

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Institut für Molekularbiologie  
und Innere Klinik (Tumorforschung)

Untersuchungen zur möglichen Sensibilisierung  
zytostatikaresistenter Tumorzellen  
für die Behandlung mit Zytostatika  
durch Expression transformationsdefekter E1A-Derivate

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Norman Zschech  
aus Spremberg  
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Jöckel  
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Bertram Opalka  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Angelika Eggert

Tag der mündlichen Prüfung: 11. April 2006

Publiziert:

Norman Zschech, Bertram Opalka, Ulrich R. Hennge und Hans-Christoph Kirch:  
Sensibilisierung zytostatikaresistenter Tumorzellen für die Behandlung mit  
Zytostatika durch Expression transformationsdefekter E1A-Derivate.  
Posterbeitrag zum Forschungstag des Universitätsklinikums Essen am  
13.06.2002.

**Für meine Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<a href="#"><u>Für meine Eltern.....</u></a>	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Struktur der E1A-Proteine.....	2
1.2 Regulationspotentiale von E1A in der Wirtszelle.....	5
1.3 Transformierendes und immortalisierendes Potential von E1A.....	6
1.4 Antionkogene Eigenschaften von E1A.....	7
1.4.1 Suppression der Transformation.....	7
1.4.2 Suppression der Tumorigenität.....	8
1.4.3 Suppression des Metastasierungspotentials.....	8
1.4.4 Induktion von Apoptose.....	9
1.4.5 Sensibilisierung gegenüber DNA-schädigenden Substanzen.....	10
1.5 Transformationsdefekte Derivate von E1Awt.....	11
<b>2 Material.....</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Zytostatika.....	15
2.3 Kits und Reagenzien.....	15
2.4 Lösungen und Materialien für die Zellkultur.....	16
2.5 Molekulargewichtsstandards.....	16
2.6 Vektoren und Plasmide.....	17
2.7 Antikörper.....	17
2.8 Zelllinien.....	17
2.9 Besondere Materialien.....	18

2.10 Spezielle Geräte.....	18
<b>3 Methoden.....</b>	<b>20</b>
3.1 Zellen.....	20
3.1.1 Zellkulturhaltung.....	20
3.1.2 Zellzählung.....	20
3.1.3 Mykoplasmentest.....	20
3.2 Nukleinsäuren.....	22
3.2.1 Messung der DNA-Konzentration und Reinheit.....	22
3.3 Proteine.....	22
3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen.....	22
3.3.2 Messung der Proteinkonzentration.....	22
3.3.3 Gelelektrophorese.....	23
3.3.4 Western Blotting.....	23
3.4 Transfektionsmethoden.....	23
3.4.1 Transferrinrezeptor- vermittelte Transfektion mit DuoFect™.....	24
3.4.2 Transfektion mit Lipid-Mizellen mit Effectene™.....	25
3.4.3 Aktiviertes Dendrimer-vermittelte Transfektion mit PolyFect®.....	26
2.....	28
(Daten nicht gezeigt).Es , wodurch aber auch die Zellschädigung zunahm (siehe Kap. 5.2.4).auch 7 bis 10 4.6 Vergrößerung 1:300.....	31
4.2.5 Transfektionseffizienz im FACSZusätzlich sollte die Transfektionseffizienz im FACS quantifiziert werden. BLM-Zellen wurden mittels PolyFect® oder GenePorter™2 mit dem GFP-Plasmid transfiziert und nach 48 Stunden der Anteil fluoreszierender Zellen ausgewertet.Dabei waren 8,6% der PolyFect®-transfizierten und 64,1% der GenePorter™2- transfizierten Zellen positiv. Die Analyse der zur Kontrolle untersuchten BLM- Zellen ergab 0,4% positive Zellen.....	32
5.4 Ergebnisse erster klinischer Studien mit E1AIn verschiedenen Studien konnte das adenovirale Gen E1A umfangreich charakterisiert werden. Neben einem immortalisierenden und transformierenden Potential in Nagerzellen zeigten sich aber auch antionkogene Eigenschaften. Wie unter Kapitel 1.4 näher beschrieben wurde, kann E1A in Tumorzellen die Transformation, Tumorigenität und das Metastasierungspotential supprimieren, Apoptose induzieren und die Zellen gegenüber Zytostatika sensibilisieren. Auch konnten	

wichtige Funktionsabläufe aufgeklärt werden. Einzelne quantitative Untersuchungen zeigten eine effektive Apoptoseinduktion und Sensibilisierung gegenüber Zytostatika durch E1A in vitro (Sanchez-Prieto, 1996; Pützer, 2000). Darüber hinaus konnte eine vergleichbare Tumorsuppression für E1A-Konstrukte, die ihr onkogenes Potential verloren hatten, gefunden werden (Dickopp, 2000). Die vorliegende Arbeit gibt zudem Hinweise auf einen wesentlichen unspezifischen nekroseinduzierenden Effekt von E1A-Konstrukten, besonders in Kombination mit Zytostatika (siehe Kap. 5.3)..... 39

<b>E1A ist ein adenovirales Gen, dessen transkribierte Proteine in die Wachstumssteuerung der Wirtszelle eingreifen und die Virusreplikation vorbereiten. E1A kann in Tumorzellen die Transformation, die Tumorigenität und das Metastasierungspotential supprimieren, Apoptose induzieren und diese für Zytostatika sensibilisieren. Daneben kann es jedoch auch Zellen transformieren und immortalisieren. Es wurden E1A-Derivate entwickelt, die einerseits die onkogenen Potenziale verloren haben, andererseits weiterhin antionkogene Eigenschaften besitzen. Für die Derivate E1AdelCR2 und E1ASpm2 konnten diese Voraussetzungen nachgewiesen werden.....</b>	<b>45</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>57</b>
<a href="#"><u>Laufbahn.....</u></a>	<a href="#"><u>57</u></a>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>58</b>
<a href="#"><u>Laufbahn.....</u></a>	<a href="#"><u>58</u></a>













## 1 Einleitung

Seit über 25 Jahren sind Adenoviren und adenovirale Gene Gegenstand der molekularbiologischen Forschung und ein wichtiges Hilfsmittel bei der Aufklärung zellulärer Funktionsabläufe wie Regulation des Zellzyklus, Genregulation und alternativen Spleissvorgängen.

Vor allem in der molekularbiologischen Tumorforschung rückte eine Gruppe adenoviraler Proteine in den Mittelpunkt des Interesses, die von der frühen Region 1 A (early region 1 A, E1A) kodiert werden. Von dieser Region kodierte Proteine werden schon kurz nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle exprimiert und spielen eine wichtige Rolle für die Vorbereitung der Virusreplikation bei der Übernahme der zellulären Wachstumskontrolle.

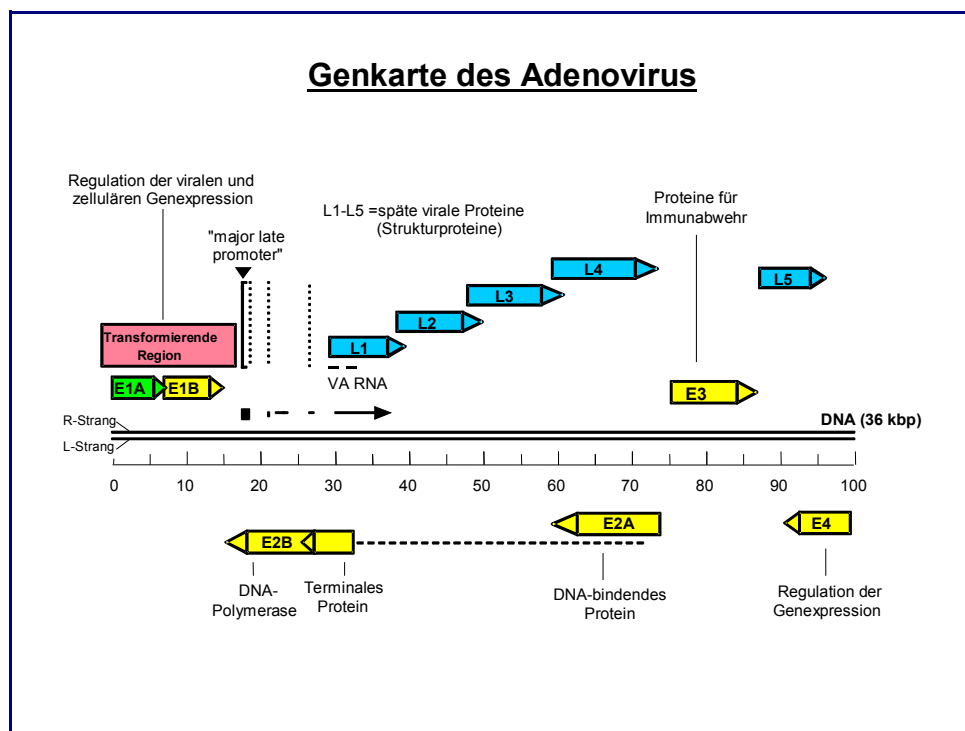
Obwohl zuerst als virale Onkogene charakterisiert, zeigte sich in den letzten Jahren, dass die beiden großen von E1A kodierten multifunktionellen Proteine in menschlichen Zellen auch tumorsupprimierende Eigenschaften besitzen (Übersicht in Mymryk, 1996). Diese Eigenschaften sind inzwischen partiell untersucht worden. Neben dem bereits in den USA in klinischen Studien angewandten Ad5 E1A-Wildtyp-Gen werden zur Zeit Konstrukte für die Tumorthherapie entwickelt (vergleiche u.a. Dickopp, 2000), die durch Eliminierung der onkogenen Eigenschaften einerseits ein geringes Risikoprofil für den

Patienten andererseits ein hohes Wirkungspotential gegen den Tumor haben sollen.

Das Bestreben, solche Konstrukte zu entwickeln, wird bestärkt durch erste klinische Studien mit dem E1A Wildtyp (E1Awt), der die in ihn gesetzten Erwartungen nur teilweise erfüllte (siehe Kap. 5.4). Möglicherweise können durch spezifische Modifikationen des Gens effizientere Konstrukte geschaffen werden.

## 1.1 Struktur der E1A-Proteine

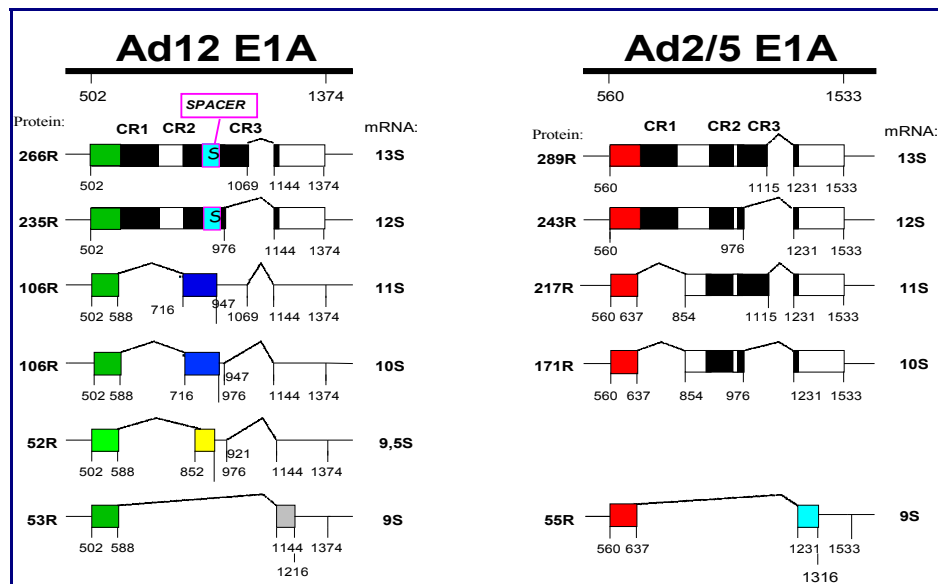
Das E1A-Gen befindet sich am äußersten linken Ende des Adenovirusgenoms (Lewis, 1980; Nevins, 1981; siehe Abb. 1.1). Insgesamt wird eine Gruppe von mindestens 5 (Adenovirus 5, Ad5) bzw. 6 (Adenovirus 12, Ad12) Proteinen exprimiert. Die entsprechend transkribierten mRNA haben Sedimentationskoeffizienten von 13S, 12S, 11S, 10S und 9S; zusätzlich 9,5S bei Ad12. Die am häufigsten exprimierten Proteine werden von den 13S- und 12S-mRNA kodiert. Diese großen Proteine können alle für E1A bekannten Funktionen ausführen.

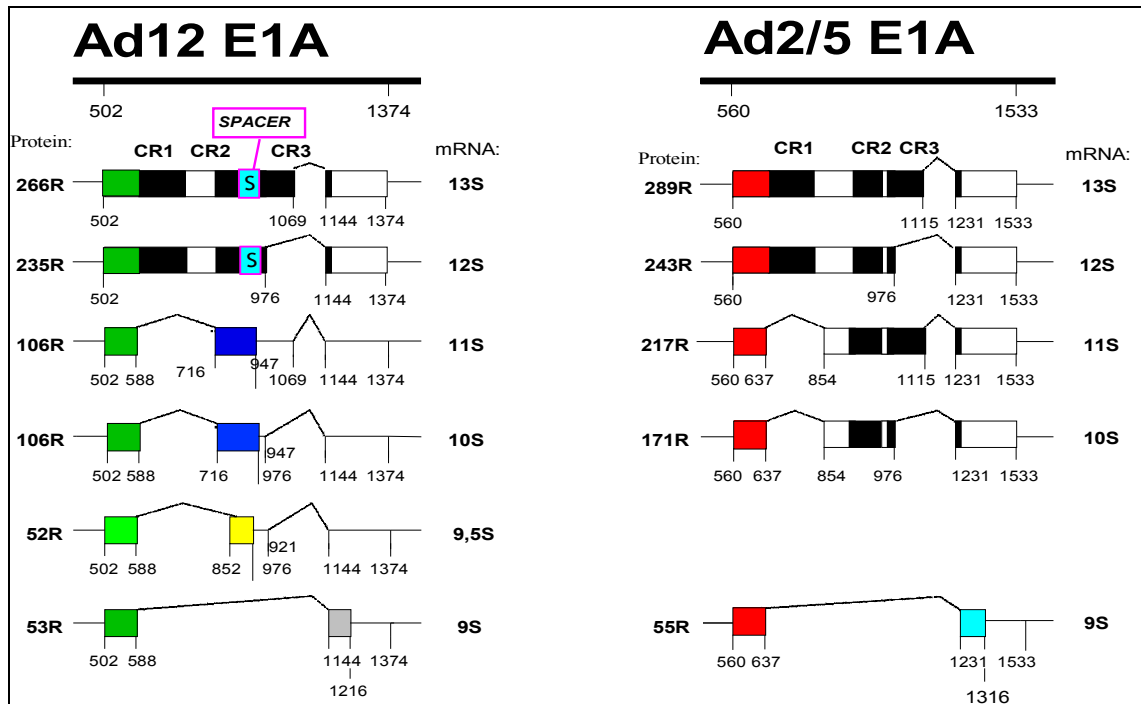


**Abbildung 1.1:** Genkarte des Adenovirus Typ 5. Gezeigt ist die Position von E1A am äußersten linken Ende und deren Relation zur Lage der anderen bekannten Gene. E1A gehört zur frühen Region E1 und wird schon kurz nach Eintritt des Virus in die Zelle transkribiert.

Es gibt drei konservierte Regionen, die unter einer Anzahl verschiedener Adenovirus-Serotypen eine homologe DNA-Sequenz aufweisen (Kimelman, 1985; van Ormondt, 1980). Diese sogenannten Conserved Regions CR 1, 2 und 3 enthalten einen Großteil der für die E1A-Funktionen wichtigen Abschnitte (siehe Abb. 1.2). Selbst größere Deletionen und Insertionen außerhalb der CR zeigten kaum eine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität der E1A-Proteine.

Daraus schloss man auf einen modularen Aufbau der E1A, durch welchen die den verschiedenen Funktionen zugeordneten Regionen unabhängig voneinander fungieren (Lillie, 1987).





**Abbildung 1.2:** Struktur der verschiedenen E1A mRNA. Von der E1A-Region leiten sich mehrere Proteine ab. Die transkribierten mRNA von Ad12 und Ad2/5 E1A weisen zueinander eine hohe Homologie auf. Rechteckig sind proteinkodierende Abschnitte dargestellt. Schwarze Rechtecke zeigen die konservierten Regionen (CR1, CR2, CR3), farbig sind Strukturhomologien hervorgehoben. In der linken Spalte sind die resultierenden Proteingrößen in Anzahl der Aminosäuren (R), in der rechten Spalte die Größe der mRNA in Svedberg-Einheiten aufgeführt. Die Skala unter den Darstellungen gibt die Nukleotidposition im adenoviralen Genom an.

