyklen:

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
98	180	1
95	30	5
53	30	
72	15	
95	30	30
59	30	
72	15	
72	600	1
4		

100 µl Reaktionsansatz der miR30-PCR:

Volumen [µl]	Substanz
10	10x Reaktionspuffer
2	DMSO (50%ig Stock)
4	dNTPs (10mM Stock)
1	mi30xLuc-tpl-as (100µM Stock)
1	mi30xLuc-tpl-s (100µM Stock)
1	mi30-PCR-rev-pr (100µM Stock)
1	mi30-PCR-fw-pr (100µM Stock)
1	Herculase™ Hotstart Polymerase (10U)
79	H ₂ O

5.4.8 Quantitative PCR (qPCR)

Zur relativen Quantifizierung viraler DNA wurde der qPCR™ Mastermix Plus (Eurogentec) mit 100 ng augereinigter DNA und den spezifischen Primern (Hex-fw und Hex-rev) sowie der Sonde angesetzt. Dazu wurde folgender Ansatz pipetiert.

25µl Reaktionsansatz der qPCR:

Volumen [µl]	Substanz
5	Template (10-100 ng)
3	Primermix (10 µM Stock)
0,5	Sonde (10 µM Stock)
12,5	qPCR™ Mastermix Plus
4	H ₂ O

Die Hexon PCR (Primermix: Hex-fw / Hex-rev; Sonde: Hex-Sonde) wurde gegen endogene Templates mit käuflichen Kits normalisiert. Für humanes Genom wurde das Ubiquitin C Control Kit und für Maus Genom wurde das 18S Genomic Control Kit verwendet.

5.4.9 Präparation von viraler DNA aus infiziertem Gewebe oder Zellkultur

10 mg Gewebe bzw. 1×10^6 Zellen wurden mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Nach Bestimmung der DNA Konzentration wurden der Gehalt der viralen DNA mittels realtime PCR gemessen.

5.4.10 RNA-Extraktion

Zur Isolierung der mRNA aus transfizierten oder infizierten eukaryotischen Zellen wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend 5 min mit 500 μ l peqGOLD RNApureTM-Reagenz (peQLab Biotechnologie) je 6 cm-Schale behandelt. Die lysierten Zellen wurden in einen Reagiergefäß überführt und mit 0,2 ml Chloroform / ml Reagenz versetzt sowie gut durchmischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde bei 12.000 x g und 4°C 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase, die 60 % des Volumens ausmacht, entnommen und mit 500 μ l Isopropanol versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 75 %igem Ethanol gewaschen und mit RNase-freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die RNA mit DNase (Promega) behandelt und die Konzentration sowie Reinheit wurden mittels OD bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Zur Erhöhung der Reinheit konnte zusätzlich noch über RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt werden.

5.4.11 Quantitative Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Zur analytischen Untersuchung einer mRNA wurde diese mit Hilfe der TaqMan[®] Reverse Transkription Reagents (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Zur Umschreibung in cDNA wurden entweder polydT oder random Hexamer Primer verwendet. Für den Ansatz wurden folgende Inkubationen 10 min bei 25°C, 1 h bei 48°C und 5 min bei 95°C durchgeführt.

50 μ l Reaktionsansatz der RT-PCR:

Volumen [μ l]	Substanz
5	10x Reaktionspuffer
11	MgCl ₂ (25 mM Stock)
10	dNTPs (10 mM Stock)
2	polydT-Primer (5 μ M Stock)
2	mRNA-Template (0,5 μ g/ μ l Stock)
1	RNase Inhibitor
1	Reverse Transkriptase (4 U/ μ l Stock)
18	RNase-freies Wasser

Aus der auf diese Weise erstellten cDNA, konnte anschließend mit spezifischen Primern Sequenzbereiche analytisch mittels qPCR untersucht werden. Dazu wurde SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) verwendet. 5 μ l des in cDNA umgeschriebenen Ansatzes wurden für die Quantifizierung eingesetzt.

25 μ l Reaktionsansatz der qPCR:

Volumen [μ l]	Substanz
5	cDNA
2,5	Primermix (20 μ M Stock)
12,5	SYBR-Green PCR Master Mix
2,5	H ₂ O

PCR mit Template und ohne Reverse Transkriptase wurde als Kontrolle für eventuelle DNA Kontamination verwendet. Amplifikons adenoviraler RNA wurden mit GAPDH-Werten normalisiert.

5.5 Virale Arbeitstechniken

5.5.1 Klonierung rekombinanter Adenoviren

Rekombinante Adenoviren wurden durch eine *in vitro* Ligation kloniert (73). Als adenoviraler Zielvektor wurde pAdHM4 eingesetzt. Dieser Vektor ist 30,3 kb groß und verfügt über Sequenzen, die eine stabile Replikation in *E. coli* unter Ampicillinselektion erlauben. Das in diesem Vektor enthaltene Genom hat Deletionen im E1 und E3-Bereich. Der E1-Bereich enthält einen Polylinker, der als Zielsequenz für die Insertion heterologer DNA dient. Die heterologe DNA wurde zunächst in einen speziellen *Shuttle*-Vektor (pHM3) kloniert und konnte dann durch *I-Ceu* I und *Pi-Sce* I isoliert werden. Über diese Schnittstellen erfolgt dann die Insertion in den Vektor pAdHM4. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen homologen Rekombination ist der definierte Einbau der heterologen DNA, die einfache Kontrolle rekombinanter Plasmide über Mini-Plasmidpräparationen und der Wegfall aufwendiger Plaque-Aufreinigung.

5.5.1.1 DNA-Präparation zur Klonierung rekombinanter Adenoviren

Präparation des Inserts: 2 µg des Insert enthaltenden *Shuttle*-Plasmids (Midi aufgereinigt) wurden mit 5 U *Pi-Sce* I bei 37°C über Nacht verdaut. Nach Aufreinigung der DNA mittels QIAquick PCR Purification-Kit wurde der Vektor weiter mit 1 U *I-Ceu* I bei 37°C für maximal 2 h inkubiert. Danach wurde die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt. Das Fragment von Interesse wurde aus der Agarose extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit) und in 15 µl EB-Puffer eluiert. Die Konzentration des Inserts wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt.

Präparation des Vektors: Beim Arbeiten mit genomischen Adenovirusplasmiden musste beachtet werden, dass diese aufgrund ihrer Größe gegen Scherkräfte enorm empfindlich ist und raue Prozeduren leicht zur Fragmentierung der DNA führen können. Daher wurde für die Klonierung Mini (s. 5.4.4.5) aufgereinigtes pAdHM4-Vektor eingesetzt. Die DNA-Lösung musste zunächst RNase verdaut werden. Nach einer Aufreinigung über Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (5.4.2) wurde die DNA über Nacht mit 5 U *Pi-Sce* I verdaut. Anschließend wurde erneut mit Phenol/Chloroform aufgereinigt und mit 1 U *I-Ceu* I 1h verdaut. Nach einer weiteren Aufreinigung mit Phenol-Chloroform wurde in 10 µl Tris pH 8.0 aufgenommen. Die Konzentration und Qualität des restringierten Vektors wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt.

