

Aus der Medizinischen Universitäts- und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin I  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

**Effizienzsteigerung  
der therapeutischen Suizidgentherapie  
durch Kopplung mit  
Zellpermeabilität-vermittelnden Motiven**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Claudia Irene Wolf  
aus Freudenstadt

2008

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. M. Lauer

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Lemken, M. L., F. Graepler, C. Wolf, W. A. Wybranietz, I. Smirnow, U. Schmidt, M. Gregor, M. Bitzer, and U. M. Lauer. 2007. Fusion of HSV-1 VP22 to a bifunctional chimeric SuperCD suicide gene compensates for low suicide gene transduction efficiencies. *Int J Oncol.* 2007; 30:1153-1161.
2. Lemken, M. L., C. Wolf, W. A. Wybranietz, U. Schmidt, I. Smirnow, H. J. Bühring, A. F. Mack, U. M. Lauer, and M. Bitzer. 2007. Evidence for the presence of intercellular trafficking of VP22 in living cells. *Mol. Ther.* 2007; 15:310-319.

1.	Einleitung .....	4
1.1.	Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) .....	4
1.2.	Therapeutische Optionen des HCC .....	5
1.3.	Genherapie und Gentransfersysteme .....	8
1.4.	Suizidgenherapie .....	9
1.5.	Zellpermeabilität-vermittelnde Motive .....	11
1.5.1.	<i>Translocation Motif (TLM)</i> .....	13
1.5.2.	<i>VP22</i> .....	14
1.6.	Zielsetzung der Arbeit .....	16
2.	Material und Methoden.....	17
2.1.	Allgemeines.....	17
2.2.	Zellbiologische Materialien und Methoden .....	17
2.2.1.	Verwendete Zelllinien .....	17
2.2.2.	Zellkultur.....	19
2.2.2.1.	Allgemeines.....	19
2.2.2.2.	Material für allgemeine Zellkultur .....	19
2.2.2.3.	Auftauen von Zellen .....	20
2.2.2.4.	Zellpassage.....	21
2.2.2.5.	Cryokonservierung von Zellen.....	22
2.2.2.6.	Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer.....	23
2.2.3.	Transfektion eukaryotischer Zellen .....	24
2.2.3.1.	Lipofektion mit FuGENE 6.....	25
2.2.4.	rt-PCR (reverse Polymerase-Ketten-Reaktion) .....	30
2.2.4.1.	Isolierung von RNA .....	30
2.2.4.2.	rt-PCR-Reaktion .....	32
2.2.4.3.	Gelelektrophorese.....	37
2.3.	Virologische Materialien und Methoden .....	38
2.3.1.	Adenoviren .....	38
2.3.1.1.	Replikationsdefiziente Adenoviren .....	39
2.3.2.	Transduktion von adhärenenten Zellen mit rekombinanten Adenoviren ..	40
2.4.	Proteinchemische Materialien und Methoden .....	42
2.4.1.	Zellaufschluss .....	42

2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	43
2.4.2.1. Gießen des Gels .....	45
2.4.2.2. Gel-Lauf .....	47
2.4.3. Western Blotting .....	47
2.4.3.1. Blotting .....	48
2.4.4. ECL-Detektionssystem .....	49
2.5. Proliferationstest: SRB-Cytotoxizitätsassays .....	53
2.6. Immunologische Materialien und Methoden .....	57
2.6.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	57
2.6.2. Direkte Immunfluoreszenzfärbung .....	60
2.7. statistische Analyse .....	61
3. Ergebnisse .....	62
3.1. Nachweis auf Proteinebene – die Westernblotanalyse .....	62
3.1.1. Nachweis von <i>TLM</i> -SCD und SCD- <i>TLM</i> .....	62
3.1.2. Nachweis von <i>VP22</i> -SCD und SCD- <i>VP22</i> .....	64
3.2. Nachweis der mRNA – die rt-PCR .....	68
3.3. Nachweis des <i>Bystander</i> -Effektes ( <i>Spread</i> ) .....	70
3.3.1. Direkte Immunfluoreszenz .....	71
3.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz .....	75
3.4. Nachweis der Funktionalität – der Cytotoxizitätsassay .....	79
3.4.1. Transfektion mit Plasmiden .....	80
3.4.2. Transduktion mit adenoviralen Vektoren .....	86
3.4.2.1. Nachweis von <i>TLM</i> -SCD und SCD- <i>TLM</i> .....	86
3.4.2.2. Nachweis von <i>VP22</i> -SCD und SCD- <i>VP22</i> .....	91
4. Diskussion .....	97
4.1. Das <i>Translocation Motif TLM</i> als Fusionspartner .....	98
4.1.1. Nachweis auf Proteinebene .....	98
4.1.2. Nachweis des <i>Spread</i> .....	99
4.1.3. Nachweis der Funktionalität .....	100
4.2. <i>VP22</i> als Fusionspartner .....	103
4.2.1. Nachweis auf Proteinebene .....	103
4.2.2. Nachweis des <i>Spread</i> .....	104

4.2.2.1. Direkter Nachweis der <i>VP22</i> -Fusionsproteine.....	104
4.2.2.2. Indirekter Nachweis der <i>VP22</i> -Fusionsproteine .....	105
4.2.3. Nachweis der Funktionalität .....	105
4.3. Ausblick.....	107
5. Zusammenfassung.....	108
6. Anhang.....	110
6.1. Literaturverzeichnis .....	110
6.2. Abkürzungsverzeichnis .....	116
6.3. Firmenverzeichnis .....	118

# 1. Einleitung

## 1.1. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt zu den primär malignen Lebertumoren. Es wächst lange klinisch unauffällig, ist aber, wenn es Symptome zeigt, aufgrund des dann meist weit fortgeschrittenen Tumorstadiums nur schwer zu behandeln [40,70].

In Europa und den USA kommt das HCC mit einer Inzidenz von 5:100 000 Einwohner pro Jahr relativ selten vor. In den Tropen dagegen ist es das häufigste Malignom bei Männern mit einer Inzidenz bis zu 150:100 000 Einwohner pro Jahr [40,70].

Die Ätiologie ist vielfältig. In 80 % der Fälle entsteht das hepatozelluläre Karzinom aufgrund einer Leberzirrhose jeder Genese. Das größte HCC-Risiko haben Zirrhosepatienten auf dem Boden einer Hämochromatose, einer chronischen Hepatitis B oder C. Ein mittleres Risiko, ein HCC zu entwickeln, haben Patienten mit einer alkoholinduzierten Leberzirrhose,  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel oder Autoimmunhepatitis. Dagegen nur ein niedriges Risiko besteht für Patienten, die an *M. Wilson* erkrankt sind, die an einer primär biliären Zirrhose oder an einer primär sklerosierenden Cholangitis leiden. Seltene Ursachen eines HCC sind eine chronische Intoxikation mit dem *Aflatoxin B<sub>1</sub>* des Pilzes *Aspergillus flavus*, der bei feuchtem Klima auf Getreide und Nüssen wächst [40,70].

Die molekulare Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms ist nicht vollständig geklärt. Es wird postuliert, dass äußere Noxen, wie z.B. Alkoholabusus oder eine Hepatitis B Virus Infektion zu einer chronischen Entzündung führen. Diese wird von einer chronischen Gewebeschädigung und einem sukzessivem Leberumbau begleitet. Die Entzündung kann schließlich zu einer Zirrhoseentwicklung führen und endet häufig im Stadium des HCC. Der Grund dafür ist u. a. die Anhäufung von genetischen Alterationen, die zu einer Dysregulation von molekularen Signalketten und somit zur Störung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der genomischen Stabilität führen.

Dies hat zur Konsequenz, dass DNA und Zellproteine oxidativ geschädigt werden [8].

Verschiedene Genmutationen werden mit dem HCC assoziiert. Dazu zählen Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen, im MET Protoonkogen sowie im beta-1 Cateningen (CTNNB1) [62]. Liegen diese Mutationen vor, besteht eine genetische Disposition zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms.

Die Prognose des unbehandelten HCC ist schlecht, die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt nur ca. 4-6 Monate [40,65]. Leider konnte trotz verschiedener Therapieansätze die Überlebenszeit der Patienten in den letzten 30 Jahren nicht verbessert werden [12]. Eine möglichst frühe Diagnose des HCC ist deshalb wichtig, weil nur dann eine effektive Behandlung (z. B. mittels Lebertransplantation) durchgeführt und damit eine Heilung herbeigeführt bzw. die Überlebenszeit verlängert werden kann [9]. Das Tumorwachstum des hepatozellulären Karzinoms ist initial häufig langsam und klinisch lange inapparent, so dass der Tumor meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird [40,70]. Nur etwa 20 % der Fälle mit hepatozellulärem Karzinom sind bei Diagnosestellung noch kurativ, weil operativ resektabel [65].

## **1.2. Therapeutische Optionen des HCC**

Die therapeutischen Optionen zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms kann man in fünf Kategorien einteilen [12]: chirurgische, perkutane und transarterielle Interventionen sowie Bestrahlungs- und Chemotherapie.

Die chirurgischen Interventionen beinhalten die bisher kurativen Therapieansätze: die Leberteilresektion und die Lebertransplantation [12]. Solitäre Tumorherde kann man in ausgewählten Fällen mit einer Leberteilresektion behandeln. Bei multilokulärem Vorkommen und Fehlen von Metastasen ist die Hepatektomie mit orthotoper Lebertransplantation die Methode der Wahl [40]. Heterotope Rezidive kommen nach Resektion in 20-50 % der Fälle vor. Für die Lebertransplantation kommen gemäß den sog. Milano-Kriterien nur einzelne Tumore kleiner als 5 cm oder bis zu drei Herde mit jeweils bis zu 3 cm

Durchmesser in Frage. In Deutschland wie in vielen anderen Ländern gibt es allerdings viel zu wenig Spenderorgane, so dass die Patienten, die für eine Transplantation in Frage kämen, häufig zu lange auf ein Organ warten müssen. Steht dann ein Organ zur Verfügung, ist der Tumor meist progredient gewachsen und erfüllt die Indikation für eine Lebertransplantation nicht mehr [65].

Nur bei einer Minderheit der Patienten mit HCC ist eine chirurgische Intervention indiziert. Deshalb müssen in den meisten Fällen andere therapeutische Optionen herangezogen werden [9].

Die systemische Chemotherapie als weitere therapeutische Option führt zu keinem relevanten antitumoralen Effekt oder einer Verlängerung des Überlebens bei HCC-Patienten, was u. a. auf eine deutlich erhöhte Expression des sog. Multidrug resistant (MDR) Transporters zurückgeführt werden kann [9]. Deshalb kann bislang kein Chemotherapeutikum außerhalb klinischer Studien zur Therapie empfohlen werden [12].

Die Radiotherapie spielt bislang ebenso wie auch die Chemotherapie eine untergeordnete Rolle in der Therapie des hepatozellulären Karzinoms [12].

Die anderen therapeutischen Optionen werden vor allem palliativ angewandt [9,40,65,70]. Hierzu gehören die perkutane und die transarterielle Intervention.

Die perkutanen Möglichkeiten der Therapie eignen sich besonders für kleine nicht resektable HCC. Dazu zählen die perkutane Alkoholinjektion in den Tumor (PAI) und die Radiofrequenzablation (RFA) [12].

Für die perkutane Alkoholinjektion kommen in der Regel nur HCC Herde kleiner als 3 cm in Frage. Der Alkohol wird durch ultraschallgesteuerte Injektion in den Tumor gebracht und führt dort zu einer Koagulationsnekrose. Die 5-Jahres-Überlebensrate in der Behandlung von Tumoren kleiner 3 cm liegt bei 50 % [12]. Das Problem dieser Methode ist, dass viel zu selten eine komplette Nekrotisierung des Tumorherdes erreicht wird und somit keine vollständige Abtötung der Tumorzellen [54].

Die Radiofrequenzablation ist die am häufigsten angewandte minimal invasive Tumorthherapie beim HCC und eine Alternative zur PAI. Dabei wird die in HCC Herde applizierte elektrische Energie in Wärmeenergie umgewandelt wodurch

eine Nekrose des HCC Herdes induziert wird. Nach lokaler Anästhesie wird eine Sonde in den Tumor eingebracht und ein Wechselstrom von 500 kHz angelegt. Somit fließt zwischen der Sonde und einer Neutralelektrode, die auf die Haut aufgebracht wird, Strom. Die Indikation zur RFA ist eng: der Tumor darf in der Regel nicht größer als 3 cm sein und es darf keine Metastasierung vorliegen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 30-40 % [12].

Zu den transarteriellen Interventionen gehört die transarterielle Chemoembolisation (TACE). Bei der Embolisation nutzt man die Tatsache, dass ein hepatozelluläres Karzinom zu 90 % arteriell mit Sauerstoff und Nährstoffen über Äste der Leberarterie (Arteria hepatica) versorgt wird. Normales Leberparenchym dagegen wird zum Großteil über die Pfortader und nur zu geringen Teilen über die Äste der Arteria hepatica versorgt [40]. Man wendet die TACE bei intrahepatisch fortgeschrittenen Tumorherden an. Dabei wird ein Zytostatikum über einen in die Leistenarterie (Arteria iliaca) eingebrachten und bis zur Arteria hepatica vorgeschobenen Katheter injiziert. Es erfolgt die Embolisation der Tumorgefäße mit einem Embolisat (Lipiodol). Dies führt zu einer Ischämie und Zellnekrose. Der Vorteil der Methode liegt in der lokalen Wirkung des Zytostatikums; damit treten nur in seltenen Fällen systemische Nebenwirkungen auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate kann mit dieser Therapie bei ausgewählten Patienten-Kollektiven gesteigert werden; aufgrund einer z. T. hohen Rezidivrate ist diese Methode allerdings in der Regel als eine palliative Maßnahme anzusehen [61].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die therapeutischen Optionen bislang nicht ausreichend sind, um die Morbidität und Mortalität des HCC entscheidend zu senken. Deshalb wird seit längerer Zeit nach neuen therapeutischen Möglichkeiten gesucht [12]. Einen dieser Ansätze stellt die Gentherapie dar.

### **1.3. Gentherapie und Gentransfersysteme**

Die Gentherapie ist definiert als der Versuch, eine genetische Krankheit durch das Einschleusen eines Gens in den Körper zu heilen. Dabei unterscheidet man die somatische Gentherapie an Körperzellen von der Keimbahntherapie, bei der Keimzellen gezielt genetisch verändert werden. Die Keimbahntherapie ist in Deutschland gesetzlich verboten [1,2].

Um Gene in Zielzellen einschleusen zu können, stehen eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Für diesen Gentransfer verwendet man für Prokaryoten die Methoden der Konjugation, Transduktion oder Transformation. Die Konjugation beschreibt die Übertragung von Teilen eines Genoms von einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle mittels Zellkontakten (*gap junctions*). Die Transduktion ist die Genübertragung durch Viren; unter Transformation versteht man die Aufnahme unverpackter DNA in Bakterien [1,2].

Häufig verwendete Viren, die als Genfähren dienen, sind Retro- oder Adenoviren. Adenoviren stellen lineare doppelsträngige DNA-Viren mit Hüll- und Kapsidproteinen dar. Durch Deletion von Teilen des Virusgenoms und Insertion der gewünschten therapeutisch wirksamen Sequenz, die unter die Regulation eines konstitutiven Viruspromotors gestellt wird, wird das Virus zu einem replikationsdefizienten Vektor umgebaut. Um in eukaryote Zellen zu gelangen, tritt das Adenovirus mit Coxsackie-Adenovirus-Rezeptoren (CAR) auf der Zelloberfläche in Wechselwirkung und wird nach dieser Interaktion von der Zielzelle mittels Endosomen aufgenommen. Aus den Endosomen gelangt es in das Cytosol, von wo aus die Vektor-DNA den Zellkern erreicht, indem diese, ohne in das Wirtsgenom integriert zu werden, zur Expression des therapeutisch wirksamen Fremdgens führt [56].

Die erste Gentherapie wurde 1990 an einem Patienten mit Adenosin-desaminase-Mangel durchgeführt. Inzwischen gibt es mehrere Bereiche, in denen die Gentherapie Einzug findet, insbesondere im Bereich der Tumorthherapie [56].

Die somatische Gentherapie bietet einen innovativen Ansatz zur Heilung schwer behandelbarer Krebsformen wie des hepatozellulären Karzinoms [48,49,84,88].

Hierfür sind einige Fragen von entscheidender Bedeutung. Dazu gehören Fragen nach der geeigneten Zielzelle, des optimalen Vektors für den Gentransfer, der Zellspezifität, der Expression des zu übertragenden Gens in der Zielzelle sowie der Sicherheit dieser Verfahren.

## 1.4. Suizidgentherapie

Einen Zweig der somatischen Tumor-Gentherapie stellt die Suizidgentherapie dar. Sie beruht auf einer selektiven Abtötung der Tumorzellen durch Erzeugung toxischer Metabolite [48,49,63,84,88]. Dabei werden sog. Suizidgene, die in Säugetierzellen nicht vorkommen, Vektor-vermittelt in Tumorzellen eingebracht. Nachfolgend wird eine ungiftige Substanz, die sogenannte *Prodrug*, systemisch appliziert, die im Rahmen einer enzymatischen Reaktion spezifisch durch das Suizidgen-Produkt in einen toxischen Metaboliten umgewandelt wird. Dies führt zum Zelluntergang transduzierter Tumorzellen. Darüber hinaus werden aber auch umgebende, primär nicht transduzierte Tumorzellen über einen Transport des toxifizierten Stoffes in die Nachbarzellen (*Bystander-Effekt*) abgetötet. Der *Bystander-Effekt* wird über einfache Diffusion oder über Zell-Zellkommunikation (*gap junction*) vermittelt [22]. Entscheidend für die antitumorale Wirkung des Suizidgenes im Zielorgan sind die Transduktionsrate, die Dauer und Höhe der Expression des Suizidgens und die Menge an erzeugtem toxischem Metaboliten.

Ein typisches Suizidgen stellt die *Cytosindesaminase* (CD) dar. Sie kommt in einer Vielzahl von Bakterien und Pilzen vor, nicht jedoch in Säugetieren [7]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die *Cytosindesaminase* aus *Saccharomyces cerevisiae* (YCD = Yeast CD) im Vergleich zur CD aus *Escherichia coli* (BCD = bakterielle CD) einen wesentlich stärkeren Suizidgeneffekt vermittelt [45]. CD katalysiert die Umwandlung der nicht-toxischen *Prodrug* 5-Fluorcytosin (5-FC) zu 5-Fluoruracil (5-FU). 5-FU wird nachfolgend in die aktiven

cytotoxischen Metaboliten *5-Fluoruraciltriphosphat* (5-FUTP) oder *5-Fluor-desoxymonophosphat* (5-FdUMP) umgewandelt. Diese Reaktion ist in Abbildung 1 dargestellt.

Ein Fusionsgen aus dem YCD Suizidgen und dem *Yeast Uracilphosphoribosyl-transferase* Gen (YUPRT) sorgt für eine Weiterverstoffwechslung von 5-FU in 5-FUMP. Somit führt es zu einer weiteren Verstärkung des Suizidgen-Effektes [5,28]. Dieses Fusionsgen wird als *Super-Cytosindesaminase* (SuperCD = SCD) bezeichnet.

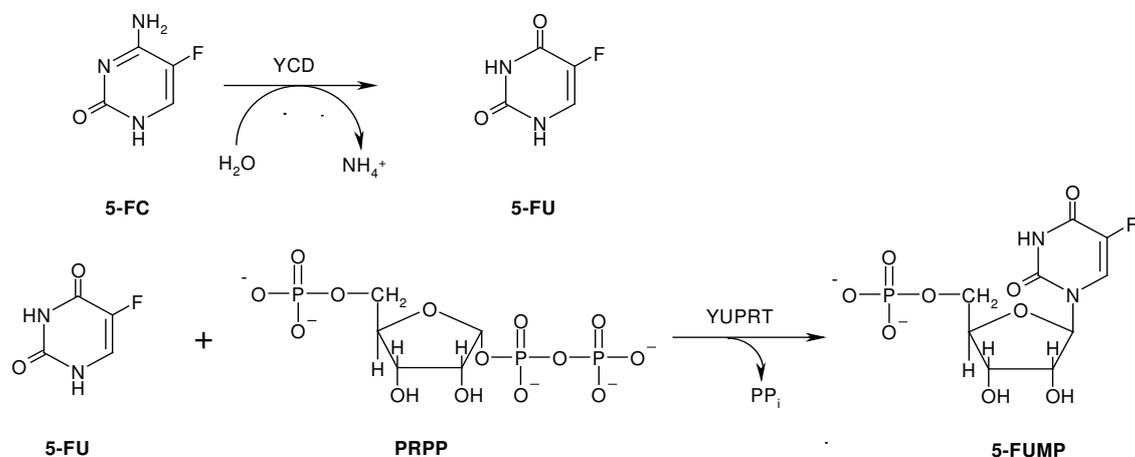


Abbildung 1 zeigt die durch die *Yeast Cytosindesaminase* (YCD) und die *Yeast Uracilphosphoribosyltransferase* (YUPRT) vermittelte Toxifikation der *Prodrug 5-Fluorcytosin*. YCD katalysiert die Desaminierung von 5-FC zu *5-Fluoruracil* (5-FU). Anschließend wird der Metabolit 5-FU von YUPRT unter der Verwendung des Cosubstrats *Phosphoribosylpyrophosphat* (PRPP) zu *5-Fluoruracilmonophosphat* (5-FUMP) umgewandelt [75].

Die Toxizität von 5-FU kommt in zweierlei Hinsicht zum Tragen. Durch die Umwandlung des 5-FU zu 5-FUTP steht der zellulären RNA-Synthese anstelle von *Uridinphosphat* ein falscher Baustein zur Verfügung und führt so zum Kettenabbruch. Andererseits wird 5-FU in der Zelle zum *Fluordesoxy-monophosphat* (FdUMP) umgebaut, das eine irreversible Hemmung der Thymidylatsynthase bewirkt. Die Thymidylatsynthase katalysiert die Konversion von *Desoxy-Uracilmonophosphat* (dUMP) zu *Desoxy-Thymidinmonophosphat* (dTMP) und stellt damit sicher, dass für die DNA-Synthese genug Desoxyribonukleinsäuren zur Verfügung stehen [56]. FdUMP wird von der Thymidylatsynthase als Substrat erkannt und dauerhaft gebunden, so dass das Enzym für

eine Neusynthese von dTMP nicht mehr zur Verfügung steht [57]. Tumorzellen, die ein solches Suizidgen tragen, können auf diese Weise gezielt und hoch-effizient abgetötet werden.

## 1.5. Zellpermeabilität-vermittelnde Motive

Der Erfolg der Gentherapie hängt davon ab, dass möglichst viele Zielzellen das therapeutisch wirksame Gen erhalten - die Transduktionseffizienz also so hoch wie möglich ist. Ein interzellulärer Transport der Suizidgen-Produkte würde diese Effizienz verbessern.

Im letzten Jahrzehnt wurden verschiedene Peptide und Proteine entdeckt und charakterisiert, welche die Eigenschaft besitzen, zelluläre Membranen zu durchdringen und so in das Innere von Zellen gelangen zu können. Außerdem können diese Motive an sie gekoppelte Ladungsmoleküle ins Cytoplasma und/oder in den Zellkern von Zielzellen einschleusen (sog. *Spread*).

Nutzbar für den therapeutischen Gentransfer können diese interzellulären Transporteigenschaften beispielsweise dadurch sein, dass Suizidgene an Zellpermeabilität-vermittelnde Motive, wie z. B. das VP22-Protein aus *Herpes simplex Virus Typ1*, gekoppelt werden.

Zu den Proteinen mit interzellulären Transporteigenschaften gehören:

- Das *transactivator of transcription* Protein aus dem *Humanen Immundefizienzvirus (HIV)* Tat [87].  
Es hat eine Länge von 87 Aminosäuren und wird mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in Zellen aufgenommen [60].
- Der *Kaposi-Fibroblasten Wachstumsfaktor (Kaposi-fibroblast-growth-factor K-FGF)* [71].  
Er wird unabhängig vom Golgi-Apparat sekretiert, aber mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in Zellen aufgenommen [42].
- Die *Homöo-Domäne* der *Homöoboxproteine (homeodomain proteins AntPs)* von *Antennapedia* aus *Drosophila melanogaster* [19,20].

Der Transport dieses Proteins verläuft energie- und rezeptorunabhängig über eine invertierende Micellenbildung [19,20].

- Das *Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1)* Strukturprotein *VP22* [24,67]. Dieses Protein hat eine Länge von 301 Aminosäuren und wird Golgi-Apparat-unabhängig sekretiert und rezeptorunabhängig in umgebende Zellen hinein transportiert.
- Das Protein *Translocation Motif (TLM)* aus dem *Hepatitis B Virus (HBV)* [66].  
*TLM* ist 12 Aminosäuren lang. Der Transport in umliegende Zellen vollzieht sich passiv und energieunabhängig.

Der Translokationsmechanismus ist bislang bei keinem der Zellpermeabilitätsvermittelnden Motive vollständig verstanden. Die Internalisation in Zellen findet energie- und auch rezeptorunabhängig statt. Es wurden verschiedene Modelle postuliert, z.B. *inverted micelle model*, *pore formation model* und *carpet model* [30,59,81].

Das *inverted micelle model* wurde von Alain Prochiantz entwickelt und beschreibt die Interaktion von Penetratin, einem 16 Aminosäuren langen Peptid, mit der Phospholipidmembran von Zielzellen. Diese Interaktion führt zu der Bildung einer Micelle und ist damit der erste Schritt des Transportes der Peptide ins Innere der Zellen [59].

Das *pore formation model* beschreibt einen Mechanismus, wie antimikrobiell wirkende Peptide die Membran von Bakterien angreifen, indem sie die Integrität der Zellwand zerstören. Amphipatische  $\alpha$ -Helices formieren sich zu einem Bündel und kreieren eine Pore in der Membran, was zur Translokation von Peptiden führt [59].

Das *carpet model* wurde ursprünglich ebenfalls zur Erklärung für den Transport antimikrobiell-wirksamer Peptide verwendet, konnte aber auch als Modell für die Aufnahme einiger Zellpermeabilitätsvermittelnder Motive benutzt werden. Dabei kommt es zu einer Interaktion positiv geladener Teile von Peptiden mit der negativ geladenen Phospholipidmembran. Diese führt zu einer Änderung der Sekundärstruktur und damit zu einer Rotation der Peptide. Dies hat eine

Wechselwirkung hydrophober Teile der Peptide mit hydrophoben Anteilen der Membran zur Folge. Aufgrund dessen kommt es zu einem Bruch der Membran, der die Aufnahme der Peptide in die Zellen erlaubt [59].

Weiter wurde für einige der Zellpermeabilität-vermittelnden Peptide gezeigt, dass sich eine Internalisation durch endocytotische Prozesse vollzieht. [23,31,81]

Zwei der bisher erforschten Zellpermeabilität-vermittelnden Motive wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zur Erprobung einer möglichen Effizienzsteigerung des Suizidgen-Transfers in Tumorzellen ausgesucht:

- das *Translocation Motif (TLM)* aus *Hepatitis B Virus* und
- das Protein *VP22* aus *Herpes simplex Virus Typ 1*.

### **1.5.1. *Translocation Motif (TLM)***

Das *Translocation Motif (TLM)* stammt aus dem *Hepatitis B Virus (HBV)*, dem kleinsten humanpathogenen DNA-Virus aus der Familie der *Hepadnaviridae*, welcher Hepatozyten mit hoher Spezifität infiziert [66].

Ein Gen von HBV kodiert für die viralen Oberflächenproteine (*HBV-Surface-Antigen - HBsAg*) und ist folgendermaßen aufgebaut:

**AUG – PreS1-Region – AUG – PreS2-Region – AUG – S-Region.**

Die PreS2-Region kodiert dabei für ein Struktur- und Zellpermeabilitätsprotein, das auch eine transkriptionelle Aktivierungsfunktion besitzt. Diese Region enthält ein 12 Aminosäuren langes, amphipatisches  $\alpha$ -Helix-Peptid, das *Translocation Motif* (PLSSIFSRIGDP), welches für die Translokation verantwortlich ist. *TLM* ist für die Infektiosität von *HBV* notwendig [80]. Die *TLM*-vermittelte Membrantranslokation stellt einen passiven, energieunabhängigen Prozess dar und ist nicht auf bestimmte Zellarten begrenzt [66]. Eine Translokation ist auch dann möglich, wenn man das *TLM* an Proteine, Peptide oder Nukleinsäuren koppelt und somit ein Fusionsmolekül bildet. Die Partner der Fusionsproteine werden somit in umliegende Zellen geschleust. Dabei wird weder die zelluläre Integrität geschädigt noch in irgendwelche Signaltransduktionskaskaden einge-

griffen. Im Gegensatz zu anderen Zellpermeabilität-vermittelnden Motiven zeigt *TLM* keine Bevorzugung für subzelluläre Kompartimente. Die Bevorzugung der Lokalisation des Fusionspartners wird durch die Fusion mit *TLM* nicht beeinflusst [37,41,74]. Außerdem werden endosomale Kompartimente umgangen [13].

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich *TLM* wegen der oben beschriebenen Eigenschaften sehr gut für die Kopplung mit einem Fusionspartner eignet und auf diese Weise eine Effizienzsteigerung der Suizidgen-therapie prinzipiell erreicht werden könnte

### **1.5.2. VP22**

*VP22* ist das Produkt aus dem Gen *UL 49* des *Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV 1)*. Es ist ein Phosphoprotein und stammt aus der Tegument-Region [27,68]. *VP22* hat eine Länge von 301 Aminosäuren, woraus sich ein Molekulargewicht von 38 kDa ergibt. Das Protein hat die Fähigkeit zum interzellulären Transport (*Spread*). Der Mechanismus ist wie auch bei den anderen transportvermittelnden Motiven noch nicht vollständig geklärt [24]. Der Transport ist energie- und Golgi-Apparat-unabhängig [24,58]. Durch den Transport können mit *VP22* fusionierte Proteine erfolgreich in umliegende Zellen transportiert werden [24].

Diese Möglichkeit des *Spread* macht das *VP22* zu einem hoffnungsvollen Werkzeug, um niedrige Transduktionseffizienzen in der Gentherapie zu verbessern, so dass eine signifikante Steigerung gentherapeutischer Effekte erzielt werden kann.

Im letzten Jahrzehnt wurde die Eigenschaft des interzellulären Transports ausgiebig erforscht, wobei die Ergebnisse z. T. sehr gegensätzlich und auch verwirrend sind.

Zum einen wird darüber berichtet, dass *VP22* entgegen den initialen Befunden doch keinen *Spread* ermöglichen kann und zum anderen darüber, dass der Transport von *VP22*-Fusionsproteinen lediglich ein Artefakt bei der Fixierung von Zellen darstellt. Manchen Forschern war es nicht möglich, den *VP22*

vermittelten *Spread* an lebenden Zellen zu detektieren, sondern nur an fixierten toten Zellen. Sie postulierten weiter, dass der *Spread* von *VP22*-Fusionsproteinen zu ineffizient sei, um sicher nachgewiesen werden zu können [6,25]. Darüber hinaus gibt es Forschungsarbeiten, die berichten, dass der *Spread* von *VP22*-Fusionsproteinen überhaupt nicht beobachtet werden konnte, weder nach Methanol-Fixierung [29] noch nach Paraformaldehyd-Fixierung [6,14]. Im Gegensatz dazu gibt es Forschungsgruppen, die den *Spread* direkt mittels Fusionierung des *VP22* mit dem fluoreszierenden Protein GFP [35,89] und auch indirekt durch die funktionellen Eigenschaften von *VP22*-TK- [21,35,46] oder *VP22*-CD-Fusionsproteinen [50,88] nachgewiesen haben.