Die Hauptproteine von Ad5 E1A mit 289 und 243 Aminosäureresten (R) unterscheiden sich im fast vollständigen Fehlen der CR3 im 46 Aminosäuren kleineren 243R Protein.

Die Hauptproteine von Ad12 sind 266R und 235R groß, wobei wiederum beim kleineren die CR 3 nahezu komplett deletiert ist. Im Unterschied zu Ad5 besitzt das große Protein von Ad12 266R eine Spacer-Region zwischen CR2 und CR3. Dieser wird ein Teil der onkogenen Eigenschaften zugeschrieben (Telling, 1994). E1A-Proteine werden posttranslational durch Phosphorylierung und andere Modifikationen moduliert. Die Phosphorylierung scheint jedoch nicht essentiell für die Transregulation und Transformation zu sein (Review von Brockmann, 1995). Sie sind saure und prolinreiche Phosphoproteine und hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.

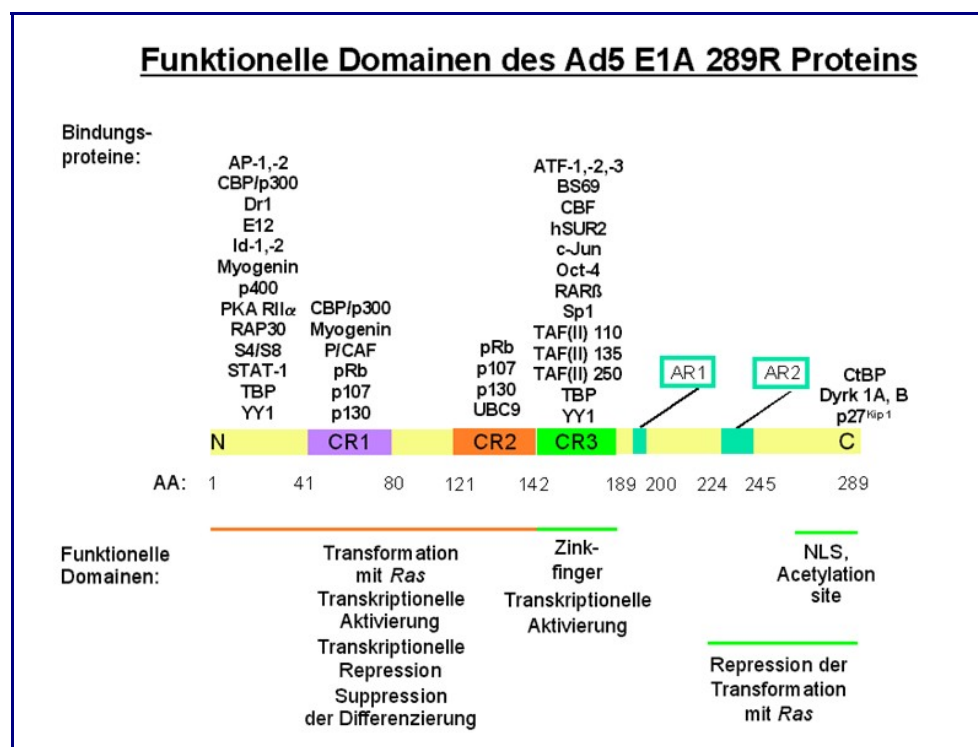


## 1.2 Regulationspotentiale von E1A in der Wirtszelle

Zu den frühen Funktionen von E1A nach Infektion der Zelle gehören die Aktivierung der viralen Gentranskription und die Beeinflussung der zellulären Expression, um so optimale Bedingungen für die Virusreplikation zu schaffen.

Dabei greift E1A gezielt in komplexe Regulationsmechanismen ein und kann die Transkription verschiedener Gene sowohl spezifisch aktivieren als auch supprimieren. Die Zelle wird so unter anderem in den Zellzyklus geführt und die Differenzierung gehemmt.

E1A kann jedoch nicht mit spezifischen DNA-Sequenzen interagieren (Ferguson, 1985; Chatterjee, 1988). Vielmehr bildet es mit zahlreichen Proteinen, die an der Zellsteuerung beteiligt sind, Komplexe und scheint so, deren Funktion zu beeinflussen oder zu hemmen.



**Abbildung 1.3:** Bindungsproteine und funktionelle Domänen des Ad5 E1A 289R-Proteins (verändert nach Gallimore, 2001). E1A greift in die Zellsteuerung ein, indem es an Regulatorproteine bindet und deren Funktion modifiziert.

Das zellkernassoziierte Phosphoprotein p300 vermag sequenzspezifisch an Doppelstrang-DNA zu binden. Diese Sequenz kommt unter anderem in Promoter-/Enhancerregionen von Genen vor, für die eine E1A-Regulation bekannt ist. Außerdem kann E1A über 2 Regionen, von denen sich eine in CR1 befindet, an p300 binden. Man geht davon aus, dass E1A über die Komplexbildung mit p300 die Transkription von Genen beeinflusst. (Review von Brockmann, 1995)

D. Barbeau et al. (1994) postulierten, dass noch andere CR2-assoziierte Proteine an diesen Komplex binden.

Es wurden viele Proteine identifiziert, an die E1A zu binden vermag, und es bestehen hohe Korrelationen zwischen den Funktionen dieser Proteine in der Zelle und dem Einfluss den E1A auf diese ausüben kann.

E1A kann alleine vor allem aber in Kombination mit einem zweiten Onkogen Nagerzellen transformieren und die Proliferationshemmung aufheben. Diese Eigenschaften sollen in einem eigenen Abschnitt betrachtet werden (siehe unten). Andererseits weist E1A eine Reihe von antionkogenen Potenzialen wie Transformationshemmung, Einschränkung der Tumorigenität und Metastasierungsfähigkeit, Apoptoseinduktion und Sensibilisierung für Zytostatika auf (Review von Mymryk, 1996).

Die E1A-Produkte gehören somit zu einer Klasse von Wachstums- und Differenzierungsproteinen, die abhängig vom Zustand der Wirtszelle transformierende wie antionkogene Funktionen ausüben können.

### **1.3 Transformierendes und immortalisierendes Potential von E1A**

E1A besitzt transformierende und immortalisierende Eigenschaften. Für eine vollständige Transformation von Nagerzellen durch Ad5 E1A sind jedoch weitere Kofaktoren wie E1B oder aktiviertes Ha-ras notwendig (Ruley, 1983; Lynch, 1989). Ad12 E1A kann auch alleine in den Zellzyklus eingreifen. Grand et al. (1998) zeigten, dass durch Infektion mit Ad12 E1A verschiedene humane Zelllinien von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus übergangen.

Wahrscheinlich wird die Transformation von E1A/E1B bzw. E1A/Ha-ras über verschiedene Signalwege gesteuert. Dabei spielen von Exon 2 kodierte Funktionen eine entscheidende Rolle. Während es die onkogenen Eigenschaften von E1A/E1B verstärkt, hemmt es jene von E1A/Ha-ras. Derivate mit deletierter Exon 2-Region zeigen ein hohes transformierendes Potenzial (Subramanian, 1989; Douglas, 1991; Review von Gallimore, 2001).

Das Transformationspotential von E1A-Produkten wird wesentlich durch die Bildung von Komplexen mit zellulären Proteinen wie p105-RB, p107, p130 und p300 vermittelt. Barbeau et al., 1994 zeigten, dass die Bindung von p105-RB, p107, p130 von CR2 abhängig ist, wobei es intensive Interaktionen mit CR1 und dem Aminoterminus gibt.

## **1.4 Antionkogene Eigenschaften von E1A**

### **1.4.1 Suppression der Transformation**

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, über die E1A die Transformation supprimieren kann.

Wie schon oben beschrieben hemmt das Genprodukt von Exon 2 die Transformation durch E1A und aktiviertem Ha-ras. Dieselben Regionen, die für diese Hemmung notwendig sind, zeigten sich auch für die Fähigkeit verantwortlich, CtBP zu binden. CtBP ist ein zelluläres Phosphoprotein, das in Interaktion mit Repressoren die Transkription von Genen unterdrücken kann (Chinnadurai, 2002). Man vermutet, dass CtBP durch Bindung am C-Terminus als Tumorsuppressorprotein fungieren kann und in Kombination mit E1A und Ha-ras die Transformationsinhibition vermittelt (Boyd, 1993). Transfektionsversuche mit E1A-Derivaten mit Deletionen im CtBP-bindenden Bereich des C-Terminus zeigten ein höheres Transformationspotential bei Nagernierzellen *in vitro* und starkes Tumorstwachstum dieser Zellen *in vivo* (Subramanian, 1989).

Das c-erbB2/neu Onkogenprodukt ist eine Untereinheit des Differenzierungs- und epidermalen Wachstumsfaktors Neu (Karunagaran, 1996). E1A kann durch Binden an pRB, dem Tumorsuppressor-Protein des Retinoblastoma-Gens, die Transkription von c-erbB2/neu unterdrücken und so die Transformation von Nagerzellen supprimieren (Yu, 1990; 1991; 1994).

Des Weiteren kann E1A die Anreicherung des tumorsupprimierenden Genprodukts p53 bewirken. Dabei fördert E1A einerseits die Transkription, andererseits verhindert es den Abbau des Proteins (Braithwaite, 1990; Chiou, 1994). Dies ist ein wichtiger Mechanismus in der Transformationssuppression von E1A.

#### **1.4.2 Suppression der Tumorigenität**

Durch Transkriptionshemmung des c-erbB2/neu-Onkogens kann auch die Tumorigenität gesenkt werden (siehe Kap. 1.4.1). Die Tumorbildung von c-erbB2/neu-überexprimierenden humanen Tumorzelllinien in immundefizienten Mäusen konnte durch eine E1A-induzierte Suppression des c-erbB2/neu-Promoters verhindert werden (Chang, 1997).

Die c-erbB2/neu-unabhängigen Einflüsse von E1A auf die Tumorigenität sind weniger gut untersucht. Deletionen in Regionen von Exon 2, die auch für die Bindung von CtBP zuständig sind, zeigten einen Anstieg der Tumorigenität in Nagerzellen (Boyd, 1993).

#### **1.4.3 Suppression des Metastasierungspotentials**

Es ist bekannt, dass E1A das Metastasierungspotential von Tumorzellen unterdrücken kann.

Unter Metastasierung wird allgemein das Streuen von malignen Zellen im Körper und das Bilden von Tochter Tumoren verstanden. Dazu müssen sich Zellen vom Tumorverband lösen. Den Kontakt zwischen Zellen stellen unter anderem Cadherine her. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Zellkontakte bei Tumoren mit einem Sinken der E-Cadherin-Expression einhergeht (Takeichi, 1993). E1A kann die Expression von E-Cadherin induzieren und so unter anderem das Metastasierungspotential senken (Frisch, 1994).

In einem weiteren Schritt müssen Tumorzellen die Basalmembran durchdringen, welches durch eine Reihe von Enzymen wie den Matrix-Metalloproteinasen

(MMP) vermittelt werden kann. E1A kann die Repression von Stromelysin 1 (MMP-3) (Offringa, 1988; Linder, 1992), Kollagenase IV (MMP-9) (Bernhard, 1995), interstitielle Kollagenase (MMP-1) und Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ (Frisch, 1990) bewirken. Man vermutet darin einen wesentlichen Faktor der E1A-induzierten Metastasierungsinhibition.

Andere Wege der Suppression des Metastasierungspotentials durch E1A-Proteine wurden durch die Ha-ras – assoziierten Bindung an CtBP postuliert (Boyd, 1993).

#### **1.4.4 Induktion von Apoptose**

Apoptose ist der kontrollierte, signalgesteuerte Zelltod und spielt eine wichtige Rolle in der körpereigenen Suppression der Onkogenese. E1A kann vermutlich über mehrere Wege Tumorzellen in die Apoptose führen.

White (1999) beschrieb ein Modell für die p53-abhängige E1A-induzierte Apoptose. E1A greift in die Zellzyklusregulation ein und man vermutet, dass p53 durch diese veränderte Regulation im Zellkern akkumuliert. Der Anstieg von p53 bewirkt entweder einen Wachstumsstopp oder die Apoptose der Zelle. Außerdem kann E1A Zellen von der G0 in die S Phase treiben, wohingegen p53 den Zellzyklus bei G1/S inhibiert (Diller, 1990; Ginsberg, 1991; Kastan, 1991; Martinez, 1991). Wahrscheinlich resultiert aus diesen widersprüchlichen Wachstumssignalen die Apoptose (Debbas, 1993).

Das 19kDa-Protein von E1B und außerdem Bcl-2, ein humanes Apoptoseinhibitorprotein, können die Apoptoseinduktion durch E1A verhindern, wobei sie vermutlich indirekt p53 antagonisieren (Review von White 1995).

Des Weiteren wurden p53-unabhängige Wege der E1A-induzierten Apoptose gefunden. Ein Kernelement der Apoptoseeinleitung ist die Aktivierung der Caspasen (Cysteine Aspartic Acid-specific Protease) durch verschiedene Effektoren. E1A kann die Caspase-3 sowohl prozessieren als auch aktivieren. Caspase-3 spaltet und inaktiviert Poly-(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), welches ein frühes Ereignis in einer Signalkette der Apoptose darstellt (Boulakia, 1996).

Pützer et al. (2000) zeigten, dass E1A auf diesem Wege bei humanen Tumorzellen p53-unabhängig Apoptose induziert. Die Apoptoseinduktion konnte durch Koexpression des E1B 19kDa-Proteins, Bcl-2 und pRB geblockt werden. Außerdem kann E1A die Procaspase-8 prozessieren und aktivieren, Cytochrom-c umverteilen und die Procaspase-3 aktivieren und so die Zelle in die Apoptose führen. Dies geschieht unabhängig von FADD, welches ein Adaptorprotein ist, dass die Fas/TNFR1 Aktivierung durch Caspase-8 vermittelt. Die Procaspase-8 aktivierende Eigenschaft von E1A wird von Bcl-2 antagonisiert (Nguyen, 1998). Zusätzlich vermag E1A einerseits Cytochrom-c aus den Mitochondrien freizusetzen und mit Apaf-1 die Caspase-9 zu aktivieren. Andererseits kann es auch unabhängig davon Apaf-1 und die Caspase-9 aktivieren (Fearnhead, 1998).

#### **1.4.5 Sensibilisierung gegenüber DNA-schädigenden Substanzen**

Eine wichtige Therapie der malignen Tumorerkrankung ist die Chemotherapie mit DNA-schädigenden Substanzen. Oftmals sind jedoch die entarteten Zellen nicht sensibel gegenüber diesen Substanzen oder entwickeln Resistenzen.

Die Expression von E1A konnte Tumorzellen für Cisplatin, Doxorubicin und andere Zytostatika sensibilisieren (Frisch, 1995; Sánchez-Prieto, 1996). Diese Sensibilisierung scheint sowohl über einen p53-abhängigen als auch einen p53-unabhängigen Mechanismus zu funktionieren (Lowe, 1993; Sánchez-Prieto, 1995).

Bei Pam 212 Keratinozyten waren für die Sensibilisierung gegenüber Gammastrahlen und Cisplatin die Regionen CR1 und CR2 essentiell, dagegen reichte für die Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin die Region CR1 (Sánchez-Prieto, 1995). Auch diese Erkenntnis spricht für verschiedene Wege über die E1A Tumorzellen sensibilisieren kann.

Akt und p38 sind zelluläre Kinasen und funktionelle Gegenspieler bei der Regulation der Apoptose. Dabei kann durch p38 die Expression von proapoptotischen Genen gesteigert und das Zellwachstum inhibiert werden. E1A kann durch Expression von p38 und Repression von Akt Brustkrebszellen gegenüber Paclitaxel sensibilisieren und so Apoptose induzieren. (Liao, 2003)

Es sind weitere sensibilisierende Eigenschaften von E1A für Gammastrahlen und TNF $\alpha$  bekannt (Mymryk, 1996).

## 1.5 Transformationsdefekte Derivate von E1Awt

Für die Genprodukte von E1A konnten *in vitro* onkogene Eigenschaften nachgewiesen werden (siehe Kap. 1.3). Sie sind also potentiell in der Lage, eine maligne Entartung zu induzieren. Dies trifft für alle Adenovirus-Typen zu. Obwohl für Ad5 und Ad12 E1A keine Assoziation zu malignen humanen Erkrankungen bekannt ist, kann die Möglichkeit nicht generell ausgeschlossen werden.