5.5.1.2 *In vitro* Ligation adenoviraler Vektoren

Zur *in vitro* Ligation von adenoviralem Vektor und heterologem Insert wurde eine Standard-Ligation für kohäsive Enden (5.4.5.7) durchgeführt. Das molare Vektor/Insert Verhältnis betrug hierbei 1:4 bis 1:8. Die Ligation erfolgte bei 14°C über Nacht und weitere 4 h mit erneuter Zugabe von 1 µl Ligase bei 4°C. Anschließend wurde 1,5 µl des Ligationsansatzes über Elektroporation (5.4.4.3) transformiert.

5.5.1.3 Transformation und Präparation adenoviraler Plasmide

Die Transformation adenoviraler Ligationsansätze erfolgte mithilfe einer Elektroporation. Aufgrund der adenoviralen DNA-Größe, ist die Ligationseffizienz sehr gering, weshalb eine hohe Transformationseffizienz notwendig war.

Von den unter Ampicillinresistenz über Nacht gewachsenen Klonen wurden nur die kleinen Kolonien ausgewählt und in 2 ml LB (+ 125 µg Carbenicillin, ein pH-stabiles Ampicillinderivat) inokuliert. Nach 5 h Schüttelinkubation bei 37°C (225 rpm) wurde die Bakteriensuspensionen, durch eine Mini-Plasmidpräparationen (5.4.4.5) auf das rekombinante Plasmid untersucht. Bei positiven Klonen wurde eine Midi-Plasmidpräparation angesetzt. Da mit adenoviralen Plasmiden transformierte Bakterien schlecht haltbar sind, wurde die Midi-Plasmidpräparation in 400 ml LB mit Carbenicillin versetzt und maximal 10 h bei 225 rpm und 37°C schüttelinkubiert. Danach erfolgte eine endotoxinfreie Midi-Plasmidpräparation (5.4.4.6).

5.5.2 Herstellung infektiöser Viren aus Adenovirusplasmiden

Die in dieser Arbeit klonierten Adenovirusplasmide wurden in 293 Zellen zu infektiösen Partikeln generiert. In der 293-Zelllinie wird eine schnelle und erhöhte Propagation der Viren, aufgrund einer stabil integrierten E1-Region im Genom, erreicht. Diese Eigenschaft ermöglicht auch die Vermehrung nichtreplikativer Viren, die eine Deletion der E1-Region aufweisen, aber dieser virale Defekt in dieser Zelllinie komplementiert wird und somit die Viruspropagation ermöglicht (33).

Das Adenovirusgenom liegt im nativen Zustand linearisiert vor. Zur Herstellung infektiöser Viren aus den Adenovirusplasmiden muss das rechte und linke ITR (*inverted terminal repeat*) freigelegt und somit das Plasmid linearisiert werden. Dazu wurden 5 µg Plasmid über Nacht mit der Restriktionsendonuclease *Pac I* verdaut. Durch diesen Verdau werden auch die für die stabile Replikation in *E. coli* notwendigen DNA-Abschnitte entfernt. Die Transfektion der permissiven Zelllinie 293 mittels Lipofectamine (5.2.6) wurde direkt aus dem *Pac I*-Verdau durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden für mindestens 5 Tage in 2%igem FCS Medium inkubiert und durch drei Einfrier/Auftau-Zyklen lysiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 500 x g und 4°C wurden mit dem Überstand neue 293-Zellen (in T25-Zellkulturflaschen 1,5 x 10⁶ Zellen, mit DMEM/2%FCS) infiziert. Diese Flaschen wurden bereits nach 60 h geerntet, lysiert und zentrifugiert (wie zuvor beschrieben). Dieser Infektionszyklus wurde wiederholt bis ein cytopathischer Effekt (CPE) sichtbar wurde (maximal 4 Zyklen). Durch einen CPE wird im Rahmen der adenoviralen Infektion Zellen morphologisch in Form der Zellabrundung und dem Verlust der Adhäsionsfähigkeit verändert. Danach erfolgte die Präparation der Viren in größerem Maßstab (5.5.3).

5.5.3 Vermehrung und Präparation von Adenoviren

70 % konfluente 293 Zellen in T75-Zellkulturflaschen wurden mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von etwa 10 infiziert. Die MOI gibt vorhandene Anzahl der infektiösen Partikel pro Zielzelle an. Eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle des einsetzenden CPE (meist nach ca. 60 h) und des Mediumfarbwechsels ermöglichte die Bestimmung des geeigneten Erntezeitpunktes.

Nach Einsetzen des CPE wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Dialysepuffer aufgenommen. 20 Kulturschalen mussten mindestens für eine Viruspräparation infiziert werden, um eine möglichst hohe Ausbeute an infektiösen Partikeln zu erhalten. Die Zellpellets wurden nach dem Zentrifugationsschritt in einem Volumen von 5 ml vereint. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und sofort wieder aufgetaut und kräftig gevortext. Um die Zellen möglichst vollständig aufzuschließen, wurde dieser Vorgang insgesamt 3 x wiederholt. Die Suspension wurde bei 2.000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und das Pellet in 2 ml Dialysepuffer resuspendiert und nach einem weiteren Einfrier/Auftau-Zyklus erneut bei 2000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Überstand des 1. Zentrifugationsschrittes vereinigt.

Die Anreicherung und Reinigung der Viruspartikel erfolgte mittels Ultrazentrifugation auf einem Cäsiumchlorid-Stufengradienten in einem Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Fa. Beckman) für den Rotor SW-28i. Der Gradient wurde aus jeweils 3,5 ml CsCl₂ der Dichten 1,4 g/ml und 1,2 g/ml aufgebaut und mit der Virussuspension beladen. Es wurde für 4 Std. bei 28.000 rpm (Rotor SW-28i, Fa. Beckmann) und 10°C ultrazentrifugiert. Die Virusbande konnte anschließend mit einer feinen Kanüle (Ø 0,8 mm, Fa. Braun) durch seitliches Einstechen in das Röhrchen aus dem CsCl₂-Gradienten gezogen werden. Zur größeren Reinheit wurde die Suspension mit Dialysepuffer auf ein Volumen von 7 ml aufgefüllt und nochmals auf einem CsCl₂-Gradienten ultrazentrifugiert. Die Virusbande mit 1 Volumen 2 x Lagerungspuffer versetzt oder direkt in Dialysekassette (5.5.5) versetzt und dialysiert.