Die zelluläre Lokalisation von *VP22* ist zweigeteilt; in den Produzentenzellen befindet sich das Protein im Cytoplasma, wobei es in der frühen Mitosephase seinen Standort vom Cytoplasma in den Kern verlagert und an Chromatin bindet. Es wird so an die Tochterzellen weitergegeben [26]. Die den Produzentenzellen benachbarten Zellen, die selbst kein *VP22* produzieren, zeigen eine Aufnahme von *VP22* direkt in den Zellkern [26].

Einige andere Forscher haben die Lokalisation von *VP22* während einer Infektion als dreigeteilt beschrieben. Die drei subzellulären Lokalisationen umfassen (i) das Cytoplasma, (ii) eine „diffuse“ Verteilung über die gesamte Zelle und (iii) den Nukleus. *VP22* befindet sich in einem frühen Stadium der Infektion im Cytoplasma und lagert sich später im Nukleus an [68].

Um weitere Klarheit über den funktionellen Nutzen des interzellulären Transports durch *VP22* zu erlangen, wurden in dieser Arbeit Fusionsproteine aus *VP22* und dem Suizidgenprotein SCD gebildet und detailliert charakterisiert.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit besteht in einem bisher noch nicht erfolgten Effizienzvergleich zweier Kopplungsverfahren des Suizidgenproteins SCD mit Zellpermeabilität-vermittelnden Motiven. Die dabei untersuchten Motive sind *TLM* und *VP22*.

Auf dieser Grundlage soll es ermöglicht werden, eine rationale Vorauswahl für den angestrebten klinischen Einsatz der Fusionsproteine *TLM-SCD*, *SCD-TLM*, *VP22-SCD* und *SCD-VP22* als Suizidtherapeutika zu treffen.

Das so definierte Ziel soll in verschiedenen Arbeitsschritten erreicht werden:

- *Morris Hepatom Zellen* (MH) werden mittels Lipofektion mit bereits zur Verfügung stehenden Expressionsplasmiden, die für die oben aufgeführten Fusionsproteine kodieren, transfiziert. Nach fünftägiger Inkubation mit der *Prodrug 5-Fluorcytosin* (5-FC) werden zur vergleichenden Bestimmung der Abtötungseffizienz sog. SRB-Cytotoxizitätsassays durchgeführt.
- In einem zweiten Schritt werden erzeugte E1-/E4-deletierte adenovirale Vektoren, die für die oben aufgeführten Fusionsproteine kodieren, in gleicher Vektorpartikel-Zahl zur Transduktion von MH-Zellen eingesetzt. Die dadurch vermittelte Expression der Proteine wird mittels Westernblotanalysen geprüft.
- Der dritte Schritt erfolgt ebenfalls über die Transduktion von MH-Zellen. Nach fünftägiger Inkubation mit der *Prodrug 5-FC* werden zur vergleichenden Bestimmung wiederum SRB-Cytotoxizitätsassays durchgeführt.
- Im vierten Schritt erfolgen Zellmischungs-Experimente, wodurch die *in vitro* Effizienz der Ausbreitung zellpermeabler Fusionsproteine in naive Nachbarzellen (*Spread*) mittels Immunfluoreszenzverfahren untersucht wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Allgemeines

Alle Chemikalien besitzen mindestens den Reinheitsgrad „zur chemischen Analyse, ACS“; sofern erhältlich, wird der Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“ bevorzugt.

Das für molekularbiologische Experimente verwendete „Aqua bidest.“ wird durch zusätzliche Reinigung von deionisiertem Wasser über eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland) gewonnen.

Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien werden durch einen 20-minütigen Autoklaviervorgang bei 120 °C und 2 bar Überdruck erhalten (Stand-Autoklav FVD 3, Fedegari, Integra biosciences, Fernwald, Deutschland).

### 2.2. Zellbiologische Materialien und Methoden

#### 2.2.1. Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden mittels ELISA (Mycoplasma Detection Kit; Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) auf Mycoplasmen getestet. Es wurden nur Mycoplasmen-negative Linien verwendet, bei positivem Ergebnis wurde die entsprechende Zelllinie komplett verworfen und durch einen Mycoplasmen-freien Stamm ersetzt.

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

COS-1 Zellen:

Die COS-1 Zellen sind CV-1-Derivate (Affennieren-Zellen) und besitzen eine stabile Integration des kompletten SV40-Genoms [32]. Die Zellen bilden das SV40 *large* T-Antigen und benötigen zum Wachstum kein Selektionsmedium. Die Zellen wurden von G. Frommer, Institut für Zellbiologie, Tübingen, und von A. Phelan, MCRI, Oxted, UK, zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium; mit 2 mM Alanyl-Glutamin) + 10 % Fötale Kälberserum (FCS, Cambrex bio science, Verviers, Belgien)

HeLa Zellen:

HeLa Zellen entstammen einer epitheloiden Cervix-Adeno-Carcinom-Zelllinie humanen Ursprungs (31-jährige dunkelhäutige Frau). Es ist die erste aneuploide Zelllinie aus humanem Gewebe, die kontinuierlich kultiviert werden konnte.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alanyl- Glutamin) + 10 % FCS

MH Zellen (Morris Hepatom 3924a):

MH-Zellen entstammen einem Hepatom der Ratte. Dieses Hepatom wurde 1951 von Morris durch chemische Carcinogenese mit N-(2-Fluorenyl)-diacetamid in der ACI-Ratte induziert [64]. Die Morris Hepatom 3924a-Zellen wurden bei der Tumorbank des DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum), Heidelberg, Deutschland erworben.

Kulturmedium: DMEM (mit 2mM Alanyl-Glutamin) + 10 % FCS

HEK 293 E4/5-38 Zellen:

HEK 293 E4/5-38 Zellen entstammen einer Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen humanen Ursprungs (*human epithelial kidney* HEK-Derivat), transformiert mit DNA von humanem Adenovirus, Serotyp 5 [34]; in diesen Zellen werden die adenoviralen Genprodukte der E1- und E4-Region *in trans* zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium: DMEM (mit 2 mM Alanyl-Glutamin) + 10 % FCS

## **2.2.2. Zellkultur**

### **2.2.2.1. Allgemeines**

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, werden unter einer Sicherheitswerkbank (HERA-Safe KS18, Kendro Laboratory Products, Asheville, USA) durchgeführt.

Medien und Puffer werden vor Gebrauch im Wasserbad (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) auf 37 °C temperiert.

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgt bei 36,5 °C in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in Wasser-ummantelten Inkubatoren (Biosafe eco, Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland).

### **2.2.2.2. Material für allgemeine Zellkultur**

- sterile Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (Costar, Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Pasteur-Pipetten (Fortuna, Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Mikropipettenspitzen Safe Seal-Tips 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland)
- Mikropipetten (Biohit, Helsinki, Finnland)
- Zellkulturflaschen 50 ml (klein), 260 ml (mittel), 800 ml (groß) (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland)
- Handschuhe, Safe Skin Satin plus (Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland)
- Zentrifugen:
  - Megafuge 3.0R und Biofuge fresco (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
  - Megafuge 1.0R mit Ausschwingrotor (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Mikroskop: Olympus IMT-2 (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland)

- Fötale Kälberserum (FCS; Cambrex bio science, Verviers, Belgien)
- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS (alles: Cambrex bio science, Verviers, Belgien):
  - 450 ml DMEM werden mit 5 ml einer 200 mM L-Glutamin-Lösung und 50 ml FCS versetzt.
- PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  :
  - 95,5 g Dulbecco's PBS-Pulver (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) werden in 10 l Aqua bidest. gelöst, aliquotiert und autoklaviert. Die Lösung hat folgende Zusammensetzung:
    - § 8 g/l NaCl,
    - § 1,15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,
    - § 0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
    - § 0,2 g/l KCl;
    - § (alles: Merck KG, Darmstadt, Deutschland)
- Trypsin/EDTA mit Phenolrot:
  - Fertiglösung (Cambrex bio science, Verviers, Belgien), die 0,25 g/l Trypsin enthält und bei -20 °C gelagert wird. Einmal aufgetaute Gebrauchslösung wird bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.2.2.3. Auftauen von Zellen

Folgendes Protokoll wird für alle benutzten Zelllinien verwendet:

Materialien:

- DMEM
- Zentrifuge (Megafuge 1.0R mit Ausschwingrotor, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Wasserbad (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)

Durchführung:

Die in Stickstoff eingefrorenen Zellen werden möglichst rasch im 37 °C-Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wird vorsichtig mit 10 ml FCS-haltigem Medium versetzt, für 2 min mit 200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät.

#### 2.2.2.4.Zellpassage

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit werden die in Kultur gehaltenen Zelllinien ein- bis dreimal pro Woche passagiert. Die Passage erfolgt, wenn die Zellen 80 % Konfluenz erreicht haben.

Materialien:

- PBS
- Trypsin
- DMEM

**Tabelle 1 zeigt die benötigte Materialmenge für die Zellpassage.**

Material	Kleine Flasche 50 ml	Mittlere Flasche 260 ml	Große Flasche 800 ml
PBS	5 ml	5 ml	10 ml
Trypsin	0,5 ml	1 ml	2 ml
Medium	5 ml	9 ml	8 ml
Verwerfen	Abhängig von der Konfluenz. Die Menge wird so gewählt, dass genug Zellen für das Weiterwachstum in der Flasche enthalten sind.		
Medium	Auf 5 ml auffüllen	Auf 13-15 ml auffüllen	Auf 25-30 ml auffüllen

Durchführung:

In Tabelle 1 sind die Mengen der verwendeten Flüssigkeiten aufgeführt. Das alte Medium wird entfernt und die Zellen mit der für die Flaschengröße notwendigen Menge PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Trypsin wird so zugegeben, dass der gesamte Zellrasen bedeckt ist. Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, wird DMEM mit 10 % FCS zugesetzt. Das FCS inaktiviert das Trypsin. Die gesamte Zellsuspension wird nun aufgenommen und die gewünschte Menge ( $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{1}{20}$ ) passagiert. Anschließend wird die Flasche mit frischem Medium versetzt. Die übrigen Zellen werden verworfen.

#### **2.2.2.5.Cryokonservierung von Zellen**

Materialien:

- Trypsin
- Zentrifuge Megafuge 1.0R (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Einfriermedium:
  - 78 % FCS-freies Medium, 22 % FCS, 10 % DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland);
- Cryoröhrchen, 2 ml (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland);
- Freezing Container, Nalgene® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Ethanol (Merck KG, Darmstadt, Deutschland)

Durchführung:

Die Zellen werden trypsiniert und in 10 ml FCS-haltigem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird für 2 min mit 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird in 2 ml (Zellen aus einer 260 ml-Kulturflasche) oder 4 ml (Zellen aus einer 800 ml-Kulturflasche) Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml in Cryoröhrchen überführt.

Die Cryoröhrchen werden nun in das Einfriergerät (Freezing Container) gestellt, welches mit Ethanol gefüllt ist und werden im -80 °C Gefrierschrank

eingefroren. Nach dem Einfrieren werden die Zellen zur Lagerung in einen Container mit Flüssigstickstoff überführt.

#### **2.2.2.6.Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer**

Zur Aussaat definierter Zellzahlen ist eine vorherige Zellzählung nötig. Diese erfolgt mit dem Hämocytometer nach Neubauer.

Materialien:

- 0,4 % Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Hämocytometer nach Neubauer (Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland)
- Deckgläser (Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland)
- Eppendorf-Tube Safe-Lock 1,5 ml (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland)

Durchführung:

Zuerst erfolgt eine Waschung der Zellen mit PBS. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst.

Die Zellsuspension nimmt man in 8 ml Medium (DMEM + 10 % FCS) auf und erhält damit ein Gesamtvolumen von 10 ml. 10 µl dieser Zellsuspension werden mit 90 µl Trypanblau (0,4 %) in einem Eppendorfgefäß gemischt. Ein Deckglas wird von der Seite flach auf die Zählkammer geschoben, so dass spektrale Brechungsreflexe unter den aneinander liegenden Glasflächen sichtbar werden. Von der Seite befüllt man vorsichtig die Zählkammer mit einem Tropfen Farbstoff-Zellgemisch. Die vier großen Eckquadrate werden nun ausgezählt, wobei immer nur zwei und zwar die oberen und linksseitigen Ränder pro Quadrat mitgezählt und zusammengelagerte Zellen nur als eine Zelle gezählt werden. Die Auszählung erfolgt unter dem Mikroskop (Olympus IMT-2, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland).

Lebende Zellen erscheinen weiß auf blauem Hintergrund, während abgestorbene Zellen blau angefärbt werden. Nur die weißen, lebendigen Zellen werden gezählt.

Bestimmung der Zellzahl:

Ein Eckquadrat der Kammer entspricht bei aufgebrachtem Deckglas einem Volumen von  $10^{-4}$  cm<sup>3</sup>. Die Zellsuspension wurde durch die Zugabe des Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat errechnet sich aus der Gesamtzahl der Auszählung geteilt durch vier, da vier Quadrate ausgezählt wurden.

Formel:

Zellzahl/ml = durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat  $\times 10^4 \times 10$

### **2.2.3. Transfektion eukaryotischer Zellen**

Transfektion bezeichnet den Prozess, Fremd-DNA in eukaryotische Zellen zu transportieren und somit Proteinexpression zu steuern. Zum Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen, die in Zellkultur gehalten werden, existieren unterschiedliche Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lipofektion verwendet.

Bei der Lipofektion werden DNA-Liposomen-Gemische endozytotisch aufgenommen. Die DNA-Liposomen-Gemische bestehen aus einer Mischung aus polykationischen Lipiden zur Bindung der DNA und neutralen Lipiden. Bei vielen Zelllinien lassen sich mit der Lipofektion höhere Transfektions-Effizienzen erzielen als mit anderen Methoden. Allerdings ist eine Anpassung des Lipidgemisches an den zu transfizierenden Zelltyp notwendig, da die Liposomengemische bei der Lipofektion selten auch zytotoxisch wirken können.

### 2.2.3.1. Lipofektion mit FuGENE 6

Die folgende Arbeitsvorschrift beschreibt exemplarisch die Transfektion in 35 mm-Kulturschalen. Für Transfektionen in 60 mm-Kulturschalen wird jeweils das Doppelte der angegebenen Mengen verwendet.

FuGENE (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) kann in Serum-freiem Medium oder in Medium mit Serum verwendet werden. Erfordert die besondere Zellart eine Transfektion in Serum-freiem Medium, sollte man 3-8 Stunden nach der Transfektion in das Medium wieder Serum zugeben. Das Medium muss vor weiteren Versuchsschritten nicht unbedingt gewechselt werden. Das DNA-Reagenz schadet den Zellen nur in seltenen Fällen.

Die Plasmide sollten jedoch immer in Serum-freiem Medium vorbereitet werden. Beim Pipettieren muss man darauf achten, dass das Reagenz niemals den Plastikrand berührt. Deshalb wird immer direkt in das Serum-freie Medium pipettiert. Die Zellen sollten zur Transfektion zu 50-80 % konfluent sein. Als Mengenverhältnis zwischen FuGENE 6 ( $\mu\text{l}$ ) zu DNA ( $\mu\text{g}$ ) ist 3:2, 3:1 und 6:1 möglich. Hier wurde das Verhältnis 3:1 gewählt.

Volumen und Menge der verwendeten Reagenzien und DNA sind von der Größe der Kulturschalen abhängig und im Folgenden dargestellt.

Die Plasmidkonzentration sollte immer zwischen 0,02-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  betragen.

**Tabelle 2 zeigt die möglichen Volumina und Mengen abhängig von der Größe der Kulturschalen. Dabei wurde ein Verhältnis FuGENE ( $\mu\text{l}$ ) zu DNA ( $\mu\text{g}$ ) von 3:1 verwendet.**

Plattengröße	Oberfläche pro Well ( $\text{cm}^2$ )	Medium insgesamt pro Well (ml)	Volumen FuGENE ( $\mu\text{l}/\text{Well}$ )	DNA-Masse ( $\mu\text{g}/\text{Well}$ )
6-Well	9,4	2	3	1
12-Well	3,8	1	1,5	0,5
24-Well	1,9	0,5	0,6	0,2
96-Well	0,3	0,15	0,15	0,05

Materialien:

- FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA)
- DMEM mit 10 % FCS
- Serum-freies Medium Opti-MEM (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA)
- Plasmid-DNA

Durchführung:

Einen Tag vor der Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen trypsiniert und im Hämocytometer ausgezählt. Die gewünschte Zellzahl wird ausgesät (ca.  $1 \times 10^4$  Zellen für 24-Well-Platten oder ca.  $2,5 \times 10^5$  Zellen für 6-Well-Platten), mit 0,5 ml bzw. 2 ml Medium versetzt und für 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator belassen.

Zur Transfektion werden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen für jede Transfektion 94 µl Serum-freies Medium und 6 µl FuGENE vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend gibt man die in Serum-freiem Medium verdünnte DNA (2 µg DNA mit OPTI-MEM auf 10 µl auffüllen) in das Eppendorfgefäß hinzu und inkubiert nochmals 5 min. Nun fügt man 100 µl pro Well tropfenweise zu den Zellen. Dabei werden die Platten leicht geschwenkt.

Die Zellen werden abschließend bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. 24 h nach Beginn der Transfektion ersetzt man das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium.

Die Transfektion wurde zum einen durchgeführt, um Plasmide in MH-Zellen einzuführen und anschließend mit einem SRB-Cytotoxizitätsassay (siehe 2.5 Proliferationsassays) das Absterben aufgrund einer zweimaligen 5-FC-Gabe zu quantifizieren, zum anderen wurden Plasmide für eine rt-PCR in Zellen eingeführt.

Dabei wurden folgende Plasmide verwendet:

Alle Plasmide enthalten Gensequenzen von Adenovirus Serotyp 5. Diese Vektoren enthalten stromaufwärts und stromabwärts der Expressionskassette adenovirale Sequenzen, die den E1-Bereich umgeben.

- **pTG 6600 (6930 bp)**

Die Expressionskassette besteht aus dem „immediate early“-Promotor des humanen Cytomegalie-Virus (hCMV), einem chimären Intron aus humanem  $\beta$ -Globin (BGL) und Immunglobulin G (IgG) der Maus, einer multiplen Klonierungsstelle und der SV40-Polyadenylierungsstelle aus Simian Virus 40 (SV40-pA). Außerdem sind folgende bakterielle pUC19 Sequenzen im Plasmid enthalten, die nicht gezeigt sind: ein Ampicillin-Resistenz-Gen ( $Amp^r$ ) und ORI, der dem bakteriellen Replikationsursprung entspricht.

Adenoviraler Basis-Vektor [17].



Wichtige Komponenten:

**Ad:** adenovirale Sequenzen, die den E1-Bereich umgeben.

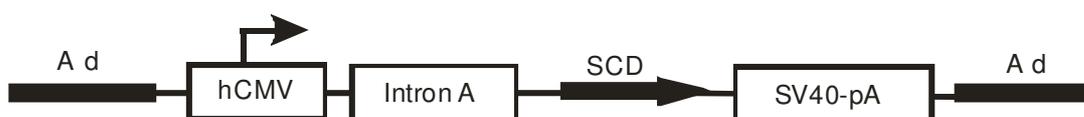
**hCMV:** ein starker eukaryoter Promotor aus dem Cytomegalivirus.

**Chimäres Intron:** aus humanem  $\beta$ -Globin (BGL) und Immunglobulin G (IgG) der Maus, zur Verbesserung der Expression.

**Multiple Klonierungs-Stelle (MCS:** *multiple cloning site*): mit singulären Schnittstellen zum Einfügen des zu transferierenden Gens.

**Sv40-pA:** entsprechen Polyadenylierungssignalen aus dem SV40-Virus zur korrekten posttranskriptionalen Prozessierung

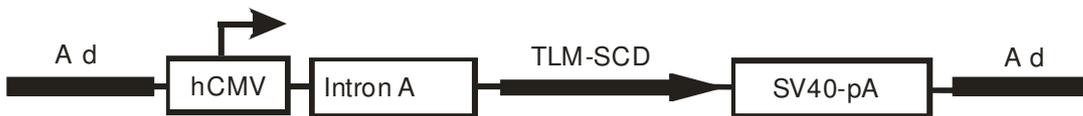
- **pTG6600- SCD (7380 bp) [33]**



- **pTG6600 SCD-TLM (7402 bp)**



- **pTG6600 TLM-SCD (7424 bp)**



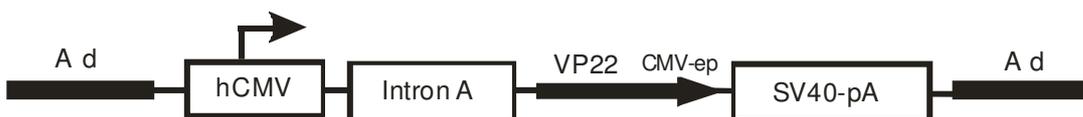
- **pTG6600 SCD-VP22 (8258 bp) [51]**



- **pTG6600 VP22-SCD (8293 bp) [51]**



- **pTG6600 VP22 (9213 bp) [88]**

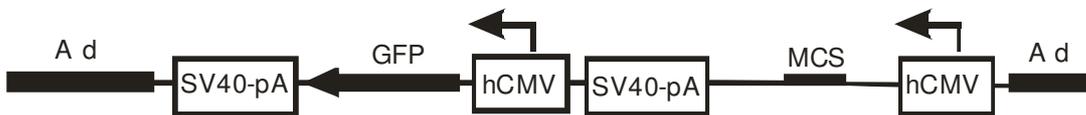


Der in diesem Plasmid enthaltene CMV-Epitop-Tag schafft die Möglichkeit, das Protein *VP22* in voller Länge zu detektieren.

Die Expressionskassetten der folgenden Plasmide wurden in Antisense-Orientierung in die E1-Region des Adenovirus Serotyp 5 kloniert (AdEasy System™ von Quantum, Montreal, Kanada) [39]. Die Kassette enthält einen starken Promotor aus dem humanen Cytomegalie-Virus (**hCMV**), eine multiple Klonierungsstelle (**MCS**) und eine Polyadenylierungssequenz aus Simian Virus 40 (**SV40-pA**). Nicht gezeigt sind die bakterielle Replikationsursprungssequenz ORI sowie das Kanamycin-Resistenzgen (Kan<sup>r</sup>).

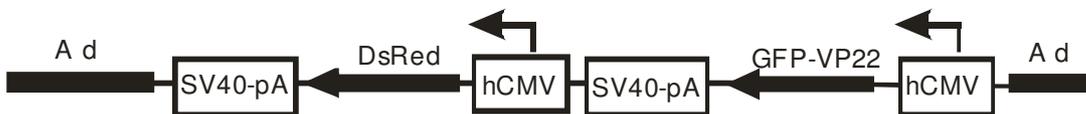
Bei den folgenden Plasmiden sind zwei von einander unabhängige Expressionskassetten mit zwei vorgestellten hCMV-Promotoren vorhanden.

- **p GFP (8175 bp) [52]**

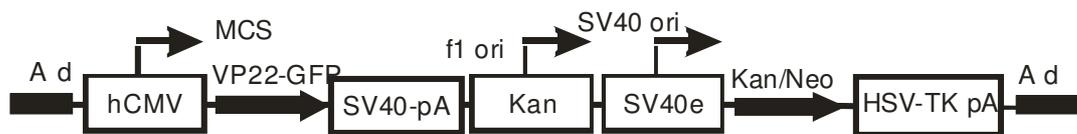


Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von S. Isenmann (Universitätsklinik Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

- **p VP22GFP-DsRed (10744 bp) [52]**



- **p VP22-GFP (9111 bp) [51]**



Dieses Plasmid enthält neben dem hCMV-Promotor noch zwei weitere Promotoren. Weiter beinhaltet das Plasmid ein Kanamycinresistenzgen sowie ein Gen für die Resistenz gegen Neomycin. Freundlicherweise von P. O'Hare, Marie-Curie-Institut, Oxted, UK, zur Verfügung gestellt.

## 2.2.4. rt-PCR (reverse Polymerase-Ketten-Reaktion)

### 2.2.4.1. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit des starken RNase-Hemmers Guanidiniumisothiocyanat. Die RNA wird chromatographisch an Anionenaustauschersäulen auf Kieselgelbasis aufgereinigt. Dabei wird der Sachverhalt ausgenutzt, dass Silicagel in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze RNA adsorbiert. Durch Waschen mit Puffern, die chaotrope Salze enthalten können Proteinverunreinigungen abgetrennt werden.

Da es sich um kleinste Mengen zu isolierender RNA handelt, aber aufgrund der Quantifizierung eine maximale Ausbeute an isolierter RNA (möglichst 100 %) erhalten werden soll, wird der Lysepuffer mit sog. „carrier-RNA“ versetzt.

Es wurde das Kit von Macherey-Nagel zur RNA-Isolierung verwendet (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Materialien:

- PBS
- Puffer RLN:
  - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 140 mM NaCl
  - 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0,5 % Nonidet P-40
  - 1000 U/ml RNase-Inhibitor
  - 1 mM DTT
- β-Mercaptoethanol 14,3 M (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
- NucleoSpin Filter units (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Eppendorfgefäß (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland)
- (70 %) Ethanol (Merck KG, Darmstadt, Deutschland)

- Vortex (Vibrofix VF 1, Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland)
- 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- DNase-Reaktionsmix: 10 µl DNase I + 90 µl DNase Reaktions Puffer (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Waschgänge:
  - 200 µl RA2 Puffer (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
  - 600 µl RA3 Puffer (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
  - 250 µl nochmals RA3 Puffer
- 60 µl Aqua bidest. (RNase-frei)
- Zentrifuge (Megafuge 1.0R, Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Photometer (Dynatech MR 7000, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland)
- Filterpipettenspitzen (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland)

#### Durchführung:

Die Zellen werden nach dem Trypsinieren 2 min bei 1000 U/min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend wird das Zellpellet mit PBS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Nach nochmaligem Abzentrifugieren und Absaugen des Überstandes lysiert man die Zellen mittels 350 µl Puffer RLT + 3,5 µl β-Mercaptoethanol.

Um die Viskosität des Lysates zu reduzieren und das Lysat zu reinigen, benutzt man einen NucleoSpin Filter, durch den man das Lysat bei 11000 U/min zentrifugiert. Der Rest wird in einem Sammeleppendorfgefäß gesammelt. Die Probe wird nun homogenisiert, indem man 350 µl (70 %) Ethanol ins Sammeleppendorfgefäß gibt und das Gefäß auf dem Vortex schüttelt. Das Homogenisieren dient dem Spalten der DNA.

Als nächstes wird die RNA an eine absorptive Membran gebunden. Dazu gibt man die Probe auf eine NucleoSpin Säule in einem 2 ml Eppendorfgefäß und zentrifugiert diese 30 sec mit 8000 U/min.

Anschließend wird die Probe nach Gabe von 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) noch einmal 1 min bei 11000 U/min zentrifugiert.

Nun folgt der DNA-Verdau mittels eines DNase-Reaktionsmixes. Pro Isolierung benötigt man 10 µl DNase I + 90 µl DNase-Reaktions-Puffer. 95 µl des Reaktionsmixes werden nun auf die Säule aufgetragen, genau in die Mitte der Membran und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen 3 Waschgänge. Dabei wird die Säule nach jedem Waschgang auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt.

Beim ersten Waschgang werden 200 µl RA2 in die Säule gegeben, um die DNase zu deaktivieren. Die Probe wird 30 sec bei 8000 U/min zentrifugiert. Beim zweiten Waschgang werden 600 µl RA3 auf die Säule gegeben und wiederum 30 sec bei 8000 U/min in ein neues Gefäß zentrifugiert. Der letzte Waschgang beinhaltet eine 250 µl Gabe von RA3 und ein zweiminütiges Zentrifugieren bei 11000 U/min. Anschließend wird die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit der enthaltene Alkohol verdampft. Die Säule kommt nun in ein neues Eppendorfgefäß und die RNA wird mit 60 µl Aqua bidest. (RNase-frei) eluiert. Das Wasser wird auf die Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 11000 U/min zentrifugiert.

Abschließend kann die RNA auf ihre Reinheit überprüft und ihre Konzentration im Photometer gemessen werden. Die Konzentration ist für die Konzentrationsberechnung der rt-PCR von Bedeutung.

Die RNA kann bei -80 °C gelagert werden.

#### **2.2.4.2.rt-PCR-Reaktion**

Die rt-PCR ist eine effiziente Methode, um eine reverse Transkription aus einem Kulturüberstand isolierter RNA in cDNA (*complementary DNA*) und anschließend eine PCR Amplifikation durchzuführen.

Die reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) ist eine Modifikation der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR), um Ribonukleinsäure (RNA) zu amplifizieren. Dazu muss die RNA zunächst in ihre komplementäre DNA umgeschrieben (revers transkribiert) werden, um

diese anschließend mittels PCR zu vervielfältigen. Dies kann in einem oder in zwei Schritten passieren.

Auf Grund des exponentiellen Charakters der PCR müssen selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes findet räumlich getrennt von dem Ort statt, an dem das PCR-Produkt analysiert wird, wobei ein hierfür reservierter Pipetten-Satz verwendet wird. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien werden in Aliquots gelagert. Steriles Aqua bidest. wird nur einmalig verwendet. Vermutlich mit PCR-Produkt verunreinigte Reagenzien werden ausgetauscht, verunreinigte Gegenstände werden mit UV-Licht bestrahlt oder mit 1 M HCl behandelt.

#### Materialien:

Es wurde ein Kit von Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland verwendet.

- One Step RT-PCR Enzyme Mix:
  - 1 mM Dithiothreitol (DTT),
  - 0,1 mM EDTA,
  - 0,5 % Nonidet® p-40 (reverse Transkriptase)
  - 0,5 % Tween® 20 (Taq-Polymerase),
  - 50 % Glycerol,
  - Stabilisator pH 9 (20 °C)
- QIAGEN OneStep RT-PCR-Puffer:
  - 5 x konzentrierte Tris-Cl, KCl,
  - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 12,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , DTT; pH 8,7 (20 °C)
- Q-Lösung:
  - fünffach konzentriert (Bestandteile nicht näher beschrieben).
- dNTP-Mix:
  - 10 mM je dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- steriles Aqua bidest.
  - RNase-frei, ultrareine Qualität

- spezifische Primer:

- 0,6 µM forward-Primer
- 0,6 µM reverse-Primer
- *TLM-SCD*:

- § *forward-Primer*

- (MWG Biotech AS, Ebersberg, Deutschland):

5'- ATG CCC TTA TCG TCA ATC TTC TCG AGG A- 3'

Annealingtemperatur: 65,1 °C

- § *reverse-Primer*

- (MWG Biotech AS, Ebersberg, Deutschland):

5'- CCG CGG CCG CCT TAA ACA CAG TAG TAT CTG TCA CC- 3'

Annealingtemperatur: 70,6 °C

- *SCD-TLM*:

- § *forward-Primer* (Eurogentec, Seraing, Belgien):

5'- GGG GTA CCG CCA CCA TGG TGA CAG GGG GAA TGG CAA G- 3'

Annealingtemperatur: 66,2 °C

- § *reverse-Primer* (Eurogentec, Seraing, Belgien):

5'- TCA AGG GTC CCC AAT CCT CGA GAA GAT TGA CGA TA- 3'

Annealingtemperatur: 63 °C

- Filter-Pipettenspitzen (Biozym Diagnostik GmbH, Odendorf, Deutschland)
- Dünnwandige 0,2 ml-Reagenzgefäße (Biozym Diagnostik GmbH, Odendorf, Deutschland)
- PCR-Gerät „Thermo-Cycler“:
  - Gene-Amp 9700 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)

Durchführung:

Im Versuch wurde eine Ein-Schritt-Methode von QIAGEN, der OneStep RT-PCR Kit, verwendet.

Als erstes präpariert man einen Master Mix, der alle Komponenten die für die RT-PCR benötigt werden, beinhaltet, ausgenommen der RNA. Die Komponenten sind in Tabelle 3 angegeben.

Der Master Mix wird in einem auf Eis vorgekühlten 2 ml Eppendorfgefäß in der angegebenen Reihenfolge gemischt und dann in die 0,2 ml Gefäße aliquotiert. Der PCR-Mix wird für alle Reaktionen, die unter den gleichen Bedingungen ablaufen sollen, gemeinsam in einem 1,5 ml-Reagenzgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reagenzgefäße verteilt.