Folglich sollten E1A-Derivate konstruiert werden, die einerseits ihre onkogenen Eigenschaften verloren haben, andererseits weiterhin eine hohe antionkogene Potenz besitzen. Dieses Bestreben wurde durch den modularen Aufbau des Gens erleichtert.

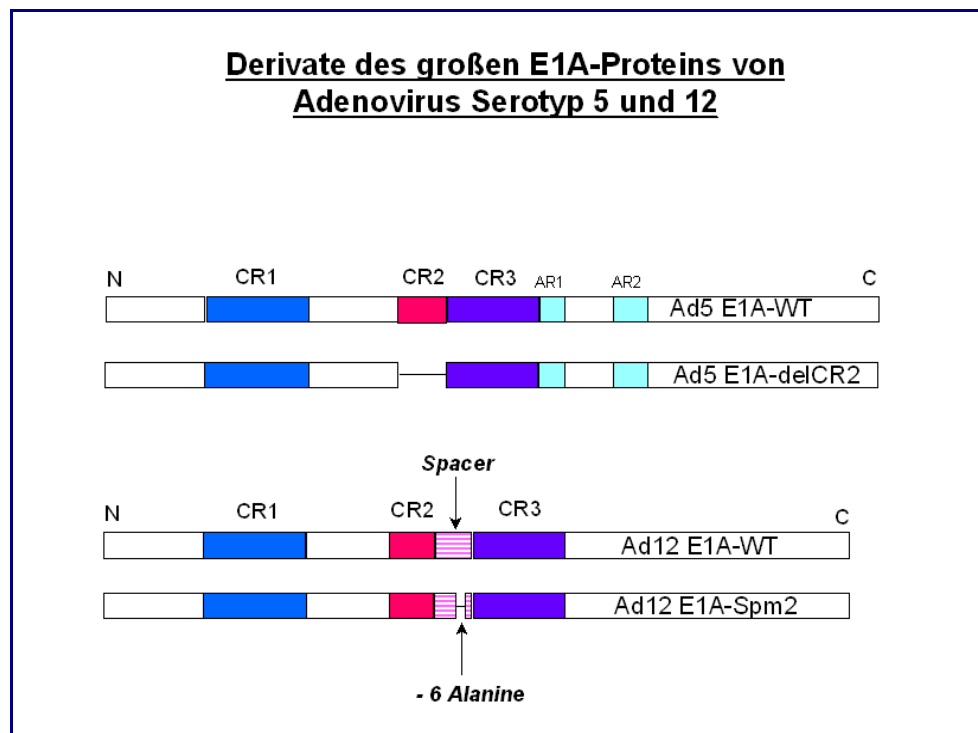
Die CR2 von E1A ist verantwortlich für die Bindung von p105-RB, welche für die Transformation durch E1A nötig ist. Entsprechend verlieren Derivate, bei denen diese Region deletiert ist, ihre transformierende Fähigkeit (Barbeau, 1994).

Dickopp et al. (2000) transfizierten Zellen mit dem Konstrukt Ad5 E1A<sub>delCR2</sub>, das eine Deletion der CR2 vorwies (siehe Abb. 1.4).

In mit diesem Derivat transient transfizierten Nierenzellen von Mäusen (Primary baby mouse kidney, BMK) konnte zunächst gezeigt werden, dass im Gegensatz zum Wildtyp das Konstrukt bei Kotransfektion mit E1B weder in der Lage war, Zellen zu immortalisieren noch eine vollständige maligne Transformation zu erzielen.

Trotzdem zeigten E1A<sub>delCR2</sub> stabil exprimierende BLM-Zellen antionkogene Eigenschaften. In Nacktmäusen wuchsen sie stark verzögert gegenüber der Kontrolle zu Tumoren aus; in Weichagar wurde im Vergleich ein geringeres Wachstum festgestellt. Dies sind Hinweise für eine durch E1A<sub>delCR2</sub> supprimierte Tumorigenität und Metastasierungsfähigkeit.

In ersten Pilotversuchen wurden Hinweise dafür gefunden, dass diese Linien gegenüber Zytostatika wie Cisplatin sensibler als E1Awt exprimierende Zellen (Dickopp, 2000).



**Abbildung 1.4:** Lage der Deletionen der E1A-Derivate. Aus den spezifischen Deletionen resultiert eine geringere Bindungsfähigkeit von E1A an p105-RB, welche mit einem Verlust transformierender Eigenschaften von E1A korreliert.

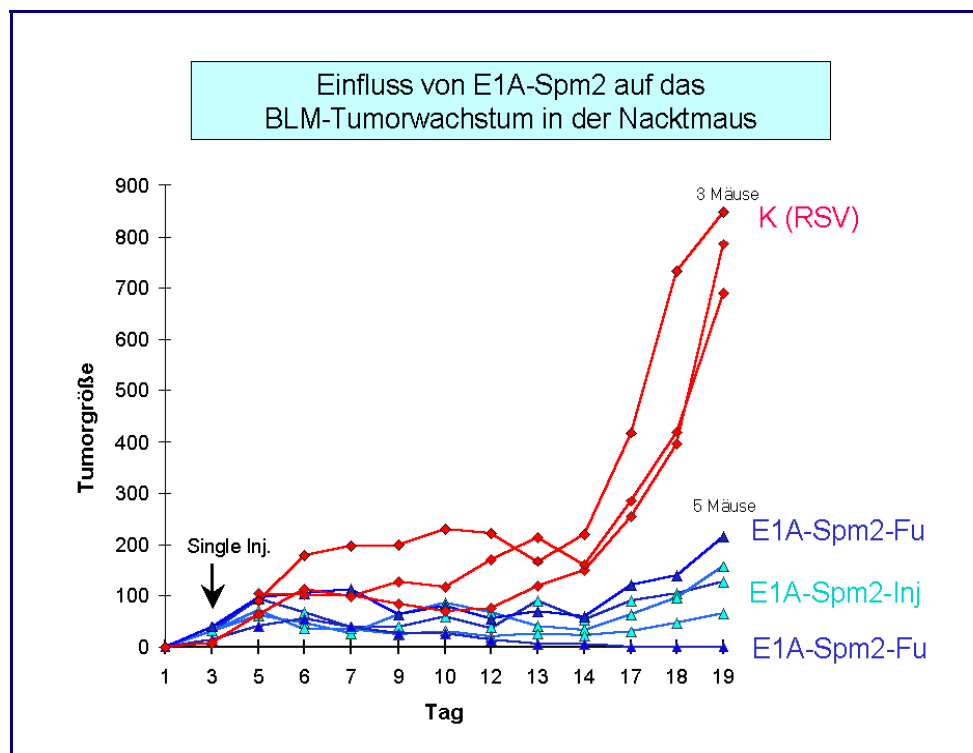
Durch Hybridisierungsversuche mit Ad5/12 wurde herausgefunden, dass der Spacer-Region zwischen CR2 und CR3 eine essentielle Rolle für die onkogenen Eigenschaften von Ad 12 zukommt (Telling und Williams, 1994; Williams, 1995). Rumpf et al. (1999) untersuchten das Ad12 Derivat E1A<sub>Spm2</sub>, bei welchem der hydrophobe 6-Alanin-Abschnitt der Spacer-Region deletiert war (siehe Abb. 1.4).

Die Genprodukte dieses Konstrukts wiesen im Gegensatz zum Wildtyp eine schwache Bindungsfähigkeit zu p105-RB auf. Die Bindung anderer Regulatorproteine wie p130 war dagegen wenig beeinflusst. Die



Bindungsfähigkeit zu p105-RB korrelierte mit den transformierenden Eigenschaften.

Nierenzellen von Mäusen, die mit E1A<sub>Spm2</sub> transfiziert wurden, starben nach 10 bis 14 Wochen ab, was auf eine Störung der Transformationseigenschaften zurückgeführt wurde. Zudem konnte eine deutliche Tumorstillstandsuppression für E1A<sub>Spm2</sub> stabil exprimierende BLM-Zellen *in vivo* gezeigt werden (unveröffentlichte gruppeneigene Daten, siehe Abb. 1.5).



**Abbildung 1.5:** *In vivo* Tumorstillstandsuppression durch E1A<sub>Spm2</sub>. E1A<sub>Spm2</sub>-exprimierende BLM-Zellen bei der Nacktmaus subkutan injiziert zeigen ein deutlich gehemmtes Wachstumsverhalten gegenüber den Kontrollen.



## 2 Material

Alle in den vorgestellten Versuchen verwendeten Chemikalien und Materialien wurden in p. A.-Qualität bezogen. Die hier nicht aufgelisteten Produkte wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck oder Roche bestellt.

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid	BioRad, München
Agarose	Biozym, Hameln
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Eosin	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, München
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Sigma-Aldrich, München
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München
MTT	Sigma-Aldrich, München
PBS-Puffer	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München
TAE	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Sigma-Aldrich, München

### 2.2 Zytostatika

Doxorubicin	Pharmacia, Freiburg
Platinex (Cisplatin)	Bristol, München

### 2.3 Kits und Reagenzien

Advanced Protein Assay	BioRad, München
ATPLite™-M	Packard, Dreieich

CellTiter 96 <sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, Madison; USA
Dosper <sup>®</sup> Liposomal Transfection Reagent	Roche Mannheim
DuoFect <sup>™</sup>	Qiagen, Hilden
Effectene <sup>™</sup>	Qiagen, Hilden
GenePorter <sup>™</sup> Transfection Reagent	Peqlab, Erlangen
GenePorter <sup>™</sup> 2 Transfection Reagent	Peqlab, Erlangen
PCR Mycoplasma Detection Set	TaKaRa, Shiga; Japan
PolyFect <sup>®</sup> Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Roti <sup>®</sup> -Block	Roth, Karlsruhe

## 2.4 Lösungen und Materialien für die Zellkultur

100x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
DMSO	Riedel-de-Haen, Seelze
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Eggenstein
Eosin	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum	PAA, Marburg
Glutamin	Merck, Darmstadt
Penicillin G	Hoechst, Frankfurt
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Life Technologies, Eggenstein
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/ml)	Roche Mannheim
Zellkulturflaschen, -platten, -schalen	Greiner, Solingen;
(Zellkulturschalen 30mm, 80mm Ø; 6er-	Nunc, Wiesbaden;
Zellkulturplatten 35mm Ø; 24er-	BD Biosciences/Falcon, San Diego;
Zellkulturplatten 15mm Ø; 96er-	USA
Zellkulturplatten 6mm Ø)	

## 2.5 Molekulargewichtsstandards

100 bp DNA-Ladder	Life Technologies, Eggenstein
Prestained SDS-PAGE Standards	BioRad, München

## 2.6 Vektoren und Plasmide

pEGFP-N1	GFP Plasmid, Clontech
pRc-RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Heidelberg
pVP22	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Heidelberg

## 2.7 Antikörper

Anti-E1A	monoklonaler	Maus-IgG-	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Antikörper (M73, Best.Nr. sc-25)			
Anti-E1A	monoklonaler	Maus-IgG-	Calbiochem, Heidelberg
Antikörper (M73, Best.Nr. DP11)			
Anti-Maus	IgG-Antikörper	peroxidase-	Calbiochem, Heidelberg
kojugiert (Best.Nr. 401253)			

## 2.8 Zelllinien

293	Humane embryonale Nierenzelllinie mit Ad5 E1A und E1B transformiert, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Graham, 1977)
BLM	Humane Melanomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Guido Swart, Universität Nijmegen, Niederlande (van Muijen, 1991)
H1299	Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Gazdar, 1990; Takahashi, 1992)
L23	Humane großzellige Lungenkarzinomlinie, zur Verfügung gestellt von M. Müller, ursprünglich von P. Twentyman, Cambridge, England (Twentyman, 1991)

MOR	Humane Lungenadenokarzinomlinie, zur Verfügung gestellt von M. Müller, ursprünglich von P. Twentyman, Cambridge, England (Twentyman, 1991)
MV3	Humane Melanomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Guido Swart, Universität Nijmegen, Niederlande (van Groningen, 1996; van Muijen, 1991)
SAOS-2	Humane Osteosarkomzelllinie (Stanelle, 2002)

## 2.9 Besondere Materialien

Negativfilme (Select Series, Kodak, Stuttgart Elitechrome, 400 ISO)	
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel; Invitrogen, Karlsruhe	
NuPAGE Runningbuffer; NuPAGE Transferbuffer	
Polaroidfilme	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme (BIOMAX X-omat AR5)	Kodak, Stuttgart
Whatman-Filterpapier	Whatman, Maidstone; GB

## 2.10 Spezielle Geräte

Biofuge 28 RS (22.000 Upm)	Heraeus, Düsseldorf
Luminometer	Berthold, Overath
Novaspec II Photometer	Pharmacia, Freiburg
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Vortex Reax 2000	Heidolph, Kelheim
Zeiss-IM 35 Mikroskop	Zeiss, Göttingen



## 3 Methoden

### 3.1 Zellen

#### 3.1.1 Zellkulturhaltung

Die Zellen wurden auf beschichteten Zellkulturflaschen bzw. -schalen und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Dabei wurden H1299-Zellen in RPMI 1640-Medium, A549-, BLM-, L23-, Mor-, MV3, SAOS-2- und 293-Zellen in DMEM-Medium gehalten.

Diesen Medien wurde 10% Fetal Calf Serum (FCS), 0,03 M L-Glutamin, nichtessentielle Aminosäuren und je 100 µg/ml Streptomycin und Penicillin hinzugefügt.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig vor Erreichen der Konfluenz „gesplittet“. Dazu wurden die adhärennten Zellen nach Waschen mit PBS<sup>-</sup> mit Trypsin abgelöst und in Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie im Verhältnis 1:10 oder 1:20 wieder ausgesät und mit ausreichend Medium wieder in Kultur gegeben. Die Passagen wurden dokumentiert.

Um eine Vergleichbarkeit der Versuche zu sichern wurden regelmäßig Passagen bei -180°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen und mit 1°C/min in einer Isolierkammer abgekühlt.

#### 3.1.2 Zellzählung

Die adhärennten Zellen wurden zunächst mit Trypsin abgelöst und in frischem Medium suspendiert. Ein Aliquot wurde mit Eosin gefärbt und die vitalen Zellen in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop gezählt.

#### 3.1.3 Mykoplasmentest

Mykoplasmen leben als Parasiten und können in allen biologischen Materialien und so auch auf Zellkulturen vorkommen. Sie können Versuche, in denen Zellüberleben und Zellvitalität gemessen wird, verfälschen.

Mykoplasmen reduzieren Tetrazolium-Salze (Kirchhoff, 1992) und beeinflussen so die Ergebnisse von tetrazoliumbasierten Vitalitätstesten, vor allem wenn diese



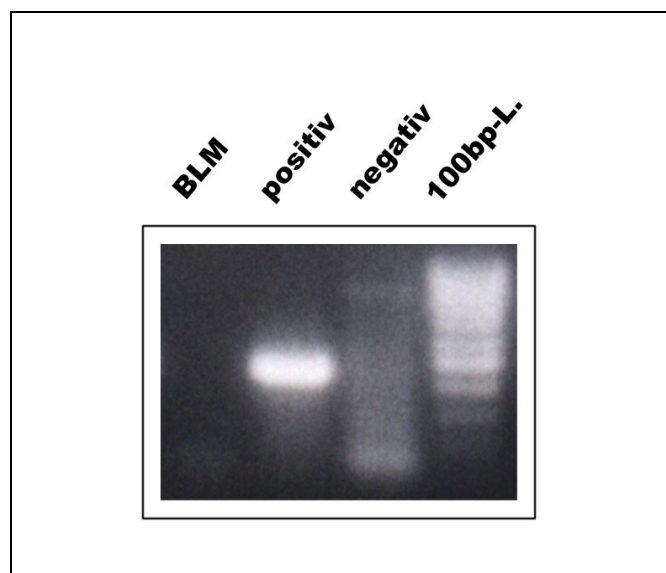
als Toxizitätsteste zur Untersuchung von Chemotherapeutika verwendet werden (Denecke, 1999).

Alle Versuche wurden mit mykoplasmenfreien Zelllinien durchgeführt, was durch regelmässige Kontrollen sichergestellt wurde.

Hierzu wurde ein PCR-Detektionskit für Mykoplasmen verwendet, mit welchem DNA von einer großen Anzahl von Mykoplasmen und von *Ureaplasma urealyticum* im Kulturmedium nachgewiesen werden kann.