Die Viruslösung in Lagerungspuffer wurde bei -20°C und Viruslösung nach Dialyse wurde bei -80°C gelagert. Der Gehalt an viralen Partikeln wurde spektrophotometrisch durch Bestimmung der OD bei 260 nm einer 1:20 Verdünnung in 0,1 % SDS ermittelt. Eine OD₂₆₀ = 1 entspricht 10¹² viralen Partikeln/ml. Üblicherweise entsprechen 10-50 Adenoviruspartikel einem infektiösen Partikel (IP). Die Konzentration der pfu pro Volumeneinheit ist das Maß für die Infektiosität einer Viruspräparation und kann durch Titerung (5.5.4) bestimmt werden.

CsCl₂-Gradient (für jeweils 100 ml)

Dichte 1,2 g/ml: 26,5g CsCl₂, 92,5 ml H₂O, 1 ml Tris/HCl pH 7,5

Dichte 1,4 g/ml: 53,5 g CsCl₂, 85,5 ml H₂O, 1ml Tris/HCl pH 7,5

2 x Lagerungspuffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0

100 mM NaCl

1 mM MgCl₂

50 % Glycerol
0,1 % BSA

5.5.4 Bestimmung des infektiösen Titers von adenoviralen Präparationen

Die tatsächliche Infektiösität von Adenoviruspräparationen kann mit Hilfe des Adeno-X Rapid-Titer Kit (BD Clontech) quantifiziert werden. Dieser Assay basiert auf einer immunocytochemischen Färbung des adenoviralen Hexonproteins in infizierten Einzelzellen. Dazu werden in 24-well-Platten ausgesäte permissive 293-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-8} einer Adenoviruspräparation infiziert. Nach 42 bis 48 h wurden der infizierten Zellrasen mit Methanol fixiert und infektiöse Ereignisse sichtbar gemacht. Dabei wurden die Vorgaben des Herstellers befolgt. Zur Färbung wurden die Verdünnungsstufe eingesetzt, die zwei logarithmische Verdünnungsstufen nach der Stufe mit mikroskopisch erkennbaren CPE folgt. Die Berechnung des infektiösen Titers erfolgt anhand der Zählung gefärbter Einzelzellen im Lichtmikroskop bei definierter Vergrößerung.

$$\frac{IP}{ml} = \frac{x \times y}{Vf \times Vol.}$$

IP: infektiöse Partikel
Vf: Verdünnungsfaktor
Vol: eingesetztes Virusvolumen (meist 0,1 ml)
x: Mittelwert aus gefärbter Zellen im Sichtfeld
y: Faktor für Anzahl der Sichtfelder für ein well bei definierter Vergrößerung: 20x: 331
10x: 79
4x: 10

5.5.5 Dialyse der Adenoviren

Zur Nutzung von Adenoviren bei Tierexperimenten ist ein Austausch des Lagerungspuffers und des Cäsiumchlorids aus der Ultrazentrifugation gegen ein physiologisches Medium in Form einer Dialyse notwendig.

Adenoviren sind in glycerolfreien, physiologischen Medien nur begrenzt haltbar. Daher wurde die Dialyse erst kurz vor Beginn der Infektionsversuche durchgeführt. Hierzu wurde die benötigte Adenovirusmenge mit einem mindestens 50%igen Überschuss, aufgrund des Verlustes an der Dialysemembran, in einer zuvor angefeuchtete Dialysekassette (Fa. Pierce) mit einer 0,8 mm-Kanüle injiziert. Die überschüssige Luft aus der Kassette wurde abgezogen. Dialysiert wurde 2 x 2 h gegen Dialysepuffer. Die Virussuspension wurde aus der Kassette abgezogen und die OD aufgrund der infolge der Dialyse auftretenden Volumenänderung erneut bestimmt. Die MOI konnte dann aus dem vor der Dialyse bestimmten Verhältnis zwischen Gesamtpartikel aus OD und infektiöse Partikel aus Titerung berechnet werden.

5.5.6 Kristallviolett-Färbung zur Quantifizierung der Onkolyse

Tumorzellen wurden in 24-well-Platten mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen / well ausgesät und 12 h nach Adhäsion der Zellen mit 40 ng / well Doxorubicin behandelt. 8 h nach Doxorubicin Behandlung wurden die Zellen mit den Viren in verschiedenen MOIs infiziert. Die infizierten Platten wurden bis zum Erscheinen des CPE inkubiert. Mit einer Kristallviolett-Färbung des Zellrasens konnte das infolge der viralen Replikation erfolgte CPE und das daraus resultierende Auflösen des Zellrasens verdeutlicht werden.

8 bis 10 Tage nach Virusgabe wurde das Medium entnommen und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen 10 min in 10 %igem Formalin in PBS fixiert. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und der Zellrasen mit 0,1% Kristallviolett in 10 % Ethanol für 30 min gefärbt. Die Färbelösung wurde mit einem weiteren Waschschriff mit Wasser vollständig entnommen.

5.5.7 Infektion von IMR-90 Fibroblasten

Aufgereinigtes CAR_{ex}TAT-Fusionprotein wurde mit der entsprechenden Virusmenge vermischt (100 ng Protein / 1×10^4 infektiöse Einheiten) und 10 min inkubiert. 5×10^5 IMR-90 Fibroblasten wurden mit CAR_{ex}-TAT-beladenen Viren mit einer MOI 0,1 infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden zelluläre DNA von infizierten Zellen mittels QIAamp-DNA-Mini Kit (Qiagen) isoliert und über eine OD₂₆₀/OD₂₈₀-Messung quantifiziert. Zur Quantifizierung der viralen DNA-Replikation wurde eine qPCR (s. 5.4.8) durchgeführt.

5.6 Tierexperimentelle Methoden

Pathogenfreie männliche NMRI-nu/nu Mäuse (6 – 8 Wochen alt) wurden vom Tierhaus der Medizinische Hochschule Hannover erhalten. Das Gewicht der Mäuse betrug ca. 15 – 20 g. Die Tiere wurden in Gruppen von maximal 6 Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Fa. Makrolon) des Typs II auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten (Raumtemperatur 22 +/- 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55+/- 5 %, Belichtung 07.00 bis 19.00 MEZ, kontinuierliche Fütterung mit einer pelletierten autoklavierten Alleindiät (Fa. Altromin, Gesamtprotein 19 %, Fett 4 % , N-freie Extraktstoffe 50,5 %, umsetzbare Energie 2850 kcal/ kg)). Steriles Leitungswasser wurde über Tränkflaschen zugeführt. Die Tiere wurden hinter einer Infektionsbarriere gehalten und monatlich auf Erregerfreiheit entsprechend der GV-SOLAS-Liste getestet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperiment erfolgten gemäß dem Tierversuchsantrag 04/888 und der Anzeige §4/86.