Als Negativkontrolle dient eine Reaktion ohne RNA-Zusatz.

Sofort nach der Zugabe des QIAGEN Enzym-Mix werden die Proben in den „Thermo-Cycler“ gesetzt. Da der Deckel des Geräts beheizt ist und so ein Verdunsten der Proben verhindert, ist ein Überschichten der Proben mit Mineralöl nicht nötig. Ein Standard-Programm für den „Thermo-Cycler“ ist in Tabelle 4 dargestellt.

Die mRNA wird nun bei 50 °C in cDNA umgeschrieben. Dabei wird mit Hilfe der reversen Transkriptaseaktivität einer DNA-Polymerase und spezifischen Primern die mRNA in 5'- 3' Richtung zu cDNA transkribiert.

Nun kommt die initiale PCR-Aktivierung: Der Thermo-Cycler wird für 15 min auf 95 °C aufgeheizt. Bei dieser Temperatur wird die reverse Transkriptase deaktiviert und die Taq-DNA-Polymerase, welche die cDNA nun amplifiziert, aktiviert. Außerdem wird durch die Hitze die cDNA denaturiert (in Einzelstränge geteilt). Danach erfolgt eine schnelle Temperaturreduktion auf 62 °C für 1 min, wodurch sich zwei Oligonukleotid-Primer an das zu amplifizierende cDNA-Fragment anlagern (*annealen*). Die Annealingtemperatur ist vom spezifischen Primer abhängig. Die Primer lagern sich jeweils an das 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Fragmente an. Mit einer erneuten Temperaturerhöhung auf 72 °C verdoppelt nun die DNA-Polymerase die Fragmente in 5'- 3' Richtung durch Verknüpfen von dNTP an den Strangenden, mit dem cDNA-Fragment als Matrize. Diese Elongation dauert 1 min. Das Amplifikat ist zum „Mutterstrang“

komplementär und hybridisiert mit diesem. Im zweiten Zyklus werden diese beiden DNA-Stränge wieder denaturiert, die Primer annealen und die Taq-Polymerase verdoppelt die Zielsequenzen. Die Zyklenanzahl hängt von der Menge der RNA ab, hier wurde 40 Zyklen lang amplifiziert.

Ein Aliquot jedes PCR-Ansatzes wird zur Auswertung auf einem analytischen Agarose-Gel aufgetrennt.

Nach Beendigung des PCR-Programmes können die Proben über Nacht bei 4 °C oder für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des RNA-Mix**

Komponenten		Volumen pro Reaktion	Endkonzentration im Ansatz
5x QIAGEN			
Master- Mix:	OneStep RT-PCR Puffer (enthält 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 µl	1 x
	5x Lösung Q (Qiagen)	10 µl	1 x
	10 mM dNTP-Mix	2 µl	400 µM von jedem dNTP
	10 µM forward-Primer	3 µl	0,6 µM
	10 µM reverse-Primer	3 µl	0,6 µM
	Aqua bidest. (Rnase frei)	22 µl-x µl	-
	RNA:	Messenger-RNA	x µl
Endvolumen:		50 µl	-

**Tabelle 4: Ablauf eines Standard-PCR-Programms. Für jedes Primer-Paar muss die optimale Annealing-Temperatur ermittelt werden. Je nach Länge des PCR-Produktes gilt die Faustregel für die Extension: pro 1 kb Länge – 1,5 min „Elongation“.**

Programmschritt	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50 °C (besser 60 °C)
Aktivierung Taq-Polymerase, Deaktivierung Reverser Transkriptase		
Initiale PCR-Aktivierung	15 min	95 °C
Denaturierung der DNA		
3-SCHRITT PCR (Zahl der Zyklen: 25-40):	Denaturieren	30 sec 94 °C
	Annealing	30 sec 50-68 °C
	Extension	1 min 72 °C
finale Elongation :	10 min	72 °C

### 2.2.4.3. Gelelektrophorese

Um die rt-PCR-Produkte auswerten und sichtbar machen zu können, werden diese auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Materialien:

- Agarose-Gel: 1 %
  - TAE-Puffer:
    - § 4 mM Tris
    - § 1 ml EDTA
    - § 1 ml Eisessig
    - § pH auf 7,8 mit Eisessig einstellen und auf 1000 ml auffüllen
  - Agarosepulver (Rotiagarose, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
- Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
- 1 Kb-DNA-Leiter (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA)

- 10 x Ladepuffer (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
- Gelelektrophoresekammer (Owl Scientific, Woburn, MA, USA).
- Spannungsquelle: Power Pac 300 (BioRAD Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- UV-Licht-Quelle (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland)
- Imagemaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Durchführung:

Zur Herstellung des Gels (1 %) werden der TAE-Puffer und das Agarose-Pulver vermischt und solange erhitzt, bis die Masse flüssig ist. Dem Gel wird 1 µl Ethidiumbromid zugegeben. Dieses lagert sich in der Doppelhelix der DNA an, fluoresziert unter UV-Licht und macht somit die Position der cDNA-Fragmente im Gel sichtbar. Das Gel wird anschließend in die Kammer gegossen und erhärtet. Außerdem wird ein 1 kb-DNA-Leiter als Größenstandard im Gel mitaufgetrennt. Es werden 20 µl der Proben und 2 µl 10 x Ladepuffer aufgetragen, anschließend schließt man an die Gelkammer ein elektrisches Feld von 100 V an, wobei die (negativ geladenen) DNA-Fragmente im Gel abhängig von ihrer Größe zum positiven Pol wandern. Nach 1 Stunde wird das Ethidiumbromid, welches im Gel enthalten ist, mit UV-Licht (302 nm) angeregt und die Positionen der Banden sichtbar gemacht, mit dem Imagemaster fotografiert, miteinander verglichen und somit die Größe bestimmt.

## **2.3. Virologische Materialien und Methoden**

### **2.3.1. Adenoviren**

Adenoviren (Familie Adenoviridae) besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von etwa 36 kb.

Adenoviren sind unbehüllt und haben ein ikosaedrisches Viruskapsid, aufgebaut aus den Kapsidproteinen Hexon, Penton und Fiber. Für den Gentransfer werden fast ausschließlich die Serotypen 2 und 5 verwendet. Beide sind nicht onkogen. Adenoviren können aufgrund des ubiquitären Vorkommens des Adenovirus-Rezeptors (CAR-Rezeptor [10]) ein breites Spektrum an Säugierzellen infizieren. Der zeitliche Verlauf der Adenovirusinfektion wird in eine frühe und eine späte Phase gegliedert, die nach dem Start der Replikation beginnt. Vor Beginn der Virusreplikation werden die Gene E1-E4 der frühen Regionen transkribiert. Die E1 A-Genprodukte werden zuerst synthetisiert. Sie fungieren als Regulatoren der Transkription und sind für die Aktivierung der restlichen frühen Gene notwendig. Die E1 B-, E2- und E4-Regionen kodieren für Proteine mit essentiellen regulatorischen Funktionen. Die Expression von E1 B blockiert die frühe Genexpression, die sonst kontinuierlich weiterlaufen würde und somit vor Fertigstellung neuer Viruspartikel den Zelltod auslösen würde. Gleichzeitig schützt E1 B die virale und zelluläre DNA vor dem Abbau. Durch Kombination von E1 B und E4 wird die späte Genexpression beschleunigt. Ein zweites, von der E4-Region kodiertes Protein spielt in der Regulation der Transkription der E2-Region eine Rolle. Die E2-Region kodiert für Proteine, die für die Virusreplikation benötigt werden, wie die DNA-Polymerase. Die E3-Region kodiert für Proteine, die dem Virus helfen, den Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entkommen, z.B. der Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten [86].

### **2.3.1.1.Replikationsdefiziente Adenoviren**

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Adenoviren sind im Bereich der E1- und E4-Region deletiert. Anstelle der adenoviralen Gensequenzen enthalten sie eine Expressionskassette mit dem gewünschten Transgen (z.B. das Reporter-gen für das Suizidgen *Super Cytosidesaminase = SCD*).

Bei Gentransfer-Systemen auf adenoviraler Basis muss gewährleistet sein, dass das rekombinante Adenovirus, welches als Genfähre dient, in der Zelle nicht replizieren kann, also replikationsdefizient ist [83]. Um diesem

Sicherheitsaspekt gerecht zu werden, macht man sich die Tatsache zunutze, dass für die Bildung vollständiger adenoviraler Partikel das komplette adenovirale Genom in einer Zelle vorliegen muss. Da dies bei E1- und E4-deletierten Adenoviren nicht gegeben ist, kann eine Replikation ausschließlich in Zelllinien stattfinden, welche die E1- und E4-Region als *trans*-Element bereitstellen. In HEK 293 E4/5-38-Zellen sind diese Regionen stabil ins Genom integriert. Diese Zelllinien sind somit in der Lage, alle E1- und E4-Proteine zu synthetisieren und dann nach adenoviraler Transduktion die Vermehrung von infektiösen, aber replikationsdefizienten adenoviralen Partikeln zu ermöglichen.

### **2.3.2. Transduktion von adhärennten Zellen mit rekombinanten Adenoviren**

Materialien:

- DMEM Kulturmedium mit 10 % FCS
- Serum-reduziertes Medium (OptiMEM; Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)

Durchführung:

Einen Tag vor der Transduktion werden die Zellen trypsiniert, im Hämocytometer ausgezählt und die gewünschte Zellzahl ( $2,5 \times 10^5$ ) in 6-Well-Platten ausgesät, mit 2 ml Medium versetzt und für 24 h bei 36,5 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert.

Die Transduktion von adhärennten Zellen erfolgt in möglichst geringen Volumina, um eine hohe Transduktionseffizienz zu erreichen. Das Virus wird in Serum-reduziertem Medium (OptiMEM) zur benötigten *Multiplicity of Infection* (MOI) verdünnt, auf die zuvor mit OptiMEM gewaschenen Zellen gegeben und für 1 h bei 36,5 °C inkubiert. Anschließend wird die Viruslösung entfernt und durch serumhaltiges Medium ersetzt. Die Inkubationszeit von 1 h reicht für die Adsorption und den Eintritt der Adenoviren in die Wirtszelle aus, da diese Vorgänge sehr effizient und schnell ablaufen [76].

**MOI (*Multiplicity of infection*)** ist ein Maß für die Menge infektiöser Viruspartikel, die erforderlich ist, um eine definierte Anzahl einer Standard-Zielzelle zu infizieren. Die MOI rekombinanter adenoviraler Partikel wird standardisiert an der Zelllinie HEK 293 bestimmt. Dieser Wert gilt als Vergleichsmaßstab.

Bsp.: MOI 1 ist gegeben, wenn in einer Adenovirussuspension genau ein infektiöses Viruspartikel für jede zu infizierende Zelle vorliegt.

Da es für die maximale Expression der zu übertragenen Transgene erforderlich ist, ein Vielfaches von 1 Viruspartikel in die zu adressierenden Zielzellen einzuschleusen, ist es sinnvoll, Virusmengen mit einer MOI von bis zu 1000 einzusetzen.

Es wurden MH-Zellen für die SRB-Analyse und für den Proteinnachweis mittels Westernblot transduziert.

Des Weiteren wurden COS-1 Zellen für den Nachweis eines *Spread* (energieunabhängiger Transport in Nachbarzellen) transduziert.

Als Transduktionskontrolle dienten COS-1 Zellen, die mit Ad GFP transduziert wurden. Ein Tag nach der Transduktion wurden Bilder unter dem Mikroskop gemacht. Danach betrug die Transduktionseffizienz nahezu 100 %.

Es wurden folgende rekombinante Adenoviren verwendet:

- Ad 0
- Ad SCD
- Ad *VP22*
- Ad *VP22-SCD*
- Ad *SCD-VP22*
- Ad *TLM-SCD*
- Ad *SCD-TLM*
- Ad *VP22GFP-DsRed*
- Ad GFP

## 2.4. Proteinchemische Materialien und Methoden

### 2.4.1. Zellaufschluss

Zur Gewinnung des Gesamtproteins aus kultivierten, adhären Zellen werden diese mechanisch vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend erfolgt zur Freisetzung der zellulären Proteine ein Zellaufschluss. Im Gegensatz zur Isolierung von Proteinen aus Geweben oder Organen ist die Gefahr eines Proteasen-vermittelten Abbaus der freigesetzten Proteine sehr viel geringer, so dass dem Lysepuffer in der Regel keine Proteasehemmer zugesetzt werden müssen.

Materialien:

- Lysepuffer für den hypotonen Zellaufschluss:
  - 25 mM Tris-HCl
  - 0,5 mM EDTA
  - pH 7,0

Durchführung:

Zunächst werden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden des Wells abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min mit 200 U/min bei 4 °C wird der Überstand abgenommen und verworfen, das Zellsediment in Lysepuffer aufgenommen (z. B. 120 µl für die Zellen eines Wells einer 6-Well-Platte). Nach dem Resuspendieren der Zellen im Lysepuffer wird die Suspension vier Frier-/Tau-Zyklen (Ethanol/Trockeneis, 37 °C/Wasserbad) unterworfen. Zur Abtrennung von Zelltrümmern kann das Lysat für 10 min mit 15000 U/min bei 4 °C zentrifugiert werden. Die Lagerung der gewonnenen Lysate erfolgt bei -80 °C.

## 2.4.2. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Bei dem verwendeten elektrophoretischen Verfahren [47] erfolgt die Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen (Anwesenheit von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol), wobei eine Kombination von zwei Geltypen eingesetzt wird: Zum einen ein großporiges Sammelgel, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt werden, zum anderen ein darunter liegendes kleinporiges Trenn- oder Laufgel, in welchem die Proteine nach Molekulargewicht getrennt werden. Als Gelmaterial kommt Polyacrylamid zum Einsatz. Das Trennvermögen dieser diskontinuierlichen Elektrophorese beruht auf der Kombination des Molekularsiebeffekts mit einem Konzentrierungseffekt. Letzterer wird dadurch verursacht, dass sich in Trenn- und Sammelgel andere Ionen (Leitonen: Chlorid-Anionen) als in den Elektrodengefäßen (Folgeionen: Glycinat, ein Zwitterion, dessen Ladungszustand somit stark pH-abhängig ist) befinden und der pH-Wert im Sammelgel niedriger als im Elektrodenpuffer und im Trenngel ist. Die effektive Beweglichkeit aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhält sich dabei wie folgt: Leitonen > Proteine > Folgeionen. Bei Anlegen einer Gleichspannung wandern die Leitonen infolge ihrer hohen Beweglichkeit den Proteinen und Folgeionen im Sammelgel voraus und hinterlassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit. Dadurch steigt die Feldstärke, was wiederum eine Beschleunigung der Proteine und Folgeionen hervorruft. Da die Proteine nicht schneller wandern als die Leitonen, andererseits von den Folgeionen nicht überholt werden können, entsteht eine schmale, konzentrierte Proteinschicht. Beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel nimmt, infolge des alkalischeren pH-Wertes im Trenngel, die Beweglichkeit der Folgeionen stark zu und erreicht die Beweglichkeit der Leitonen. Damit wandern im Trenngel Leit- und Folgeionen der Proteinschicht voraus. Die Trennung der Proteine erfolgt in Anwesenheit von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol, also unter denaturierenden Bedingungen, hauptsächlich nach der Größe der Proteine. SDS als starkes Detergens zerstört

alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen, während mit Hilfe von  $\beta$ -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert werden.

Weiterhin binden die SDS-Anionen an die Proteinkette, und zwar ein SDS-Anion je zwei Aminosäure-Reste, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Zahl der Aminosäure-Reste und damit dem Molekulargewicht ungefähr proportional ist. Die durch das gebundene SDS hervorgerufene negative Ladung „überdeckt“ im Regelfall die ursprüngliche Nettoladung des Proteins bei weitem, sodass diese bei der Auftrennung keine Rolle mehr spielt.

#### Materialien:

- Acrylamid/Bisacrylamid (30 %):
  - Rotiphorese Gel 30 (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland), gebrauchsfertig.
  - Tris-HCl, 1 M (pH 8,7) für Trenngel:
    - 60,55 g Tris Base werden in 400 ml Aqua bidest. gelöst, der pH mittels konzentrierter HCl auf 8,7 eingestellt und die Lösung auf 500 ml aufgefüllt.
- Tris-HCl, 1 M (pH 6,8) für Sammelgel:
  - 12,11 g Tris Base werden in 80 ml Aqua bidest. gelöst, der pH mittels konzentrierter HCl auf 6,8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.
- SDS (10 %): Natriumdodecylsulfat
  - 14,42 g SDS werden in 100 ml Aqua bidest. gelöst.
- Elektrophoresepuffer (5x):
  - 15,1 g Tris Base,
  - 94 g Glycin,
  - 10 g SDS,
  - werden in 900 ml Aqua bidest. gelöst, der pH auf 8,3 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt.
- APS-Stammlösung (10 %):

- 1 g APS, gelöst in 10 ml Aqua bidest. Die Stammlösung wird aliquotiert und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Die Lösung ist bei  $-20\text{ °C}$  praktisch unbegrenzt haltbar, die Aliquots sollten aber nur einmal aufgetaut werden.
- TEMED (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
- Rotiload (4 x konzentriert, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)
- Molekulargewicht-Standard:
  - Rainbow-Marker (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA)

#### **2.4.2.1. Gießen des Gels**

Vorarbeiten:

Für  $16\text{ cm} \times 18\text{ cm}$  Gele (1,5 mm dick) werden die entsprechenden Glasplatten (Ohren- und Spacerplatten) je zweimal mit Ethanol (80 %) und Aqua bidest. gereinigt. Auf die Spacerplatte wird erst die Silicondichtung, dann die Ohrenplatte aufgelegt und das Sandwich mit den entsprechenden Klammern fixiert.

Gießen des Gels (10 %):

Zur Herstellung des Gels wird eine Lösung mit den in Tabelle 5 dargestellten Konzentrationen hergestellt. Nach Zugabe der beiden Komponenten APS und TEMED wird jeweils kurz gemischt und das Gel sofort mit Hilfe einer 5 ml Stabpipette gegossen. Direkt nach dem Gießen wird die Flüssigkeit mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, um einen geraden Gelrand zu erhalten. Nach ca. 1 h wird vom polymerisierten Trenngel das n-Butanol abgegossen und mit Aqua bidest. nachgespült, verbliebene Flüssigkeitsreste werden mit Gel-Blotting-Papier abgesaugt.

**Tabelle 5: Benötigte Lösungen zur Herstellung eines Trenngels mit Gesamtvolumen 30 ml.**

	Trenngel (10 %)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %/0,8 %)	10 ml
Aqua bidest.	11,9 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,7)	7,5 ml
SDS (10 %)	300 µl
APS (10 %)	300 µl
TEMED	12 µl

Gießen des Sammelgels (5 %):

Die Bestandteile (siehe Tabelle 6) werden gemischt. Die Polymerisationsreaktion wird wiederum durch Zugabe von 200 µl APS (10 %) und 20 µl TEMED gestartet und das polymerisierte Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet. Direkt nach dem Gießen wird der Probenkamm eingesetzt. Nach ca. 1-2 h ist die Polymerisierungsreaktion abgeschlossen und die Gele können mit den Proben beladen werden.

**Tabelle 6 zeigt die benötigten Lösungen zur Herstellung eines Sammelgels (5 %), Gesamtvolumen 20 ml.**

	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % / 0,8 %)	3,4 ml
Aqua bidest.	13,6 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,7)	2,5 ml
SDS (10 %)	200 µl
APS (10 %)	200 µl
TEMED	20 µl

#### **2.4.2.2. Gel-Lauf**

Vorarbeiten:

Der Kamm wird entfernt und die eventuell vorhandenen Gelreste vorsichtig aus den Taschen mit Laufpuffer ausgewaschen. Dann wird das Gelsandwich in die Gelkammer (Biometra, Göttingen, Deutschland) eingebaut. Vor dem Probenauftrag werden die Probenaschen mit Laufpuffer gespült und Luftblasen am unteren Gelrand entfernt.

Probenvorbereitung:

Die benötigten Zelllysate werden aufgetaut und jeweils die gewünschte Menge entnommen. Alle Proben sowie der Molekulargewichtsstandard werden mit Lysepuffer auf das gleiche Volumen gebracht und mit der entsprechenden Menge Rotiload versetzt. Die Proben werden für 10 min bei 90 °C inkubiert und anschließend aufs Gel aufgetragen. Der Rainbow-Molekulargewichtsstandard sollte weder mit Probenpuffer versetzt noch erhitzt werden, da dies die an die Proteine gekoppelten Farbstoffe zerstört. Damit geht der entscheidende Vorteil dieses Markers verloren, nämlich die Sichtbarkeit der Proteinbanden sowohl im Gel als auch auf der Membran nach erfolgtem Proteintransfer.

Der Probeneinlauf erfolgt mit konstanter Spannung (100 V) für 1 h, die Auftrennung der Proben bei 60 V über Nacht. Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die Bromphenolblau-Bande die untere Gelgrenze erreicht hat.

#### **2.4.3. Western Blotting**

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA-Nachweisverfahren Southern und Northern Blotting eine Methode entwickelt, die als Western Blotting bezeichnet wird [15,82]. Hierbei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch (siehe 2.4.2) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran übertragen, was dem eigentlichen Blotting entspricht. Die immobilisierten Proteine werden mit einem für das nachzuweisende Protein

spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durchgesetzt haben sich nicht-radioaktive Methoden, bei denen ein sekundärer Antikörper, der gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, verwendet wird. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, welches eine leicht detektierbare Reaktion katalysiert.

Materialien:

- Blotpuffer (Towbin-Puffer):
  - 2,42 g Tris,
  - 11,26 g Glycin
  - werden mit 700 ml Aqua bidest. versetzt und auf pH 8,3 eingestellt. Dann werden 200 ml Methanol zugesetzt und abschließend mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.
- PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 3MM Filterpapiere (Whatman, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- BioRad TRANS-BLOT™ Cell Wet blot electrophoresis apparatus (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

#### **2.4.3.1. Blotting**

Vorbereitung der PVDF-Membran:

Die Membran wird vollständig mit Methanol benetzt, dann 5 min in Aqua bidest. zum Entfernen des Methanols unter leichtem Schütteln gespült (Wasser zweidreimal wechseln) und abschließend für 15 min in Blotpuffer eingeweicht. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die relativ hydrophobe PVDF-Membran immer vollständig benetzt ist.

Zusammenbau des Blot-Sandwichs:

Das Filterpapier (Whatman) wird auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotpuffer eingeweicht. Ein Schwamm und zwei mit Blotpuffer getränkte Filterpapiere werden luftblasenfrei auf den Kathodendeckel der passenden Mylarmaske (abhängig von der Gelgröße) der Blotapparatur aufgelegt. Anschließend wird das Trenngel auf die Filterpapiere gelegt, wobei man sehr vorsichtig sein muss, damit das Gel nicht einreißt. Die vorbereitete PVDF-Membran wird nun luftblasenfrei auf das Gel gebracht. Wegen der einsetzenden Bindung der Proteine an die Membran sollte die Membran nach Möglichkeit nicht mehr nachträglich gegen das Gel verschoben werden. Abschließend werden zwei weitere Filterpapiere und ein Schwamm aufgelegt.

Proteintransfer (Blotting):

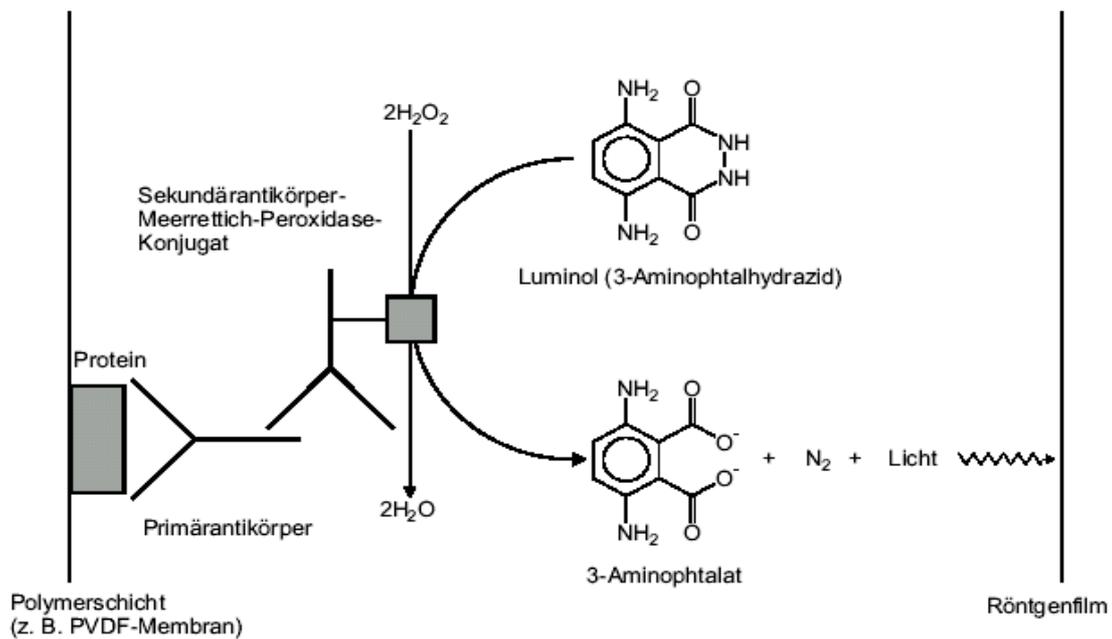
Die Apparatur wird mit dem Anodendeckel geschlossen, in die Blotkammer eingesetzt und die Proteinproben mit einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 90 min bei Raumtemperatur geblottet.

#### **2.4.4. ECL-Detektionssystem**

Das *enhanced-chemiluminescence* (ECL) System ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von immobilisierten Antigenen, die direkt oder indirekt mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper markiert werden. Die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) oxidiert ein geeignetes organisches Substrat, das Diacylhydrazid *Luminol*, unter Umsetzung von  $H_2O_2$  zu  $H_2O$ . Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand aus dem es unter Lichtemission, die mittels Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird, wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Reaktion erreicht ca. 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab. In Abbildung 2 ist das Funktionsprinzip des ECL-Systems schematisch dargestellt.

Materialien:

- TBS:
  - 150 mM NaCl (8,76 g/l),
  - 13 mM Tris (1,57 g/l),
  - werden in 900 ml Aqua bidest. gelöst auf pH 7,5 gebracht (am pH-Meter mit HCl 36 % einstellen) und auf 1000 ml aufgefüllt.
- TBS-T:
  - 1 l TBS, pH 7,5 werden mit 0,02 % Triton X-100 (200 µl) versetzt.
- Block-Lösung:
  - Rotiblock-Konzentrat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) 1:10 in Aqua bidest. verdünnt.
  - Milchpulver (5 %): 2,5 g Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 50 ml 1 x TBS lösen.
- Primärantikörper (z.B.  $\alpha$ -FCU1 (Ratte) Transgene, Straßburg, Frankreich)
  - Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (10 ml pro Blot, dargestellt in Tabelle 7)
- Sekundärantikörper (z.B. Anti-Ratte Chemikon, Temecula, USA):
  - Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (20 ml pro Blot, dargestellt in Tabelle 7)
- ECL-Detektionslösungen 1 und 2:
  - Fertiglösungen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
- ECL-Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)



**Abbildung 2: Prinzip der ECL-Detektion: An das immobilisierte Protein bindet der für das zu detektierende Protein spezifische Primärantikörper. Dessen Fc-Teil wird vom Sekundär-antikörper erkannt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Diese setzt das Substrat Luminol in einer lichterzeugenden Reaktion um (mittels Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ). Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Films detektiert [78].**

**Tabelle 7 zeigt die beim Westernblotting verwendeten Antikörper.**

Primärantikörper		
$\alpha$ -FCU1 (Ratte)	1:2000 Rotiblock	Transgene, Straßburg, Frankreich
$\alpha$ -Vinculin (Maus)	1:8000 Milchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
$\alpha$ -YCD (Schaf)	1:500 Rotiblock	Biotrend, Köln, Deutschland
$\alpha$ -VP22 (Kaninchen)	1:7500 Milchpulver	Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA
Sekundärantikörper		
Anti-Ratte	1:5000 Rotiblock	Chemikon, Temecula, CA, USA
Anti-Maus	1:4000 Milchpulver	BioRAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Anti-Schaf	1:4000 Rotiblock	Chemikon, Temecula, CA, USA
Anti-Kaninchen	1:3000 Milchpulver	BioRAD Laboratories GmbH, München, Deutschland

Blocken der Membran:

Die Membran wird in ein Schälchen überführt (Proteinseite nach oben) und 50-100 ml Block-Lösung zugegeben. Dann werden unspezifische Bindungsstellen für 1 h bei 20 °C unter leichtem Schütteln geblockt. Nach dieser Zeit wird die verwendete Block-Lösung verworfen.

Bindung des primären Antikörpers:

Die Antikörper-Verdünnung wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und in das Schälchen mit der geblockten Membran überführt. Verwendet man Milchpulver zum Blocken der Membran, muss dieses erst durch Waschen mit Aqua bidest. entfernt werden. Dann wird die Probe mit der Antikörper-Verdünnung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, wobei auf eine gleichmäßige Benetzung der Membran zu achten ist.

Waschen:

Die Antikörper-Lösung wird entfernt, Reste mit TBS-T ausgewaschen und dann die Membran 3 × 10 min mit je 50 ml TBS-T gewaschen.

Bindung des sekundären Antikörpers:

Die Antikörper-Verdünnung des Sekundärantikörpers wird unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und in das Schälchen mit der gewaschenen Membran überführt. Dann wird für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Waschen:

Die Antikörper-Lösung wird entfernt, Reste mit TBS-T ausgewaschen und anschließend 6 × 10 min mit je 50 ml TBS-T gewaschen.

Detektion:

Die gewaschene Membran wird auf einen aufgeschnittenen Plastikbeutel gelegt. Je 5 ml ECL-Reagenz 1 und 2 werden gemischt (1:1), auf die Membran gegeben und nachfolgend für 45 sec inkubiert. Überschüssiges Reagenz wird durch Abtropfen entfernt. Als nächstes wird die Membran auf eine Plastikfolie in

einer Filmkassette gelegt und mit einer zweiten Plastikfolie fixiert. Luftblasen werden durch Ausstreichen entfernt. In der Dunkelkammer wird ein ECL-Hyperfilm aufgelegt und der Blot somit entwickelt. Es wird mit einer Belichtungszeit von 30 sec begonnen. Je nach Intensität der entstehenden Banden wird die Dauer der Belichtungszeit angepasst.

## **2.5. Proliferationstest: SRB-Cytotoxizitätsassays**

Proliferationstests dienen der quantitativen Bestimmung des Zellwachstums bzw. des cytotoxischen Effektes. Die gebräuchlichsten nicht-radioaktiven Methoden sind dabei der MTT-Proliferations-Test, der die metabolische Aktivität lebender Zellen misst, und der SRB-Assay, der die Inhibition des Zellwachstums detektiert [77]. Der SRB-Test beruht auf der Bindung des Protein-Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB) und ist das Standard-Testverfahren des National Cancer Institutes der USA zum Screening zellschädigender Substanzen. Das gebundene lösliche Sulforhodamin B kann spektrophotometrisch quantifiziert werden. Die so ermittelten OD-Werte (optische Dichte-Werte) verhalten sich direkt proportional zur Zellzahl. Vergleiche von MTT- und SRB-Tests ergaben, dass das SRB-Reagenz die Wachstums-Inhibition über einen größeren linearen Bereich, empfindlicher und in einer höheren Anzahl von Zelllinien zuverlässiger quantifiziert als der MTT-Farbstoff [44,73]. In der vorliegenden Arbeit wird im Rahmen von Cytotoxizitäts-Tests die SRB-Färbung verwendet.

Zur Untersuchung der Funktionalität der durch entsprechende virale Vektoren vermittelten Suizidgenaktivität müssen Zielzellen (MH-Zellen) zunächst mit den jeweiligen Viren transduziert werden. Mittels SRB-Vitalitätsassays wird die Suizidgen-vermittelte Abtötung der transduzierten Zellen quantifiziert.