Im Einzelnen wurden zunächst Wasser, 10x PCR Puffer, dNTP-Gemisch, Primer und Taq-Polymerase mit dem zu untersuchenden Kulturmedium gemischt, mit einer Mineralölschicht überzogen und im Thermocycler inkubiert (35 Zyklen à 94°C für 0,5 min, 55°C für 2 min, 72°C für 1 min). Für die folgende Elektrophorese wurden 20 µl Probe in einem 1% Agarose-Gel, das 16 µg/l Ethidinbromid enthielt, bei 30 V aufgetrennt. Als Standard wurde eine 100bp „Ladder“ von GeneGraft® verwendet.

Zur Auswertung und Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und auf Polaroid®-Film fotografiert.



**Abbildung 3.1:** Mykoplasmennegatives PCR-Ergebnis einer BLM-Kultur. Zur Größenkontrolle wurde eine 100bp-Ladder sowie eine Positiv- und Negativkontrolle im Agarosegel mit aufgetrennt. Die farbstoffmarkierten DNA-Banden fluoreszieren im UV-Licht.

## **3.2 Nukleinsäuren**

### **3.2.1 Messung der DNA-Konzentration und Reinheit**

Um eine gute Transfektion zu gewährleisten, muss nicht nur die Quantität bekannt sondern auch eine hohe Qualität der verwendeten DNA gesichert sein. Hierzu wurde die DNA bei 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen.

Eine Extinktion bei 260 nm von 1 entspricht der DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Auf die Reinheit der DNA kann man Rückschlüsse aus dem Quotienten der Messwerte bei 260 nm zu denen bei 280 nm ziehen. Dieser sollte optimal bei 1,8 liegen.

Die DNA wurde immer in endotoxinfreiem TE-Puffer suspendiert.

## **3.3 Proteine**

### **3.3.1 Proteinextraktion aus Zellen**

Zur Proteinextraktion wurden die adhärenenten eukaryonten Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> vorsichtig von der Zellkulturschale abgeschabt, in Lysepuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Darauf wurde das Lysat bei 22000 U/min. und 4°C 10 Minuten zentrifugiert, um gelöste Proteine von den Zellresten zu trennen, und der Überstand abpipettiert. Nun wurde die Gesamtproteinkonzentration bestimmt.

Proteinextrakte wurden ausschließlich bei -70°C gelagert.

### **3.3.2 Messung der Proteinkonzentration**

Die Messung der Proteinkonzentration wurde in Anlehnung an Bradford (1976) durchgeführt. Dazu wurden 3 µl einer Probe mit 1 ml Advanced Protein Assay<sup>®</sup> gemischt und die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Eichung ausgerechnet.

Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Roti<sup>®</sup>Nanoquant. Es wurden 3 µl einer Probe mit 160 µl Reagenz und 837 µl Aqua bidest gemischt und die

Absorption bei 450 nm und 590 nm bestimmt. Der Quotient der Werte bei 590 nm/450 nm wurde mit einer zuvor erstellten Eichkurve verglichen.

### **3.3.3 Gelelektrophorese**

Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben für 10 Minuten auf 70°C erhitzt.

Für die Elektrophorese wurde ein Bis-Tris-Gradientengel verwendet, welches vorher kurz mit 60%igem Methanol abgespült wurde. Nach Auftragen des Proteinstandards und der Proben in die Geltaschen wurde für 30 bis 45 Minuten eine Spannung von 200 V angelegt, bis der Standard gut aufgetrennt war.

Im Anschluss wurden die Proteine geblottet.

### **3.3.4 Western Blotting**

Das Western Blotting (Harlow, 1988) wurde in einer „Semi-dry-blotting“-Apparatur durchgeführt. Dazu wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF-Membran gelegt, welche zuvor kurz in Methanol getaucht wurde. Gel und Membran wurden in leicht feuchte, in Transferpuffer getränkte Saugpapiere gebettet und zwischen die Elektrodenplatten gelegt. Geblottet wurde bei 70 mA für eine Stunde.

Danach wurde die Membran eine weitere Stunde in Roti Block® geblockt. Es folgte die Inkubation des 1. spezifischen Antikörpers im Blockpuffer bzw. in TBS-T über Nacht bei Kühlschranktemperatur.

Nun wurde die Membran erst zweimal 10 Minuten, dann viermal 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Der 2. unspezifische Antikörper wurde 30 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die oben aufgeführten Waschschriffe wiederholt. Abschließend wurde zweimal 5 Minuten mit TBS gespült.

Zuletzt wurde ein 1:1 Gemisch von Lumin 1® und Lumin 2® auf die Membran aufgetragen und die Chemilumineszenz auf Röntgenfilm detektiert.

## **3.4 Transfektionsmethoden**

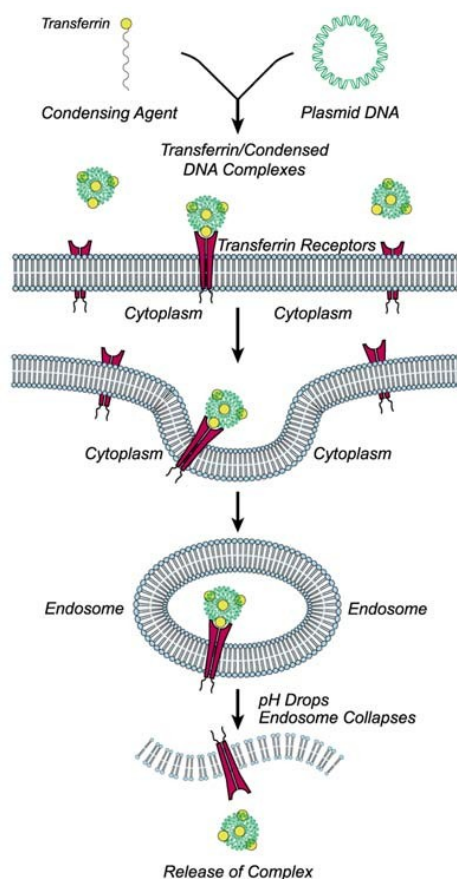
Vor jeder Transfektion wurde sichergestellt, dass die adhärenenten Zellen sich in sehr gutem Zustand befanden und zwischen 40-70% dicht ausgewachsen waren.

### 3.4.1 Transferrinrezeptor- vermittelte Transfektion mit DuoFect™

Das Reagenz DuoFect™ basiert auf einer Transferrinrezeptor-vermittelten Endozytose, mit deren Hilfe DNA in die Zelle transportiert werden kann.

Menschliches Transferrin ist in diesem Reagenz kovalent mit einem polykationischen Transporter wie Polyethylenimin (PEI) verbunden und besitzt so die Fähigkeit an einen Transferrinrezeptor der Zelle zu binden und einen effektiven Eisentransport zu vermitteln. Bei der DuoFect™-Transfektion wird ein Komplex von modifiziertem Transferrin-PEI mit kondensierter DNA gebildet. Die DNA wird über Endozytose aufgenommen und nach Freisetzung exprimiert.

Deferrioxamin ist ein zellpermeabler Eisenchelator, welcher die Transferrin-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche erhöht und damit den DNA-Transport potentiell verstärken kann.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Transferinrezeptor-vermittelten Transfektion. (Mit freundlicher Genehmigung durch Qbiogene, Illkirch; Frankreich)

Vor Transfektion wurden die Zellen über Nacht in Deferrioxamin-Medium (50  $\mu\text{M}$ ) gehalten.

Zuerst wurde eine DNA-Verdünnung von 40  $\mu\text{g/ml}$  DNA in 1X HBS-Puffer hergestellt. Zur Herstellung des Transfektionscocktails wurde PEI-Transferrin, DNA und HBS in Mengen nach unten stehender Tabelle verwendet und ca. 30 Mal auf- und niederpipettiert. Das N/P-Verhältnis entspricht dem molaren Verhältnis von Stickstoff- (PEI) und Phosphatgruppen (DNA) und ist wichtig für optimale Transfektionsergebnisse. Nun folgten 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.

Während dieser Zeit wurde ein Mediumwechsel mit Deferrioxamin-Medium durchgeführt und nach der Inkubation der Transfektions-cocktail hinzugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und danach unter normalen Kulturbedingungen weitergehalten.

	<b>N/P- Verhältnis</b>	<b>PEI-Tf (1mg/ml)</b>	<b>DNA (40<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>1X HBS</b>
<b>6-Well</b>	3,6	1,8 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	98,2 $\mu\text{l}$
<b>6-Well</b>	4,8	2,4 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	97,6 $\mu\text{l}$
<b>6-Well</b>	6,0	3 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	97 $\mu\text{l}$

**Tabelle 3.1:** Pipettierverhältnisse zur Transferinrezeptor-vermittelten Transfektion.

### 3.4.2 Transfektion mit Lipid-Mizellen mit Effectene™

Im Unterschied zu liposomalen Transfektionsreagenzien wird die DNA durch Lipidmizellen in die Zelle transportiert. In einem definierten Puffersystem wird die DNA zunächst kondensiert und dann in Mizellen gebunden. Diese ermöglichen den Transport in die Zelle.

Zunächst wurde die DNA mit dem Kondensationspuffer Buffer EC gemischt und anschließend der Enhancer hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nun wurde das Transfektionsreagenz Effectene™ hinzugefügt und nach kurzem Mischen erneut 10 Minuten inkubiert. Inzwischen wurde bei den zu transfizierenden Zellen ein Mediumwechsel mit Vollmedium durchgeführt.

Zuletzt wurde Vollmedium zu den DNA-Effectene™ Komplexen gemischt und unter Schwenken das Transfektionsgemisch auf die Zellen getropft.

Die Zellen wurden weiter unter normalen Kulturbedingungen gehalten.

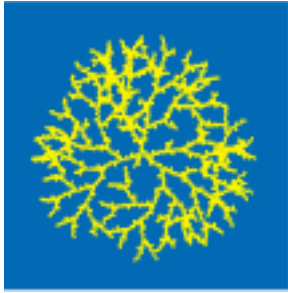
	DNA (µg)	Enhancer (µl)	Zwischenvol. mit Buffer EC (µl)	Effectene (µl)	Medium auf Zellen (ml)	Medium zu Komplexen (ml)
<b>6-Well</b>	0,4	3,2	100	10	1,6	0,6

**Tabelle 3.2:** Pipettierverhältnisse zur Transfektion mit Lipid-Mizellen.

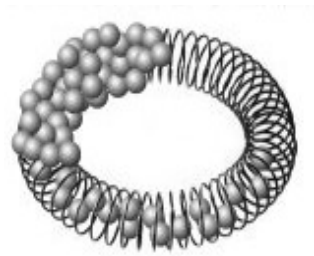
### 3.4.3 Aktiviertes Dendrimer-vermittelte Transfektion mit PolyFect®

Die Transfektion mit PolyFect® beruht auf dem Prinzip des aktivierten Dendrimers. Dieses besteht aus von seinem zentralen Anteil zentrifugal ausgehenden Armen, an deren Ende sich positiv geladene Aminosäuregruppen befinden (siehe Abb. 3.4). Seine definierte sphärische Struktur erleichtert die Bindung von kompakter DNA, wobei der PolyFect®-DNA Komplex eine positive Nettoladung besitzt. Diese ermöglicht die Bindung an negativ geladene Rezeptoren der Zelloberfläche von eukaryonten Zellen.

Nach Endozytose des Komplexes in die Zelle bewirkt PolyFect® eine Abpufferung des lysosomalen PH-Wertes, wodurch die lysosomalen Nukleasen inaktiviert werden. Auf diese Weise wird eine Lyse der DNA verhindert und der PolyFect®-DNA Komplex kann in den Kern aufgenommen werden (siehe Abb. 3.4).



**Abbildung 3.3:** PolyFect<sup>®</sup>, schematische Darstellung des verzweigten, aktivierten Dendrimers.



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des PolyFect<sup>®</sup>-DNA Komplexes. (Abb. 3.3 und 3.4 mit freundlicher Genehmigung durch Qiagen, Hilden)

Zunächst wurde die DNA (500 ng/ $\mu$ l) mit serum-, protein- und antibiotikafreiem Medium verdünnt, gevortext und kurz anzentrifugiert. Dann wurde das PolyFect<sup>®</sup> Transfektionsreagenz hinzupipettiert und wieder gemischt und kurz zentrifugiert.

Im Anschluss fand ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen statt und zum PolyFect<sup>®</sup>-DNA Gemisch wurde nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur weiteres frisches Vollmedium hinzugegeben. Das Gemisch wurde sofort auf die Zellen pipettiert und nach kurzem Schwenken wurden die Zellen für 24 bis 48 Stunden im Brutschrank inkubiert (siehe Tab. 3.3).

	DNA ( $\mu$ g)	Serumfreies Medium ( $\mu$ l)	PolyFect <sup>®</sup> ( $\mu$ l)	Vollmedium zu den Zellen (ml)	Vollmedium zum Komplex (ml)
<b>6-Well</b>	1,5	98,5	10	1,5	0,6
<b>25 cm<sup>2</sup></b>	2,5	145	15	3	1

**Tabelle 3.3:** Pipettierverhältnisse zur Aktiviertes Dendrimer-vermittelte Transfektion.


1x 6 Stunden )-

einer -Lösung (New DNA Diluent B) ( 3.4)gemischt™-(FCS) FCS-


3.4™- / 25 µl Lösung (siehe Tab. 3.5)2FCS-


3.52-- Stunden 100x 160x Zur Auswertung im FACS wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät und transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen in 10 ml PBS suspendiert, für 10 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und anschließend in 1 ml resuspendiert. Die Proben wurden direkt im FACS mit einem GFP-Filter analysiert.-t


**3.6 Zytostatika**

Zytostatikum Vitalitätstest -Biochemisches Prinzip der MTT- und MTS-Vitalitätsassays ist die Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes durch zelluläre Enzyme. Beide Tests zeichnen sich durch eine sehr hohe Reliabilität aus. MTT-AufNiederpipettieren HCl


3.7 96er Zellkulturplatten (96-Well) Well bis 60 Minuten n einem 96-Well Photometer ,die die , die n1(Hoe) mm- Lösung

**2**



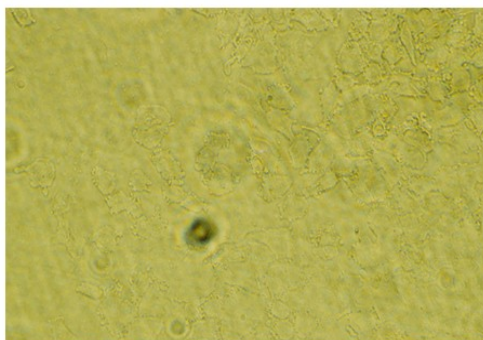
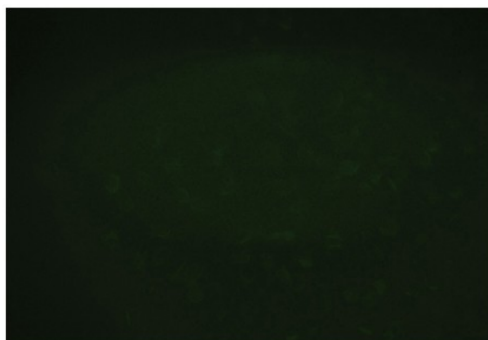

3.8chst 33342PropidiumjodidLösung	10 Minuten
-----------------------------------	------------

In der vorliegenden Arbeit sollten resistente Tumorzellen durch Transfektion mit Transformationsdefekten E1A-Derivaten für die Behandlung mit Zytostatika sensibilisiert werden. Auf der Suche nach geeigneten

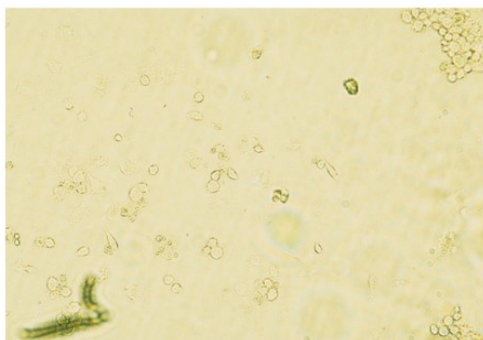
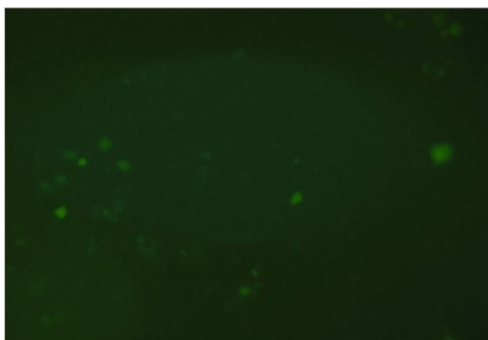
Auf Signifikanzberechnungen konnte hier verzichtet werden, da es sich im Wesentlichen um qualitative Untersuchungen zur Optimierung des Versuchsaufbaus handelte. **Abbildung 4.1** wurde der **E** **Abbildung 4.2** Zytostatikum Stunden **Abbildung 4.3** Die ist zu Eine deutliche Wirkung zeigt sich vor allem nach 18 und 24 Stunden. **Abbildung 4.4** Bei **Abbildung 4.4** 24 Stunden **Abbildung 4.5**