5.6.1 Untersuchung der intrahepatischen, viralen DNA Replikation

Zur Untersuchung der viralen DNA-Replikation in der Leber wurden die Mäuse zunächst mit Doxorubicin (1,75 µg Doxorubicin / g Maus 8 h vor Virus- bzw. Zellgabe) behandelt, um ein hohes p53-Niveau vorzubereiten. Anschließend wurden die Viren mit 1×10^7 IP oder mit 5×10^5 Hep3B-Zellen, die 24 h vorher mit den entsprechenden Viren mit einer MOI 25 vorbehandelt waren, i.v. injiziert. Die zu verabreichende Menge wurde vor der Injektion auf ein injizierbares Volumen von 250 µl in Dialysepuffer gebracht und über die Schwanzvene, welche vor der Injektion durch Aufbringen von warmem Wasser auf die Schwanzhaut dilatiert wurde, injiziert. Bei der Injektion kamen Insulinnadeln (27 G) der Fa. Braun zum Einsatz. Zu den in den Abbildungen dargestellten Zeitpunkten wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation und nachfolgendem Genickbruch getötet. 24 h, 48 h und 72 h nach der Injektion wurden 10 mg Lebergewebe entnommen und die DNA wurde mittels QIAamp-DNA-Mini Kit (Fa. Qiagen) isoliert. Der Anteil viraler DNA wurde anschließend durch quantitative PCR (5.4.8) nachgewiesen.

5.6.2 *in vivo* Onkolyse

Zur Untersuchung der intratumoralen Lysewirkung von Adenoviren wurden 1×10^7 Tumorzellen in 200 µl sterilem PBS durch s.c. Injektion in die linke Flanke inokuliert. Nach Erreichen einer Tumorgröße von etwa 200 mm³ wurde mit der virotherapeutischen Behandlung begonnen. Die Applikation der Viren erfolgte in 150 µl durch Insulinnadeln (27 G) intratumoral, wobei die Mäuse mit Ether betäubt waren. Die Virusdosis betrug 5×10^8 pfu und wurde in 4 Tagesabschnitten wiederholt. Die Tumorgröße konnte mit einer digitalen Schieblehre gemessen werden. Die Volumengröße wurde anhand folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Tumolvolumen}(mm^3) = \frac{\text{Tumurlänge}(mm) \times \text{Tumorbreite}^2(mm^2)}{2}$$

Nach Beendigung eines Versuchs wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation und nachfolgendem Genickbruch getötet.

5.7 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde in dieser Arbeit mithilfe des Programms GraphPad Prism mit dem *parametric, unpaired t-Test* und *two-tailed P-Values* mit einem Konfidenz Intervall von 95 % errechnet.

6 Literaturverzeichnis

1. Adachi, Y., Reynolds, P.N., Yamamoto, M., Wang, M.H., Takayama, K., Matsubara, S., Muramatsu, T. and Curiel, D.T. (2001) A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Research*, **61**, 7882-7888.
2. Andersson, M.G., Haasnoot, P.C.J., Xu, N., Berenjian, S., Berkhout, B. and Akusjarvi, G. (2005) Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *Journal of Virology*, **79**, 9556-9565.
3. Aparicio, O., Razquin, N., Zaratiegui, M., Narvaiza, I. and Fortes, P. (2006) Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *Journal of Virology*, **80**, 1376-1384.
4. Bangma, C.H., Kraaij, R., van Rijswijk, A., Haisma, H.J., van Beusechem, V. and Gerritsen, W. (1999) Transductional targeting of adenoviral vectors to prostate cancer in vitro. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **2**, S5.
5. Bannister, S.C., Wise, T.G., Cahill, D.M. and Doran, T.J. (2007) Comparison of chicken 7SK and U6 RNA polymerase III promoters for short hairpin RNA expression. *Bmc Biotechnology*, **7**.
6. Barker, S.D., Dmitriev, I.P., Nettelbeck, D.M., Liu, B., Rivera, A.A., Alvarez, R.D., Curiel, D.T. and Hemminki, A. (2003) Combined transcriptional and transductional targeting improves the specificity and efficacy of adenoviral gene delivery to ovarian carcinoma. *Gene Therapy*, **10**, 1198-1204.
7. Bilsland, A.E., Merron, A., Vassaux, G. and Keith, W.N. (2007) Modulation of telomerase promoter tumor selectivity in the context of oncolytic adenoviruses. *Cancer Research*, **67**, 1299-1307.
8. Bischoff, J.R., Kim, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson Johannes, A., Fattaey, A. *et al.* (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.
9. Bischoff, J.R., Kim, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson Johannes, A., Fattaey, A. *et al.* (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.
10. Blackburn, E., Cohen, P., Gilley, D., Lee, M. and McEachern, M. (1994) Telomeres and Telomerase. *Journal of Cellular Biochemistry*, **83**.
11. Boden, D., Pusch, O., Silbermann, R., Lee, F., Tucker, L. and Ramratnam, B. (2004) Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Research*, **32**, 1154-1158.
12. Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*, **113**, 25-36.

13. Cai,X.Z., Lu,S.H., Zhang,Z.H., Gonzalez,C.M., Damania,B. and Cullen,B.R. (2005) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 5570-5575.
14. Carette,J.E., Overmeer,R.M., Schagen,F.H.E., Alemany,R., Barski,O.A., Gerritsen,W.R. and van Beusechem,V.W. (2004) Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells. *Cancer Research*, **64**, 2663-2667.
15. Cascallo,M., Capella,G., Mazo,A. and Alemany,R. (2003) Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Research*, **63**, 5544-5550.
16. Chu,L., Gu,J., Sun,L., Qian,Q., Qian,C. and Liu,X. (2008) Oncolytic adenovirus-mediated shRNA against Apollon inhibits tumor cell growth and enhances antitumor effect of 5-fluorouracil. *Gene Therapy*, **15**, 484-494.
17. Chung,K.H., Hart,C.C., Al-Bassam,S., Avery,A., Taylor,J., Patel,P.D., Vojtek,A.B. and Turner,D.L. (2006) Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Research*, **34**.
18. Chung,Y.S., Kim,M.K., Lee,W.J. and Kang,C. (2007) Silencing E1A mRNA by RNA interference inhibits adenovirus replication. *Archives of Virology*, **152**, 1305-1314.
19. Coffey,M.C., Strong,J.E., Forsyth,P.A. and Lee,P.W.K. (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science*, **282**, 1332-1334.
20. Coukos,G., Makrigiannakis,A., Kang,E.H., Caparelli,D., Benjamin,I., Kaiser,L.R., Rubin,S.C., Albelda,S.M. and Molnar-Kimber,K.L. (1999) Use of carrier cells to deliver a replication-selective herpes simplex virus-1 mutant for the intraperitoneal therapy of epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, **5**, 1523-1537.
21. Doench,J.G., Petersen,C.P. and Sharp,P.A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, **17**, 438-442.
22. Doronin,K., Kuppaswamy,M., Toth,K., Tollefson,A.E., Krajcsi,P., Krougliak,V. and Wold,W.S.M. (2001) Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *Journal of Virology*, **75**, 3314-3324.
23. Dostie,J., Mourelatos,Z., Yang,M., Sharma,A. and Dreyfuss,G. (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, **9**, 180-186.
24. Edwards,S.J., Dix,B.R., Myers,C.J., Dobson-Le,D., Huschtscha,L., Hibma,M., Royds,J. and Braithwaite,A.W. (2002) Evidence that replication of the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14(ARF) tumor suppressor genes. *Journal of Virology*, **76**, 12483-12490.
25. Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K. and Tuschl,T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.

26. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 7413-7417.
27. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
28. Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. and Dobner, T. (1998) E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *Journal of Virology*, **72**, 7960-7971.
29. Garber, K. (2006) China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, **98**, 298-300.
30. Gitlin, L. and Andino, R. (2003) Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *Journal of Virology*, **77**, 7159-7165.
31. Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R. (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, **418**, 430-434.
32. Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1998) p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *Journal of Virology*, **72**, 9479-9490.
33. Graham, F.L. and Prevec, L. (1995) Methods for Construction of Adenovirus Vectors. *Molecular Biotechnology*, **3**, 207-220.
34. Gu, J., Andreeff, M., Roth, J.A. and Fang, B. (2002) hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. *Gene Therapy*, **9**, 30-37.
35. Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.
36. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
37. Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres Shorten During Aging of Human Fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
38. Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research*, **25**, 585-&.
39. He, L. and Hannon, G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 522-531.
40. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J. *et al.* (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, **435**, 828-833.

41. Heise,C., Hermiston,T., Johnson,L., Brooks,G., Sampson-Johannes,A., Williams,A., Hawkins,L. and Kirn,D. (2000) An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine*, **6**, 1134-1139.
42. Hollstein,M., Rice,K., Greenblatt,M.S., Soussi,T., Fuchs,R., Sorlie,T., Hovig,E., Smith-Sorensen,B., Montesano,R. and Harris,C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3551-3555.
43. Huang,B. and Kochanek,S. (2005) Adenovirus-mediated silencing of huntingtin expression by shRNA. *Human Gene Therapy*, **16**, 618-626.
44. Jakubczak,J.L., Ryan,P., Gorziglia,M., Clarke,L., Hawkins,L.K., Hay,C., Huang,Y., Kaloss,M., Marinov,A., Phipps,S. *et al.* (2003) An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: Dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy
1. *Cancer Research*, **63**, 1490-1499.
45. John,B., Enright,A.J., Aravin,A., Tuschl,T., Sander,C. and Marks,D.S. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS. Biol.*, **2**, e363.
46. Kim,N.W., Piatyszek,M.A., Prowse,K.R., Harley,C.B., West,M.D., Ho,P.L.C., Coviello,G.M., Wright,W.E., Weinrich,S.L. and Shay,J.W. (1994) Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.
47. Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
48. Knudson,A.G. (1971) Mutation and Cancer - Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **68**, 820-&.
49. Komata,T., Koga,S., Hirohata,S., Takakura,M., Germano,I.M., Inoue,M., Kyo,S., Kondo,S. and Kondo,Y. (2001) A novel treatment of human malignant gliomas in vitro and in vivo: FADD gene transfer under the control of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter. *International Journal of Oncology*, **19**, 1015-1020.
50. Komata,T., Kondo,Y., Kanzawa,T., Ito,H., Hirohata,S., Koga,S., Sumiyoshi,H., Takakura,M., Inoue,M., Barna,B.P. *et al.* (2002) Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells. *Human Gene Therapy*, **13**, 1015-1025.
51. Kraaij,R., van Rijswijk,A.L.C.T., Oomen,M.H.A., Haisma,H.J. and Bangma,C.H. (2005) Prostate specific membrane antigen (PSMA) is a tissue-specific target for adenoviral transduction of prostate cancer in vitro. *Prostate*, **62**, 253-259.
52. Kuhnel,F., Schulte,B., Wirth,T., Woller,N., Schafers,S., Zender,L., Manns,M. and Kubicka,S. (2004) Protein Transduction Domains Fused to Virus Receptors Improve Cellular Virus Uptake and Enhance Oncolysis by Tumor-Specific Replicating Vectors. *J. Virol.*, **78**, 13743-13754.

53. Kuhnel,F., Zender,L., Wirth,T., Schulte,B., Trautwein,C., Manns,M. and Kubicka,S. (2004) Tumor-specific adenoviral gene therapy: transcriptional repression of gene expression by utilizing p53-signal transduction pathways. *Cancer Gene Therapy*, **11**, 28-40.
54. Kuppuswamy,M., Spencer,J.F., Doronin,K., Tollefson,A.E., Wold,W.S.M. and Toth,K. (2005) Oncolytic adenovirus that overproduces ADP and replicates selectively in tumors due to hTERT promoter-regulated E4 gene expression. *Gene Therapy*, **12**, 1608-1617.
55. Kurihara,T., Brough,D.E., Kovesdi,I. and Kufe,D.W. (2000) Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *Journal of Clinical Investigation*, **106**, 763-771.
56. Lagos-Quintana,M., Rauhut,R., Lendeckel,W. and Tuschl,T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, **294**, 853-858.
57. Land,H., Chen,A.C., Morgenstern,J.P., Parada,L.F. and Weinberg,R.A. (1986) Behavior of Myc and Ras Oncogenes in Transformation of Rat Embryo Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, **6**, 1917-1925.
58. Lane,D.P. (1992) Cancer - P53, Guardian of the Genome. *Nature*, **358**, 15-16.
59. Lecellier,C.H., Dunoyer,P., Arar,K., Lehmann-Che,J., Eyquem,S., Himber,C., Saib,A. and Voinnet,O. (2005) A cellular MicroRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, **308**, 557-560.
60. Lee,R.C., Feinbaum,R.L. and Ambros,V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
61. Lee,Y., Ahn,C., Han,J.J., Choi,H., Kim,J., Yim,J., Lee,J., Provost,P., Radmark,O., Kim,S. *et al.* (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419.
62. Lee,Y., Jeon,K., Lee,J.T., Kim,S. and Kim,V.N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.*, **21**, 4663-4670.
63. Liu,X.D., Ma,S.M., Liu,Y., Liu,S.Z. and Sehon,A. (2004) Short hairpin RNA and retroviral vector-mediated silencing of p53 in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **324**, 1173-1178.
64. Liu,Y.P., Haasnoot,J., ter Brake,O., Berkhout,B. and Konstantinova,P. (2008) Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Research*, **36**, 2811-2824.
65. Lu,S.H. and Cullen,B.R. (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *Journal of Virology*, **78**, 12868-12876.
66. Lynch,H.T., Casey,M.J., Lynch,J., White,T.E.K. and Godwin,A.K. (1998) Genetics and ovarian carcinoma. *Seminars in Oncology*, **25**, 265-280.