Materialien:

- Materialien für Transduktion: siehe 2.3.2
- 50 mM 5-FC-Stammlösung selbst hergestellt aus Pulver (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- PBS-Puffer
- Fixierlösung: 10 % TCA (Trichloressigsäure, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
  - 100 g Trichloressigsäure werden mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.
- Waschlösung: 1 % Essigsäurelösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
  - 10 ml konz. Essigsäure (Eisessig) wird mit 990 ml Aqua bidest. gemischt.
- Färbelösung: 0,4 % SRB
  - 0,4 g Sulforhodamin B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) werden in 100 ml 1 % Essigsäurelösung gelöst.
- Extraktionslösung: 10 mM Tris-Base (pH 10,5)
  - 1,211 g Tris-Base werden in 1 l Aqua bidest. gelöst; Extraktionslösung ist eine ungepufferte Lösung, d.h. der pH-Wert wird nicht eingestellt.

Durchführung:

Morris-Hepatom-Zellen (MH) werden in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in 24-Well Platten ausgesät. MH-SCD, eine MH-Zelllinie, die das Suizidgen Super-Cytosindesaminase (SCD) stabil exprimiert, werden mit der selben Dichte  $1 \times 10^4$  auf einer Platte als Positivkontrolle ausgesät. Die Platten werden anschließend bei 36,5 °C inkubiert (Tag 1).

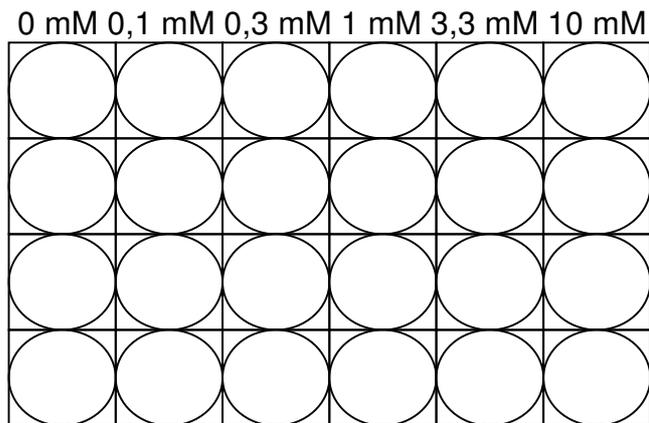
Am nächsten Tag (Tag 2) werden die MH-Zellen mit Adenovirus in verschiedenen MOI transduziert. Eine Platte wird mit reinen MH-Zellen als Negativkontrolle belassen, wird aber genauso wie die anderen Zellen weiterbehandelt.

Die anderen Platten werden mit folgenden Adenoviren transduziert:

- Ad 0 (reiner replikationsdefizienter Adenovirus ohne Transgenkassette)
- Ad *TLM*-SCD (enthält das Gen für das Fusionsprotein *Translocation-Motif*-Super-Cytosindesaminase)
- Ad SCD-*TLM* (enthält das Gen für das Fusionsprotein Super-Cytosindesaminase-*Translocation-Motif*)
- Ad SCD (enthält das Gen für Super-Cytosindesaminase)
- Ad SCD-*VP22* (enthält das Gen für das Fusionsprotein Super-Cytosindesaminase-*VP22*)
- Ad *VP22*-SCD (enthält das Gen für das Fusionsprotein *VP22*-Super-Cytosindesaminase)
- Ad *VP22* (enthält das Gen für *VP22*)

Sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrolle werden während der Transduktion 1 h mit OptiMEM behandelt. Nach der Transduktion folgt eine weitere Inkubation für 24 h.

Am Tag 3 des Versuches (24 h nach der Transduktion) erfolgt die erste Zugabe der CD-spezifischen *Prodrug 5-Fluorcytosin* (5-FC) in unterschiedlichen Konzentrationen (0 mM-10 mM) . Um die verschiedenen Konzentrationen herzustellen wird die 50 mM Stammlösung 5-FC mit DMEM bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Jede Konzentration wird für eine vierfache Bestimmung verwendet. Die verwendeten Konzentrationen sind 0 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM, 3,3 mM und 10 mM (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3 zeigt eine 24-Well-Platte. Pro Platte wird die Abtötung von MH-Zellen, die mit einem bestimmten Virus transduziert und mit verschiedenen Konzentrationen 5-FC behandelt wurden, quantifiziert. Die einzelnen Konzentrationen werden vierfach bestimmt. Dieselbe Bestimmung gilt für die Kontroll-Wells mit untransduzierten MH-Zellen.**

Die Platten werden für 72 h inkubiert. Am Tag 6 erfolgt eine Erneuerung der 5-FC-Lösungen. Die Platten werden weitere 48 h (bis Tag 8) inkubiert.

Mittels SRB-Vitalitätsassays wird die Suizidgen-vermittelte Abtötung der infizierten Zellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC-Applikation quantifiziert.

Die Cytotoxizitätsinkubation wird beendet, indem die 24-Well-Platten auf Eis gestellt, tote Zellen mit kaltem PBS-Puffer ausgewaschen und überlebende Zellen durch 30-minütige Inkubation in TCA-Lösung bei 4 °C fixiert werden. TCA-Reste werden in viermaligen Waschgängen mit Leitungswasser ausgewaschen und die fixierten Zellen über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Um die cytotoxische Wirkung sichtbar zu machen, müssen die fixierten Zellen angefärbt werden. Dazu werden die Zellen durch 10-minütige Überschichtung mit je 250 µl 0,4 % SRB-Farbstoff bei Raumtemperatur gefärbt. Ungebundener Farbstoff wird durch mehrmaliges Waschen mit 1 % Essigsäure entfernt und die gefärbten Zellen mindestens 6 h bei 37 °C getrocknet. Der restliche proteingebundene Farbstoff wird nun durch 10-minütige Inkubation auf Eis mit 10 mM Tris-Base extrahiert. Pro 24-Well-Kavität werden drei 80 µl umfassende Aliquots auf eine 96-Well-Platte (Flachboden; Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland) transferiert und im ELISA-Reader (Dynatech MR7000, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland) bei 550 nm

vermessen und ausgewertet. Je geringer die gemessene optische Dichte ausfällt, desto kleiner ist die Zahl überlebender Zellen und desto größer der cytopathische Effekt. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gefärbten Zellen, welche die 5-FC-Applikation überlebt haben, und der vermessenen optischen Dichte nach Freisetzung bzw. Extraktion des SRB-Farbstoffs aus den Zellen. Diese lineare Beziehung gilt für OD-Werte unter 1,8. Wenn der OD-Wert größer als 1,8 ist, muss mit alkalischer 10 mM Tris-Lösung weiter verdünnt und neu gemessen werden.

## **2.6. Immunologische Materialien und Methoden**

### **2.6.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Das verwendete Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung beruht auf Vorgaben des Labors von P. O'Hare, Marie Curie Research Institut (MCRI, Oxted, UK), mit kleineren Modifikationen. Die Fixierung der Zellen erfolgt dabei mit Paraformaldehyd.

Materialien:

- verwendete Viren:
  - Ad 0 (reiner replikationsdefizienter Adenovirus, ohne Transgenkassette)
  - Ad SCD
  - Ad VP22-GFP
  - Ad SCD-VP22
  - Ad VP22-SCD
- PBS
- Paraformaldehyd
- Newborn Calf Serum (NCS, Life Technologies, Eggenstein, Deutschland)
- Blocklösung: 450 ml PBS mit 50 ml Newborn Calf Serum (NCS) mischen
- Antikörper: siehe Tabelle 8, alle Verdünnungen werden in Blocklösung angesetzt.

**Tabelle 8 zeigt die für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper.**

Primärantikörper		
VP22-AK (Rabbit)	1:500	P. O'Hare, MCRI, Oxted, UK
HSV-1, AGV30		
T-Antigen-AK (Mouse)	1:20	Probst Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
SV40 <i>large T-Antigen</i>		
Sekundärantikörper		
Anti-Rabbit (goat)	1:1000	FITC-konjugierter Ak von Vector, Burlingame CA, USA
Anti-Mouse (goat)	1:1000	Alexa546™-konjugierter Ak Molecular Probes, Eugene OR, USA

- 0,1 % Triton
- 10 x *DABCO antifade reagent*:
  - 1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland);
  - DABCO schützt fluoreszierende Proben vor dem zu schnellen Ausbleichen;
  - 25 %-Lösung in PBS; als 1,5 ml-Aliquots bei –20 °C aufbewahren
- Mowiol 40-88 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland):
  - Mowiol ist ein „Harzlack“, der an der Luft fest wird.
  - 2,4 g Mowiol 40-88 mit 6 g Glycerol mischen, 6 ml Aqua bidest. zugeben, wiederum mischen und bei Raumtemperatur setzen lassen; 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5 werden zugeben, mindestens 10 min bei 50 °C erhitzen und anschließend 15 min bei 5000 U/min zentrifugieren.
  - Mowiol 40-88 löst sich nie komplett, der unlösliche Anteil wird deshalb abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in 1,5 ml-Aliquots portioniert. Mowiol 40-88 kann bei -20 °C aufbewahrt werden.
- mounting medium:

- 1 x DABCO antifade reagent (2,5 % Endkonzentration) in Mowiol:
- 1:10 Verdünnung erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen und bei 37 °C inkubieren. Die Vorbehandlung ist wichtig, da das Gemisch bei Raumtemperatur zu viskös ist, um pipettiert zu werden.

Durchführung:

Am Tag 1 erfolgt die Aussaat von COS-1 Zellen auf 6-Well-Platten in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well. Nach 24 h werden die COS-1 Zellen mit Virus transduziert (Tag 2) und wiederum einen Tag später mit HeLa Zellen in 12-Well-Kulturschalen auf Coverslips (Deckgläschen) in verschiedenen Verhältnissen (1:5, 1:10 oder 1:20) coplattiert (Tag 3). Ein weiterer Tag später erfolgt dann die Immunfluoreszenzfärbung (Tag 4). Zum Zeitpunkt der Färbung sollen die Zellen konfluent, aber nicht zu dicht sein. Während der Färbeprozedur dürfen die Zellen nie austrocknen. Das Medium wird dabei abgekippt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS kann danach abdekantiert und die Zellen mit Paraformaldehyd (0,5 ml/Well) 15 min fixiert werden. Anschließend muss man die Zellen nochmals mit PBS waschen und 0,1 % Triton auf die Zellen geben. Nach dessen Abdekantieren folgt ein erneutes Waschen mit PBS. Anschließend gibt man für 15 min Blocklösung auf die Coverslips. Die Blocklösung wird wiederum abdekantiert, die 12-Well-Kulturschalen gut ausgeschüttet und die Coverslips mit einer Pinzette in neue Kulturschalen übertragen. Nun wird der Primärantikörper aufgetragen (50-100 µl/Well ansetzen) und für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Coverslips dreimal mit PBS gewaschen und nochmals 5-10 min mit Blocklösung geblockt. Dies setzt die Oberflächenspannung herab. Die Coverslips werden erneut mit einer Pinzette in neue Kulturschalen übertragen und es wird sofort die sekundäre Antikörper-Lösung zugegeben (50-100 µl/Well ansetzen) und für weitere 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Eindeckeln werden die Coverslips nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Nun folgt „mount & seal“: Das frische *mounting medium* wird auf einen Objektträger gegeben und die Coverslips nach Entfernen der restlichen Flüssigkeit luftblasenfrei auf diese aufgelegt, so dass die Zellen unten zu liegen kommen.

Am darauffolgenden Tag können die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 135 Mikroskop, Göttingen, Deutschland) mithilfe von verschiedenen Farbfiltern beurteilt werden. Es werden währenddessen Bilder der Zellen gemacht. Dazu benutzt man eine PCO CCD SensiCam 370XL (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und eine Carl Zeiss Vision Axio Vision 3.1 Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland). Die Objektträger können für einige Wochen im Dunkeln und bei 4 °C aufbewahrt werden.

### **2.6.2. Direkte Immunfluoreszenzfärbung**

Die direkte Immunfluoreszenz hat den Vorteil, dass die Zellen nicht via Antikörper angefärbt werden. Sie leuchten durch farbige Genprodukte von selbst. Dadurch müssen die Zellen nicht erst abgetötet werden, bevor ihre Komponenten und damit der *Spread* farblich gekennzeichnet werden können. Dazu dient ein adenoviraler Vektor, der für eine duale VP22-GFP/DsRed Expressionskassette kodiert. Dieses Konstrukt enthält zwei Gene mit voneinander unabhängigem Promotor (hCMV). Durch die beiden Promotoren werden gleichzeitig zwei Proteine produziert. Zum einen das grün-fluoreszierende Fusionsprotein aus VP22 und GFP (green fluorescent protein) und zum anderen das rot fluoreszierende Protein DsRed. Dadurch ist es möglich, den VP22 vermittelten interzellulären Transport direkt zu detektieren [52]. Die Zellen leuchten durch die Genprodukte von selbst, ohne eine Anfärbung mit Antikörpern.

Materialien:

- verwendete Viren:
  - Ad GFP (Negativkontrolle/Transduktionskontrolle)
  - Ad VP22-GFP/DsRed

Durchführung:

Am ersten Tag werden COS-1 Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well auf eine 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 h mit Virus transduziert (Tag 2). Wiederum einen Tag später folgt die Coplattierung der COS-1 Zellen mit HeLa Zellen in 6-Well-Kulturschalen in unterschiedlichen Verhältnissen (1:10 und 1:20, Tag 3). Am vierten Tag erfolgt dann die Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 135 Mikroskop), ebenfalls unter Mithilfe von verschiedenen Farbfiltern. Die Bilder werden mit der Kamera PCO CCD SensiCam 370XL fotografiert und anschließend mit der Carl Zeiss Vision Axio Vision 3.1 Software verarbeitet.

## **2.7. statistische Analyse**

Die statistischen Analysen wurden mittels JMP IN 5.1 Software (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) unternommen. Für die Berechnung der Mittelwerte wurde der statistische Dunnett-Test angewandt. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde dabei als signifikant erachtet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Nachweis auf Proteinebene – die Westernblotanalyse

Zur Gewährleistung der zellulären Expression der Fusionsproteine in den Zellen wurden verschiedene Westernblotanalysen durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben und dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membran erfolgte der eigentliche Nachweis, wie unter 2.4.4 beschrieben.

#### 3.1.1. Nachweis von *TLM-SCD* und *SCD-TLM*

Zum Nachweis der hinsichtlich ihrer Fusionspartner unterschiedlich orientierten Fusionsproteine *TLM-SCD* und *SCD-TLM* wurde der primäre Antikörper  $\alpha$ -FCU1 aus der Ratte gegen das Protein SCD von der Fa. Transgene in einer 1:2000 Verdünnung verwendet; als Sekundärantikörper diente ein Anti-Ratten Antikörper von der Fa. Chemikon, 1:5000 verdünnt. Ein zusätzlicher Antikörper gegen *TLM* stand kommerziell nicht zur Verfügung.

Für den Westernblot, der in Abbildung 4 gezeigt ist, diente Vinculin, ein Adhäsionsprotein eukaryoter Zellen, als Expressionsstandard. Es hat eine Länge von 116 kDa (Spuren 1, 3-8) und wird an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran exprimiert. Als Positivkontrolle dienten Lysate der stabilen Zelllinie MH-SCD, welche das *Super-Cytosindesaminase* (SuperCD = SCD) Suizidgen stabil exprimiert (Spur 3). Außerdem wurden MH-Zellen mit dem SCD kodierenden adenoviralen Vektor Ad SCD transduziert; nachfolgend hergestellte Zelllysate wurden als zweite Positivkontrolle (SCD Protein ohne Fusion mit dem *TLM* Protein) verwendet (Spur 4). Die Bande von SCD erschien der Aminosäurelänge entsprechend bei 42 kDa, wobei bei adenoviral-vermittelter Expression von SCD (Spur 4) eine doppelte Bande (im Sinne einer zusätzlichen, geringgradig höhermolekulareren Zusatzbande unklarer Bedeutung) zur Darstellung kam.

Die Negativkontrolle stellten untransduzierte MH-Zellen dar (Spur 1). Dort waren keine spezifischen Banden erkennbar.

Die Spuren 5 und 6 zeigen das Ergebnis mit Lysaten von Zellen, die das Fusionsprotein *TLM-SCD* exprimieren (MOI 200 und 500); die Spuren 7 und 8 zeigen die Expression des Fusionsproteins *SCD-TLM* (MOI 200 und 500). Der Größe entsprechend konnten dort Banden von 43 kDa detektiert werden, wobei ebenfalls wieder zusätzliche Zerfallsbanden zur Darstellung kamen.

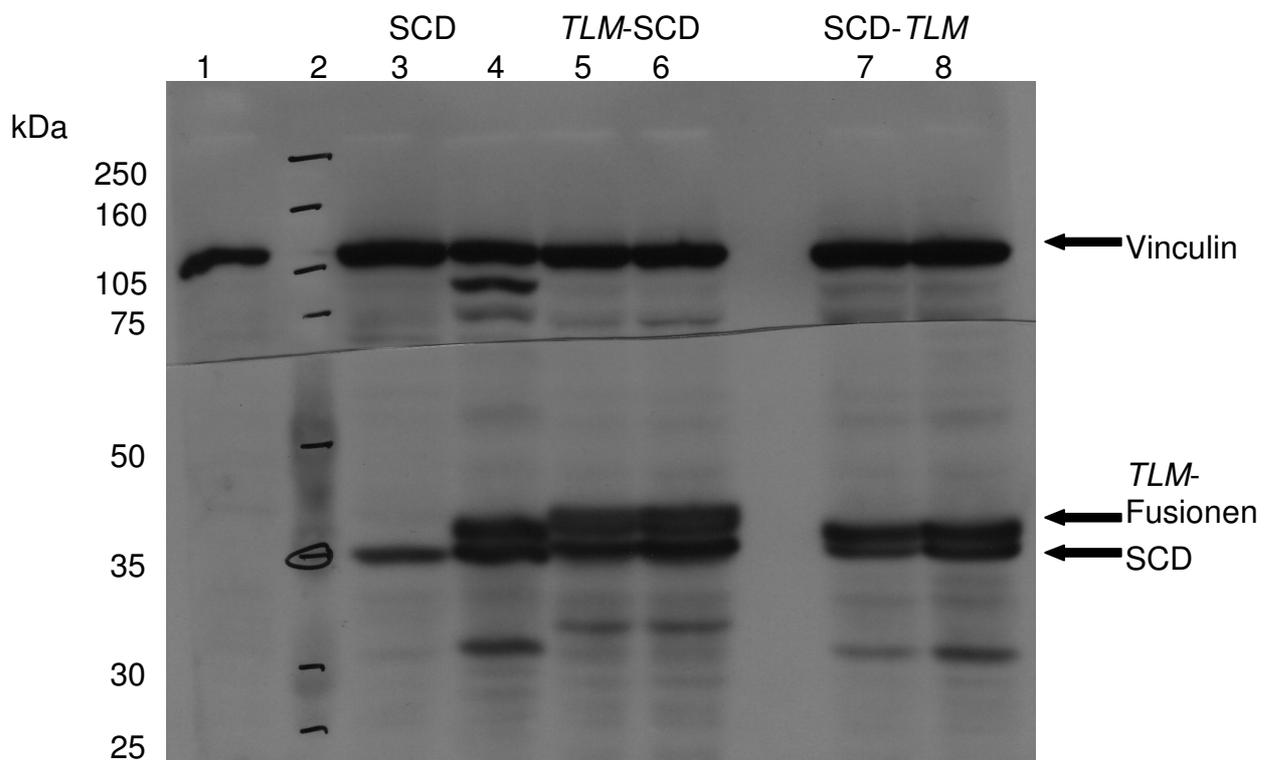


Abbildung 4 zeigt den Nachweis der *TLM*-Fusionsproteine *TLM-SCD* und *SCD-TLM* mittels Westernblotting.

- 1: Negativkontrolle, untransduzierte MH-Zellen
- 2: Protein-Molekulargewichtsstandard (Rainbow-Marker, Amersham)
- 3: Positivkontrolle, stabil SCD exprimierende MH-Zellen
- 4: Positivkontrolle, MH-Zellen transduziert mit Ad SCD
- 5: MH transduziert mit Ad *TLM-SCD* (MOI 200)
- 6: MH transduziert mit Ad *TLM-SCD* (MOI 500)
- 7: MH transduziert mit Ad *SCD-TLM* (MOI 200)
- 8: MH transduziert mit Ad *SCD-TLM* (MOI 500)

Vinculin: 116 kDa; SCD: 42 kDa; *SCD-TLM*: 43 kDa; *TLM-SCD*: 43 kDa

### 3.1.2. Nachweis von *VP22-SCD* und *SCD-VP22*

Für den Nachweis des Motives *VP22* aus Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) in den Fusionsproteinen *VP22-SCD* und *SCD-VP22* standen Antikörper gegen beide Komponenten, *SCD* und *VP22*, zur Verfügung. Somit konnte jeder Fusionsbestandteil einzeln detektiert werden.

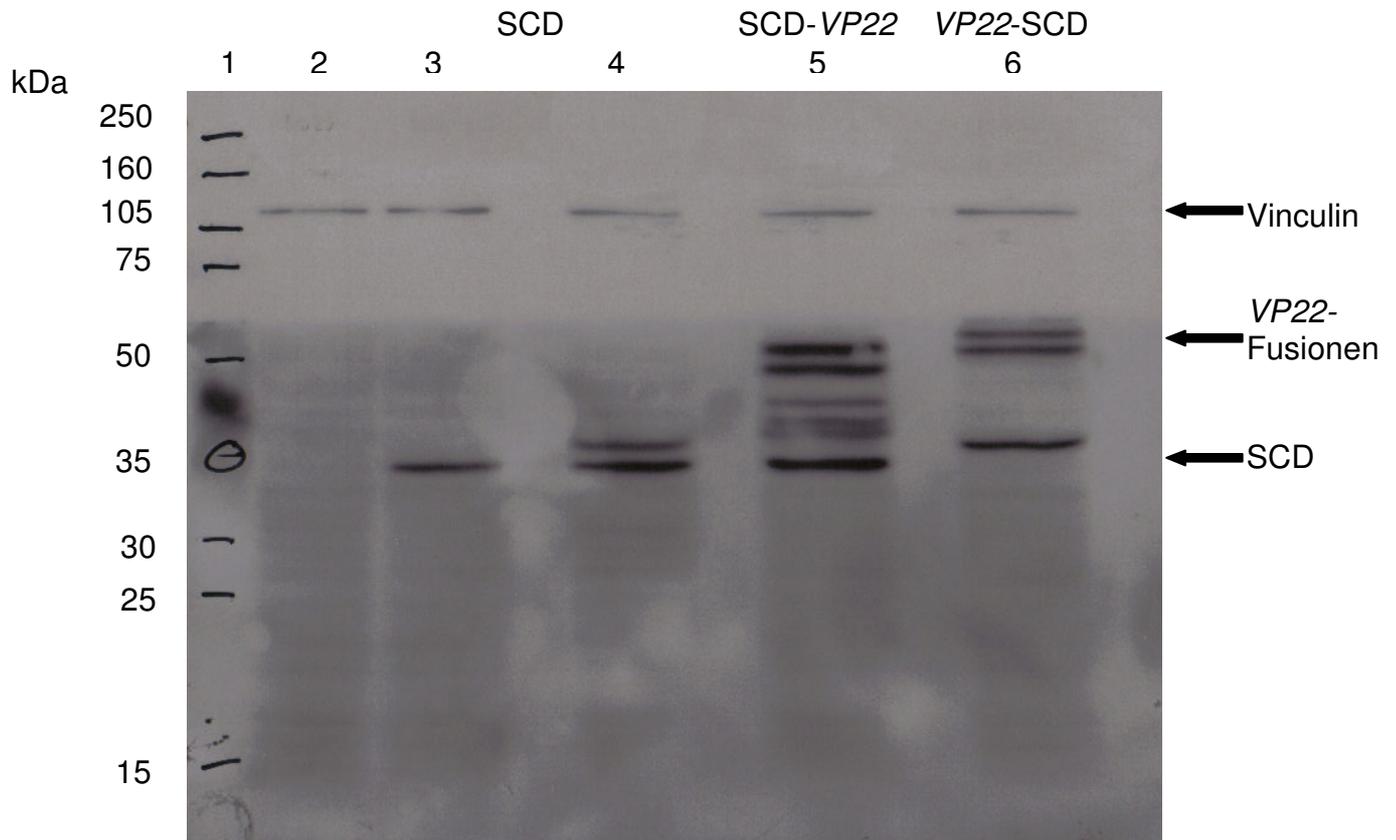
Als Expressionsstandard diente wiederum Vinculin (Banden bei 116 kDa in Abbildung 5 und Abbildung 6).

In der Analyse mit dem *SCD*-Antikörper (Abbildung 5) wurde der Primärantikörper  $\alpha$ -FCU1 (Ratte) in einer Verdünnung von 1:2000 und der oben beschriebene Anti-Ratten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet. Als Positivkontrollen für die Expression von *SCD* wurden wiederum die stabile Zelllinie MH-*SCD* sowie MH-Zellen, die mit Ad *SCD* transduziert wurden, verwendet. Die Bande von *SCD* war wiederum bei einer Größe von 42 kDa zu sehen (Spuren 3 und 4). Wieder zeigten sich in Spur 4 bei dem aufgetragenen Lysat der mit dem adenoviralen Vektor *SCD* transduzierten Zellen eine doppelte Bande, im Sinne einer zusätzlichen, geringgradig höhermolekulareren Zusatzbande unklarer Bedeutung. Die Banden der Fusionsproteine erschienen für *SCD-VP22* bei 77 kDa (Spur 5) und für *VP22-SCD* ebenfalls bei 77 kDa (Spur 6). In beiden Spuren zeigten sich Banden mehrerer Zerfallsprodukte dieser Fusionsproteine, deren Genese und Bedeutung unklar ist.

Für die Analyse der Fusionsproteine *VP22-SCD* und *SCD-VP22* mit *VP22*-Antikörper, dessen Ergebnis in Abbildung 6 gezeigt ist, wurde als Primärantikörper der im Kaninchen erzeugte *VP22*-Antikörper der Fa. Invitrogen in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Kaninchen Antikörper der Fa. BioRad, der in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt wurde. Als Positivkontrolle wurden Lysate von MH-Zellen ausgewählt, die mit dem adenoviralen Vektor Ad *VP22* transduziert worden waren. Eine für die Expression von *VP22* spezifische Bande wurde bei 35 kDa sichtbar (Spur 3), wobei wiederum Zerfallsbanden zur Darstellung kamen (bei 17, 18, 25 und 30 kDa). Das Fusionsprotein *SCD-VP22* konnte bei einer Größe von 77 kDa als alleinige Bande detektiert werden (Spur 4). *VP22-SCD* konnte

bei 77 kDa dargestellt werden, wobei allerdings zwei Zerfallsbanden zu beobachten waren (bei 50 und 55 kDa). Es fiel auf, dass bei nahezu gleich starker Bande des Vinculin-Expressionsstandards die Bande des Fusionsproteins SCD-*VP22* (C-terminale Orientierung von *VP22*) stärker zur Ausprägung kam als bei der des Fusionsproteins *VP22*-SCD (N-terminale Orientierung von *VP22*).

Die Negativkontrollen bei beiden Westernblotanalysen stellten Lysate von untransduzierten MH-Zellen dar (Abbildung 5 und Abbildung 6, jeweils Spur 2). Dort waren keine für die zu detektierenden Proteine spezifischen Banden erkennbar.



**Abbildung 5: Nachweis der Fusionsproteine SCD-VP22 und VP22-SCD mittels Westernblotting. Verwendet wurde ein Primärantikörper gegen SCD.**

**1: Protein-Molekulargewichtsstandard (Rainbow-Marker, Amersham);**

**2: Negativkontrolle, untransduzierte MH-Zellen**

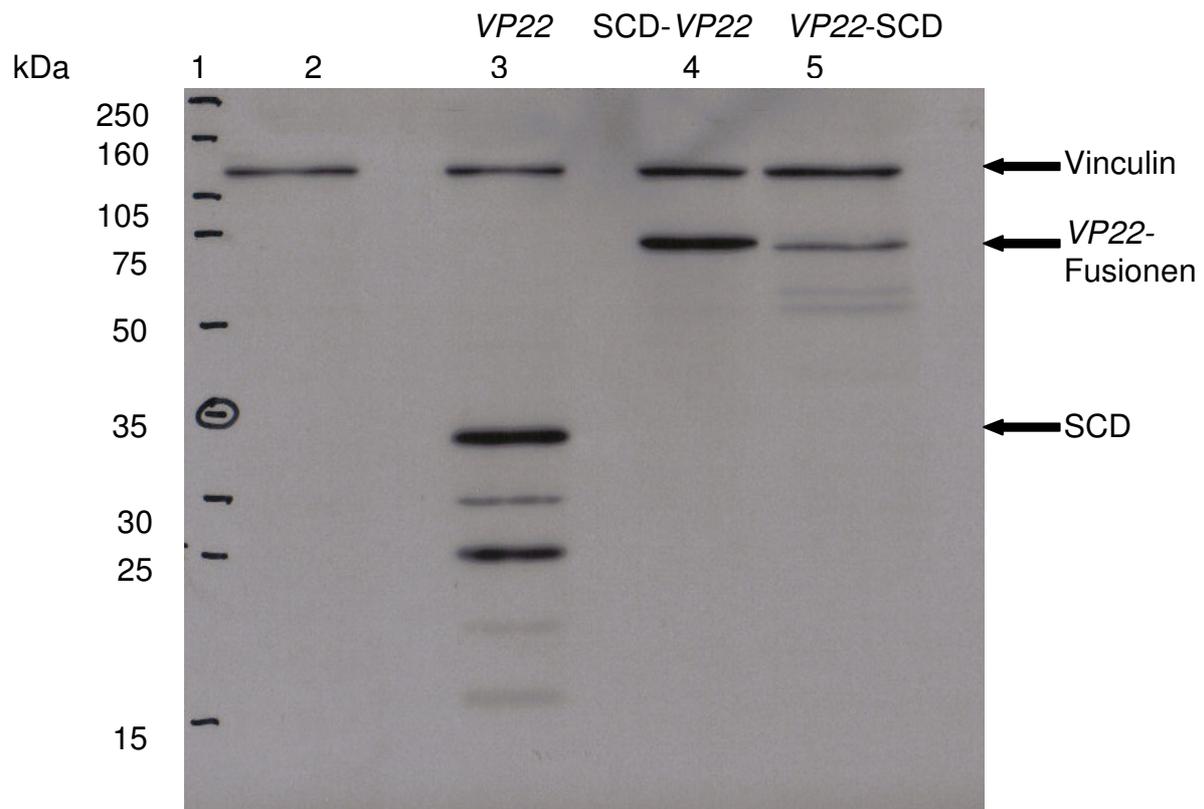
**3: Positivkontrolle, stabil SCD exprimierende MH-Zellen**

**4: Positivkontrolle, MH- Zellen transduziert mit Ad SCD (MOI 50)**

**5: MH transduziert mit Ad SCD-VP22 (MOI 50)**

**6: MH transduziert mit Ad VP22-SCD (MOI 50)**

**Vinculin: 116 kDa; SCD: 42 kDa; SCD-VP22: 77 kDa; VP22-SCD: 77 kDa**



**Abbildung 6: Nachweis der Fusionsproteine SCD-VP22 und VP22-SCD mittels Westernblotting. Verwendet wurde ein Primärantikörper gegen VP22.**

**1: Protein-Molekulargewichtsstandard (Rainbow-Marker, Amersham)**

**2: Negativkontrolle, untransduzierte MH-Zellen**

**3: Positivkontrolle, MH-Zellen transduziert mit Ad VP22 (MOI 50)**

**4: MH transduziert mit Ad SCD-VP22 (MOI 50)**

**5: MH transduziert mit Ad VP22-SCD (MOI 50)**

**Vinculin: 116 kDa; VP22: 35 kDa; SCD-VP22: 77 kDa; VP22-SCD: 77 kDa**

### 3.2. Nachweis der mRNA – die rt-PCR

Ursprünglich wurde die Westernblotanalyse zum Nachweis der Fusionsproteine *TLM-SCD* und *SCD-TLM* mit einer MOI 50 durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Hierbei waren keine spezifischen Banden zu erkennen. Darum stellte sich die Frage, ob der unter diesen Transduktionsbedingungen (vergleichsweise niedrige MOI; später wurde eine MOI von maximal 500 eingesetzt) fehlende Nachweis des Proteins daran lag, dass überhaupt keine mRNA in den infizierten Zellen gebildet wurde und somit eventuell ein Abschreibefehler des Gens während der Transkription vorlag oder ob der Grund alternativ darin zu suchen ist, dass eine zu geringe Virusmenge während der Infektion vorlag. Dies entspräche einer zu geringen Menge an Genmaterial in den Zielzellen, was in einer unzureichenden Fremdprotein-Expression resultieren könnte.