Anteil fluoreszierende Zellen (Daten nicht gezeigt) die Zelle und den Kern. Im Schnitt fluoreszierten nach 24 Stunden ein Drittel 32% und nach

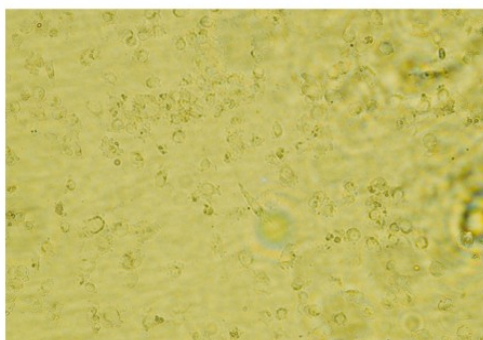
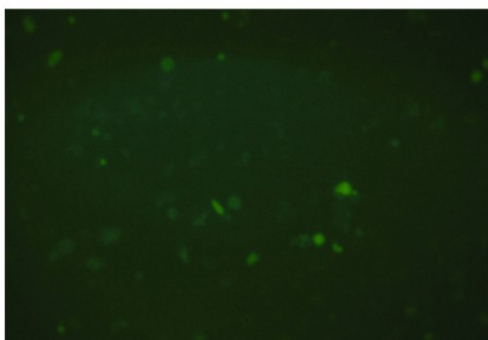
0h

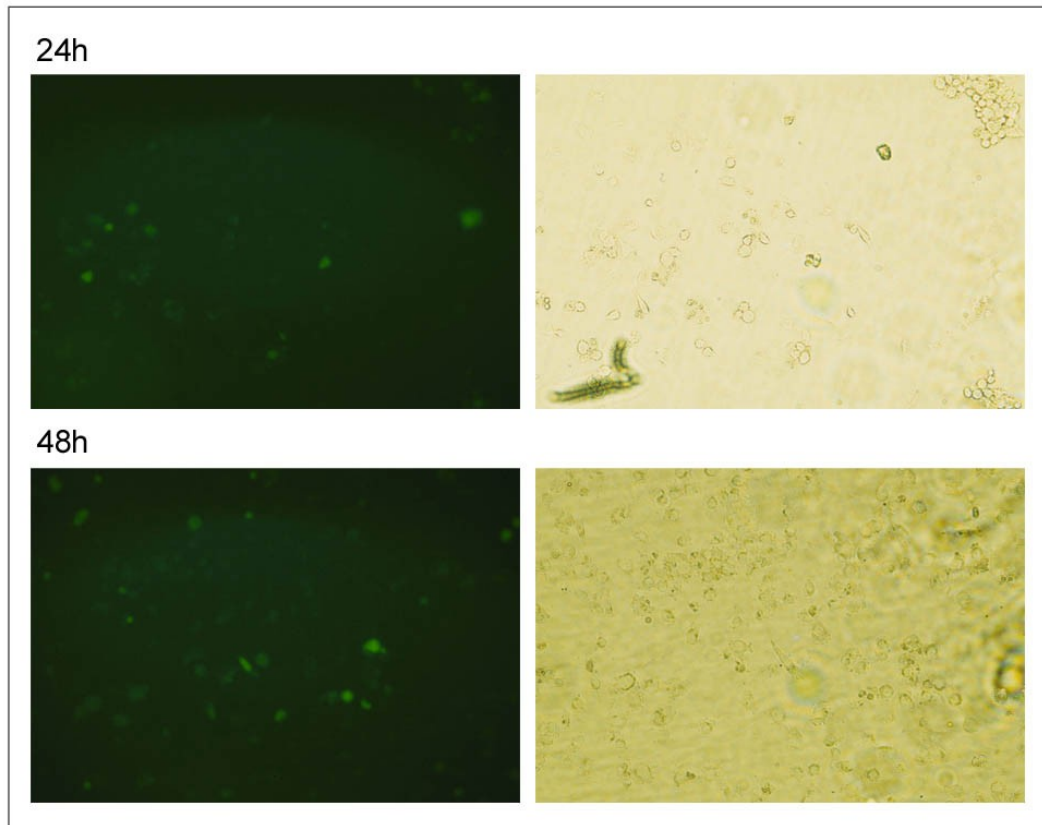


24h



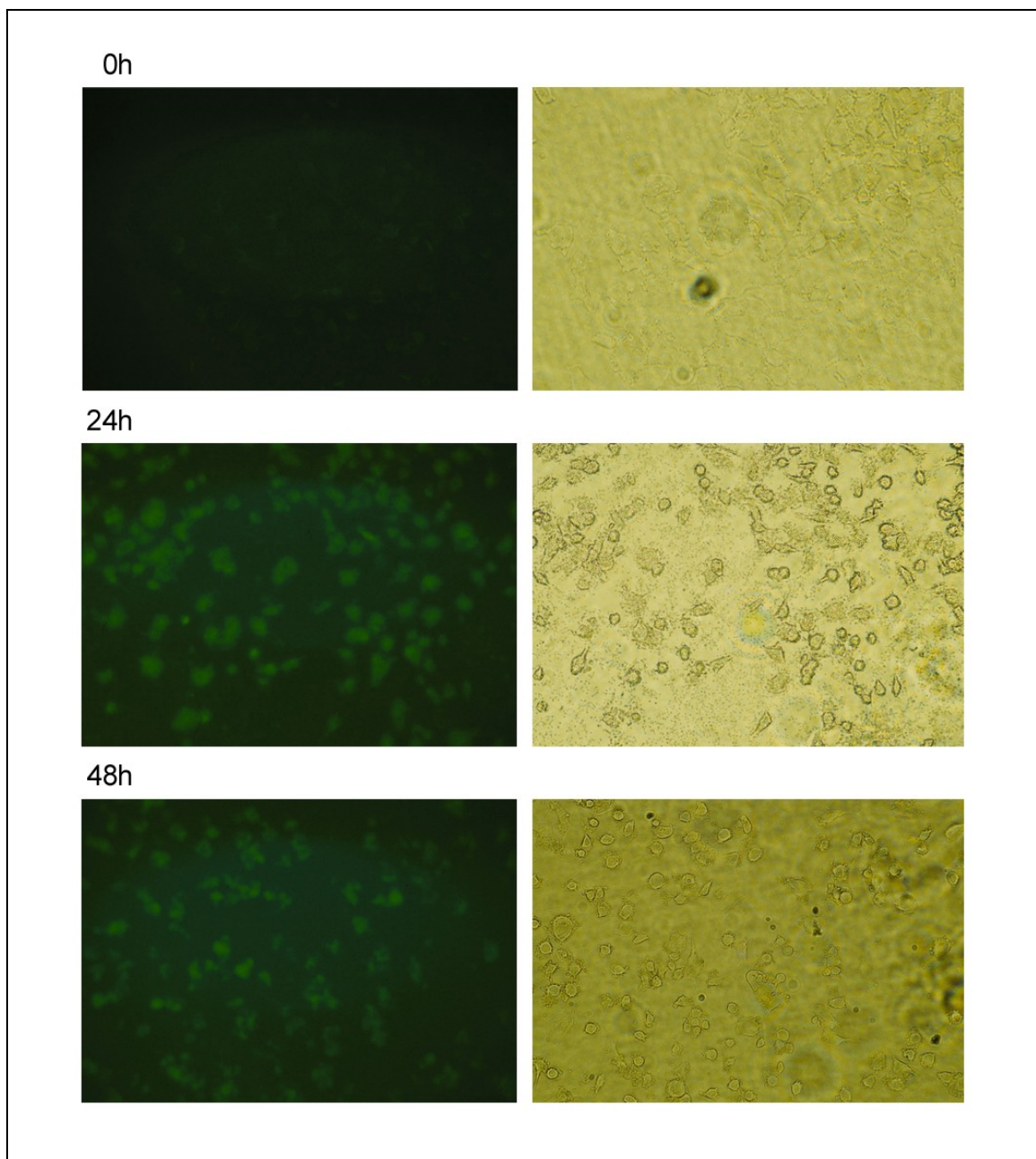
48h





#### 4.6: Fluonden nach Gößerung 1:300.4.2.3

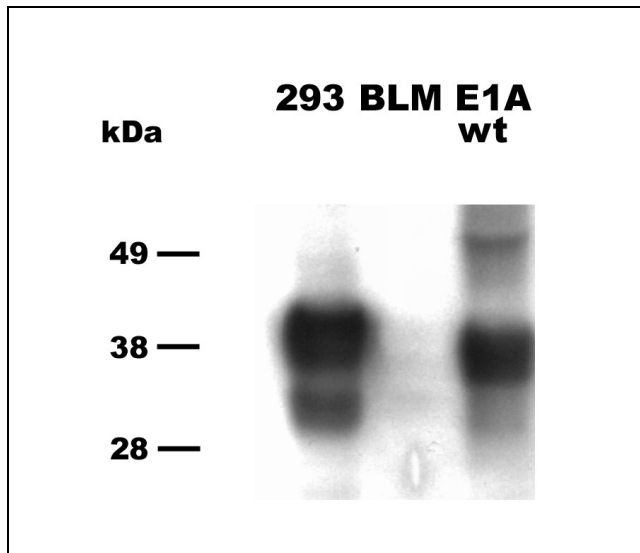
(Daten nicht gezeigt).Es , wodurch aber auch die Zellschädigung zunahm  
(siehe Kap. 5.2.4).auch 7 bis 10



#### 4.6 Vergrößerung 1:300.

4.2.5 Transfektionseffizienz im FACS Zusätzlich sollte die Transfektionseffizienz im FACS quantifiziert werden. BLM-Zellen wurden mittels PolyFect® oder GenePorter™2 mit dem GFP-Plasmid transfiziert und nach 48 Stunden der Anteil fluoreszierender Zellen ausgewertet. Dabei waren 8,6% der PolyFect®-transfizierten und 64,1% der GenePorter™2-transfizierten Zellen positiv. Die Analyse der zur Kontrolle untersuchten BLM-Zellen ergab 0,4% positive Zellen.

Dieser Versuch bestätigte, dass die höchste Transfektionrate für BLM-Zellen mit GenePorter™2 erreicht werden konnte. 6 rrt im C-terminalen Bereich der und 12SE1A-eta daher Zur Kontrolle wurden 293-Zellen verwendet.



4.7 Spuren GenePorter™ 2. Der nach

rechts unten verlaufende Shift der Banden ist versuchsbedingt auf eine Spannungsdifferenz des elektrischen Feldes zurückzuführen. Mutantendlung sens. 4.5). In diese sensit E1A Abbildung 4.8 SAOS-2 bei über 24 Stunden MTS Zytostatikum deutlichen Kontrollplasmiden alleine

In orientierenden Versuchen ließ sich keine Toxizität des Transfektionsmediums ohne DNA feststellen (Ergebnisse hier nicht aufgeführt). Vektorplasmide

**Abbildung 4.8** Kontrollvektor sfZellen h) eZellent sich eine hohe Grundtoxizität des Vektorplasmids von ca. 40%. Wahrschn Abbildung 4.9 war Auch in diesem Versuch wurde wahrscheinlich die Cisplatin-sensibilisierende Wirkung des Derivates durch die Grundtoxizität des Vektors überdeckt. **Abbildung 4.9** mit pRc/RSV und Derivaten t /ml Erneut zeigt sich eine hohe Toxizität des Vektors. 2 blutungen gleichze (siehe Kap. 3.7.3) (siehe Kap. 3.7.4)

n Abbildung 4.10 Zytostatikum apoptose telag bei unter 7,5 Zellenmische Anteile der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen.

Der apoptoseinduzierende Effekt der E1A-Konstrukte in Kombination mit Cisplatin verhielt sich additiv. Auffallend war die relativ geringe Apoptoseinduktion durch die Derivate mit kleiner 10% (siehe Kap. 5.3). **Abbildung 4.10** Vergleich der Apoptoseinduktion bei BLM-Zellen nach Transfektion ohne und mit Cisplatin (7,5 µg/ml; 24 h). In allen Ansätzen hatte Cisplatin ein hohes apoptoseinduzierendes Potential. Der Effekt der E1A-Derivate war nicht signifikant unterschiedlich zu dem der Kontrollvektoren und war insgesamt niedrig (ca. 10%).

**Abbildung 4.11** verursachte Kontrollvektoren Vektors relevant größer wurde . markierter Es konnte mit dem Student's T-Test die Signifikanz ( $p=0,007$ ) des Effektes nachgewiesen werden.

Weiter fiel ein hoher Anteil nekrotischer Zellen von über 20% bei allen mit Kontrollvektoren oder E1A-Derivaten transfizierten BLM-Zellen auf. **Abbildung 4.11** Vergleich nekrotischer BLM-Zellen nach Transfektion ohne und mit Cisplatin (7,5 µg/ml; 24 h). Das Zytostatikum bewirkte die Nekrose von über 30% der Zellen. Die nekrotische Wirkung von E1A<sub>delCR2</sub> in Kombination mit Cisplatin unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle. Das Derivat E1A<sub>Spm2</sub> potenzierte die Cisplatinwirkung.

In den 4.12 bis 4.16 sind zu sehen (Vergrößerung 1:300) In der Blaufärbung erkennt man apoptotische Zellen durch ihre verdichtete, zum Teil geflockte und besonders intensiv gefärbte Kernregion. Dies sind Zeichen der Kondensation des Chromatins, welche im Verlauf der Apoptose einer Zelle stattfindet. Alle nekrotischen Zellen färben sich rot an, da der Farbstoff Propidiumjodid erst nach Schädigung der Zellmembran in die Zelle eindringen kann, was als Hinweis auf Nekrose gewertet wurde. **Abbildung 4.12** BLM-Zellen ohne und mit Cisplatin. Bei unbehandelten BLM-Zellen fanden sich nur sehr vereinzelt apoptotische oder nekrotische Zellen (obere Reihe). Cisplatin hat eine deutliche apoptoseinduzierende Potenz; es zeigten sich die typischen Apoptosezeichen in der Mikroskopie. Zusätzlich fand sich eine nekrotische Wirkung des Zytostatikums. **Abbildung 4.13** Mit dem Vektor pRc/RSV transfizierte BLM-Zellen ohne und mit Cisplatin. Die Transfektion des Vektorplasmids induzierte gering Apoptose bei deutlichen nekrotischen Anteilen. In Kombination mit Cisplatin zeigen sich reichlich apoptotische und auch nekrotische Zellen. **Abbildung 4.14** Mit dem Derivat E1A<sub>delCR2</sub> transfizierte BLM-Zellen ohne und mit Cisplatin. Nach Transfektion waren nur wenige Zellen apoptotisch bei deutlich nekrotischen Zellanteilen. Nach der Inkubation mit Cisplatin fand sich ein großer Anteil apoptotischer aber auch nekrotischer Zellen. **Abbildung 4.15** Mit dem Vektor pVP22 transfizierte BLM-Zellen ohne und mit Cisplatin. Die Apoptoseinduktion ohne Cisplatin war gering. Es fand sich ein Anteil nekrotischer Zellen. Durch Cisplatin wurde auch hier reichlich Apoptose induziert bei deutlichen nekrotischen Anteilen. **Abbildung 4.16** Mit dem Derivat E1A<sub>Spm2</sub> transfizierte BLM-Zellen ohne und mit Cisplatin. Nach Transfektion von E1A<sub>Spm2</sub> fanden sich nur einzelne apoptotische Zellen und ein deutlicher nekrotischer Anteil. Nach Cisplatininkubation wurde reichlich Apoptose induziert, der größte Anteil der Zellen war aber nekrotisch. Die Translationsprodukte von E1Awt können bei Tumorzellen Apoptose induzieren und sie für DNA schädigende Substanzen sensibilisieren (Mymryk, 1996). Da sie auch transformierende und immortalisierende Eigenschaften besitzen, wurden E1A Konstrukte entwickelt, die die onkogenen Fähigkeiten verloren hatten. Die Konstrukte wiesen dabei weiterhin die oben aufgeführten tumorsupprimierenden Eigenschaften auf (Dickopp, 2000). Wenig untersucht ist jedoch das quantitative Ausmaß der Apoptoseinduktion und die Relation von apoptotischer und nekrotischer Wirkung. Besonderes Interesse dieser Arbeit galt den zytostatikasensibilisierenden Eigenschaften der E1A-Konstrukte. Ziel war es, quantitative Ergebnisse zur Bewertung der antionkogenen Potenz zu finden. Unter dieser Fragestellung wurde

ein starker nekrotisierender Effekt vor allem des Konstrukts E1A<sub>sp2</sub> in Kombination mit Cisplatin festgestellt. Die meisten Erkenntnisse über antionkogene Eigenschaften von E1A stammen aus Untersuchungen von E1A stabil exprimierenden Zelllinien. In den vorgestellten Versuchen sollten Ergebnisse auf Basis der transienten Transfektion gewonnen werden, um eine Nähe zu *in vivo* und potentiellen klinischen Studien herzustellen. logiDabei wird Cisplatin. Es ert die DNA-Synthese. Doxorubicin ist ein Antibiotikum und gehört zur Gruppe der Antrazykline. Außer bei Karzinomen wird es auch gegen Hodgkin- und non-Hodgkin-Lymphome sowie Leukämien verwendet. Es interkaliert ebenfalls in DNA, kann die Topoisomerase II binden und hemmt die DNA-, RNA- und Proteinsynthese.