67. Malerba,M., Nikolova,D., Cornelis,J. and Iggo,R. (2006) Targeting of autonomous parvoviruses to colon cancer by insertion of Tcf sites in the P4 promoter. *Cancer Gene Therapy*, **13**, 273-280.
68. Martin-Rivera,L., Herrera,E., Albar,J.P. and Blasco,M.A. (1998) Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 10471-10476.
69. Martuza,R.L., Malick,A., Markert,J.M., Ruffner,K.L. and Coen,D.M. (1991) Experimental-Therapy of Human Glioma by Means of A Genetically Engineered Virus Mutant. *Science*, **252**, 854-856.
70. McCart,J.A., Ward,J.M., Lee,J., Hu,Y., Alexander,H.R., Libutti,S.K., Moss,B. and Bartlett,D.L. (2001) Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Research*, **61**, 8751-8757.
71. Meyerson,M. (2000) Role of telomerase in normal and cancer cells. *Journal of Clinical Oncology*, **18**, 2626-2634.
72. Meyerson,M., Counter,C.M., Eaton,E.N., Ellisen,L.W., Steiner,P., Caddle,S.D., Ziaugra,L., Beijersbergen,R.L., Davidoff,M.J., Liu,Q.Y. *et al.* (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, **90**, 785-795.
73. Mizuguchi,H. and Kay,M.A. (1998) Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method. *Human Gene Therapy*, **9**, 2577-2583.
74. Moolten,F.L., Wells,J.M., Heyman,R.A. and Evans,R.M. (1990) Lymphoma Regression Induced by Ganciclovir in Mice Bearing A Herpes Thymidine Kinase Transgene. *Human Gene Therapy*, **1**, 125-134.
75. Moosmann,P., Georgiev,O., Thiesen,H.J., Haggmann,M. and Schaffner,W. (1997) Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol. Chem.*, **378**, 669-677.
76. Nakabayashi,H., Taketa,K., Miyano,K., Yamane,T. and Sato,J. (1982) Growth of Human Hepatoma-Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Research*, **42**, 3858-3863.
77. Nakamura,T. and Russell,S.J. (2004) Oncolytic measles viruses for cancer therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **4**, 1685-1692.
78. Nawrath,M., Pavlovic,J. and Moelling,K. (2000) Inhibition of human hematopoietic tumor formation by targeting a repressor Myb-KRAB to DNA. *Cancer Gene Ther.*, **7**, 963-972.
79. O'Shea,C.C., Johnson,L., Bagus,B., Choi,S., Nicholas,C., Shen,A., Boyle,L., Pandey,K., Soria,C., Kunich,J. *et al.* (2004) Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell*, **6**, 611-623.

80. Obuchi,M., Fernandez,M. and Barber,G.N. (2003) Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *Journal of Virology*, **77**, 8843-8856.
81. Paul,C.P., Good,P.D., Winer,I. and Engelke,D.R. (2002) Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology*, **20**, 505-508.
82. Pengue,G. and Lania,L. (1996) Kruppel-associated box-mediated repression of RNA polymerase II promoters is influenced by the arrangement of basal promoter elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, **93**, 1015-1020.
83. Pfeffer,S., Zavolan,M., Grasser,F.A., Chien,M., Russo,J.J., Ju,J., John,B., Enright,A.J., Marks,D., Sander,C. *et al.* (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**, 734-736.
84. Power,A.T., Wang,J.H., Falls,T.J., Paterson,J.M., Parato,K.A., Lichty,B.D., Stojdl,D.F., Forsyth,P.A.J., Atkins,H. and Bell,J.C. (2007) Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Molecular Therapy*, **15**, 123-130.
85. Qiao,J., Kottke,T., Willmon,C., Galivo,F., Wongthida,P., Diaz,R.M., Thompson,J., Ryno,P., Barber,G.N., Chester,J. *et al.* (2008) Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nature Medicine*, **14**, 37-44.
86. Querido,E., Marcellus,R.C., Lai,A., Charbonneau,R., Teodoro,J.G., Ketner,G. and Branton,P.E. (1997) Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *Journal of Virology*, **71**, 3788-3798.
87. Ramachandra,M., Rahman,A., Zou,A., Vaillancourt,M., Howe,J.A., Antelman,D., Sugarman,B., Demers,G.W., Engler,H., Johnson,D. *et al.* (2001) Re-engineering adenovirus regulatory pathways to enhance oncolytic specificity and efficacy. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1035-1041.
88. Reinhart,B.J., Weinstein,E.G., Rhoades,M.W., Bartel,B. and Bartel,D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, **16**, 1616-1626.
89. Rodriguez,R., Schuur,E.R., Lim,H.Y., Henderson,G.A., Simons,J.W. and Henderson,D.R. (1997) Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Research*, **57**, 2559-2563.
90. Rothmann,T., Hengstermann,A., Whitaker,N.J., Scheffner,M. and zur Hausen,H. (1998) Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *Journal of Virology*, **72**, 9470-9478.
91. Samols,M. and Renne,R. (2006) Virus-encoded microRNAs: a new chapter in virus-host cell interactions. *Future Virology*, **1**, 233-242.
92. Samols,M.A., Hu,J.H., Skalsky,R.L. and Renne,R. (2005) Cloning and identification of a MicroRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology*, **79**, 9301-9305.

93. Schramke,V. and Allshire,R. (2004) Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **14**, 174-180.
94. Shay,J.W. (1996) Telomerase and cancer. *Trends in Genetics*, **12**, 486-487.
95. Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, **33**, 787-791.
96. Sieber,T. and Dobner,T. (2007) Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription. *Journal of Virology*, **81**, 95-105.
97. Stegmeier,F., Hu,G., Rickles,R.J., Hannon,G.J. and Elledge,S.J. (2005) A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13212-13217.
98. Stoff-Khalili,M.A., Rivera,A.A., Mathis,J.M., Banerjee,N.S., Moon,A.S., Hess,A., Rocconi,R.P., Numnum,T.M., Everts,M., Chow,L.T. *et al.* (2007) Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, **105**, 157-167.
99. Suh,M.R., Lee,Y., Kim,J.Y., Kim,S.K., Moon,S.H., Lee,J.Y., Cha,K.Y., Chung,H.M., Yoon,H.S., Moon,S.Y. *et al.* (2004) Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Biology*, **270**, 488-498.
100. Sullivan,C.S., Grundhoff,A.T., Tevethia,S., Pipas,J.M. and Ganem,D. (2005) SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, **435**, 682-686.
101. Sun,D.Q., Melegari,M., Sridhar,S., Rogler,C.E. and Zhu,L. (2006) Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown. *Biotechniques*, **41**, 59-63.
102. Tatsugami,K., Eto,M., Harano,M., Hamaguchi,M., Miyamoto,T., Morisaki,T., Furue,M., Akashi,K. and Naito,S. (2008) Dendritic cell therapy in combination with interferon-alpha for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.*
103. ter Brake,O., 't Hooft,K., Liu,Y.P., Centlivre,M., von Eije,K.J. and Berkhout,B. (2008) Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Molecular Therapy*, **16**, 557-564.
104. Toth,K., Djeha,H., Ying,B.L., Tollefson,A.E., Kuppuswamy,M., Doronin,K., Krajcsi,P., Lipinski,K., Wrighton,C.J. and Wold,W.S.M. (2004) 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 Research*, **64**, 3638-3644.
105. Ui-Tei,K., Naito,Y., Takahashi,F., Haraguchi,T., Ohki-Hamazaki,H., Juni,A., Ueda,R. and Saigo,K. (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Research*, **32**, 936-948.