Aus diesen Gründen wurde die Transkription der Fusionsgene *TLM-SCD* und *SCD-TLM* mittels rt-PCR aus zellulärer mRNA (siehe 2.2.4) durchgeführt. Dazu wurden MH-Zellen mit *TLM-SCD* und *SCD-TLM* kodierenden adenoviralen Vektorpartikeln transduziert, deren RNA isoliert (2.2.4.1) und durch eine rt-PCR (2.2.4.2) vervielfältigt. Anschließend wurden die gewonnenen Amplifikate auf ein Agarosegel aufgetragen (2.2.4.3) und somit überprüft, ob die entsprechende Suizidgen-spezifische mRNA-Bildung in den Zellen erfolgte.

Es wurden folgende Primer verwendet:

- *TLM-SCD*:

- *forward-Primer*:

5'- ATG CCC TTA TCG TCA ATC TTC TCG AGG A- 3'

- *reverse-Primer*:

5'- CCG CGG CCG CCT TAA ACA CAG TAG TAT CTG TCA CC- 3'

- SCD-*TLM*:
  - *forward-Primer*:

5'- GGG GTA CCG CCA CCA TGG TGA CAG GGG GAA TGG CAA G- 3'

- *reverse-Primer*:

5'- TCA AGG GTC CCC AAT CCT CGA GAA GAT TGA CGA TA- 3'

Die Gesamtlänge der Fusionsproteingene errechnete sich aus der Größe der Komponenten *TLM* (36 bp) und SCD (1114 bp). Daraus ergab sich eine Gesamtlänge der Fusionsproteingene von 1150 bp.

Auf das Gel wurden als Positivkontrollen in die Taschen 1 und 5 die den Fusionsproteingenen *TLM-SCD* und *SCD-TLM* entsprechenden DNA-Fragmente aus früher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Extraktionen, und in die Taschen 3 und 7 die entsprechenden *TLM-SCD* und *SCD-TLM* kodierenden Plasmide aufgetragen. In den Taschen 2 und 6 wurde die isolierte DNA aus den mit *TLM-SCD* und *SCD-TLM* kodierenden adenoviralen Vektorpartikeln transduzierten COS-1 Zellen aufgetragen. Als Negativkontrolle bzgl. von PCR-Kontaminanten diente Wasser, jeweils in den Taschen 4 und 8.

Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Negativkontrollen zeigten keine Banden. In allen anderen Spuren waren spezifische Banden bei 1150 kb zu detektieren.

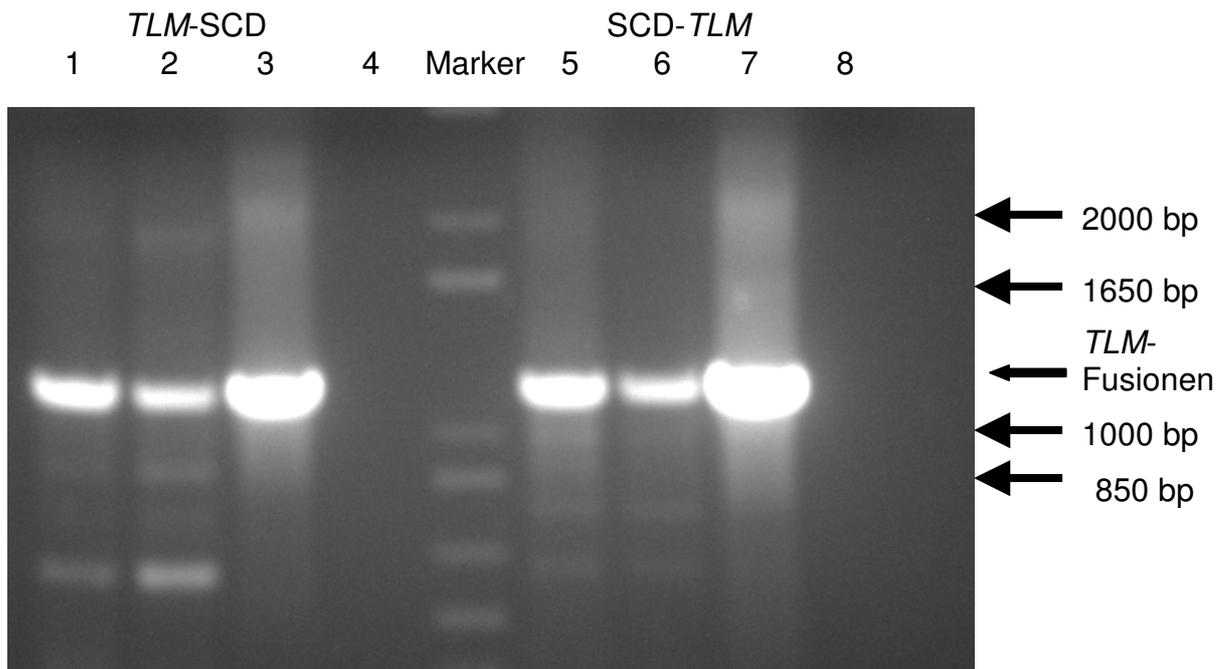


Abbildung 7 zeigt den Nachweis der mRNA aus adenviral transduzierten COS-1 Zellen mittels rt-PCR. Es wurden für die Transfektion Plasmide verwendet die für *TLM-SCD* und *SCD-TLM* kodierten.

1 DNA aus Ad <i>TLM-SCD</i> (Positivkontrolle)	5 DNA aus Ad <i>SCD-TLM</i> (Positivkontrolle)
2 Probe: COS-1 mit Ad <i>TLM-SCD</i>	6 Probe: COS-1 mit Ad <i>SCD-TLM</i>
3 <i>TLM-SCD</i> Plasmid (Positivkontrolle)	7 <i>SCD-TLM</i> Plasmid (Positivkontrolle)
4 Wasser (Negativkontrolle)	8 Wasser (Negativkontrolle)
<i>TLM-SCD</i> : 1150 kb	<i>SCD-TLM</i> : 1150 kb

### 3.3. Nachweis des *Bystander*-Effektes (*Spread*)

Der Transport der Fusionsproteine in die Nachbarzellen (*Spread*) wurde mittels Immunfluoreszenzverfahren gezeigt. Es wurden Versuche mit direkter und indirekter Immunfluoreszenz unternommen. Die direkte Immunfluoreszenz hat den Vorteil, dass lebende Zellen ohne durch Zellfixierung eventuell erzeugte Artefakte zu beobachten sind.

### 3.3.1. Direkte Immunfluoreszenz

Zur direkten Visualisierung des umstritten diskutierten *VP22*-vermittelten *Spreads* (siehe Einleitung) wurden COS-1 Zellen auf 6-Well-Platten in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät und nach 24 h mit MOI 50 oder MOI 100 transduziert. Dazu diente ein adenoviraler Vektor, der für eine duale Expressionskassette (*VP22*-GFP/DsRed) kodiert (siehe 2.6.2). Einen Tag später wurden die COS-1 Zellen mit nicht-transduzierten HeLa Zellen in verschiedenen Verhältnissen (1:10 und 1:20) coplattiert. Wiederum einen Tag danach wurde der von den COS-1 Zellen auf nicht-transduzierte HeLa Zellen übergegangene *Spread* der *VP22*-GFP Fusionsproteine unter dem Mikroskop beurteilt. Durch die duale Expressionskassette wurden zwei voneinander unabhängige Proteine produziert: zum einen das grün fluoreszierende Fusionsprotein aus *VP22* und GFP (*green fluorescent protein*) und zum anderen das rot fluoreszierende Protein DsRed. Die Zellen leuchteten aufgrund der inhärenten Fluoreszenzeigenschaften der Genprodukte *VP22*-GFP und DsRed, so dass die Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern gänzlich entfiel.

Zum Nachweis des *Spread* wurden Bilder mithilfe einer Kamera, die auf dem Fluoreszenzmikroskop installiert war, gemacht. Dazu bediente man sich spezifischer Filter, durch welche die Bilder in die einzelnen Farbkomponenten unterteilt werden konnten. Die Einstellungen waren: Durchlicht, ohne Filter, grüner Filter, roter Filter und eine Überlagerung von grünem und rotem Filter, die im Fusionsbild zu einer Gelbfärbung von Zellen führte, die sowohl *VP22*-GFP und DsRed exprimierten (dies entspricht den primär transduzierten Zellen). Die Fotografien wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen gemacht (Übersichtsaufnahmen in 10-facher, die restlichen Bilder in 40-facher Vergrößerung).

Die COS-1 Zellen, die mit dem adenoviralen Vektor Ad *VP22*-GFP/DsRed transduziert wurden, produzierten beide fluoreszierenden Proteine (GFP und DsRed). Sie leuchteten unter den entsprechenden Filtern sowohl rot (durch das rot fluoreszierende Protein DsRed) als auch grün (durch das grün

fluoreszierende Protein VP22-GFP). Unter Überlagerung beider Filter erschienen die Zellen gelb. Diejenigen Zellen, die durch den *Spread* erreicht wurden und somit das Fusionsprotein VP22-GFP enthielten, erschienen unter dem grünen Filter grün. Hier gab es keine rote Fluoreszenz.

Es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse der beiden Zelltypen zueinander ausprobiert (COS-1:HeLa: 1:10 und 1:20). Bei beiden Verhältnissen war ein *Spread* zu beobachten. Jedoch war in der Übersicht (10 x Vergrößerung) zu erkennen, dass beim 1:20 Verhältnis, (Abbildung 8, Zeilen 5-8) weniger HeLa Zellen vom *Spread* erreicht wurden als beim Verhältnis 1:10 (Abbildung 8, Zeilen 1-4). Somit erwies sich das Verhältnis von COS-1 Zellen zu HeLa Zellen mit 1:10 als das günstigere. Dieses Verhältnis wurde dementsprechend auch bei den späteren Versuchen mit indirekter Immunfluoreszenz angewandt.

Die Virusinfektionsmenge der COS-1 Zellen wurde ebenfalls variiert. Zum einen wurde der Virus mit einer MOI von 50 auf die Zellen gegeben (Abbildung 8 in den Zeilen 1, 2, 5 und 6 zu sehen), zum anderen mit einer MOI von 100, (Abbildung 8 in den Zeilen 3, 4, 7 und 8 dargestellt). Im Ergebnis zeigte sich, dass die Menge der zur Transduktion verwendeten Viren mit dem Ausmaß des *Bystander*-Effektes korrelierte (Abbildung 8).

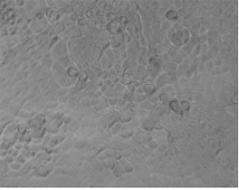
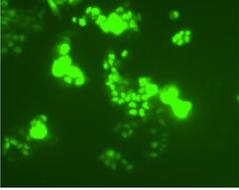
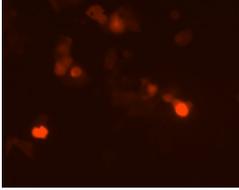
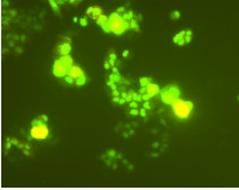
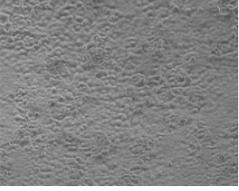
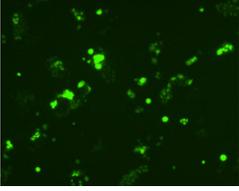
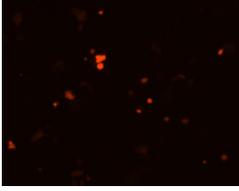
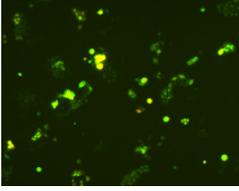
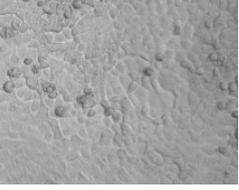
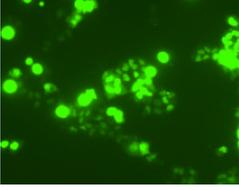
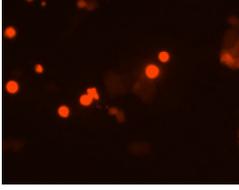
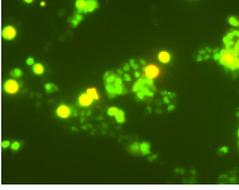
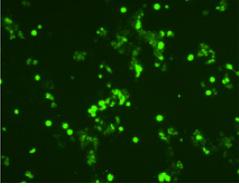
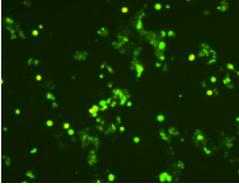
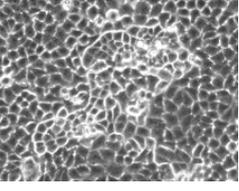
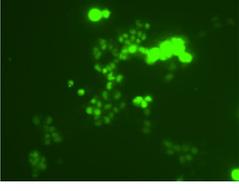
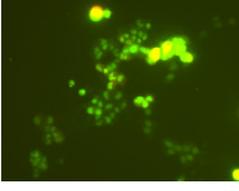
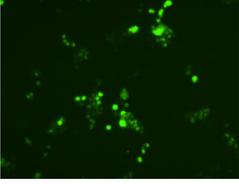
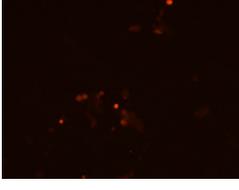
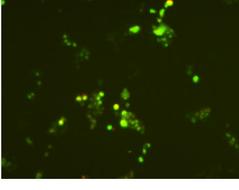
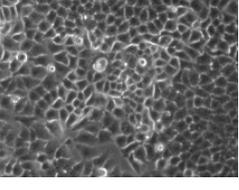
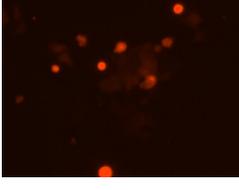
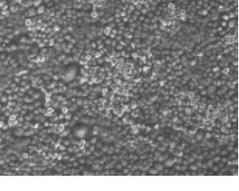
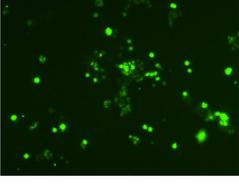
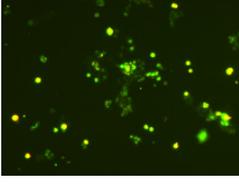
	Durchlicht	grüner Filter	roter Filter	grüner+roter Filter
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Coplattierung von transduzierten COS-1 Zellen und nicht-transduzierten HeLa Zellen in verschiedenen Mischungsverhältnissen. Die Transduktion erfolgte mit einem adenoviralen Vektor, der für eine duale Expressionskassette kodiert (Ad VP22-GFP/DsRed). Dadurch erscheinen alle primär transduzierten COS-1 Zellen unter den entsprechenden Filtern sowohl rot (DsRed) als auch grün (VP22-GFP). Mittels Überlagerung der beiden Aufnahmen erscheinen alle primär transduzierten COS-1 Zellen gelb. Die umliegenden HeLa Zellen, die das Fusionsprotein sekundär durch den *Bystander*-Effekt erhielten, fluoreszierten dagegen lediglich grün. Es werden verschiedene Vergrößerungsbilder gezeigt (Übersicht: 10x; restlichen Bilder 40x). Im Durchlichtbild sind die Zellen ohne Immunfluoreszenz zu sehen.

Zeile 1: COS-1 Zellen, transduziert mit Adenovirus VP22-GFP/DsRed (MOI 50), coplattiert mit HeLa Zellen (1:10), 40-fache Vergrößerung.

Zeile 2: COS-1 Zellen, transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 50), coplattiert mit HeLa Zellen (1:10), Übersichtsvergrößerung (10x).

Zeile 3: COS-1 Zellen, transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 100), coplattiert mit HeLa Zellen (1:10), Vergrößerung: 40x

Zeile 4: COS-1 Zellen, transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 100), coplattiert mit HeLa Zellen (1:10), Übersichtsvergrößerung (10x).

Zeile 5: COS-1 Zellen, transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 50), coplattiert mit HeLa Zellen (1:20), Vergrößerung: 40x

Zeile 6: COS-1 Zellen, transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 50), coplattiert mit HeLa Zellen (1:20), Übersichtsvergrößerung (10x).

Zeile 7: COS-1 Zellen transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 100), coplattiert mit HeLa Zellen (1:20), Vergrößerung: 40x

Zeile 8: COS-1 Zellen, transduziert mit Ad VP22-GFP/DsRed (MOI 100), coplattiert mit HeLa Zellen (1:20), Übersichtsvergrößerung (10x).

### 3.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Um den *Spread* der Fusionsproteine aus *VP22* und dem Suizidgenprotein SCD nachzuweisen, wurde ein indirektes Immunfluoreszenzverfahren mit Hilfe von Antikörpern benutzt. Dazu wurden COS-1 Zellen auf 6-Well-Platten in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät und nach 24 h transduziert. Nach weiteren 24 h wurden die COS-1 Zellen auf Deckgläschen mit nicht infizierten HeLa Zellen 1:10 coplattiert. Wiederum einen Tag später erfolgte die Färbung mittels Immunfluoreszenz (siehe 2.6.1). Am darauf folgenden Tag konnten die Zellen mikroskopiert und somit der Transport mittels rot oder grün leuchtender Zellen detektiert werden. Der Transport wurde mit einer Kamera, die am Fluoreszenzmikroskop installiert war, festgehalten.

Da kein Primärantikörper gegen *TLM* zur Verfügung stand, konnte der Transportnachweis nur für das Motiv *VP22* erfolgen. Bei der Verwendung des Primärantikörpers gegen SCD zeigte sich allerdings nach mehrfacher Testung unter unterschiedlichen Bedingungen auf verschiedenen Zelllinien stets eine unspezifische Färbung. Der SCD-Antikörper war somit zwar gut für die Westernblotanalyse, nicht aber für Immunfluoreszenzverfahren geeignet.

COS-1 Zellen haben ein Oberflächenantigen des Simian Virus 40 stabil in ihr Genom integriert: das *SV40 large T-Antigen*. Dieses Antigen diente deshalb zur Erkennung der COS-1 Zellen, indem ein Primärantikörper (Maus-Ursprung) der Fa. Probst in einer Verdünnung von 1:20 zur Kennzeichnung des T-Antigens verwendet wurde. Anschließend wurde ein mit rotem Immunfluoreszenzfarbstoff (Alexa546™-konjugiert) gekoppelter Sekundärantikörper zum Anfärben der COS-1 Zellen verwendet. Der Sekundärantikörper war ein Anti-Maus-Antikörper der Fa. Molecular Probes und wurde 1:1000 verdünnt.

Der Transport der Fusionsproteine wurde mithilfe eines grünen Immunfluoreszenzfarbstoffs sichtbar gemacht. Der Primärantikörper richtete sich gegen das Motiv *VP22* (Kaninchen), von P. O'Hare zur Verfügung gestellt und wurde 1:500 verdünnt. Der Sekundärantikörper der Fa. Vector war an einen grünen Immunfluoreszenzfarbstoff (FITC) konjugiert und wurde 1:100 verdünnt verwendet.

Die Bilder in Abbildung 9 wurden wie zuvor auch bei der direkten Immunfluoreszenz - wiederum mittels spezifischer Filter in die einzelnen Farbkomponenten unterteilt. Es wurden Durchlichtbilder ohne Filter gemacht. Weiter wurde ein grüner Filter, der alle Zellen zeigen sollte, die das Fusionsprotein enthielten, ein roter Filter, der alle COS-1 Zellen zeigen sollte und eine Überlagerung von grünem und rotem Filter verwendet. Durch die Überlagerung der Aufnahmen wurden primär transduzierte COS-1 Zellen wiederum als gelb detektiert.

Als funktionelle Negativkontrolle des Versuchs wurden die einzelnen Antikörper getestet. Im Resultat erschien bei keinem Ansatz eine unspezifische Färbung (Ergebnisse nicht gezeigt). Außerdem wurden drei weitere Ansätze als Negativkontrollen verwendet (siehe Abbildung 9, Zeilen 1-3): ein Ansatz mit unbehandelten COS-1 Zellen (Zeile 1), einer mit COS-1 Zellen, die mit Adenovirus ohne Expressionskassette transduziert wurden (Zeile 2), und ein dritter Ansatz mit COS-1 Zellen, die mit Ad SCD transduziert wurden (Zeile 3). Alle Ansätze wurden mit HeLa Zellen coplattiert. Es zeigte sich bei allen drei Negativkontrollen ein ähnliches Bild. Unter grünem Filter, der den *Spread* verdeutlichen sollte, war ein schwacher grüner Hintergrund zu detektieren, jedoch keine spezifische Fluoreszenzfärbung. Die COS-1 Zellen leuchteten unter passendem Filter rot. Unter Überlagerung von rot und grün leuchteten die COS-1 Zellen gelb. In den Negativkontrollen wurden keine *VP22*-Proteine detektiert.

Als Positivkontrolle, in Abbildung 9, Zeile 4 dargestellt, dienten COS-1 Zellen, die mit dem adenoviralen Vektor Ad *VP22*-GFP transduziert wurden. Bei *VP22*-GFP handelt es sich um ein Fusionsprotein, das durch die Proteinkomponente GFP (green fluorescein protein) selbst grün fluoresziert. Deshalb leuchteten die COS-1 Zellen der Positivkontrolle in einem kräftigen Grün. Die HeLa Zellen, die direkt im Umfeld der transduzierten COS-1 Zellen lagen, erhielten das Fusionsprotein mittels Transport und leuchteten ebenfalls grün, verglichen mit den COS-1 Zellen aber schwächer. Die COS-1 Zellen erschienen mit entsprechendem Filter neben grün auch rot. In der Überlagerung waren gelbe COS-1 Zellen und grün gefärbte HeLa Zellen zu detektieren.

Die Ansätze mit SCD-*VP22* (Abbildung 9, Zeile 5) und *VP22*-SCD (Abbildung 9, Zeile 6) zeigten ähnliche Ergebnisse, die dem Anfärbeverhalten der Positivkontrolle entsprachen. Die COS-1 Zellen wurden mit dem jeweiligen Virus transduziert und leuchteten nach Anfärben mit den Antikörpern unter den entsprechenden Filtern rot und grün, in der Überlagerung gelb. Die umliegenden HeLa Zellen enthielten ebenfalls das Fusionsprotein und leuchteten grün (verglichen mit der Positivkontrolle durch den Modus der indirekten Anfärbung jedoch wesentlich schwächer). Im Ergebnis zeigten sich die ähnliche Stärke der Immunfluoreszenz und die ähnliche Anzahl der Zellen, die vom *Spread* erreicht wurden, unabhängig davon, ob das *VP22* Motiv N- oder C-terminal mit dem SCD Suizidgenprotein verknüpft wurde.

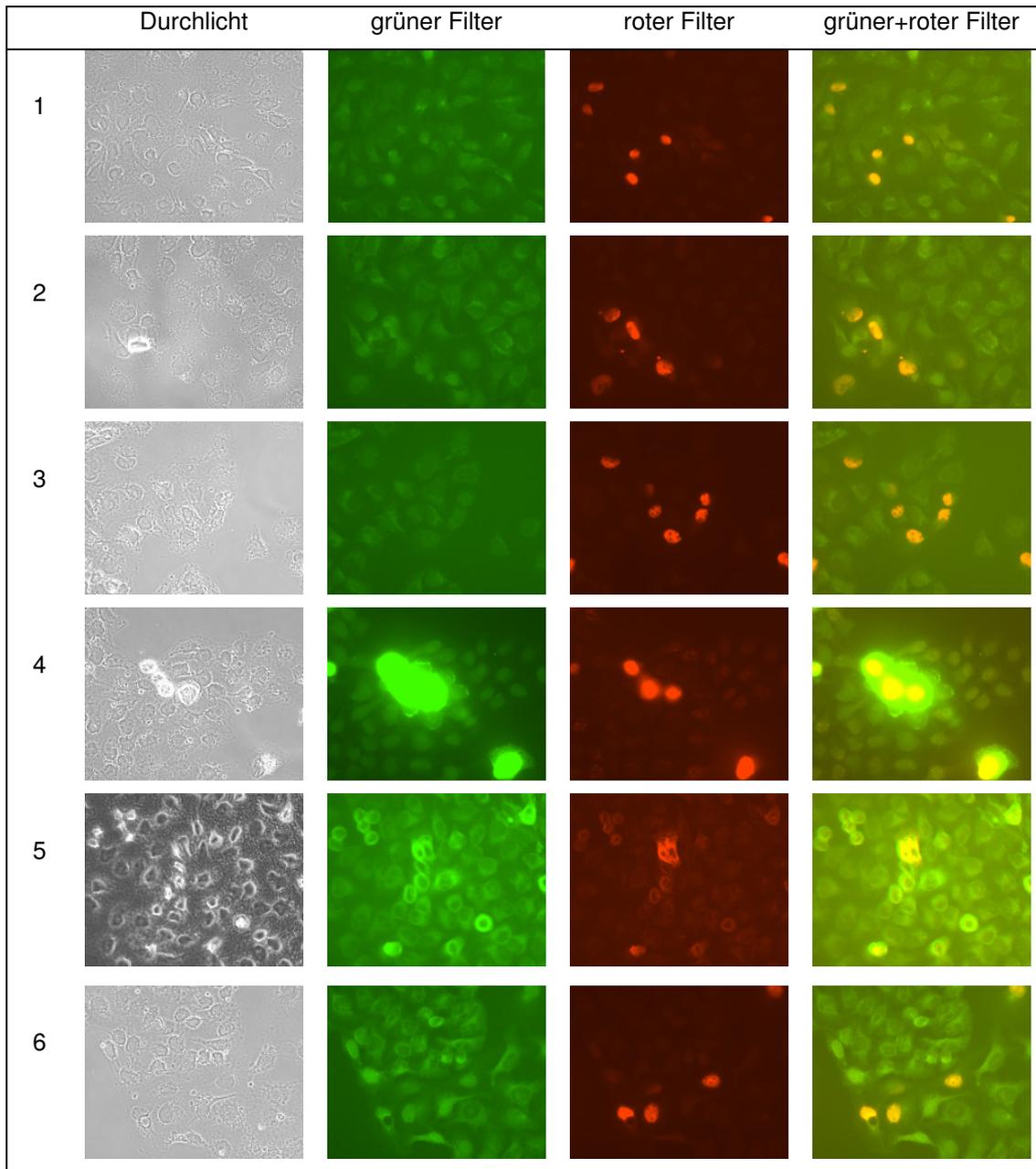


Abbildung 9 zeigt Immunfluoreszenzbilder, die den interzellulären Transport der Fusionsproteinen *VP22-SCD* und *SCD-VP22* belegen. Dazu wurden COS-1 Zellen transduziert und mit HeLa Zellen 1:10 coplattiert. Anschließend wurden Primärantikörper gegen *VP22* (Kaninchen) und gegen das in COS-1 Zellen exprimierte *SV 40 large T-Antigen* (Maus) der COS-1 Zellen verwendet. Als Sekundärantikörper dienten an Immunfluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper, nämlich ein Anti-Kaninchen Antikörper, der an FITC (grün), und ein Anti-Maus Antikörper, der an den roten Farbstoff Alexa546™ gekoppelt war. Die COS-1 Zellen leuchteten rot, die Zellen, die das Fusionsprotein entweder durch Transduktion oder durch *VP22*-vermittelten interzellulären Transport erhielten, leuchteten grün. In der Überlagerung ist es möglich, die COS-1 Zellen von den HeLa Zellen zu unterscheiden, da die COS-1 Zellen sowohl rot als auch grün (in der Überlagerung also gelb) fluoreszieren, während die HeLa Zellen nur grün fluoreszieren. Im Durchlichtbild sind die Zellen ohne Immunfluoreszenz zu sehen.

Zeile 1: nicht transduzierte COS-1 Zellen mit HeLa Zellen coplattiert.

Zeile 2: COS-1 Zellen (transduziert mit einem Adenovirus, das für kein Fremdgen kodiert), coplattiert mit HeLa Zellen.

Zeile 3: COS-1 Zellen mit einem Adenovirus transduziert, der für das Suizidgen SCD kodiert, mit HeLa Zellen coplattiert.

Zeile 4: COS-1 Zellen mit Adenovirus transduziert, der VP22-GFP, ein Fusionsprotein aus dem Motiv VP22 und GFP, mit HeLa Zellen coplattiert; Positivkontrolle.

Zeile 5: COS-1 Zellen mit Adenovirus transduziert, der für SCD-VP22 kodiert, mit HeLa Zellen coplattiert.

Zeile 6: COS-1 Zellen mit Adenovirus transduziert, der für VP22-SCD kodiert, mit HeLa Zellen coplattiert.

### **3.4. Nachweis der Funktionalität - der Cytotoxizitätsassay**

Zur Untersuchung der Funktionalität der über die entsprechenden viralen Vektoren oder von Plasmiden vermittelten Suizidgenaktivität und deren Effizienzsteigerung durch die Kopplung mit Zellpermeabilität-vermittelnden Faktoren diente der SRB-Vitalitätsassay.

Dazu wurden MH-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^4$  in 24-Well-Platten ausgesät und nach 24 h Inkubation mit entsprechenden Viren transduziert oder mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. Nach weiteren 24 h begann die Behandlung mit der Prodrug 5-Fluorcytosin (5-FC) in verschiedenen Konzentrationen von 0 mM bis 10 mM (siehe 2.5). Die Zellen wurden über 5 Tage mit der Prodrug inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert, angefärbt und die optische Dichte vermessen. Je geringer die vermessene optische Dichte ausfiel, desto kleiner war die Zahl überlebender Zellen und desto größer der cytopathische Effekt. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gefärbten Zellen, welche die 5-FC-Applikation überlebt hatten, und der vermessenen optischen Dichte nach Freisetzung bzw. Extraktion des SRB-Farbstoffes aus den Zellen.

Als Negativkontrolle dienten nicht-transduzierte MH-Zellen, die mit derselben Menge an 5-FC behandelt wurden. Das Wachstum der MH-Zellen war von der

alleinigen Anwesenheit der *Prodrug* kaum beeinflusst. Erst bei sehr hohen 5-FC-Konzentrationen war eine 5-FC eigene Toxizität zu beobachten. Im Folgenden wurde der Wert der Adenovirus-infizierten Zellen ohne Zugabe von *Prodrug* auf 100 % festgesetzt und alle anderen Messwerte hierauf bezogen.

Als interne Positivkontrolle wurde die Zelllinie MH-SCD verwendet, welche das Suizidgen SCD stabil exprimiert. Hier starben die Zellen schon bei Zugabe von sehr geringen Mengen an 5-FC ab, was an der starken Abnahme der optischen Dichte zu sehen war.

### **3.4.1. Transfektion mit Plasmiden**

Hierbei wurde wie oben beschrieben verfahren. Abbildung 10 zeigt die entsprechenden 24-Well-Platten nach fünftägiger 5-FC-Behandlung. Anhand der farblichen Änderung ist das Absterben der Zellen zu detektieren.