tink (siehe Abb. 4.1)

In klinischen Studien mit Bronchialzellkarzinomen werden pro Zyklus mittlere Cisplatinkonzentrationen von 100 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche oder entsprechend etwa 2,5 mg/kg Körpergewicht intravenös infundiert (vergleiche Fossella, 2003). Orientierend ergäbe sich bei gleicher Verteilung im gesamten Körper eine Konzentration von rund 2,5 µg/ml. Die oben genannten Tumorzelllinien zeigten *in vitro* eine deutlich höhere Toleranz gegenüber Cisplatin. Frisch et al. (1995) fanden für die Linien HT1080 (Fibrosarkom), A2058 (Melanom) und SAOS-2 (Osteosarkom) bei einer Inkubationszeit von 17 Stunden mit 20 µg/ml Cisplatin 75%, 20% und 80% Zellüberleben. Zhang et al. (2004) zeigten 60% Vitalität der Tumورlinie A549 bei 16 µg/ml Cisplatin über 48 Stunden. Die Untersuchungsergebnisse befanden sich also in einer vergleichbaren Größenordnung, wobei zu beachten ist, dass jede Tumорlinie ein eigenes Sensibilitätsverhalten zeigt. Die Ergebnisse von Dickopp (2000) mit Vitalitätsraten von 90% der Zelllinien BLM und H1299 unter 20 µg/ml Cisplatin über 28 Stunden konnten nicht bestätigt werden. Die verwendeten Zellen entstammten unterschiedlichen Chargen mit möglicherweise genetischen Variationen. Es ist bekannt, dass Malignomlinien ihr Resistenzverhalten gegenüber Zytostatika verändern können. Heim et al. (2000) selektierten unter ansteigenden Cisplatinkonzentrationen resistente Zelllinien, die eine bis 2,5fach höhere Resistenz aufwiesen.

Das oben besprochene Resistenzverhalten der Tumорlinien konnte wiederholt gezeigt werden. Zudem wurde in den weiterführenden Versuchen stets eine unbehandelte Kontrolle zur direkten Vergleichbarkeit mitgeführt. iehe nsondteressant, dressionsstärke von Plasmiden bei transienter Transfektion innerhalb 24 bis 48 Stunden ein Optimum erreicht (siehe Kap. 5.2) und dann die Konzentration des Genprodukts am größten ist. Es konnte für dieses Zeitfenster

also eine effektive zytotoxische Wirkung des Cisplatin nachgewiesen werden. se ist dies ein Grund für die geringere Wirkung.ier genetische Variationen die Ursache (siehe oben).enZytostatika (siehe Kap. 5.4) Aktivierung des Immunsystems. Yang et al. (1994) untersuchten einen E1-deletierten adenoviralen Virusvektor *in vivo* in Nacktmäusen und fanden eine Expression viraler Proteine vermutlich durch Transaktivierung zellulärer E1-ähnlicher Faktoren oder durch eine basale Aktivität adenoviraler Promotoren. Die Präsentation der viralen Proteine auf der Zelloberfläche führte zu einer spezifischen Immunreaktion gegen die modifizierten Zellen und zum Verlust der Genexpression. Zudem wurde ein Abfall der Expression in wiederholten Infektionen mit dem gleichen Virusvektor gefunden. Die immunologische Aktivierung stellt ein Risiko für den wiederholten und systemischen Einsatz dar. Für die liposomale Transfektion konnten gute Effizienzen *in vivo* gezeigt werden. Liu et al. (1995) untersuchten die systemische Expression von Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), indem sie Komplexe von CAT-Reportergen und kationischen Liposomen bei Nacktmäusen intravenös injizierten. Es konnten hohe CAT-Aktivitäten in den großen Organen nachgewiesen werden. Nach erneuter Transfektion bei den selben Mäusen wurden mindestens gleich hohe Expressionsergebnisse erreicht. Möglicherweise ist eine immunologische Aktivierung bei nichtviralen Transfektionen seltener. Abwehrreaktionen gegen das Transgenprodukt können natürlich weiterhin auftreten..alu5.2.2 Transfekt und Dospere<sup>®</sup> zeigte für die verwendeten Zelllinien nur niedrige Transfektionsraten und eine schwache Expression.Die DNA wiexprimie-ue am ehesten scheinlichkeit der zellulären und nukleämnen der Zellen und Kernkondensation als Hinweise auf apoptotische und nekrotische Vorgänge beobachtet.Es mußalso werden sich Bei Abnahme der Expressionsstärke konnte auch noch nach 7 bis 10 Tagen eine deutliche Fluoreszenz der Zellen gezeigt werden. Für die weiteren Untersuchungen sollte der Zeitraum optimaler Expression genutzt werden, um eiE1A-n.schrieben wurde (Dickopp, 2000). Die Lipofektion mit Genprodukte des Adenovirus 12E1Awt und entsprechend das Derivat E1A<sub>Spm2</sub> Die Expression von E1A<sub>delCR2</sub> wurde nicht untersucht. In weiteren Schritten sollte jedoch die Expression zum Beispiel mittels einer Sequenzanalyse bestätigt werden, was im Rahmen dieser medizinischen, zeitlich und finanziell begrenzten Arbeit nicht möglich war.Es ist bekannt, dass E1A wt und E1A-Derivate können einerseits



direkt antionkogene Effekte ausüben, andererseits Tumorzellen für Cisplatin und andere weitere Cytostatika/Zytostatika sensibilisieren können. Diese sensibilisierende Wirkung sollte nun unter Verwendung einer liposomalen transienten Transfektionsmethode gezeigt werden. Dazu wurden zum einen Vitalitätsassays durchgeführt, um den Einfluss auf die Gesamtzellvitalität zu beurteilen. In weiteren Schritten wurde die Induktion von Apoptose und der Anteil nekrotischer Zellen nach Transfektion der E1A-Derivate und Cisplatinbehandlung untersucht. In einem Vergleich der beiden Tests fanden Petty et al. (1995) eine gute Linearität bei der Detektion von unbehandelten Zellen für beide Verfahren. Allerdings wurde für den ATP-Assay eine höhere Sensitivität bei kleinen Zellmengen gefunden. Zudem können membrangeschädigte Zellen eine unverändert hohe mitochondriale Dehydrogenasenaktivität besitzen und die Vitalitätsergebnisse beeinflussen. Beide Testverfahren messen unspezifisch die Zellvitalität, lassen jedoch keinerlei Rückschlüsse auf apoptotische oder nekrotische Vorgänge zu. Die Ergebnisse sind daher auch nicht direkt mit denen aus den Apoptose- und Nekroseuntersuchungen vergleichbar.

Bei der Auswertung von ATP-Tests zeigten sich Vitalitätsverluste von rund 40% durch E1A<sub>wt</sub>, E1A<sub>delCR2</sub> und E1A<sub>Spm2</sub> aber auch durch die Kontrollvektoren pRc/RSV und pVP22. In Kombination mit Cisplatin ergaben sich Vitalitätsverluste von etwa 60% gleichermaßen für E1A<sub>wt</sub>, Konstrukte und Leervektoren. Ähnliche Ergebnisse brachte die Transfektion von BLM-Zellen und die Auswertung mit dem MTS-Test. Auch hier war der Vitalitätsverlust durch E1A mit und ohne Cisplatin im Bereich der Kontrollvektoren (siehe Kap. 4.3.1). In orientierenden Versuchen konnte keine Toxizität der Transfektionsreagenzien oder Liposomverbindungen gefunden werden (Ergebnisse hier nicht aufgeführt). Offensichtlich bewirkte die Transfektion der Vektoren starke Zellschädigungen und die Effekte von E1A<sub>wt</sub> und den Derivaten wurde dadurch überschrieben. Die Gründe hierfür sind unklar. Dickopp et al., 2000 hatten bei E1A stabil exprimierenden Zelllinien kaum Vektortoxizität beobachtet. Für weiterführende Untersuchungen mit Vitalitätsassays sollten die E1A-Konstrukte in andere, weniger toxische Vektoren umklontiert werden. In den Versuchen bei einem Drittel Apoptose und ebenfalls bei einem Drittel Nekrose. Dies Gegenüber zu einigen *in vitro* gezeigt werden, dass Cisplatin in Tumorzellen Apoptose induzieren kann (Review von Dempke, 2000). Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen Cisplatin gegenüber

den Zellen hießen, wodurch sowohl Apoptose als auch Nekrose Theorie, dass Cisplatin an die Zellkern-DNA bindet, die Transkription hemmt und die Apoptose der Zelle induziert, gibt es Hinweise für DNA-unabhängige Wirkungsmechanismen (Bose, 2002; Fuertes, 2003). So kann Cisplatin an Phospholipide der Zellmembran, an RNA und Proteine im Zytoplasma binden. In Abhängigkeit von der Cisplatinkonzentration und der metabolischen Situation der Zelle wurden Apoptose und Nekrose beobachtet. Welcher Mechanismus der entscheidende für den therapeutischen Einsatz in der Onkologie ist, bleibt zunächst Gegenstand weiterer Forschungen. Die Transfektion sowohl der E1A-Derivate als auch der Kontrollvektoren zeigte alleine eine relativ niedrige Induktion von Apoptose (<10%). Diese Ansätze enthielten aber einen untereinander etwa gleichstarken Anteil nekrotischer Zellen von über 20%. Vermutlich ist auch diese Vektortoxizität festzustellen (siehe oben). Die Auswertung der Apoptoseinduktion durch die E1A-Derivate und mit Cisplatin brachte unter Berücksichtigung der Standardabweichung und Signifikanzberechnung keine relevanten Unterschiede zu den Kontrollen. Der Vergleich der Nekroseanteile zeigte aber einen deutlichen Cisplatin-sensibilisierenden Effekt von dem Derivat E1A<sub>Spm2</sub>. Unter Cisplatin waren im Schnitt 72% der E1A<sub>Spm2</sub> exprimierenden BLM-Zellen aber nur 35% der Kontrolle nekrotisch. Die Signifikanz war  $p=0,007$ ... Erstmals wurde unter transienter Transfektion für E1A<sub>Spm2</sub> nachgewiesen, dass es in hohem Maße Zellen für das Cytostatikum Zytostatikum sensibilisieren kann. Dieser Synergismus kann zur Nekrose der Tumorzellen führen. Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da der Unterschied der Anteile nekrotischer Zellen zwischen dem E1A<sub>delCR2</sub>-Derivat und der Kontrolle unter Cisplatin erwiesen sich als nicht signifikant. Die hier vorgestellten Versuche zeigen, dass die Transfektion mit sensibilisierenden E1A-Konstrukten und Cisplatinbehandlung zu wesentlichen Anteilen zur Nekrose der Tumorzellen führen kann. Es besteht kein Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Vitalitätsassays, da die Propidiumjodidfärbung durch die frühzeitige differenzierte Detektion nekrotischer Membranschäden sensibler ist. Das Ergebnis ist besonders interessant, da vor allem Apoptose induzierende Eigenschaften von E1A beschrieben wurden (Sánchez-Prieto, 1996; Mymryk, 1996), dagegen bisher kaum aussagekräftige Untersuchungen zur E1A induzierten Nekrose durchgeführt wurden. Zur Apoptosedetektion werden zudem häufig qualitative Verfahren wie PARP-Spaltung oder DNA-Defragmentation verwendet. Pützer et al.

(2000) transfizierten jedoch p53-negative Tumorzellen mit E1A mittels Elektroporation. Sie zeigten mit dem quantitativen MTT-Test eine Vitalitätsminderung von 50% SK-OV3-Zellen nach 72 Stunden gegenüber der Kontrolle. In Analysen mit dem FACS wurde eine um das 8fache erhöhte Apoptoserate gegenüber den Leervektoren gefunden. Entsprechende Apoptoseraten von 40% der Zellen konnten in den hier vorstellten Versuchen nicht erreicht werden. Die Effektivität ist zelllinienabhängig, wie auch Pützer et al. demonstrieren, wenn sie um 10% apoptotische SAOS-2-Zellen und um 18% apoptotische H1299-Zellen nach Transfektion mit E1A finden. Zudem konnten sie eine Abhängigkeit der Effektivität von Zellkulturbedingungen wie der FCS-Konzentration zeigen.

**5.4 Ergebnisse erster klinischer Studien mit E1A**In verschiedenen Studien konnte das adenovirale Gen E1A umfangreich charakterisiert werden. Neben einem immortalisierenden und transformierenden Potential in Nagerzellen zeigten sich aber auch antionkogene Eigenschaften. Wie unter Kapitel 1.4 näher beschrieben wurde, kann E1A in Tumorzellen die Transformation, Tumorigenität und das Metastasierungspotential supprimieren, Apoptose induzieren und die Zellen gegenüber Zytostatika sensibilisieren. Auch konnten wichtige Funktionsabläufe aufgeklärt werden. Einzelne quantitative Untersuchungen zeigten eine effektive Apoptoseinduktion und Sensibilisierung gegenüber Zytostatika durch E1A *in vitro* (Sanchez-Prieto, 1996; Pützer, 2000). Darüber hinaus konnte eine vergleichbare Tumorsuppression für E1A-Konstrukte, die ihr onkogenes Potential verloren hatten, gefunden werden (Dickopp, 2000). Die vorliegende Arbeit gibt zudem Hinweise auf einen wesentlichen unspezifischen nekroseinduzierenden Effekt von E1A-Konstrukten, besonders in Kombination mit Zytostatika (siehe Kap. 5.3).

Inzwischen liegen erste Ergebnisse von klinischen Phase I- und II-Studien vor, und es stellt sich die Frage, ob die hohen Erwartungen einer effektiven Tumorsuppression *in vivo* erfüllt wurden. Eine amerikanische Forschergruppe führte klinische Phase I- und II-Studien mit einem an kationische Liposomen gebundenen E1A-Wildtyp (DCC-E1A) durch.

Nach intraperitonealer oder intrathorakaler Applikation von DCC-E1A in wiederholten Zyklen bei 6 Mammakarzinom- und 12 Ovarialkarzinompatienten wurde die Verträglichkeit, Transkription und biologische Aktivität untersucht (Hortobagyi, 2001). Alle Patienten hatten therapierefraktäre oder fernmetastasierte Tumoren. Es zeigten sich tolerierbare Nebenwirkungen bei Dosiswerten von 1,8 und 3,6 mg DNA/m<sup>2</sup> wie Übelkeit, Erbrechen und abdominelle oder thorakale Schmerzen. Werte von 7,2 mg DNA/m<sup>2</sup> wurden nicht mehr toleriert. Es wurde E1A-mRNA in Biopsien verschiedener Organe, in Tumorzellen und anderen Zellen nach peritonealer Lavage als Nachweis einer erfolgreichen Transkription gefunden. Außerdem wurde eine niedrigere Expression von Her-2/neu bei erhöhter TNF $\alpha$ -Konzentration festgestellt, was als indirekte antionkogene Wirkung gewertet wurde. Patienten mit gynäkologischen Tumoren, in denen eine Her-2/neu-Überexpression nachgewiesen wird, haben eine besonders schlechte Prognose (Slamon, 1989). Es wird dabei ein Zusammenhang zwischen einer Verminderung der Her-2/neu-Expression und dem antitumorigenen und antimetastatischen Potential von E1A in Ovarialkarzinomen vermutet (Yu, 1992). In den Untersuchungen zeigte sich weiterhin eine vermehrte Apoptose von E1A-exprimierenden Tumorzellen. Trotzdem hatten nur 3 Patienten keine Tumorprogression während des Untersuchungszeitraumes.