106. Verdel,A., Jia,S., Gerber,S., Sugiyama,T., Gygi,S., Grewal,S.I. and Moazed,D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, **303**, 672-676.
107. Vogelstein,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smits,A.M.M. and Bos,J.L. (1988) Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, **319**, 525-532.
108. Walker,P.R., Saas,P. and Dietrich,P.Y. (1997) Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: The tumor cell strikes back - Commentary. *Journal of Immunology*, **158**, 4521-4524.
109. Wiendl,H., Mitsdoerffer,M., Hofmeister,V., Wischhusen,J., Bornemann,A., Meyermann,R., Weiss,E.H., Melms,A. and Weller,M. (2002) A functional role of HLA-G expression in human gliomas: An alternative strategy of immune escape. *Journal of Immunology*, **168**, 4772-4780.
110. Wirth,T., Zender,L., Schulte,B., Mundt,B., Plentz,R., Rudolph,K.L., Manns,M., Kubicka,S. and Kuhnel,F. (2003) A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. *Cancer Research*, **63**, 3181-3188.
111. Witzgall,R., O'Leary,E., Leaf,A., Onaldi,D. and Bonventre,J.V. (1994) The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, **91**, 4514-4518.
112. Xia,H., Mao,Q., Paulson,H.L. and Davidson,B.L. (2002) siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1006-1010.
113. Xia,X.G., Zhou,H.X. and Xu,Z.S. (2006) Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can knock down the expression of multiple target genes. *Biotechniques*, **41**, 64-68.
114. Yang,Y.P., Nunes,F.A., Berencsi,K., Furth,E.E., Gonczol,E. and Wilson,J.M. (1994) Cellular-Immunity to Viral-Antigens Limits E1-Deleted Adenoviruses for Gene-Therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 4407-4411.
115. Yi,R., Qin,Y., Macara,I.G. and Cullen,B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, **17**, 3011-3016.
116. Youngusband,H.B., Tyndall,C. and Bellett,A.J.D. (1979) Replication and Interaction of Virus-Dna and Cellular Dna in Mouse Cells Infected by A Human Adenovirus. *Journal of General Virology*, **45**, 455-467.
117. Zabner,J., Couture,L.A., Gregory,R.J., Graham,S.M., Smith,A.E. and Welsh,M.J. (1993) Adenovirus-Mediated Gene-Transfer Transiently Corrects the Chloride Transport Defect in Nasal Epithelia of Patients with Cystic-Fibrosis. *Cell*, **75**, 207-216.
118. Zeng,Y., Wagner,E.J. and Cullen,B.R. (2002) Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell*, **9**, 1327-1333.

119. Zeng, Y., Wagner, E.J. and Cullen, B.R. (2002) Both natural and designed micro RNAs technique can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular Cell*, **9**, 1327-1333.
120. Zeng, Y., Yi, R. and Cullen, B.R. (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9779-9784.
121. Zhang, Q., Chen, G.H., Peng, L.H., Wang, X.H., Liu, C., Shi, W.F., Su, C.Q., Wu, H.P., Liu, X.Y., Wu, M.C. *et al.* (2006) Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus. *Clinical Cancer Research*, **12**, 6523-6531.
122. Zhang, Y.A., Nemunaitis, J., Samuel, S.K., Chen, P., Shen, Y.Q. and Tong, A.W. (2006) Antitumor activity of an oncolytic adenovirus-delivered oncogene small interfering RNA. *Cancer Research*, **66**, 9736-9743.
123. Zheng, X., Rao, X.M., Gomez-Gutierrez, J.G., Hao, H., McMasters, K.A. and Zhou, H.S. (2008) Adenovirus E1B55K region is required to enhance cyclin E expression for efficient viral DNA replication. *Journal of Virology*, **82**, 3415-3427.
124. Zhou, H.X., Xia, X.G. and Xu, Z.S. (2005) An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Research*, **33**.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>american tissue culture company</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-gal	β-Galactosidase
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
CCC	cholangiozelluläres Karzinom
CMV	Cytomegalie-Virus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
Fa.	Firma
FCS	fötale Kälberserum
h	Stunde(n)
HSV-tk	Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase
kDa	Kilodalton
LacZ	β-Galactosidase
LB	Luria Broth
Luc	Luciferase
Max.	maximal
MCS	Multiple cloning site
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Anzahl infektiöser Partikel/Zielzelle)
OD	Optische Dichte

ONYX-015	p53-abhängig replizierendes Virus der Firma ONYX Pharmaceuticals
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBS	<i>plasmid Bluescript</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
RNAse	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S.D.	Standardabweichung („standard deviation“)
SDS	sodiumdodecylsulfate/Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde(n)
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
Tris	2-Amino-2,2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Unit
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

7.2 Lebenslauf

Curriculum Vitae:

Name:	Engin Gürlevik	
Adresse:	Brentanostr. 14 30625 Hannover	
Geburt:	27.07.1978, in Bremen	
Familienstand:	verheiratet	
Schulbildung:	1986 bis 1989	Grundschule, SZ am Halmerweg / Bremen
	1989 bis 1991	Orientierungsstufe, SZ Pestalozzistraße / Bremen
	1991 bis 1995	Gymnasium, SZ Pestalozzistraße / Bremen
	1995 bis 1998	Oberstufe, SZ am Rübekamp / Bremen
Schulabschluß:	1998	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	1998 bis 1999	Wirtschaftslager des Krankenhauses Diako Bremen
Studium:	1999 bis 2005	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
	01.06 - 30.11.2004	Diplomarbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover zum Thema: „Untersuchungen und Wirkungsvergleich RNA- Polymerase-II- bzw. Polymerase-III-abhängiger Transkription von microRNA und short hairpin RNA“
Studienabschluss:	2005	Diplom-Biochemiker
Wissenschaftliche Tätigkeit:	2005-2008	Charakterisierung onkolytischer Vektoren am Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover

7.3 Publikationen

7.3.1 Wissenschaftliche Artikel

Gürlevik,E., Woller,N., Schache,P., Malek,N., Wirth,T., Zender,L., Manns,M., Kubicka,S., Kühnel,F. (2008). P53-DEPENDENT ANTIVIRAL RNA-INTERFERENCE FACILITATES TUMOR-SELECTIVE REPLICATION OF ONCOLYTIC VIRUSES (eingereicht).

Gürlevik,E., Schache,P., Strüver,N., Wirth,T., Zender,L., Manns,M.P., Kubicka,S., Kühnel,F. (2008). THE ADENOVIRAL VECTOR ADSENSOR-P53T PROVIDES A HIGHLY SELECTIVE TOOL FOR ONCOLYTIC VIROTHERAPY OF TUMORS WITH ACTIVATED TELOMERASE AND ABERRATIONS IN P53-TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY (Manuskript).