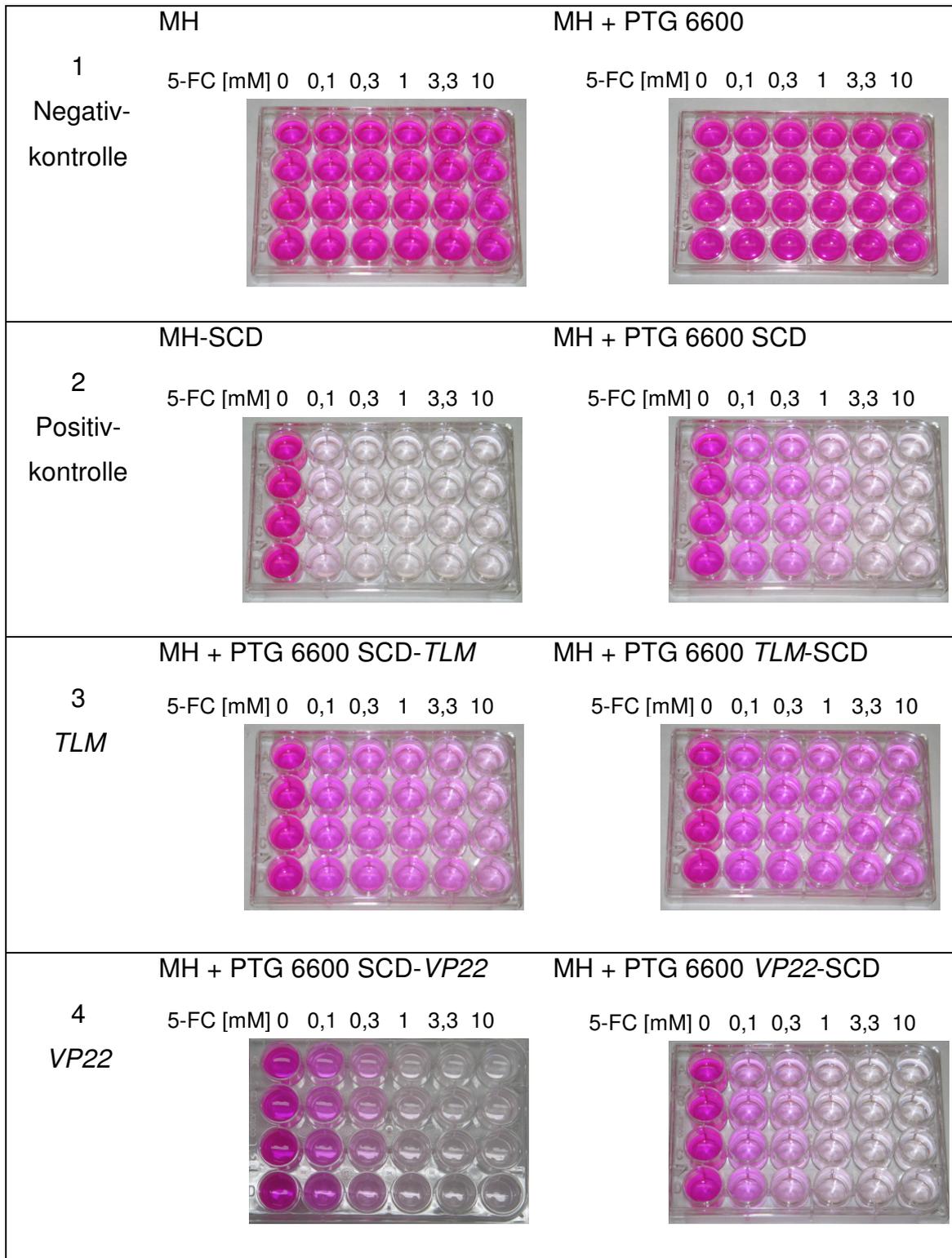


Abbildung 10 zeigt die Quantifizierung der Suizidgen-vermittelten Abtötung Plasmid-transfizierter MH-Zellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC *Prodrug*-Applikation mittels SRB-Vitalitätsassays. Überlebende Zellen wurden mit 10 % TCA fixiert und mit SRB-Lösung gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen mit TCA entfernt und proteingebundener Farbstoff mit 10 mM Tris-Base extrahiert. Es besteht ein linearer

Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gefärbten Zellen, welche die 5-FC-Applikation überlebt haben, und der vermessenen optischen Dichte nach Freisetzung bzw. Extraktion des SRB-Farbstoffes aus den Zellen. Als Negativkontrollen dienten nicht-infizierte MH-Zellen (Zeile 1, links), sowie MH-Zellen, die mit reinem Plasmid (ohne Kodierung einer Transgen-Kassette) transfiziert wurden (Zeile 1, rechts). Bei beiden war zu sehen, das 5-FC nur in einer sehr hohen Konzentration schädigend auf Zellen wirkt, die das Suizidgen nicht enthielten. Bei der Positivkontrolle (Zeile 2) MH-SCD war der mit steigender 5-FC-Konzentration zunehmende cytopathische Effekt an der Abnahme der optischen Dichte und damit der Zahl überlebender Zellen deutlich zu erkennen. Bei MH-Zellen, die mit dem SCD exprimierendem Plasmid PTG 6600 SCD transfiziert wurden, war der cytopathische Effekt ebenfalls deutlich zu sehen, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie mit der stabilen Zelllinie. Bei den Transfektionen mit den Plasmiden PTG 6600 *TLM-SCD* bzw. PTG 6600 *SCD-TLM* (Zeile 3, links und rechts) starben die Zellen im Vergleich zu dem Ansatz MH + PTG 6600 SCD weniger stark ab (Zeile 2, rechts). Die Transfektionen mit den Plasmiden PTG 6600 *VP22-SCD* und PTG 6600 *SCD-VP22* zeigten eine starke Abtötung der Zellen. Für jede 5-FC-Konzentration wurden jeweils Vierfachbestimmungen ausgeführt.

Die gemessenen Werte wurden in Relation zur uninfizierten MH-Zellpopulation gesetzt und in eine Grafik eingetragen (Abbildung 11).

Die Positivkontrolle MH-SCD vermittelte ein rasches Absterben der Zellen. Die Negativkontrolle der Cytotoxizitäts-Messungen wurden von zwei Ansätzen gebildet: (i) aus uninfizierten MH-Zellen und (ii) aus MH-Zellen, die mit dem Leer-Plasmid PTG 6600 (keine Kodierung einer Expressionskassette) transfiziert wurden. Beide Ansätze zeigten bei niedrigen 5-FC-Konzentrationen wie erwartet keine Inhibition des Zellwachstums. Steigerte man die 5-FC-Konzentration auf 10 mM, konnte ein deutliches Absterben detektiert werden. Das Suizidgen SCD zeigte schon bei niedrigen Konzentrationen der *Prodrug* ein starkes Absterben der Zellen. Bei einer 5-FC-Konzentration von 0,1 mM waren verglichen mit der Negativkontrolle 84 % der infizierten MH-Zellen abgestorben.

Bei der Testung der Fusionsproteine aus SCD und dem *Translocation Motif* (*TLM*) ergaben sich bei den Ansätzen mit *TLM-SCD* und *SCD-TLM* ähnlich verlaufende sigmoide Cytotoxizitäts-Kurven (siehe Abbildung 11) wie bei SCD (Basiskontrolle; keine Kodierung für das *TLM Translocation Motif*). Dabei zeigte sich keine Verbesserung des Suizidgen-Effektes. Der 0,1 mM Wert von *TLM-SCD* lag bei 24 %; dieser war somit um das 1,4-fache schlechter als der 0,1 mM Wert von SCD. Der entsprechende Wert beim Fusionsprotein *SCD-TLM* lag bei 20 %. Dies entsprach einer Verschlechterung um das 1,3-fache gegenüber dem 0,1 mM Wert von SCD. Die C-terminale Verknüpfung des

Fusionsproteins SCD-*TLM* erschien dabei noch besser zu sein als die N-terminale Verknüpfung *TLM*-SCD.

Bei Anwesenheit des *VP22*-Transport-Proteins war eine stärkere Abtötung zu detektieren. Die Kurven zeigten wiederum einen ähnlichen Verlauf wie das Suizidgen alleine, jedoch mit einem stärker ausgeprägten Effekt. Die 0,1 mM Werte nach 5-tägiger Inkubation mit der *Prodrug* 5-FC betragen für *VP22*-SCD 10 % und für SCD-*VP22* 12 %. Im Vergleich zum SCD-Gen konnte eine Verbesserung des Effektes um das 1,6-fache (*VP22*-SCD) bzw. um das 1,4-fache (SCD-*VP22*) gezeigt werden.

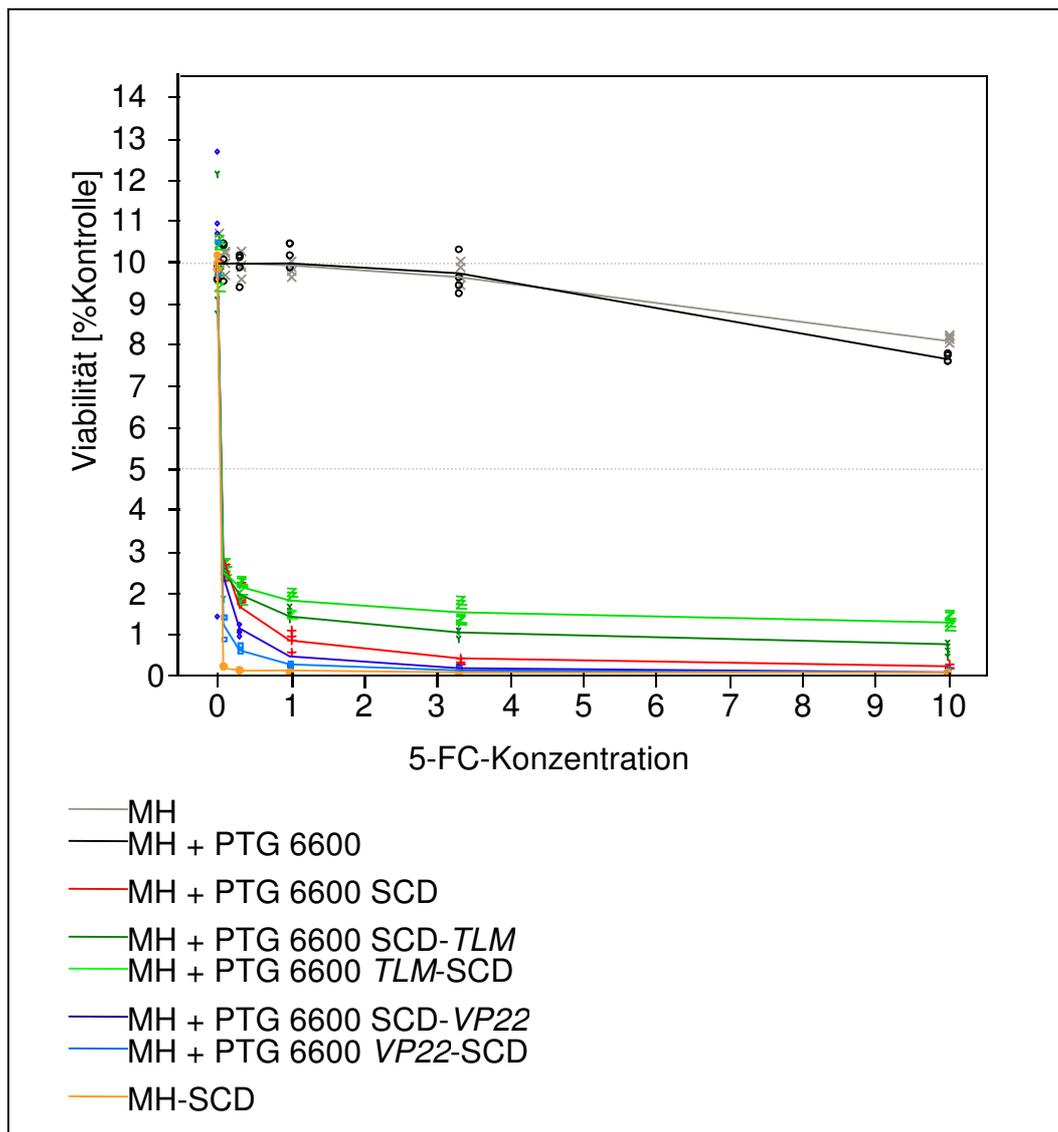


Abbildung 11 zeigt den Verlauf des Überlebens in % der Kontrolle transfizierter Zellen ohne Zugabe von *Prodrug*. Die Zellen wurden mit oben gezeigten Plasmidvektoren transfiziert: ihre optische Dichte wurde nach Anfärben mit dem SRB-Farbstoff nach 5-tägiger Inkubation mit 5-FC vermessen (siehe 2.5).

Um die einzelnen Kurven miteinander vergleichen zu können, wurde eine statistische Varianzanalyse (Dunnett-Test) verwendet. Er erfasst den Unterschied der Verläufe und adjustiert diese auf das multiple Signifikanzniveau 5 %. Hierbei wurden die Logarithmen der Mittelwerte unter Behandlung mit 5-FC berechnet; das bedeutet die Werte zwischen 0,1 mM und 10 mM wurden gemittelt und logarithmiert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 12 dargestellt.

Die Infektion mit den *TLM*-verknüpften Vektoren ist somit im Ergebnis weniger effektiv verglichen mit der Infektion des Suizidgens alleine. Ob eine N- oder C-terminale Orientierung angewandt wurde, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Abtötungswirkung auf Hepatomzellen. Demgegenüber zeigten Fusionsproteine aus *VP22* und dem Suizidgen jedoch eine Verstärkung des Abtötungseffektes verglichen mit *SCD*. Dabei zeigte *VP22-SCD* die stärkste Toxifizierungseigenschaft.

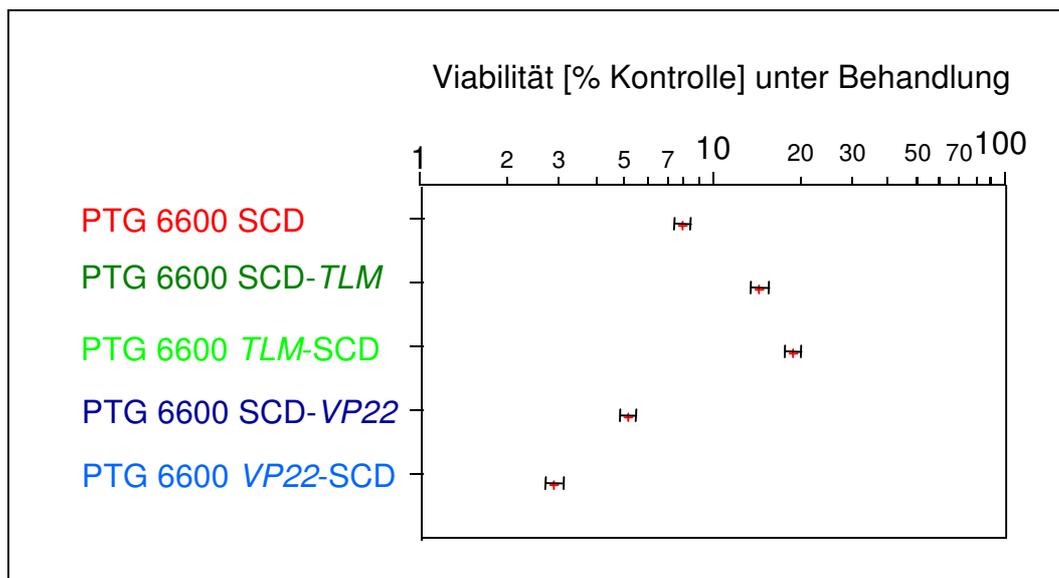


Abbildung 12 zeigt mittels Dunnett-Test berechnete logarithmierte Mittelwerte der Suizid-Effektivität der einzelnen transfizierten Zelllinien unter 5-FC-Behandlung.

### 3.4.2. Transduktion mit adenoviralen Vektoren

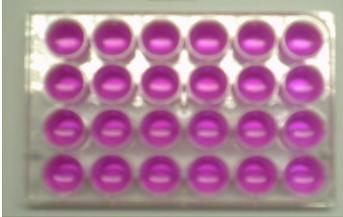
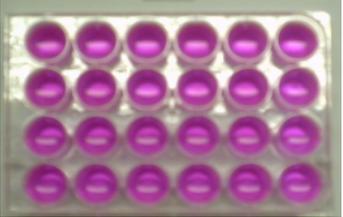
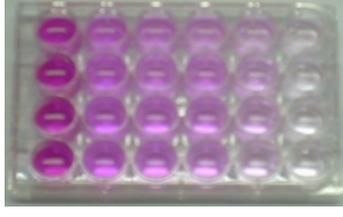
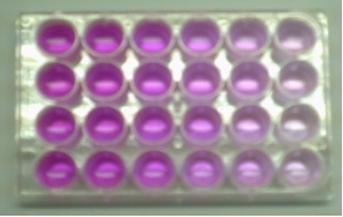
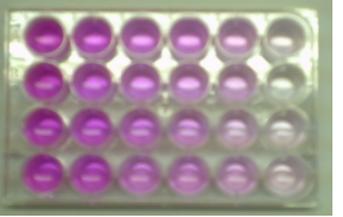
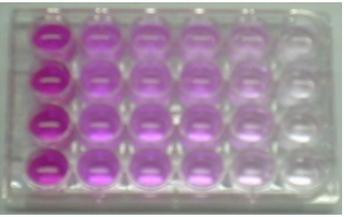
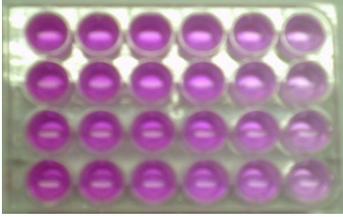
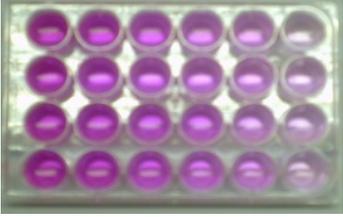
Hier dienten die den Plasmiden aus 3.4.1 entsprechenden Adenoviren als Vektoren. Für die Infektion wurden verschiedene Mengen Virus eingesetzt (MOI 50, MOI 200 und MOI 500). Der Ablauf war wie oben beschrieben.

#### 3.4.2.1. Nachweis von *TLM-SCD* und *SCD-TLM*

Zum Nachweis der funktionellen Wirkung der eingesetzten Fusionsproteine wurde wiederum ein SRB-Cytotoxizitätsassay verwendet. Es wurde pro 24-Well-Platte, also pro Ansatz, eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Bestätigung des *TLM*-vermittelten Suizidgeneffektes wurde in zwei verschiedenen Infektionsmengen erbracht.

In Abbildung 13 sind 24-Well-Platten nach Anfärbung der überlebenden Zellen gezeigt. Am Farbumschlag sieht man die Dichte lebender Zellen. Die Negativkontrollen stellen nicht-transduzierte MH-Zellen sowie MH-Zellen dar, die mit Adenoviren ohne Expressionskassette (Ad 0) transduziert wurden. Es war kein Absterben dieser Zellen zu sehen (Abbildung 13, Zeile 1). In den Zeilen 2 und 4 sind die Positivkontrollen gezeigt: MH-SCD, eine Zelllinie, die das Suizidgen stabil exprimiert (Zeile 2, links), und mit Ad SCD transduzierte MH-Zellen (Zeile 2, rechts: MOI 200; Zeile 4: MOI 500). Die Abnahme der optischen Dichtewerte detektiert das Absterben der Zellen und somit den cytopathischen Effekt. Im Ergebnis ist dieser bei der stabilen Zelllinie deutlich stärker ausgeprägt (Zeile 2, links) als bei den adenoviralen Transduktionen (Zeile 2, rechts, und Zeile 4). Die Farbtintensität nimmt schon bei sehr kleinen 5-FC-Konzentrationen ab.

Die Well-Platten mit den *TLM-SCD* und *SCD-TLM* Proben sind in Zeile 3 (MOI 200) und Zeile 5 (MOI 500) dargestellt. Der cytopathische Effekt der Fusionsproteine ist in beiden Orientierungen schwächer als bei der Transduktion von MH-Zellen mit dem Suizidgen SCD alleine. Dies gilt unabhängig von der Transduktionsdosis (MOI 200 und MOI 500).

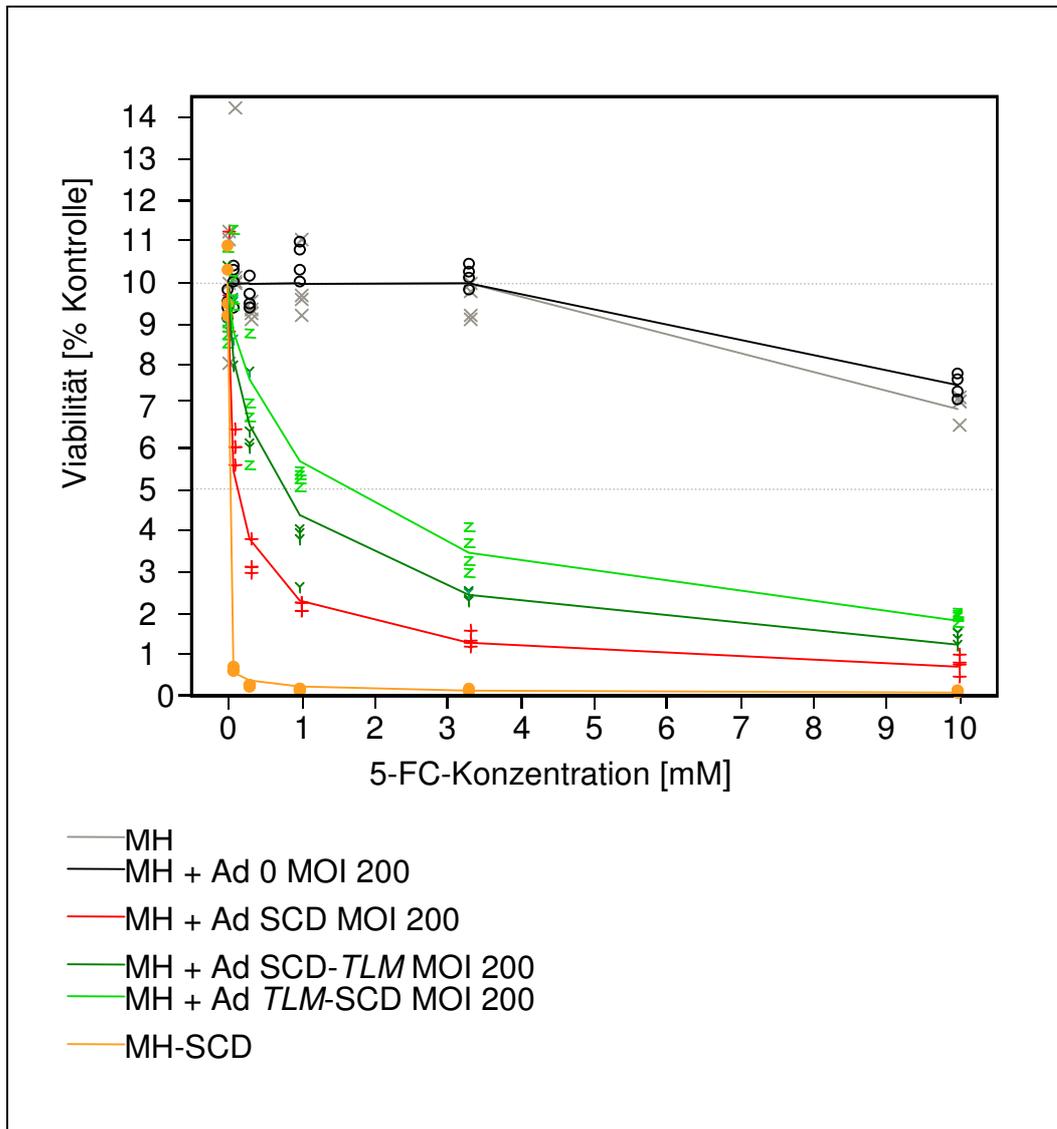
<p>1 Negativ- kontrolle</p>	<p>MH 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 	<p>MH + Ad 0 MOI 200 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 
<p>2 Positiv- Kontrolle</p>	<p>MH-SCD 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 	<p>MH + Ad SCD MOI 200 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 
<p>3 <i>TLM</i></p>	<p>MH + Ad SCD-<i>TLM</i> MOI 200 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 	<p>MH + Ad <i>TLM</i>-SCD MOI 200 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 
<p>4 Positiv- kontrolle</p>	<p>MH + Ad SCD MOI 500 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 	
<p>5 <i>TLM</i></p>	<p>MH + Ad SCD-<i>TLM</i> MOI 500 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 	<p>MH + Ad <i>TLM</i>-SCD MOI 500 5-FC [mM] 0 0.1 0.3 1 3.3 10</p> 

In Abbildung 13 ist die Quantifizierung der Suizidgen-vermittelten Abtötung Virus-transduzierter MH-Zellen fünf Tage nach Beginn der 5-FC-Applikation mittels SRB-Vitalitätsassays dargestellt. Überlebende Zellen wurden fixiert und mit SRB-Lösung gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen mit TCA entfernt und protein-gebundener Farbstoff mit 10 mM Tris-Base extrahiert. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz an gefärbten Zellen, welche die 5-FC-Applikation überlebt haben, und der vermessenen optischen Dichte nach Freisetzung bzw. Extraktion des SRB-Farbstoffs aus den Zellen. Als Negativkontrolle (Zeile 1) dienten nicht-infizierte MH-Zellen, sowie MH-Zellen, die mit Adenovirus ohne Transgen-Kassette (Ad 0) transduziert wurden. Bei beiden war zu sehen, dass 5-FC nur in einer sehr hohen Konzentration schädigend auf die Zellen wirkt. Bei den Positivkontrollen MH-SCD (Zeile 2, links) und mit Ad SCD transduzierten MH-Zellen (Zeile 2, rechts, und Zeile 4) war mit steigender 5-FC-Konzentration ein zunehmend cytopathischer Effekt an der Abnahme der optischen Dichte und damit der Zahl überlebender Zellen zu erkennen. Bei den Transduktionen mit Ad *TLM*-SCD bzw. Ad SCD-*TLM* (Zeilen 3 und 5) starben die Zellen verglichen mit dem Ansatz MH + Ad SCD weniger stark ab als erwartet. Diese geringere Effektivität war unabhängig von der Menge Virus, die verwendet wurde. Für jede 5-FC-Konzentration wurden jeweils Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Die Extinktionen stehen im linearen Zusammenhang zum Überleben der behandelten Zellen und wurden zur Veranschaulichung in eine Grafik eingetragen (Abbildung 14 und Abbildung 15). Transduzierte Zellen ohne Zugabe von *Prodrug* dienten als Kontrolle, zu denen die anderen Ansätze in Relation gesetzt wurden (Basiswert von 100%). Die unterschiedlichen MOI wurden in verschiedenen Grafiken dargestellt (MOI 200 in Abbildung 14 und MOI 500 in Abbildung 15).

In den Negativkontrollen beider Versuche überlebten bei niedrigen 5-FC-Konzentrationen nahezu alle Zellen, erst in der höchsten Konzentration von 10 mM starben Zellen ab. Die interne Positivkontroll-Zelllinie MH-SCD, die das Suizidgen stabil exprimiert, zeigte schon bei 0,1 mM 5-FC ein starkes Absterben. Es lebten nur noch weniger als 10 % der Zellen. Die Transduktion der Zellen mit dem Suizidgen zeigte bei einer MOI von 200 bei 0,1 mM ein Überleben von 47 %, bei einer MOI 500 23 %. Je mehr Virus bei der Transduktion verwendet wurde, desto ausgeprägter starben die Zellen ab. Bei einer MOI von 200 lebten unter Behandlung mit einer 5-FC-Konzentration von 0,1 mM noch 73 % der mit *TLM*-SCD transduzierten Zellen, bei MOI 500 noch 56 %. Die umgekehrte Orientierung SCD-*TLM* verhielt sich ähnlich; es lebten bei 0,1 mM 5-FC und unter Infektionsmenge MOI 200 noch 77 %, unter MOI 500 noch 59 % der MH-Zellen. Verglichen mit dem Suizidgen SCD alleine entsprach dies jedoch einem Effizienzverlust bei MOI 200 um das 1,5-fache für

*TLM-SCD* und um das 1,6-fache für *SCD-TLM*. Steigerte man die Menge Virus auf MOI 500 änderte sich der Unterschied zwischen den Abtötungseffekten der Fusionsproteine und dem ungekoppelten Suizidgenprotein. *TLM-SCD* war um das 2,4-fache und *SCD-TLM* um das 2,6-fache schlechter als *SCD*.



In Abbildung 14 ist das Überleben der mit 5-FC behandelten Zellen dargestellt. Die transduzierten MH-Zellen ohne *Prodrug*-Behandlung wurden als 100 % in Relation zu den anderen Zellen gesetzt. Die Negativkontrollen (MH: nicht-transduzierte MH-Zellen) sowie MH-Zellen, die mit Adenovirus ohne Expressionskassette (Ad 0) transduziert wurden, zeigten erst in sehr hohen *Prodrug*-Konzentrationen Absterbungstendenzen. 5-FC ist bekanntermaßen in hohen Konzentrationen zelltoxisch. Die interne Positivkontrolle, die stabile Zelllinie MH-SCD, zeigte das schnellste Absterben der Zellen. Die Behandlung der Zellen mit dem adenoviralen Vektor, der nicht-gekoppeltes Suizidgen exprimiert, zeigte eine höhere Effizienz als bei Vektor-gestützter Expression der Fusionsproteine *TLM-SCD* und *SCD-TLM*, wobei das Fusionsprotein *SCD-TLM* noch eine stärkere Wirkung aufwies als das Protein in umgekehrter Orientierung (*TLM-SCD*).