In einer Phase I-Studie mit intratumoraler Injektion von DCC-E1A bei 18 Patienten mit fortgeschrittenem Mammakarzinom oder Karzinomen der Kopf-Hals-Region wurde eine toxische Dosis nicht erreicht (Yoo, 2001). Es fanden sich bei DNA-Mengen zwischen 15 $\mu$ g DNA/cm und 120 $\mu$ g DNA/cm Tumordurchmesser nur milde Nebenwirkungen wie Schmerzen und Einblutung an der Einstichstelle. E1A-DNA konnte bei 14 von 15 Tumorbiopsien mittels PCR nachgewiesen werden, jedoch wurde keine mRNA- oder Proteinanalyse durchgeführt. Eine Suppression des Her-2/neu-Status durch E1A konnte für 2 von 5 Her-2/neu-überexprimierende Tumore gezeigt werden. Insgesamt hatten von 16 bewerteten Patienten 2 eine lokale Tumorverkleinerung, 8 unveränderte Tumorverhältnisse und 6 ein Fortschreiten der Erkrankung. Eine multizentrische Phase II-Studie mit intratumoraler Injektion von DCC-E1A bei 24 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zeigte eine gute Verträglichkeit von liposomal gebundenem E1A (Villaret, 2002). Jedoch konnte nur in 3

von 54 Proben E1A-mRNA nachgewiesen werden, aus den immunhistologischen Auswertungen auf E1A-Proteine ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse. Die Transfektionseffizienz war eher niedrig. Immerhin zeigte sich eine vollständige Rückbildung des Tumors bei 4,2%, eine über 50%ige Verkleinerung bei 8,3% und gleichbleibende Größe bei 29,2% der Patienten. Zum Vergleich können bei Patienten mit Rezidivkarzinomen des Halses mit einer systemischen Platinmonotherapie Remissionen von 11% bis 15% der Fälle und mit Zytostatikakombinationen zwischen 21% und 31% der Fälle erreicht werden (Petru, 2003). Beide Therapiekonzepte sind bei fortgeschrittenem Tumorleiden also effizienter als intratumorale Injektionen mit DCC-E1A in den beschriebenen Phase I/II-Studien.

Eine britische Forschergruppe um T. S. Ganesan untersuchte in einer multizentrischen Phase I-Studie bei 15 Patienten mit Her-2/neu-überexprimierenden Ovarialkarzinomen die Toxizität und biologische Aktivität von intraperitoneal appliziertem liposomal gebundenem E1A (Madhusudan, 2004). Dosiswerte von 1,8 und 3,6mg DNA/m<sup>2</sup> wurden gut toleriert. 4 von 8 Patienten hatten unter 7,2mg DNA/m<sup>2</sup> starke abdominelle Schmerzen und erhielten eine Dosisreduktion. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Fieber und abdominelle Schmerzen. In allen Tumoren war die PCR-Analyse auf E1A-mRNA als Nachweis einer erfolgreichen Transkription positiv. Eine Verminderung der Her-2/neu Expression konnte für 2 von 15 Patienten gezeigt werden. Trotz guter biologischer Aktivität nach liposomaler Transfektion konnte keine Tumorsuppression festgestellt werden. In klinischen Phase I- und II-Studien wurde das onkolytische Adenovirus Onyx-015 in fortgeschrittene, therapieresistente Karzinome der Kopf-Hals-Region injiziert (Kirn, 1998a, 1998b; Khuri, 2000). Onyx-015 ist ein Adenovirus der Gruppe C, bei welchem das E1B-Gen deletiert ist. E1B wird eine Schutzfunktion gegenüber vorzeitigem Zelltod nach Infektion zugeschrieben. Das Genprodukt von E1B supprimiert unter anderem die durch E1A induzierte Apoptose in humanen Zellen (White, 1995). Wahrscheinlich geht ein großer Teil der antionkogenen Eigenschaften von Onyx-015 auf die Funktion von E1A zurück. Eine durch Deletion von E1B postulierte Selektivität von Onyx-015 für p53-negative Tumorzellen konnte nicht bestätigt werden. Untersuchungen *in vitro* hatten einen zytopathischen Effekt des attenuierten Adenovirus gegen verschiedene Tumorlinien unabhängig von ihrem

p53-Status gezeigt. Zudem wurde eine Verstärkung des Effektes durch DNA-schädigende Substanzen gefunden (Heise, 1997). Die klinischen Studien ergaben eine gute Verträglichkeit von Onyx-015 mit tolerierbaren Nebenwirkungen wie Erkältungssymptomen, Einblutung und Schmerzen an der Einstichstelle.

In einer kontrollierten Phase II-Studie mit intratumoraler Injektion mit Onyx-015 und kombinierter intravenöser Chemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluorouracil bei 37 Patienten konnte in 63% eine lokale Tumorregression beobachtet werden (Khuri, 2000). Die mediane Überlebenszeit der Patienten betrug 10,5 Monate. Die Ergebnisse liegen somit im Bereich der Therapieerfolge mit herkömmlicher kombinierter Chemotherapie mit mittleren Überlebenszeiten von 7,3 bis 14,3 Monaten (Petru et al., 2003).

Onyx-015 ist ein replikationsfähiges Virus, bei dessen Einbringen in den Körper das menschliche Immunsystem aktiviert wird. Bei 62% der Patienten konnten neutralisierende Antikörper gegen das Virus nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser Immunreaktion ist noch ungeklärt. Onyx-015 ist ein seit langem unter der Bezeichnung dl1520 bekanntes Viruskonstrukt (Hall et al., 1998) und ein geschützter Produktname, hinter dem sicher hohe auch wirtschaftliche Erwartungen stehen. Es bleibt abzuwarten, welche Ergebnisse von unabhängigen Forschergruppen gefunden werden. Zusammenfassend war E1A in den aktuellen klinischen Studien gut verträglich und sicher in der Anwendung. Begleiterscheinungen wurden im Wesentlichen auf die lokale Applikation zurückgeführt, systemische Reaktionen auf die Expression des Produkts wurden nicht gefunden. Durch die Infektion mit dem Adenovirus Onyx-015 zeigte sich eine starke Immunaktivierung, dessen Bedeutung noch nicht eingeschätzt werden kann.

Eine effektive E1A-Expression und biologische Aktivität konnte sowohl durch Transfektion mit kationischen Liposomen als auch durch virale Infektion erreicht werden. Die berichtete Tumorsuppression durch Onyx-015 in Kombination mit Chemotherapie sollte kritisch betrachtet werden, da sie sich zum Teil auf unkonventionelle Bewertungskriterien stützt. So wurden nekrotische Tumoranteile in der Computertomographie subtrahiert und als Nachweis einer lytischen Viruswirkung gewertet, obwohl sich Nekrosen auch in nicht behandelten Karzinomen entwickeln. In den Studien mit liposomal transfiziertem E1A konnte

nur vereinzelt Tumorregression beobachtet werden. Insgesamt konnte bisher jedoch keine Studie eine signifikante Verbesserung des Tumorstadiums oder Verlängerung der Lebenserwartung durch eine zusätzliche Gentherapie mit E1A zeigen. Eine erfolgreiche Expression und Aktivität von E1A konnte nachgewiesen werden, möglicherweise kann E1A aber im komplexen biologischen System seine antionkogenen Eigenschaften nicht voll ausprägen. Alle vorklinischen *in vivo*-Versuche fanden an immuninkompetenten Nacktmäusen statt. Interaktionen mit dem menschlichen Immunsystem sind denkbar und insbesondere beim immunaktiven Adenovirus Onyx-015 zu erwarten. Neuere Untersuchungen mit Adenovirusvektoren der Gruppe B zeigen nach intravenöser Injektion bei Pavianen durch eine höhere Spezifität geringere Immunreaktionen und weniger endotheliale Schädigungen (Ni, 2005). Shao et al. (2000) konnten für E1A einen Bystander-Effekt nachweisen, wobei eine Suppression des Tumorwachstums, Hemmung der Angiogenese und Apoptoseinduktion nicht nur in E1A-exprimierenden sondern auch deren Nachbarzellen ohne E1A-Expression auftrat. Ein Teil dieser Wirkung ist möglicherweise auf ein Sekretionsprodukt der E1A-positiven Zellen zurückzuführen. Wahrscheinlich ist dieser Effekt klinisch nach intratumoraler Injektion oder peritonealer Applikation nicht ausreichend. Es gibt erste klinische Studien mit systemischen intravenösen Applikationsformen (Reid, 2002). Aufgrund unzureichender tumorsupprimierender Potenz in der Monotherapie werden sich am ehesten multimodale Konzepte durchsetzen. Eine sensibilisierende Wirkung von E1A für Cytostatika und Strahlentherapie konnte zumindest vorklinisch gezeigt werden (s. Kapitel 1.4.5). Durch Entwicklung und Standardisierung kombinierter Therapieverfahren in klinischen Studien lassen sich möglicherweise höhere Effizienzen erreichen (vergleiche Dobbstein, 2004). Zusätzlich sollten weitere spezifische E1A-Konstrukte und bessere Applikationsformen gefunden werden, um das entscheidende therapeutische Fenster zwischen effektiver Tumortoxizität und Schonung des normalen Gewebes zu nutzen.

#### 5.5 Ausblick

Die Versuchsreihen der hier vorgestellten Arbeit wurden in den Jahren 2000 und 2001 durchgeführt. Inzwischen zeigten klinische Phase I- und II-Studien eine gute Verträglichkeit, Sicherheit in der Anwendung und biologische Aktivität von E1A am Menschen, wenn auch eine entscheidende Tumorsuppression noch nicht nachgewiesen werden konnte. Zudem gewinnen E1A-Derivate mehr Aufmerksamkeit auf dem Wege einer sicheren Gentherapie.

Dieses Bestreben sollte durch die vorliegende Arbeit und weitere Versuchsreihen unterstützt werden. Aufgrund der beobachteten hohen Vektortoxizität sollten die Derivate zunächst in andere, weniger toxische Vektoren umkloniert und neue Versuche am gleichen Modellsystem durchgeführt werden. Hierfür sprechen die guten Erfahrungen mit den spezifischen Zellfärbemethoden, die eine quantitative Auswertung von Apoptose und Nekrose ermöglichen. Für E1A<sub>Spm2</sub> konnte die Cisplatin-sensibilisierende Wirkung gezeigt werden, die im Wesentlichen zu einem nekrotischen Zelluntergang führte. Die Mechanismen auf zellulärer Ebene dieses nekroseinduzierenden Effektes durch E1A sollten aufgeklärt werden. In der Literatur finden sich bisher vor allem Untersuchungen zellulärer Funktionsabläufe der Apoptoseinduktion durch E1A. Mit der Lipofektion konnte eine effektive transiente Transfektionsmethode für Karzinomzellen evaluiert werden. Diese sollte in weiterführenden *in vivo* Versuchsreihen dazu dienen, transformationsdefekte E1A-Derivate für die Tumorthherapie zu etablieren. So wäre die intratumorale Injektion oder systemische Applikation von E1A-Konstrukten bei der Maus in Kombination mit einer systemischen Chemotherapie vorstellbar.



**E1A ist ein adenovirales Gen, dessen transkribierte Proteine in die Wachstumssteuerung der Wirtszelle eingreifen und die Virusreplikation vorbereiten. E1A kann in Tumorzellen die Transformation, die Tumorigenität und das Metastasierungspotential supprimieren, Apoptose induzieren und diese für Zytostatika sensibilisieren. Daneben kann es jedoch auch Zellen transformieren und immortalisieren. Es wurden E1A-Derivate entwickelt, die einerseits die onkogenen Potenziale verloren haben, andererseits weiterhin antionkogene Eigenschaften besitzen. Für die Derivate E1A<sub>delCR2</sub> und E1A<sub>Spm2</sub> konnten diese Voraussetzungen nachgewiesen werden.**

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, zytostatikaresistente Tumorzellen durch transiente Transfektion mit transformationsdefekten E1A-Derivaten für die Behandlung mit Zytostatika zu sensibilisieren. Eine Induktion von Apoptose und Nekrose sollte quantifiziert werden.

Hierzu wurden zunächst Tumorzellen auf Resistenz gegenüber Cisplatin und Doxorubicin untersucht, verschiedene transiente Transfektionsmethoden hinsichtlich Transfektionseffizienz und Zellschädigung evaluiert und ein Modellsystem aufgestellt. Spezifische Zellfärbungen wurden zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen verwendet.

Es konnten BLM-Zellen mit E1A<sub>Spm2</sub> für Cisplatin sensibilisiert werden. Die kombinierte Behandlung mit Derivat und Zytostatikum führte im Wesentlichen zur Nekrose der Melanomzellen. Die Apoptoseinduktion durch die E1A-Konstrukte war dagegen gering. Dies ist besonders interessant, da in der Literatur vor allem der apoptoseinduzierende Effekt von E1A diskutiert wird, sich aber kaum quantitative Auswertungen finden.

Für E1A<sub>delCR2</sub> wurde keine signifikante zytostatikasensibilisierende Wirkung nachgewiesen. Die Ergebnisse aus den unspezifischen Vitalitätsassays ließen auf eine hohe Vektortoxizität schließen. Es sollten daher in weiterführenden Versuchen die Derivate in weniger schädigende Vektoren kloniert und die zellulären Mechanismen der Nekrose-induktion durch E1A untersucht werden. Die transiente Transfektion mit E1A könnte schließlich auch *in vivo* eingesetzt werden.

1. Barbeau, D.; Charbonneau, R.; Whalen, S. G.; Bayley, S. T. (1994): Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 9, 259-273.

Bernhard, E. J.; Hagner, B.; Wong, C.; Lubenski, I.; Muschel, R. J. (1995): The effect of E1A on MMP-9 expression and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 60, 718-724.

2. Bose, R. N. (2002): Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2, 103-111.

3. Boulakia, C. A.; Chen, G.; Ng, F. W. H.; Teodoro, J. G.; Branton, P. E.; Nicholson, D. W.; Poirier, G. G.; Shore, G. C. (1996): Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene* 12, 529-535.

Boyd, J. M.; Subramanian, T.; Schaeper, U.; La Regina, M.; Bayley, S.; Chinnadurai, G. (1993): A region in the C – terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J.* 12, 469-478.

4. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Braithwaite, A.; Nelson, C.; Skulimowski, A.; McGovern, J.; Pigott, D.; Jenkins, J. (1990): Transactivation of the p53 oncogene by E1a gene products. *Virology* 177, 595-605.

Brockmann, D.; Esche, H. (1995): Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 199, 81-112.

Chang, J. Y.; Xia, W.; Shao, R.; Sorgi, F.; Hortobagyi, G. N.; Huang, L.; Hung, M.-C. (1997): The tumor suppression activity of E1A in Her-2/neu – overexpressing breast cancer. *Oncogene* 14, 561-568.

5. Chatterjee, P. K.; Bruner, M.; Flint, S. J.; Harter, M. L. (1988): DNA-binding properties of an adenovirus 289R E1A protein. *EMBO J.* 7, 835-841.

Cheng, L.; Fu, J.; Tsukamoto, A.; Hawley, R. G. (1996): Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 14, 606-609.

Chiou, S. K.; Tseng, C. C.; Rao, L.; White, E. (1994): Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J. Virol.* 68, 6553-6566.

6. Cotter, T. G.; Martin, S. J. (1996): *Techniques in Apoptosis – A users guide*. London: Portland Press Ltd.

7. Debbas, M.; White, E. (1993): Wild-type p53 mediated apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 7, 546-554.

8. Demke, W.; Voigt, W.; Grothey, A.; Hill, B. T.; Schmoll, H.-J. (2000): Cisplatin resistance and oncogenes - a review. *Anti-Cancer Drugs* 11, 225-236.

9. Dickopp, A.; Esche, H.; Swart, G.; Seeber, S.; Kirch, H.-K.; Opalka, B. (1999): Transformation-defective adenovirus 5 E1A mutants exhibit antioncogenic properties in human BLM melanoma cells. *Cancer Gene Therapy* 7, 1043-1050. Dickopp, A. (2000): Evaluation der Tumorsuppressoraktivität transformationsdefekter Adenovirus-Serotyp 5 E1A-Mutanten. Inaugural-Dissertation an der Universität-Gesamthochschule Essen.