Kühnel,F., Gürlevik,E., Wirth,T., Strüver,N., Malek,N., Manns,M., Carnero,A., Zender,L., Kubicka,S. (2008). TARGETING OF P53 TRANSCRIPTIONAL DEFICIENCY IN CANCER BY VIROTHERAPY IS NOT LIMITED BY OTHER P53 FAMILY MEMBERS (eingereicht).

Schache,P., Gürlevik, E., Strüver,N., Malek,N., Zender,L., Wirth,T., Kühnel,F., Kubicka,S., (2008). SYNERGISM OF VSV VIROTHERAPY WITH CHEMOTHERAPY IS EXPLAINED BY ENHANCED APOPTOSIS DUE TO VSV-MEDIATED PROTEASOMAL DEGRADATION OF MCL-1 (eingereicht).

Edukulla,R., Woller,N., Mundt,B., Knocke,S., Gürlevik,E., Saborowski, M.,Malek,N., Wirth,T., Kühnel,F., and Kubicka,S. (2008). ANTITUMORAL IMMUNE RESPONSE BY RECRUITMENT AND EXPANSION OF DENDRITIC CELLS IN TUMORS INFECTED WITH TELOMERASE-DEPENDENT ONCOLYTIC VIRUSES (eingereicht).

7.3.2 Posterpräsentationen

Gürlevik,E., Schache,P., Strüver,N., Manns,M., Kubicka,S., Kühnel,F.: THE ONCOLYTIC ADENOVIRUS AD-I-REP2 UTILIZES P53-DEPENDENT RNA INTERFERENCE FOR TUMOR-SELECTIVE REPLICATION. DGVS, Berlin, 2008.

Gürlevik,E., Schache,P., Strüver,N., Manns,M., Kubicka,S., Kühnel,F.: THE ADENOVIRAL VECTOR ADSENSOR-P53T PROVIDES A HIGHLY SELECTIVE TOOL FOR ONCOLYTIC VIROTHERAPY OF TUMORS WITH ACTIVATED TELOMERASE AND ABERRATIONS IN P53-TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. DGVS, Berlin, 2008.

Kühnel,F., Gürlevik,E., Wirth,T.C., Zender,L., Manns, M.P., Kubicka,S.: THE ONCOLYTIC ADENOVIRUS ADP53-SENSOR FOR SELECTIVE REPLICATION IN P53-ALTERED TUMORS AND POTENTIAL TARGET SPECTRUM IS NOT LIMITED BY THE P73 STATUS. DGVS, Berlin, 2008.

Woller,N., Edukulla,R., Knocke,S., Gürlevik E., Saborowsky,M., Malek,N., Wirth,T., Kühnel,F., Kubicka,S.: ANTITUMORAL IMMUNE RESPONSE BY RECRUITMENT

AND EXPANSION OF DENDRITIC CELLS IN TUMORS INFECTED WITH TELOMERASE-DEPENDENT ONCOLYTIC VIRUSES. DGVS, Berlin, 2008.

Gürlevik,E., Schache,P., Strüver,N., Manns,M., Kubicka,S., Kühnel,F.: THE ADENOVIRAL VECTOR ADSENSOR-P53T PROVIDES A HIGHLY SELECTIVE TOOL FOR ONCOLYTIC VIROTHERAPY OF TUMORS WITH ACTIVATED TELOMERASE AND ABERRATIONS IN P53-TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. EASL, Mailand, 2008.

Schache,P., Gürlevik,E., Strüver,N., Manns,M.P., Kubicka,S., Kühnel,F.: GENERATION OF A CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUS HARBORING A P53-DEPENDENT SELF-DESTRUCTION SWITCH FOR TREATMENT OF P53-ALTERED TUMORS. EASL, Mailand, 2008.

Gürlevik,E., Freimann,K., Wirth,T., Manns,M., Kubicka,S., Kühnel,F.: THE CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUS ADSENSOR-P53T FOR THE TREATMENT OF TUMORS HARBORING ACTIVATED TELOMERASE AND ABERRATIONS IN P53-TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. GASL, Frankfurt, 2008.

Gürlevik,E., Freimann,K., Wirth,T., Manns,M., Kubicka,S., Kühnel,F.: THE CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUS ADSENSOR-P53T FOR THE TREATMENT OF TUMORS HARBORING ACTIVATED TELOMERASE AND ABERRATIONS IN P53-TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. ILCA, Barcelona, 2007.

Kühnel,F., Wirth,T.C., Zender,L., Gürlevik,E., Manns, M.P., Kubicka,S.: THE ONCOLYTIC ADENOVIRUS AD-P53SENSOR REPLICATES SELECTIVELY IN P53- ALTERED TUMOR CELLS AND POTENTIAL TUMOR SPECTRUM IS NOT LIMITED BY THE P73 STATUS. ILCA, Barcelona, 2007.

Woller, N., Schulte, B., Milewska, D., Schache, P., Gürlevik, E., Manns, M. P., Kubicka, S., and Kuhnel, F.: TELOMERASE DEPENDENT CONDITIONALLY REPLICATING ADENOVIRUS (hTERT-AD) EXPRESSING CAR_{ex}PTDS DISPLAYS ENHANCED ONCOLYTIC PROPERTIES IN NONPERMISSIVE TUMOR CELLS. EASL, Wien, 2006.

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Florian Kühnel für die engagierte, fachliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit. Die großzügige Förderung sowie seine ausgezeichneten Fachkenntnisse und der Ansprechbarkeit zu jedem Zeitpunkt haben zu einem stets großartigen Laborklima beigetragen.

Ich möchte mich ausdrücklich bei Prof. Dr. Kubicka für sein Ideenreichtum und seine wissenschaftlichen Kenntnisse bedanken. Die stete Diskussionsbereitschaft und sein Engagement für die Forschung als Leiter der Forschungsgruppe haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Ich danke Prof. Dr. Michael P. Manns für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ich danke Herrn Bernhard Vaske vom Institut für Biometrie für die lehrreiche Einführung in statistische Auswertungsmethoden.

Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn danke ich für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung.

Weiterhin richtet sich mein Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Kubicka für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen kleinen Hilfen zur Erleichterung des Laboralltages. Ich danke Nina Strüver, Peter Schache, Norman Woller, Bettina Fleischmann-Mundt, Arnold Kloos, Sarah Knocke und Ramakrishna Edukulla.

Meinen Eltern danke ich, dass sie immer für mich da waren.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Nurcan, die mich mit ihrer Liebe immer unterstützt und gefördert hat.

7.5 Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation

„Generierung und Charakterisierung tumorselektiv replizierender Adenoviren für die onkolytische Therapie p53-dysfunktioneller Tumore“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 02. Oktober 2008

Engin Gürlevik