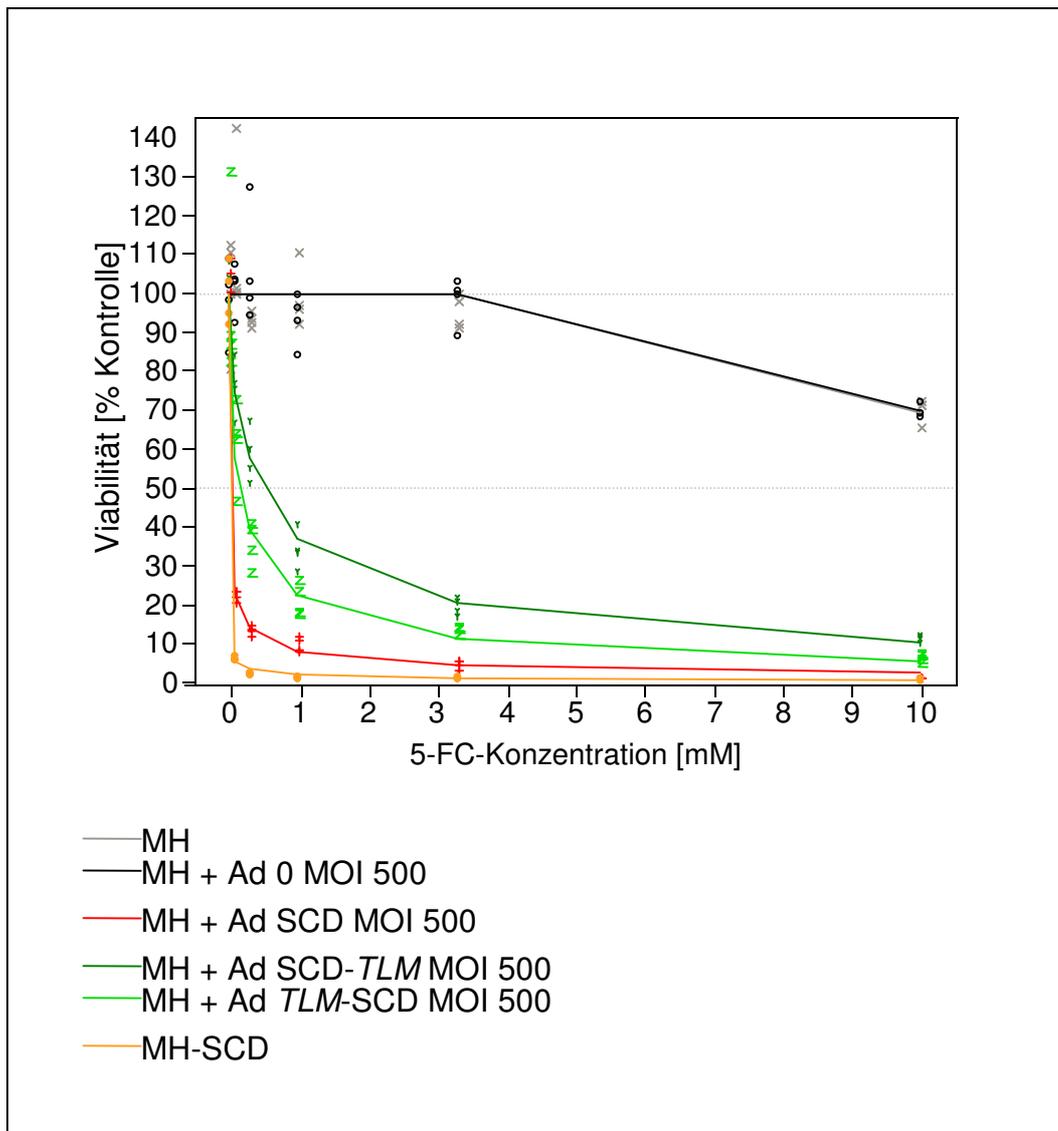
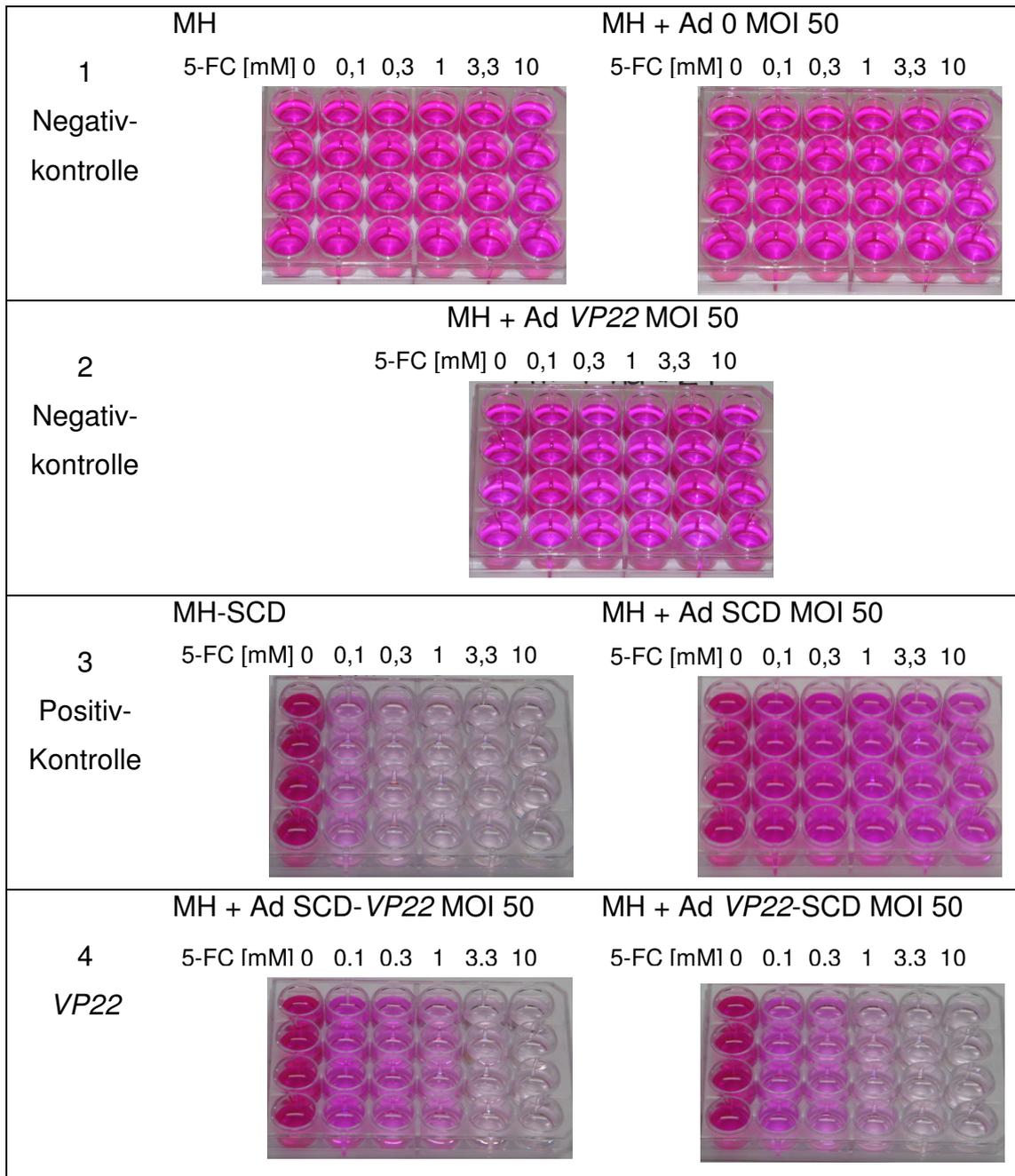


Abbildung 15 zeigt das Überleben von MH-Zellen unter der Behandlung mit 5-FC nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren. Die Zellen der Negativkontrollansätze starben erst bei hohen *Prodrug*-Konzentrationen ab. Die Abtötungseffizienz der Fusionsproteine *TLM-SCD* und *SCD-TLM* lag niedriger als bei dem Ansatz mit dem nicht-gekoppelten SCD Suizidgenprotein. Die Wirkung des N-terminal verknüpften *TLM-SCD* war hier gegenüber der anderen Orientierung (*SCD-TLM*) effektiver. Die stabile Zelllinie *MH-SCD* jedoch zeigte das effizienteste Abtötungsverhalten.

#### **3.4.2.2. Nachweis von VP22-SCD und SCD-VP22**

Weiter wurde die Wirkung der Fusionsproteine aus SCD und dem Motiv *VP22* getestet. Die adenoviralen Transduktionen wurden mit einer MOI von 50 durchgeführt. Hinsichtlich der Bestimmung der Abtötungseffizienz wurde wie oben bei der Testung von *TLM* Fusionsproteinen verfahren.

Eine weitere interne Negativkontrolle neben den nicht infizierten MH-Zellen und der Behandlung mit dem adenoviralen Leervektor Ad 0 wurden MH-Zellen auch mit dem Vektor Ad *VP22* transduziert, der alleinig für das Transportprotein *VP22* kodiert. *VP22* alleine ist nicht in der Lage, die *Prodrug* 5-FC umzusetzen. Deshalb wurde bei Einsatz von Ad *VP22* auch erwartungsgemäß keine Inhibition des Zellwachstums detektiert (Abbildung 16, Zeile 2). Die Testung der *VP22*-Fusionsproteine ergab ein nahezu gleiches Ergebnis wie die stabile Zelllinie MH-SCD, was an den ähnlich starken Farbintensitäten in Abbildung 16 zu sehen ist.



**Abbildung 16: SRB-Vitalitätsassays von MH-Zellen unter Behandlung mit 5-FC. Als Negativkontrollen dienten hier nicht infizierte MH Zellen (Zeile 1, links) sowie MH-Zellen, die mit Adenovirus ohne Expressionskassette (Ad 0; Zeile 1, rechts) transduziert wurden. Als weitere Negativkontrolle wurden mit Ad VP22 transduzierte MH-Zellen verwendet (Zeile 2). Bei allen Negativkontrollen war zu sehen, dass 5-FC nur in einer sehr hohen Konzentration (10 mM) schädigend auf die Zellen wirkt. Bei der Positivkontroll-Zelllinie MH-SCD (Zeile 3, links) war der mit steigender 5-FC-Konzentration zunehmende cytopathische Effekt an der Abnahme der optischen Dichte und damit der Zahl überlebender Zellen zu erkennen. Verglichen mit dem Ansatz nach Transduktion mit Ad SCD (Zeile 3, rechts) war der cytopathische Effekt nach Infektion mit Ad VP22-SCD bzw. Ad SCD-VP22 verstärkt (Zeile 4). Man benötigte niedrigere 5-FC Konzentrationen um den gleichen**

**Effekt zu erzielen. Für jede 5-FC-Konzentration wurden jeweils Vierfachbestimmungen ausgeführt.**

Die grafische Auswertung der Messwerte ist in Abbildung 17 zu sehen. Es war kein Absterben der Negativkontrollen in niedrigen *Prodrug*-Konzentrationen zu detektieren. Zu den Negativkontrollen zählten drei Ansätze: (i) nicht infizierte MH-Zellen, (ii) MH-Zellen transduziert mit Ad 0 und (iii) MH-Zellen mit Ad *VP22* transduziert. Erst bei einer 5-FC-Konzentration von 10 mM nahm die Überlebenskurve dieser Zellen ab.

Im Gegensatz dazu führte die Expression des Suizidgens SCD mit steigender Konzentration 5-FC zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl. Vergleicht man den inhibierenden Effekt von Ad SCD mit den adenoviralen Vektoren der *VP22*-SCD Fusionsproteine nach 5 Tagen Inkubation mit 5-FC, so ist für jeden einzelnen Messwert eine bessere Suizidgenwirkung der Fusionsproteine nachweisbar. Die beiden Orientierungen von *VP22* und SCD sind hinsichtlich der jeweiligen Abtötungseffizienz nahezu gleich gut wie die interne Positivkontrolle der stabilen Zelllinie MH-SCD. Bei einer 5-FC-Konzentration von 0,1 mM lebten in dem Ansatz von Ad SCD noch 64 % der Zellen. Im Gegensatz dazu starben unter Transduktion mit Ad SCD-*VP22* 83 % der Zellen (17 % überlebende Zellen) und mit Ad *VP22*-SCD 87 % der Zellen (12 % überlebende Zellen) ab. Das entsprach einer Effizienzsteigerung um den Faktor 5,2 für *VP22*-SCD und um 3,7 für SCD-*VP22* im Vergleich zur Transduktion mit nicht-fusioniertem Suizidgen.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass eine äußerst effektive *Prodrug*-Metabolisierung und damit ein starker cytopathischer Effekt sowohl durch das Fusionsprotein *VP22*-SCD als auch durch SCD-*VP22* vermittelt werden konnte, wobei im direkten Vergleich die N-terminale Verknüpfung (*VP22*-SCD) eine höhere Effizienzsteigerung bewirkt.

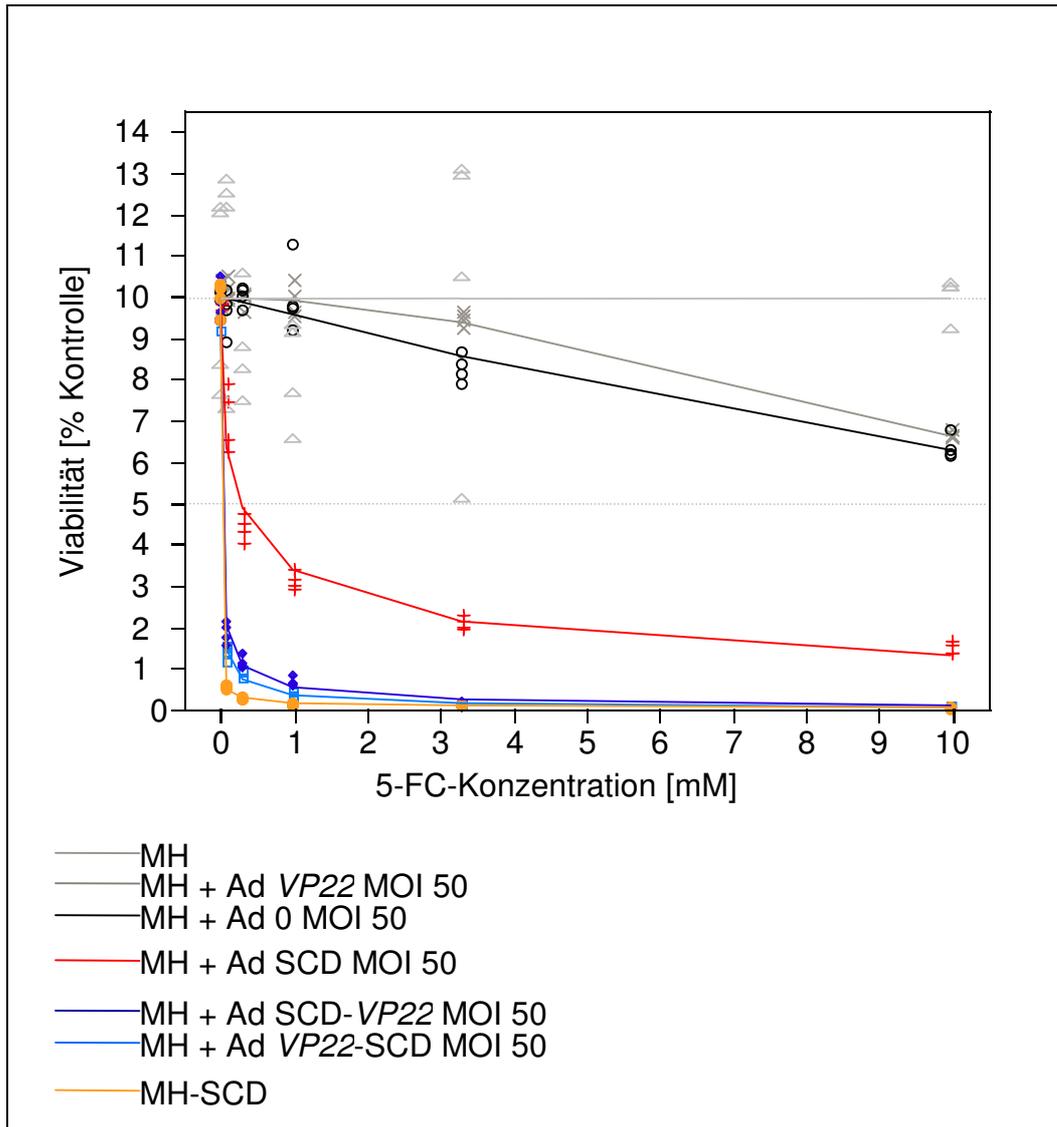


Abbildung 17 ist die grafische Darstellung des Überlebens von MH-Zellen, die mit den angezeigten adenoviralen Vektoren transduziert und nachfolgend mit 5-FC behandelt wurden. Die Negativkontrollen zeigen erst bei hohen *Prodrug*-Konzentrationen eine Absterbetendenz. Die Behandlung mit den VP22-SCD Fusionsproteinen zeigt ein sehr starkes Absterben der Zellen, nahezu gleich dem Absterben der stabilen MH-SCD-Zelllinie. Die Effizienz ist hier wesentlich stärker verglichen zur Transduktion mit einem lediglich für unfusioniertes SCD Suizidgen kodierenden Vektor.

Zum direkten Vergleich des adenoviral vermittelten Absterbens von Zellen wurden Logarithmen, Mittelwerte unter Behandlung mit 5-FC berechnet (dazu wurden die Werte zwischen 0,1 mM und 10 mM gemittelt und logarithmiert). Die Berechnung fand mittels einer statistischen Varianzanalyse, dem Dunnett-Test, statt.

Das Ergebnis in Abbildung 18 zeigt eine Abhängigkeit der Effektivität der 5-FC-Metabolisierung und damit des Absterbens von der eingesetzten viralen Partikelmenge. Je höher die MOI war, mit der transduziert wurde, desto stärker ausgeprägt war der cytopathische Effekt. Dies zeigte sich bei allen Vektoren. Weiter bestätigte sich die Vermutung aus der Plasmidtestung, dass die Transduktion mit den *TLM*-verknüpften Vektoren weniger effektiv als die Transduktion mit dem Suizidgen alleine war. Erst bei einer MOI von 500 konnten ähnlich gute Ergebnisse der *TLM*-Fusionsproteine verglichen mit SCD-Protein nach einer Transduktion mit einer MOI von lediglich 50 erreicht werden. Vergleicht man die *TLM*-Konstrukte miteinander, präsentiert sich ein uneindeutiges Ergebnis. Bei einer Partikelmenge von 200 wirkte das C-terminal mit *TLM* verknüpfte Fusionsprotein besser; bei einer MOI von 500 kehrte sich jedoch dieses Verhältnis um und die Wirkung des Fusionsproteines *TLM*-SCD erschien potenter.

Die Fusionsproteine aus *VP22* und dem Suizidgen zeigten verglichen mit SCD eine deutliche Verstärkung des Abtötungseffektes. Selbst mit einer Virusmenge von 500 Vektorpartikeln pro adressierte Zielzelle konnte das Suizidgen SCD keine annähernd guten Ergebnisse erreichen, wie die *VP22*-Konstrukte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Fusionsprotein *VP22*-SCD auf allen Ebenen (Plasmidebene, Ebene der adenoviralen Transduktion) die stärkste Toxifizierungseigenschaft zeigt.

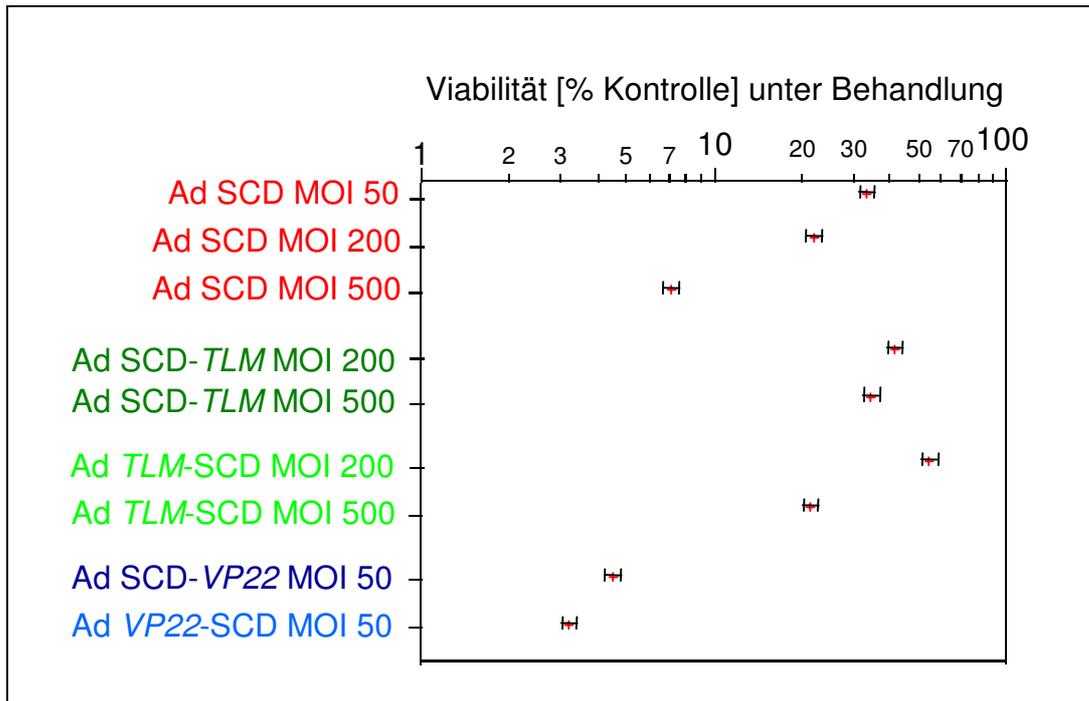


Abbildung 18 zeigt mittels Dunnett-Test berechnete logarithmierte Mittelwerte der einzelnen transduzierten Zelllinien unter 5-FC-Behandlung im Vergleich ihrer Suizidgen-Effektivität. Verglichen wurden Ansätze mit adenoviral vermittelten Fusionsproteinen gegen das Suizidgenprotein SCD alleine. Weiter wurden verschiedene Mengen an Vektorpartikeln untersucht (MOI 50, MOI 200, MOI 500). Je mehr Virus zur Transduktion verwendet wurde, desto stärker war der cytopathische Effekt ausgeprägt. Die *TLM*-Konstrukte waren verglichen mit dem ungekoppelten Suizidgen-Konstrukt in ihrer Abtötungseffizienz schwächer. *VP22*-Fusionsproteine dagegen zeigten eine sehr starke *Prodrug*-Metabolisierung und präsentierten dementsprechend die markanteste Abtötung der MH-Zellen.

## 4. Diskussion

Die Suizidgentherapie verfügt über das Potenzial, sich zu einem hoffnungsvollen Ansatz der Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln. Verschiedene präklinische und auch klinische Studien wurden bereits durchgeführt, in denen vor allem die adenovirale Suizidgentherapie viel versprechende Ergebnisse lieferte [43].

Ein Hauptproblem bisheriger Anwendungen der somatischen Gentherapie stellt allerdings die zu geringe Transduktionseffizienz dar, die mit den gegenwärtig verfügbaren viralen und auch nicht-viralen Vektoren erzielt werden kann. Eine Strategie, um diese Effizienz zu steigern, besteht in der Verwendung von Zellpermeabilität-vermittelnden Motiven. Als Fusionspartner der Motive wurde das Suizidgen Super-Cytosindesaminase (SuperCD = SCD), welches aus zwei Enzymen, der *Yeast-Cytosindesaminase* (YCD) und der *Yeast-Uracil-Phosphoribosyltransferase* (YUPRT) besteht, benutzt. Unter Verwendung von SCD konnte verglichen mit der bakteriellen Cytosindesaminase (BCD) oder der Cytosindesaminase der Hefe (YCD) ein gesteigerter Suizidgeneffekt *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt werden [28].

Als Zellpermeabilität-vermittelnde Motive wurden in der vorliegenden Arbeit das *Hepatitis B Virus* Peptid-Motiv TLM und das Protein VP22 von *HSV-1* verwendet. Zielstellung dieser Arbeit war es, eine Vorauswahl von TLM- und VP22-gekoppelten Suizidgen-Fusionsproteinen im Hinblick auf einen künftigen klinischen Einsatz zu treffen. Beide Motive haben die Eigenschaft zum interzellulären Transport (*Spread*) und sollten somit zu einer Steigerung des der SCD inhärenten sog. *Bystander*-Effektes führen.

## **4.1. Das *Translocation Motif TLM* als Fusionspartner**

Einige Studien im letzten Jahrzehnt beschreiben das Potential des HBV-Peptides *Translocation Motif (TLM)* für den Protein-Transfer [37,41,66,79].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte in mehreren Schritten die Testung, ob sich Fusionsproteine aus *TLM* und dem Suizidgen SCD in den beiden möglichen Orientierungen als potenzielle Suizidtherapeutika eignen. Dazu wurde überprüft, ob die *TLM*-Konstrukte durch adenovirale Transduktion in Zielzellen eingebracht werden können und zu einer Fusionsproteinbildung in den Zellen führen. Anschließend sollte der interzelluläre Transport mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Als letztes sollte der Beweis einer Effizienzsteigerung der Suizidtherapie durch die Verwendung des Zellpermeabilität-vermittelnden Motivs erbracht werden.

### **4.1.1. Nachweis auf Proteinebene**

Die Expression der hergestellten Fusionsproteine *TLM-SCD* und *SCD-TLM* wurde zunächst nach Transduktion von MH-Zellen mit den entsprechenden adenoviralen Vektoren in der sonst gängigen MOI von 50 getestet. Allerdings waren unter diesen Transduktionsbedingungen keine spezifischen Proteinbanden detektierbar. In den bis dato verfügbaren Veröffentlichungen wurden bisher noch nie virale Vektoren verwendet, um *TLM*-Fusionsproteine in die Zellen zu schleusen, so dass zum Zeitpunkt der Aufnahme der Untersuchungen keinerlei etablierte Vorbedingungen zur Verfügung standen. Die bislang verwendeten Methoden umfassten ausschließlich Protein-Inkubationen [66] sowie Plasmidtransfektionen [11,37,41].

Es stellte sich nun die Frage, warum die Detektion fehlschlug. Denkbar war es, dass die initial eingesetzte Virusmenge zu gering war und dementsprechend zu wenig genetisches Material für eine ausreichende Proteinsynthese zur Verfügung gestellt wurde. Desweiteren kommt als Grund für das Fehlschlagen der Detektion in Frage, dass bei der Transkription der Fusionsgene *TLM-SCD*

und SCD-*TLM* evtl. ein Fehler als Folge eines inkorrekten Klonierungsergebnisses auftrat bzw. diese Fusionsgene gar nicht transkribiert wurden.

Um das zu untersuchen, wurde eine rt-PCR durchgeführt, die die Bildung von spezifischer mRNA in adenoviral transduzierten Zellen unzweifelhaft belegte (siehe 3.2). Damit konnte also zunächst ein Fehler in der Transkription der Transgene ausgeschlossen werden.

Der Westernblot-Versuch wurde aufgrund dieser Erkenntnisse nun mit deutlich höheren Virusmengen wiederholt (siehe 3.1.1; MOI 200 und MOI 500). Als Resultat waren die erwarteten Banden bei 43 kDa nun deutlich auszumachen. Die Fusionsproteine wurden also translatiert, allerdings nur in geringen Mengen, da die spezifischen Banden erst bei einer höheren MOI detektierbar waren. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Es kann z. B. an einer wenig effizienten Translation oder aber an einem raschen Abbau der unphysiologisch zusammengesetzten Fusionsproteine liegen.

Es zeigten sich bei den Proben sowohl in N- als auch in C-terminaler Orientierung geringgradig höhermolekulare Zusatzbanden, deren Bedeutung unklar bleibt. Eine mögliche Erklärung könnte in posttranslationalen Modifikationen bei adenoviral vermittelter Expression dieser Fusionsproteine liegen. Allerdings wurden bei keiner der bisher veröffentlichten Studien in den Westernblotanalysen derartige Zusatzbanden beschrieben [11,13,37,41,66,80].

#### **4.1.2. Nachweis des Spread**

Der immunhistochemische Nachweis des Transports von *TLM*-Fusionsproteinen in die Nachbarzellen scheiterte (3.3.2). Dies lag weniger an der Methode an sich, vielmehr am Mangel der Verfügbarkeit eines geeigneten Antikörpers.

Die Antikörper, die in bisher zum Thema erfolgten Arbeiten benutzt wurden, richteten sich gegen die komplette PreS2-Region von HBV [66], gegen das HBs-Antigen [13] oder gegen den Fusionspartner des *TLM* [41].

Ein Antikörper gegen das *Translocation Motif* war kommerziell nicht verfügbar. Die künftige Generierung eines geeigneten *TLM*-Antikörpers, der kommerziell

verfügbar und für Westernblot sowie für Immunfluoreszenz gleichermaßen verwendbar ist, wäre sehr hilfreich, um eine Bestätigung des *TLM*-vermittelten *Spread* zu liefern.

Die zur Verfügung stehenden Antikörper gegen den zweiten Bestandteil der *TLM*-SCD Fusionsproteine, das SCD, erwiesen sich als nicht geeignet für die Immunfluoreszenz. Die Spezifität der Antikörper war zu gering, die Färbung undeutlich (Ergebnis nicht gezeigt). Diese Antikörper eigneten sich lediglich für die Westernblotanalyse.

Somit konnte der interzelluläre Transport der Fusionsproteine in dieser Arbeit aufgrund der Nicht-Verfügbarkeit geeigneter Antikörper nicht bewiesen werden. Eine Möglichkeit, den *Spread* in nachfolgenden Arbeiten nachzuweisen, könnte in der Verwendung sog. *Tag*-Sequenzen bestehen. Diese Sequenzen kodieren für kurze Peptide und bilden damit eine artifizielle Antigen determinate, ein sogenanntes Fremd-*Epitop*. Wird ein derartiges *Epitop* mit dem gesuchten Gen fusioniert, nennt man es *Epitop-Tag*. Das Fusionsprotein kann anschließend durch Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern identifiziert werden. Es gibt bereits einige kommerziell verfügbare Antikörper gegen derartige *Epitope* [3,4].

Ob die Funktion von *TLM* durch die Fusionierung mit einem derartigen *Epitop* eingeschränkt ist, müsste natürlich speziell getestet werden.

#### **4.1.3. Nachweis der Funktionalität**

Der eigentliche Nachweis einer potenziell verbesserten Wirksamkeit der *TLM*-basierten Fusionsproteine wurde im Cytotoxizitätsassay erbracht (siehe 2.5). Die Quantifizierung des Effektes erfolgte durch Einsatz des Protein-Farbstoffes Sulforhodamin B (SRB).

Die Menge der abgetöteten Tumorzellen nach Transduktion mit Ad SCD-*TLM* und Ad *TLM*-SCD war im Vergleich zu Ad SCD mindestens um den Faktor 1,5 geringer. Die Effektivität konnte durch Verbindung mit dem *TLM* Motiv also nicht verbessert werden, sondern war im Gegenteil deutlich schlechter. Erhöhte man

die Virusmenge bei der Transduktion, vergrößerte sich der Faktor auf das 2,5-fache (siehe 3.4.2.1, Abbildung 18).

Bei der Plasmidtransfektion (Lipofektion, 3.4.1) war die Wirkung verglichen mit der adenoviralen Transduktion zwar stärker, jedoch immer noch um das 1,4-fache schwächer als die Wirkung des ungekoppelten Suizidgenes alleine. Die Wirkungsabschwächung kann also nicht alleine an einer eventuellen falschen viralen Titrierung während der Adenovirusherstellung liegen, da die Plasmidwirkung ebenfalls schlechter als die Wirkung des adenoviralen Vektors Ad SCD ist.

Denkbar ist, dass der Wirkungsmangel/-verlust im Kontext der *TLM* Fusionsproteine aus einer Störung der Funktionalität des Suizidgenes resultiert, begründet durch eine fehlerhafte Proteinfaltung als Resultat der Zusammenfügung mit dem *TLM*-Peptid. Prinzipiell kann jede C- oder N-terminale Anlagerung und/oder Fusion von heterologen Peptiden oder Proteinen negative Auswirkungen auf die Ausbildung einer Sekundärstruktur haben [41]. Eine Testung der drei-dimensionalen Struktur der Fusionsproteine *TLM*-SCD und SCD-*TLM* wäre in diesem Zusammenhang von Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis der Westernblot-Analyse der Fusionsproteine nicht hilfreich, da diese Analyse unter stark denaturierenden Bedingungen erfolgt und somit die Proteinfaltung grundsätzlich zerstört wird. Würde das Problem ausschließlich an der Proteinfaltung liegen, hätten die Fusionsproteine auch schon bei einer MOI 50 im Westernblot nachgewiesen werden müssen (siehe 3.1.1).

Eine mangelnde Wirkverstärkung kann ebenso an einer fehlenden Internalisation durch die Zielzellen liegen. So konnte 2005 gezeigt werden, dass nur eine C-terminale Fusion von *TLM* und der bakterieller Cytosindesaminase (BCD-*TLM*) von Zielzellen aufgenommen wurde, nicht jedoch das N-terminale Gegenstück. Dort wurde festgestellt, dass der *Spread* aufgrund einer Maskierung von *TLM* durch eine bestimmte Proteinfaltung nicht stattfinden kann [41]. Gegen diese Hypothese spricht allerdings das Ergebnis der rt-PCR. Der adenovirale Vektor schleust das Gen eindeutig in die Zellen, da dort nachweislich eine Transkription *TLM*-kodierender Fusionsgene stattfindet.

Weitere Ursachen der schwächeren Abtötungseffizienz durch *TLM*-Fusionsproteine können an einer geringen Proteinbildung oder einem schnellen Abbau der Proteine liegen.