10. Diller, L.; Kassel, J.; Nelson, C. E.; Gryka, M. A.; Litwak, G.; Gebhardt, M.; Bressac, B. (1990): p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell Biol.* 10, 5772-5781.
11. Dive, C.; Gregory, C. D.; Phipps, D. J.; Evans, D. L.; Milner, A. E.; Wyllie, A. H. (1992): Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochem. Biophys. Acta* 1133(3), 275-285. Dobbelstein, M. (2004): Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273, 291-334. Douglas, J. L.; Gopalakrishnan, S.; Quinlan, M. P. (1991): Modulation of transformation of primary epithelial cells by the second exon of E1A gene. *Oncogene* 6, 2093-2103.
12. Fearnhead, H. O.; Rodriguez, J.; Govek, E.-E.; Guo, W.; Kobayashi, R.; Hannon, G.; Lazebnik, Y. A. (1998): Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13664-13669.
13. Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L. (1994): Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561.
14. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. (1987): Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417.
15. Ferguson, B.; Krippel, B.; Andrisani, O.; Jones, N.; Westphal, H.; Rosenberg, M. (1985): E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell Biol.* 5, 2653-2661.
16. Fossella, F.; Pereira, J.R.; von Pawel, J.; Pluzanska, A.; Gorbounova, V.; Kaukel, E.; Mattson, K.V.; Ramlau, R.; Szczesna, A.; Fidias, P. (2003): Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum

- combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J. Clin. Oncol.* 21, 3016–3024.
- Frisch, S. M. (1994): E1A induces the expression of epithelial characteristics. *J. Cell. Biol.* 127, 1085-1096.
- Frisch, S. M.; Dolter, K. E. (1995): Adenovirus E1A-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Res.* 55, 5551-5555.
17. Frisch, S. M.; Reich, R.; Collier, I. E.; Genrich, L. T.; Martin G.; Goldberg, G. I. (1990): Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene* 5, 75-83.
- Fuertesa, M.A.; Castillab, J.; Alonsoa, C.; Perez, J.M. (2003): Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr. Med. Chem.* 10(3), 257-266. Related Articles, Links
18. Gallimore, P. H.; Turnell, A. S. (2001): Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* 20, 7824-7835.
19. Gazdar, A. F.; Steinberg, S. M.; Russel, E. K.; Linnoila, R. I.; Oie, H. K.; Ghosh, B. C.; Coelingam, J. D.; Johnson, B. E.; Minna, J. D.; Ihde, D. C. (1990): Correlation of in vitro drug-sensitivity testing results with response to chemotherapy and survival in extensive-stage small cell lung cancer: a prospective clinical trial. *J. Nat. Cancer Inst.* 82, 117-124.
20. Ginsberg, D.; Michael-Michalovitz, D.; Oren, M. (1991): Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol. Cell Biol.* 11, 582-585.
21. Graham, F. L.; Smiley, J.; Russel, W. C.; Nairn, R. (1977): Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
22. Grand, R. J. A.; Ibrahim, A. P.; Taylor, A. M. R.; Milner, A. E.; Gregory, C. D.; Gallimore, P. H.; Turnell, A. S. (1998): Human cells arrest in S phase in

- response to Adenovirus 12 E1A. *Virology* 244, 330-342. Hall, A. R.; Dix, B. R.; O'Carroll, S. J.; Braithwaite, A. W. (1998): P53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat. Med.* 4, 1068-1072.
23. Harlow, E.; Lane, D. (1988): *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York, USA: CSH Laboratory Press.
24. Heim, M. M.; Eberhardt, W.; Seeber, S.; Müller, M. R. (2000): Differential modulation of chemosensitivity to alkylating agents and platinum compounds by DNA repair modulators in human lung cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126, 198-204.
25. Heise, C.; Sampson-Johannes, A.; Williams, A.; McCormick, F.; Von Hoff, D. D.; Kim, D. H. (1997): ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Medicine* 3, 639-645.
26. Hortobagyi, G. N.; Ueno, N. T.; Xia, W.; Zhang, S.; Wolf, J. K.; Putnam, J. B.; Weiden, P. L.; Willey, J. S.; Carey, M.; Branham, D. L.; Payne, J. Y.; Tucker, S. D.; Bartholomeusz, C.; Kilbourn, R. G.; De Jager, R. L.; Sneige, N.; Katz, R. L.; Anklesaria, P.; Ibrahim, N. K.; Murray, J. L.; Theriault, R. L.; Valero, V.; Gershenson, D. M.; Bevers, M. W.; Huang, L.; Lopez-Berestein, G.; Hung, M.-C. (2001): Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J. Clin. Oncol.* 19(14), 3422-3433. Karunagaran, D.; Tzahar, E.; Beerli, R. R.; Chen, X.; Graus-Porta, D.; Ratzkin, B. J.; Serger, R.; Hynes, N. E.; Yarden, Y. (1996): ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J.* 15, 254-264.
27. Kastan, M. B.; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig, R. W. (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.

28. Khuri, F. R.; Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Arseneau, J.; Tannock, I. F.; Romel, L.; Gore, M.; Ironside, J.; MacDougall, R. H.; Heise, C.; Randlev, B.; Gillenwater, A. M.; Brusco, P.; Kaye, S. B.; Hong, W. K.; Kirn, D. H. (2000): A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine* 6, 879-885.
29. Kimelman, D.; Miller, J. S.; Porter, D.; Roberts, B. E. (1985): Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *J. Virol.* 53, 399-409.
30. Kirn, D.; Hermiston, T.; McCormick, F. (1998a): ONYX-015: Clinical data are encouraging. *Nature Medicine* 4, 1342-1343. Kirn, D.; Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Posner, M.; Vokes, E.; Kuhn, J.; Heise, C.; Maack, C.; Kaye, S. (1998b): A phase II trial of intratumoral injection with an E1B-deleted adenovirus, ONYX-015, in patients with recurrent, refractory head and neck cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 391a.
31. Lewis, J. B.; Mathews, M. B. (1980): Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products. *Cell* 21, 303-313. Liao, Y.; Hung, M. C. (2003): Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6836-6848. Lillie, J. W.; Loewenstein, P. M.; Green, M. R.; Green, M. (1987): Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins. *Cell* 50, 1091-1100.
- Linder, S.; Popowicz, P.; Svensson, C.; Marshall, H.; Bondesson, M.; Akusjarvi, G. (1992): Enhanced invasive properties of rat embryo fibroblasts transformed by adenovirus E1A mutants with deletions in the carboxy-terminal exon. *Oncogene* 7, 439-443.
32. Liu, Y.; Liggitt, D.; Zhong, W.; Tu, G.; Gaensler, K.; Debs, R. (1995): Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.* 270, 24864-24870.

33. Lowe, S. W.; Ruley, H. E.; Jacks, T.; Housman, D. E. (1993): p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967.

34. Lynch, M. J.; Trainer, D. L. (1989): immortalization of primary baby rat kidney cells by retroviral mediated gene transfer of adenovirus E1A genes. *Cancer Research* 49, 5429-5434.

Madhusudan, S.; Tamir, A.; Bates, N.; Flanagan, E.; Gore, M. E.; Barton, D. P. J.; Harper, P.; Seckl, M.; Thomas, H.; Lemoine, N. R.; Charnock, M.; Habib, N. A.; Lechler, R.; Nicholls, J.; Pignatelli, M.; Ganesan, T. S. (2004): A multicenter phase I gene therapy clinical trial involving intraperitoneal administration of E1A-lipid complex in patients with recurrent epithelial ovarian cancer overexpressing HER-2/neu oncogene. *Clinical Cancer Research* 10, 2986-2996.

Martinez, J.; Georgoff, I.; Levine, A. J. (1991): Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev.* 5, 151-159.

35. Mymryk, J. S. (1996): Tumor suppressive properties of the adenovirus 5 E1A oncogene. *Oncogene* 13, 1581-1589.

36. Nevins, J. R. (1981): Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* 26, 213-220.

37. Nguyen, M.; Branton, P. E.; Roy, S.; Nicholson, D. W.; Alnemri, E. S.; Yeh, W.-C.; Mak, T. W.; Shore, G. C. (1998): E1A-induced processing of procaspase-8 can occur independently of FADD and is inhibited by Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 273, 33099-33102.

38. Ni, S.; Bernt, K.; Gaggar, A.; Li, Z. Y.; Kiem, H. P.; Lieber, A. (2005): Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons. *Hum. Gene Ther.* 6, 664-677.

Offringa, R.; Smits, A. M. M.; Houweling, A.; Bos, J. L.; van der Eb, A. J. (1988): Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid



- hormones on the expression of the metalloproteinase stromelysin. *Nucleic Acids Res.* 16, 10973-10984.
39. Pérez-Martin, J. M.; Requena, J. M.; Craciunescu, D.; López, M. C.; Alonso, C. (1993): The anti z-dna reactivity of z-dna forming sequences is affected by platinum antitumor drugs. *J. Biol. Chem.* 268, 24774-24778. Petru, E.; Benedicic, C.; Seewann, A.; Pickel, H (2003): Palliative cytostatic treatment of cervical carcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 24, 473-474.
40. Petty, R. D.; Sutherland, L. A.; Hunter, E. M.; Cree, I. A. (1995): Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin. Chemilumin.* 10, 29-34. Pützer, B. M.; Stiewe, T.; Parassanedjad, K.; Rega, S.; Esche, H. (2000): E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. *Cell Death and Differentiation* 7, 177-188. Reid, T.; Warren, R.; Kirn, D. (2002): Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther.* 12, 979-986. Ruley, H. E. (1983): Adenovirus region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602-606.
41. Rumpf, H.; Esche, H.; Kirch, H.-C. (1999): Two domains within the adenovirus type 12 E1A unique spacer have disparate effects on the interaction of E1A with p105-Rb and the transformation of primary mouse cells. *Virology* 257, 45-53.
42. Sánchez-Prieto, R.; Leonart, M.; Ramón y Cajal, S. (1995): Lack of correlation between p53 protein level and sensitivity to DNA-damaging agents in keratinocytes carrying adenovirus E1A mutants. *Oncogene* 11, 675-682.
43. Sánchez-Prieto, R.; Vargas, J. A.; Carnero, A.; Marchetti, E.; Romero, J.; Durantez, A.; Lacal, J. C.; Ramón y Cajal, S. (1995): Modulation of cellular chemoresistance in keratinocytes by activation of different oncogenes. *Int. J. Cancer* 60, 235-243.

44. Sánchez-Prieto, R.; Quintanilla, M.; Cano, A.; Lleonart, M.; Martín, P.; Anaya, A.; Ramón y Cajal, S. (1996): Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* **13**, 1083-1092. Shao, R.; Xia, W.; Hung, M. C. (2000): Inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis are involved in E1A-mediated bystander effect and tumor suppression. *Cancer Res.* **15**, 3123-3126. Slamon, D. J.; Godolphin, W.; Jones, L. A. (1989): Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712.
45. Stanelle, J.; Stiewe, T.; Theseling, C. C.; Peter, M.; Putzer, B. M. (2002): Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* **30(8)**, 1859-1867.
- Subramanian, T.; La Regina, M.; Chinnadurai, G. (1989): Enhanced ras oncogene mediated cell transformation and tumorigenesis by adenovirus 2 mutants lacking the C-terminal region of E1a protein. *Oncogene* **4**, 415-420.
46. Takahashi, T.; Carbone, D.; Nau, M. M.; Hida, T.; Limmoila, I.; Veda, R.; Minna, J. D. (1992): Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res.* **52**, 2340-2343.
- Takeichi, M. (1993): Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 806-811.
47. Telling, G. C.; Williams, J. (1994): Constructing chimeric type 12/type 5 adenovirus E1A genes and using them to identify an oncogenic determinant of adenovirus type 12. *J. Virol.* **68**, 877-887.
48. Twentyman, P. R.; Wright, K. A.; Rhodes, T. (1991): Radiation response of human lung cancer cells with inherent and acquired resistance to cisplatin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **20**, 217-220.
49. Ueno, N. T.; Hung, M.-C.; Weiden, P.; Daifuku, R.; Kilbourn, R. G.; Zhang, S.; Xia, W.; Willey, J. S.; Warner, D. L.; Payne, J. Y.; Nandagiri, R.; Aldridge, R.; Carey, M.; Lincoln, S. T.; Aboulafia, D.; De Jager, R. L.; Tucker, S. D.; Putnam, J. B.; Sneige, N.; Katz, R. L.; Spohn, W. H.; Bast,

- R. C.; Holmes, F. A.; Ibrahim, N. K.; Murray, J. L.; Theriault, R. L.; Rahman, Z. U.; Valero, V.; Kudelka, A. P.; Kavanagh, J. J.; Freedman, R. S.; Wolf, J. K.; Gershenson, D. M.; Bevers, M. W.; Huang, L.; Lopez-Berestein, G.; Hortobagyi, G. (1998): Phase I E1A gene therapy in patients with advanced breast and ovarian cancers. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 17, 432a.
50. Van Groningen, J. J. M.; Cornelissen, I. M. A. H.; van Muijen, G. N. P.; Bloemerts, H. P. J.; Swart, G. W. M. (1996): Simultaneous suppression of progression marker genes in the highly malignant human melanoma cell line BLM after transfection with the adenovirus-5 E1A gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 225, 808-816.
51. Van Muijen, G. N.; Cornelissen, L. M.; Jansen, C. F.; Figdor, C. G.; Johnson, J. P.; Brocker, E. B.; Ruiter, D. J. (1991): Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cell xenografted into nude mice. *Clin. Exp. Metastasis* 9, 259-272.
- Van Ormondt, H.; Maat, J.; Dijkema, R. (1980): Comparison of nucleotide sequences of the early E1a regions for subgroups A, B and C of human adenoviruses. *Gene* 12, 63-76.
52. Villaret, D.; Glisson, B.; Kenady, D.; Hanna, E.; Carey, M.; Gleich, L.; Yoo, G. H.; Futran, N.; Hung, M.-C.; Anklesaria, P.; Heald, A. E. (2002): A multicenter phase II study of tgDCC-E1A for the intratumoral treatment of patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 24, 661-669.
- White, E. (1995): Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 199, 33-58.
53. Williams, J.; Williams, M.; Liu, C.; Telling, G. (1995): Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 199, 149-175.
54. Yang, Y.; Nunes, F. A.; Berencsi, K.; Furth, E. E.; Gönczöl, E.; Wilson, J. M. (1994): Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4407-4411.

55. Yoo, G. H.; Hung, M.-C.; Lopez-Berestein, G.; LaFollette, S.; Ensley, J. F.; Carey, M.; Batson, E.; Reynolds, T. C.; Murray, J. L. (2001): Phase I trial of intratumoral liposome E1A gene therapy in patients with recurrent breast and head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 1237-1245.
56. Yu, D.; Hamada, J.; Zhang, H. (1992): Mechanisms of c-erbB2/neu oncogene-induced metastasis and repression of metastatic properties by adenovirus 5 E1A gene products. *Oncogene* 7, 2263-2270.
57. Yu, D.; Matin, A.; Hinds, P. W.; Hung, M. C. (1994): Transcriptional regulation of neu by RB and E1A in Rat-1 cells. *Cell Growth Differ.* 5, 431-438.
58. Yu, D. H.; Scorsone, K.; Hung, M. C. (1991): Adenovirus type 5 E1A gene products act as transformation suppressors of the neu oncogene. *Mol. Cell Biol.* 11, 1745-1750.
59. Yu, D.; Suen, T.-C.; Yan, D.-H.; Chang, L.-S.; Hung, M.-C. (1990): Transcriptional repression of the neu protooncogene by the adenovirus 5 E1A gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4499-4503.8

## Laufbahn 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Helmut Esche danke ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit, die zur Verfügung gestellten Ressourcen und Diskussionsbereitschaft.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Christoph Kirch und Herrn Prof. Dr. Bertram Opalka für die kontinuierliche Betreuung und liebevolle Unterstützung während meiner Arbeit, die zahlreichen Anregungen und konstruktiven Diskussionen bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Achim Sternberg für die technische Unterweisung und die gute Arbeitsatmosphäre im Labor. Auch allen Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen gilt mein Dank für die ständige Ansprechbarkeit und die vielen wertvollen Hinweise.

Meiner Freundin Nicole danke ich herzlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die liebe Motivation.

Meinen Eltern danke ich besonders für die immerwährende Unterstützung, stete Zusprache und erfahrene Begleitung.