Die Ursache für eine geringe Proteinbildung kann in einer schwachen Transkription liegen, wofür eine Mutation im Promotor verantwortlich sein kann. Eine solche Mutation im Promotor kann zu einer für die Detektion zu geringen mRNA-Menge führen. Die mRNA ist durch eine Real-Time-PCR quantitativ erfassbar. Eine Mutation im Promotor ist durch eine Sequenzierung feststellbar. Der schnelle Abbau ist durch einen Kinetik-Versuch überprüfbar, in dem eine Westernblotanalyse schon nach 24 h und nicht wie gewöhnlich nach 48 h durchgeführt wird. Wären hier schon bei einer MOI 50 spezifische Banden detektierbar, würde dieses Ergebnis für einen verfrühten Abbau sprechen. Ist der Grund für die schwächere Effizienz durch die beschriebenen Versuche nicht belegbar, muss auch eine Neuklonierung der Viren mit *TLM*-SCD und SCD-*TLM* in Betracht gezogen werden. Derartige Lösungsversuche (Computersimulationen zur Faltung von *TLM*-Fusionsproteinen, Westernblot-Analytik zu frühen Zeitpunkten nach adenoviraler Transduktion, Promotorsequenzierung, Neuklonierung) sind gegenwärtig in Arbeit.

Grundsätzlich muss immer empirisch getestet werden, ob und in welcher Orientierung der Fusion von Translokations-Motiven die Funktionalität der erzeugten Fusionsproteine erhalten bleibt. Dies ist naturgemäß auch für die hier untersuchten *TLM*-Fusionen, aber auch für jeden zukünftigen Fusionsversuch gültig.

## 4.2. VP22 als Fusionspartner

Das zweite Zellpermeabilität-vermittelnde Motiv, das im Rahmen dieser Arbeit getestet wurde, war das *HSV-1 Tegument Protein VP22*. Dieses Protein verspricht, durch seine exzellente Fähigkeit zum *Spread* von einer primär transduzierten Zelle auf viele umliegende Zellen, ein hilfreiches Werkzeug in der Verbesserung inadäquater Gentransfereffizienzen zu werden [25].

Fusionierungen mit *VP22* zeigten eine deutliche Verbesserung der therapeutischen Effizienzen von verschiedenen Suizidgenen, z.B. der bakteriellen Cytosindesaminase (BCD) [88], der *Yeast Cytosindesaminase (YCD)* [50] oder der *HSV-1 Thymidinkinase* [35,46,55].

### 4.2.1. Nachweis auf Proteinebene

Die Expressionskontrolle der adenoviralen Konstrukte im Western-Blot ergab, dass C- und N-terminale Fusionen des Suizidgens SCD mit *VP22* in den erwarteten Größen unter Verwendung eines gegen SCD, sowie eines gegen *VP22* gerichteten Antikörpers detektiert werden konnten (3.1.2).

In dem Westernblot-Nachweis, bei dem anti-SCD-Antikörper verwendet wurden, erschienen die Banden insgesamt relativ zum Marker tiefer als erwartet (siehe Abbildung 5). SCD hat eine Länge von 42 kDa und erschien bei 35 kDa. Dies lag retrospektiv betrachtet an der ungenauen Markierung des Rainbowmarkers nach der Entwicklung des Blots.

Die Westernblot-Analysen der Fusionsproteine zeigten in hohem Maße Zusatzprodukte. Im Nachweis mit Benutzung eines Antikörpers gegen das Suizidgen SCD waren in beiden Orientierungen Zusatzbanden der Fusionsproteine zu beobachten. Einige dieser Zusatz- und Abbauprodukte konnte man dem Fusionspartner SCD mit 42 kDa zuordnen. Vermutlich war die gewählte Art der Proteinverknüpfung nicht optimal, so dass vorzeitig terminierte Fragmente gebildet wurden. Unter Verwendung des anti-*VP22*-Antikörpers waren dagegen nur im N-terminal verknüpften *VP22*-SCD Zerfallsbanden zu detektieren. Dies

entspricht nicht den früheren Beobachtungen unserer und auch anderer Arbeitsgruppen [21,67,88]. Diese fanden vor allem in C-terminaler Orientierung der Fusionsproteine CD-*VP22* [88], p53-*VP22* [67] und GFP-*VP22* [21] derartige Spaltprodukte.

## **4.2.2. Nachweis des *Spread***

### **4.2.2.1. Direkter Nachweis der *VP22*-Fusionsproteine**

Trotz verheißungsvollen Ergebnissen der gentherapeutischen Anwendung unter Zuhilfenahme von Fusionsproteinen aus *VP22* und verschiedenen Suizidgenen [36,50,67,88,90,92] besteht immer noch eine kontroverse Diskussion hinsichtlich des durch *VP22* vermittelten interzellulären Transports [29,58,72,91]. Es wird spekuliert, dass der *Spread* nur ein Artefakt sei, der ausschließlich im Zuge der Fixation von Zielzellen artifiziell erzeugt wird [58,72]. Darüber hinaus gehend wird auch behauptet, dass überhaupt keine Translokation zwischen Zellen stattfindet [38,72]. Dieselben Autoren postulieren, dass ihre Ergebnisse der kontroversen Diskussion um *VP22* ein Ende setzen würden [72]. Um Klarheit in diese verwirrende Diskussion zu bringen, wurden in unseren Vorarbeiten adenovirale Vektoren konstruiert, die eine duale Expressionskassette für ein *VP22*-GFP- und ein DsRed-Protein enthalten [52] (siehe 2.6.1), wodurch zwei voneinander unabhängig identifizierbare Proteine gebildet werden, die erstmals ohne Zellfixierung einen Immunfluoreszenznachweis des *Spreads* möglich machen.

Das Ergebnis zeigte (3.3.1), dass COS-1 Zellen, die mit dem Ad *VP22*-GFP/DsRed *Spread* Vektor transduziert wurden, beide Proteine zur Expression bringen und nach Überlagerung der Grün- und Rot-Fluoreszenz gelb leuchten (GFP und DsRed). HeLa-Zellen, die mit den COS-1 Zellen coplattiert wurden, und die von einem *VP22*-vermittelten *Spread* erreicht wurden, leuchteten hingegen ausschließlich grün.

Es konnte somit durch Fluoreszenzmikroskopie an unfixierten, in Kultur befindlichen Zellen demonstriert werden, dass der *VP22*-vermittelte *Spread* nicht lediglich ein Artefakt einer Zellfixierung ist [52]. Ein vergleichbares

Werkzeug benutzte auch ein andere Arbeitsgruppe, die den *VP22*-vermittelten *Spread* durch FACS-Analysen mit uninfizierten, lebenden Pigmentzellen aus der Retina überprüften [16].

In diesem Versuch sollte darüber hinaus ein optimales Verhältnis (1:10 oder 1:20) der coplattierten Zellen zueinander sowie eine für die Transduktion hinreichende Menge an Virus (MOI 50 oder MOI 100) getestet werden. Dabei zeigte sich, dass ein Verhältnis von 1:10 und eine Transduktionsmenge von MOI 50 ausreichend für eine gute Detektion des *Spread* waren. Eine größere Menge an Viruspartikeln verstärkte zwar den Effekt, aber war nicht zwingend erforderlich, um den interzellulären Transporteffekt sichtbar zu machen.

#### **4.2.2.2. Indirekter Nachweis der *VP22*-Fusionsproteine**

Die indirekte Immunfluoreszenz diente dazu, den *VP22*-vermittelten Transport der Fusionsproteine mit dem Suizidgen SCD zu visualisieren. Es wurden wiederum COS-1 Zellen transduziert und mit naiven HeLa Zellen im Verhältnis 1:10 coplattiert. Der Nachweis des interzellulären Transports war auch hier durch die farbliche Identifizierung der ursprünglich infizierten Zellen und deren Unterscheidung von den durch den *Spread* erreichten Zellen eindeutig auszumachen. Diese Ergebnisse (3.3.2) bestätigen einen *VP22*-vermittelten Transport [51] und entsprechen den früheren Arbeiten unserer Forschungsgruppe [52,88,89].

#### **4.2.3. Nachweis der Funktionalität**

Um eine eventuelle Effizienzsteigerung der Suizidgentherapie durch die Verknüpfung des SCD mit *VP22* nachweisen zu können, wurden SRB-Cytotoxizitätsassays durchgeführt. Das Ergebnis (siehe 3.4.1 und 3.4.2.2) belegt, dass beide, sowohl das N-terminal als auch das C-terminal verknüpfte Fusionsprotein aus SCD und *VP22*, die Suizidgen-Cytotoxizität gegenüber SCD verbessern [51]. Bei der Verwendung der Fusionsproteine konnte bei jedem Messpunkt des Assays eine über das SCD Suizidgen hinaus gehende Reduktion der Viabilität erreicht werden. Bei einer 5-FC-Konzentration von

0,1 mM beispielsweise wurde das Überleben von SCD-*VP22* um das 3,6-fache und von *VP22*-SCD um das 5,2-fache gegenüber SCD verringert. Das N-terminal verknüpfte *VP22*-SCD konnte die Abtötungseffizienz gegenüber der anderen Orientierung weiter steigern. Die meisten der bisherigen Studien, die *VP22*-Fusionsproteine untersuchten, benutzen nur eine Art der Fusionskonstrukte [6,14] oder detektierten keinen von der Orientierung abhängigen Unterschied hinsichtlich des interzellulären Transportes oder des Absterbens der Zellen unter Verwendung von *VP22*-p53- und *VP22*-TK-Fusionsproteinen [21,67]. In eigenen Vorarbeiten konnten wir einen gesteigerten Abtötungseffekt unter der Behandlung mit dem C-terminalen CD-*VP22* Fusionsprotein, nicht jedoch mit dem N-terminalen *VP22*-CD belegen [88]. Die gleiche Beobachtung machte eine andere Arbeitsgruppe mit dem Fusionsprotein *BVP22*-Etk [69]. Andererseits wurde in der Studie, die das erste mal den *Spread* einer Fusion zwischen *VP22* und einem großen Polypeptid beschrieb, eine N-terminale Verknüpfung (*VP22*-GFP) benutzt [24].

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der C- und N-terminalen Fusionsproteine kann in den verschiedenen Proteinfaltungsmöglichkeiten der *VP22*-Fusionspartner zu finden sein. Durch die Proteinfaltung kann die funktionelle Domäne des Proteins maskiert werden. Weitere Untersuchungen sollten sich mit diesen wichtigen Fragestellungen beschäftigen.

Zellen, die nicht infiziert oder mit Adenovirus ohne Expressionskassette transduziert wurden, zeigten nur in sehr hohen *Prodrug*-Konzentrationen eine Abtötungstendenz. Dies spricht für eine toxische Wirkung der *Prodrug* 5-Fluorcytosin, wenn sie in einer extrem hohen Konzentration zur Anwendung kommt. Dieselben Beobachtungen, machten auch andere Arbeitsgruppen, die das Suizidgen SCD erforschen. Sie belegten ebenso, dass die Suizidwirkung auf Zellen abhängig von der Menge 5-FC [28,85] ist, und dass Zellen auch ohne SCD unter hohen 5-FC-Konzentrationen absterben [5,18,28].

### 4.3. Ausblick

Eine Verknüpfung der wirksamen Suizidgene mit Zellpermeabilitätsvermittelnden Motive stellt prinzipiell einen vielversprechenden Ansatz dar, um die mangelnde Transduktionsrate bislang verfügbarer viraler Vektoren zu verbessern. Jedes der zur Auswahl stehenden Motive muss allerdings vor einer Aussage über dessen Wirkung und seine Verwendung als potenzielles Suizidtherapeutikum ausreichend getestet werden.

Das Motiv *Translocation Motif (TLM)* aus dem *Hepatitis B Virus* konnte dieser Überprüfung im Rahmen der vorliegenden Arbeit bislang nicht genügen. Dementsprechend sind die in der Diskussion aufgeführten weiteren Arbeiten erforderlich, um eine definitive Aussage über die *Spread*-Eigenschaften des *TLM* Motivs zu treffen.

Das Transportprotein *VP22* dagegen stellt durch seine nachgewiesene Effizienzsteigerung gegenüber dem SCD einen wertvollen Baustein im Rahmen der Suizidtherapie dar. Hier folgt der nächste Schritt auf dem Weg zur sicheren Verwendung als verbessertes Suizidtherapeutikum, nämlich der Tierversuch. Bei *in vivo* Versuchen wird das Problem der Virusspezifität vermutlich an Bedeutung gewinnen. Adenoviren infizieren unselektiert alle eukaryotischen Zellen. Strategien zur Lösung dieses Problems wären die Verwendung eines Zelltyp-spezifischen Promotors oder aber die genetische Veränderung des Vektors durch spezifische Oberflächenantigene, die spezifisch an Rezeptoren auf den zu adressierenden Zielzellen binden. Eine andere Möglichkeit wäre, von herkömmlichen replikationsdefizienten adenoviralen Vektor abzuweichen und replikationskompetente onkolytische Viren als Genfähren zu verwenden.

Eine Suizidtherapie alleine wird sicherlich ein hervorragendes Instrument zu einer Tumormassenreduktion solider Tumoren darstellen, allerdings vermutlich niemals alleinig die Heilung derselben, z. B. des hepatozellulären Karzinoms, bewerkstelligen können; im Rahmen multimodaler Konzepte eröffnet sich jedoch eine hoffnungsvolle Strategie im Kampf gegen die Morbidität und Mortalität, die speziell durch das HCC verursacht werden.

## 5. Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der am häufigsten auftretenden malignen Tumoren weltweit. Die Ätiologie und Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC sind gut erforscht und multiple Schritte, die an der Hepatokarzinogenese beteiligt sind, konnten in den letzten Jahren aufgeklärt werden. Trotz dieses wissenschaftlichen Fortschrittes und der Umsetzung von Früherkennungsprogrammen bei Risikopatienten konnte das Überleben der Patienten in den letzten drei Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert werden. Dies findet seine Ursache im fortgeschrittenen Stadium des Tumors bei Diagnosestellung und den alleine schon deshalb limitierten therapeutischen Möglichkeiten.

Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit, neue Therapiestrategien zu erforschen und innovative Konzepte im präklinischen Kontext zu überprüfen. Eine dieser Strategien stellt die Suizidgentherapie dar. Sie beruht auf einer selektiven Abtötung der Tumorzellen durch Erzeugung toxischer Metabolite aus einer nicht toxischen *Prodrug*, wie z.B. 5-Fluorcytosin (5-FC). Die Metabolisierung dieser *Prodrug* geschieht über Enzyme, für die sog. Suizidgene kodieren. Das hier verwendete Suizidgen stellt eine Fusion aus der *Cytosindesaminase* aus *Saccharomyces cerevisiae* (YCD = Yeast CD) und der nachgeschalteten *Yeast Uracilphosphoribosyltransferase* (YUPRT) dar. Dieses Fusionsgen wird *Super-Cytosindesaminase* (SCD = SuperCD) genannt. Suizidgene werden über virale und nicht virale Vektoren an ihren Wirkort, die Tumorzellen, transportiert. Eine Barriere dieses Verfahrens ist die mäßige Transduktionseffizienz, die allerdings potenziell durch eine Verknüpfung des Suizidgens an ein Zellpermeabilität-vermittelndes Motiv überwunden werden soll.

Zellpermeabilität-vermittelnde Motive entsprechen verschiedenen Peptiden und Proteinen, welche die Eigenschaft besitzen, zelluläre Membranen zu durchdringen und so in das Innere der Zellen zu gelangen. Außerdem können diese Motive an sie gekoppelte Ladungsmoleküle ins Cytoplasma und/oder in

den Zellkern einschleusen. Dieser Vorgang wird auch *Spread* genannt. Zwei dieser Motive wurden in der vorliegenden Arbeit getestet: das *Translocation Motif (TLM)* aus dem *Hepatitis B Virus* und das *VP22-Protein* aus *Herpes simplex Virus Typ-1*. Die Zielsetzung bestand in einem bisher noch nicht erfolgten Effizienzvergleich der Kopplungsverfahren des Fusionsproteins SCD mit Zellpermeabilität-vermittelnden Motiven gegenüber der Therapie mit nicht-fusioniertem SCD Suizidgenprotein alleine. Auf dieser Grundlage soll es ermöglicht werden, eine Vorauswahl für den angestrebten klinischen Einsatz der Fusionsproteine *TLM-SCD*, *SCD-TLM*, *VP22-SCD* und *SCD-VP22* als potenziell verbesserte Suizidtherapeutika zu treffen.

Dazu wurden adenovirale Vektoren mit den entsprechenden Fusionsgenen generiert und deren Expression durch Westernblot-Analysen nachgewiesen. In einem weiteren Schritt gelang der Beweis des interzellulären Transports (*Spread*) der *VP22-Fusionsproteine* durch direkte und indirekte Immunfluoreszenzverfahren. Die Testung des *TLM*-vermittelten Transports gelang aus Mangel an kommerziell verfügbaren Antikörpern nicht. Schließlich fand der Effizienznachweis mittels SRB-Cytotoxizitätsassays statt. Unter Inkubation mit der *Prodrug* 5-FC konnten die Abtötungstendenzen der einzelnen Fusionsproteine gegen die Infektion mit dem Suizidgen alleine verglichen werden. Es konnte für das Protein *TLM* keine Steigerung der Cytotoxizität gezeigt werden, *VP22-Fusionsproteine* dagegen konnten das Absterben der Zellen enorm verstärken. Das N-terminal verknüpfte *VP22-SCD* präsentierte dabei den größten Effekt. Damit stellen *VP22-Fusionsproteine* nützliche Werkzeuge im Kampf der Suizidtherapie gegen die Morbidität und Mortalität durch das hepatozelluläre Karzinom dar und bedürfen der weiteren präklinischen und gegebenenfalls auch klinischen Erforschung.

---

## 6. Anhang

### 6.1. Literaturverzeichnis

1. [www.science-live.de/info/glossar.htm](http://www.science-live.de/info/glossar.htm).(Oktober 2006)
2. [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de).(Oktober 2006)
3. [http://www.genscript.com/epitope\\_antibody.html](http://www.genscript.com/epitope_antibody.html).(Januar 2007)
4. [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Life\\_Science/Antibody\\_Explorer/Spotlights/Antibodies\\_To\\_Epitope\\_Tags.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Antibody_Explorer/Spotlights/Antibodies_To_Epitope_Tags.html).(Januar 2007)
5. Adachi, Y., T. Tamiya, T. Ichikawa, K. Terada, Y. Ono, K. Matsumoto, T. Furuta, H. Hamada, and T. Ohmoto. 2000. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum.Gene Ther.* 11:77-89.
6. Aints, A., M. S. Dilber, and C. I. Smith. 1999. Intercellular spread of GFP-VP22. *J.Gene Med.* 1:275-279.
7. Andersen, L., M. Kilstrup, and J. Neuhard. 1989. Pyrimidine, purine and nitrogen control of cytosine deaminase synthesis in Escherichia coli K 12. Involvement of the glnLG and purR genes in the regulation of codA expression. *Arch.Microbiol.* 152:115-118.
8. Ballhausen, W. G. 2003. molecular pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma- State 2003. *Chirurgische Gastroenterologie* 19:207-213.
9. Beaugrand, M., G. N`kontchou, O. Seror, N. Ganne, and J. C. Trinchet. 2005. Local/regional and systemic treatments of hepatocellular carcinoma. *Semin.Liver Dis.* 25(2):201-211.
10. Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, J. E. Kurt, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Caxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.
11. Bleifuss, E., T. Kammertoens, A. Hutloff, D. Quarcoo, M. Dorner, P. Straub, W. Uckert, and E. Hildt. 2006. The translocation motif of hepatitis B virus improves protein vaccination. *Cell.Mol.Life Sci.* 63:627-635.
12. Blum, H. E. 2005. Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 11:7391-7400.
13. Brandenburg B., L. Stoeckl, C. Gutzeit, M. Roos, J. Lupberger, R. Schwartlander, H. Gelderblom, I. M. Sauer, P. H. Hofschneider, and E. Hildt. 2005. A novel system for efficient gene transfer into primary Human Hepatocytes via cell-permeable hepatitis B virus-like particle. *Hepatology* 42:1300-1309.
14. Brewis, N., A. Phelan, J. Webb, J. Drew, G. Elliott, and P. O'Hare. 2000. Evaluation of VP22 Spread in Tissue Culture. *J. Virol.* 74:1051-1056.
15. Burnette, W. N. 1981. „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal.Biochem.* 112:195-203.

16. Cashman, S. M., S. L. Sadowski, D. J. Morris, J. Frederick, and R. Kumar-Singh. 2002. Intercellular trafficking of adenovirus-delivered HSV VP22 from the retinal pigment epithelium to the photoreceptors-implications for gene therapy. *Mol. Ther.* 6:813-823.
17. Chartier, C., E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterle, A. Pavirani, and M. Mehtali. 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 70:4805-4810.
18. Chung-Faye, G. A., M. J. Chen, N. K. Green, A. Burton, D. Anderson, V. Mautner, P. F. Searle, and D. J. Kerr. 2001. In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther.* 8:1547-1554.
19. Derossi, D., G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1998. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends. Cell Biol.* 8:84-87.
20. Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1998. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269:10444-10450.
21. Dilber, M. S., A. Phelan, A. Aints, A. J. Mohamed, G. Elliott, C. I. Smith, and P. O'Hare. 1999. Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther.* 6:12-21.
22. Domin, B. A., W. B. Mathony, and T. P. Zimmermann. 1993. Transport of 5-fluorouracil and uracil into human erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 46:503-510.
23. Drin, G., S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees, and J. Temsamani. 2003. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* 278:31192-31201.
24. Elliott, G. and P. O'Hare. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a Herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223-233.
25. Elliott, G. and P. O'Hare. 1999. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther.* 6:149-151.
26. Elliott, G. and P. O'Hare. 2000. Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J. Virol.* 74:2131-2141.
27. Elliott, G. D. and D. M. Meredith. 1992. The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J. Gen. Virol.* 73:723-726.
28. Erbs, P., E. Regulier, J. Kintz, P. Leroy, Y. Poitevin, F. Exinger, R. Jund, and M. Mehtali. 2000. In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res.* 60:3813-3822.
29. Fang, B., B. Xu, P. Koch, and J. A. Roth. 1998. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins is not observed in cultured mammalian cells. *Gene Ther.* 5:1420-1424.
30. Fischer, P. M., E. Krausz, and D. P. Lane. 2001. Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation. *Bioconjug. Chem.* 12:825-841.
31. Fischer, R., K. Kohler, M. Fotin-Mleczek, and R. Brock. 2004. A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* 279:12625-12635.

32. Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
33. Graepler, F., M. L. Lemken, W. A. Wybranietz, U. Schmidt, I. Smirnow, C. D. Gross, M. Spiegel, A. Schenk, H. Graf, U. A. Lauer, R. Vontheim, M. Gregor, S. Armeanu, M. Bitzer, and U. M. Lauer. 2005. Bifunctional chimeric SuperCD suicide gene -YCD: YUPRT fusion is highly effective in a rat hepatoma model. *World J Gastroenterol* 11:6910-6919.
34. Graham, F. L. and L. Prevec. 1995. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol.Biotechnol.* 3:207-220.
35. Greco, O., M. C. Joiner, A. Doleh, and S. D. Scott. 2005. VP22-mediated intercellular transport for suicide gene therapy under oxic and hypoxic conditions. *Gene Ther.* 12:974-979.
36. Green, K. L., T. D. Southgate, K. Mulryan, L. J. Fairbairn, P. L. Stern, and K. Gaston. 2006. Diffusible VP22-E2 protein kills bystander cells and offers a route for cervical cancer gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 17:147-157.
37. Hafner, A., Brandenburg B., and E. Hildt. 2003. Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. *EMBO* 4:767-773.
38. Hakkarainen, T., T. Wahlfors, O. Merilainen, S. Loimas, A. Hemminki, and J. Wahlfors. 2005. VP22 does not significantly enhance enzyme prodrug cancer gene therapy as a part of a VP22-HSVtk-GFP triple fusion construct. *J.Gene Med.* 7:898-907.
39. He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A* 95:2509-2514.
40. Herold, G. *Innere Medizin.* Köln, pp. 474-475.
41. Hillemann, A., B. Brandenburg, U. Schmidt, M. Roos, I. Smirnow, M. L. Lemken, U. M. Lauer, and E. Hildt. 2005. Protein transduction with bacterial cytosine deaminase fused to the TLM intercellular transport motif induces profound chemosensitivity to 5-fluorocytosine in human hepatoma cells. *J Hepato*442-450.
42. Jackson, A., S. Friedman, X. Zhan, K. A. Engleka, R. Forough, and T. Maciag. 1992. Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10691-10695.
43. Kaplan, J. M. 2005. Adenovirus-based cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 5:595-605.
44. Keepers, Y. P., P. E. Pizao, G. J. Peters, J. van-Ark-Otte, B. Winograd, and H. M. Pinedo. 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur.J.Cancer* 27:897-900.
45. Kievit, E., E. Bershad, E. Ng, P. Sethna, I. Dev, T. S. Lawrence, and A. Rehemtulla. 1999. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res.* 59:1417-1421.
46. Kong, B. H., W. X. Wang, C. S. Liu, L. Song, D. X. Ma, X. Qu, J. Jiang, X. S. Yang, Y. Z. Zhang, B. Wang, M. Q. Wei, and Q. F. Yang. 2003. Efficacy of Lentivirus-mediated and MUC1 antibody-targeted VP22-TK/GCV suicide gene therapy for ovarian cancer. *In Vivo* 17:153-156.

47. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:685.
48. Lal, S., U. M. Lauer, J. T. Wessels, D. Niethammer, J. Beck, and P. G. Schlegel. 2000. Suicide Genes: Past, Present and Future Perspectives. *Immunology Today* 21:48-54.
49. Lauer, U. M., M. Spiegel, M. Bitzer, W. A. Wybranietz, C. D. Groß, F. Prinz, F. Graepler, W. Neubert, and M. Gregor. 1998. New strategies for the genetic therapy of primary liver carcinoma. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies* 7/6:567-571.
50. Lee, K. C., D. A. Hamstra, S. Bullarayasamudram, M. S. Bhojani, B. A. Moffat, K. J. Dornfeld, B. D. Ross, and A. Rehemtulla. 2006. Fusion of the HSV-1 tegument protein vp22 to cytosine deaminase confers enhanced bystander effect and increased therapeutic benefit. *Gene Ther.* 13:127-137.
51. Lemken, M. L., F. Graepler, C. Wolf, W. A. Wybranietz, I. Smirnow, U. Schmidt, M. Gregor, M. Bitzer, and U. M. Lauer. 2007. Fusion of HSV-1 VP22 to a bifunctional chimeric SuperCD suicide gene compensates for low suicide gene transduction efficiencies. *Int J Oncol.* 30:1153-1161
- 52./53. Lemken, M. L., C. Wolf, W. A. Wybranietz, U. Schmidt, I. Smirnow, H. J. Bühring, A. F. Mack, U. M. Lauer, and M. Bitzer. 2007. Evidence for the presence of intercellular trafficking of VP22 in living cells. *Mol. Ther.* 15:310-319.
54. Lin, S. M., C. J. Lin, C. C. Lin, C. W. Hsu, and Y. C. Chen. 2005. Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less. *Gut* 54(8):1151-1156.
55. Liu, C. S., B. Kong, H. H. Xia, K. A. Ellem, and M. Q. Wei. 2001. VP22 enhanced intercellular trafficking of HSV thymidine kinase reduced the level of ganciclovir needed to cause suicide cell death. *J. Gene Med.* 3:145-152.
56. Löffler, G. and P. E. Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 368-370.
57. Longley, D. B., D. P. Harkin, and P. G. Johnston. 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3:330-338.
58. Lundberg, M. and M. Johansson. 2001. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat. Biotechnol.* 19:713-714.
59. Lundberg, P. and U. Langel. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J. Mol. Recogn.* 16:227-233.
60. Mann, D. and A. D. Frankel. 1991. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO* 10:1733-1739.
61. Marelli, L., R. Stigliano, C. Triantos, M. Senzolo, E. Cholongitas, N. Davies, J. Tibballs, T. Meyer, D. W. Patch, and A. K. Burroughs. 2007. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc. intervent. Radiol.* 30 (1):6-25
62. McKusick, V. 2006. Hepatocellular Carcinoma. *Online Mendelian Inheritance in Man OMIM* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM:#114550>.

63. Moolten, F. L. 1994. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther* 1:279-287.
64. Morris, H. 1963. Some growth, morphological, and biochemical characteristics of hepatoma 5123 and other new transplantable hepatomas. *Prog.Exp.Tumor Res.* 3:370-411.
65. Müller, M. *Chirurgie*. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, Deutschland, pp. 228-230.
66. Oess, S. and E. Hildt. 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther.* 7:750-758.
67. Phelan, A., G. Elliott, and P. O'Hare. 1998. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat.Biotechnol.* 16:440-443.
68. Pomeranz, L. E. and J. A. Blaho. 1999. Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized Herpes Simplex Virus Type 1 infection. *J.Virol.* 73:6769-6781.
69. Qiu, Z., J. S. Harms, J. Zhu, and G. A. Splitter. 2004. Bovine herpesvirus tegument protein VP22 enhances thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy for neuroblastomas compared to Herpes simplex virus VP22. *J.Virol.* 78:4224-4233.
70. Renz-Polster, H., S. Krautzig, and J. Braun. *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban & Fischer, München, Jena, p. 687.
71. Rojas, M., J. P. Donahue, Z. Tan, and Y. Z. Lin. 1998. Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat.Biotechnol.* 16:370-375.
72. Roy, V., J. Qiao, P. Campos-Lima, and M. Caruso. 2004. Direct evidence for the absence of intercellular trafficking of VP22 fused to GFP or to the herpes simplex virus thymidine kinase. *Gene Ther.* 12:169-176.
73. Rubinstein, L. V., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. A. Scudiero, A. Monks, and M. R. Boyd. 1990. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J.Natl.Cancer Inst.* 82:1113-1118.
74. Saher, G. and E. Hildt. 1999. Activation of c-Raf-1 kinase signal transduction pathway in  $\alpha 7$  integrin-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 274:27651-27657.
75. Seefried, S. 2004. Generierung und Evaluation neuartiger replikationskompetenter Retroviren (RCR) für einen effizienten therapeutischen HCC-Genstransfer. *Diplomarbeit* Universität Tübingen, Fachrichtung Biochemie; S.5.
76. Shenk, T. 1996. Adenoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2111-2148.
77. Skehan, P., R. Storeng, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, Warren.J.T., H. Bokesch, S. Kenney, and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82:1107-1112.
78. Spiegel, M. 2000. Etablierung und Charakterisierung eines pseudotypisierten retroviralen Genstransfer- Systems mit Selektivität für den Hepatocyten-spezifisch exprimierten Asialoglycoprotein-Rezeptor. *Dissertation* Universität Tübingen, Fachbereich Chemie und Pharmazie.

79. Stoeckl, L., A. Berting, B. Malkowski, R. Foerste, P. H. Hofschneider, and E. Hildt. 2003. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus expression. *Oncogene* 22:2604-2610.
80. Stoeckl, L., A. Funk, Kopitzki A., Brandenburg B., S. Oess, Will H., Sirma H., and E. Hildt. 2006. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (17):6730-6734.
81. Thoren, P. E., D. Persson, P. Isakson, M. Goksor, A. Onfelt, and B. Norden. 2003. Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 307:100-107.
82. Towbin, H. and J. Gordon. 1984. Immunoblotting and dot immunoblotting. *J.Immunol.Methods* 72:313-340.
83. Trapnell, B. 1993. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv.Drug Deliver.Rev.* 12:185-199.
84. Trübenbach, J., F. Graepler, P. L. Pereira, H. Teder, U. M. Lauer, M. Gregor, C. D. Claussen, and P. E. Huppert. 2000. Growth characteristics and imaging properties of the Morris hepatoma 3924A in ACI rats - a suitable model for transarterial chemoembolization (TACE). *Cardiovascular and Interventional Radiology* 23:211-217.
85. Unger, M. M., J. Wahl, A. Ushmorov, B. Büchele, T. Simmet, K. M. Debatin, and C. Beltinger. 2007. Enriching suicide gene bearing tumor cells for an increased bystander effect. *Cancer Gene Ther* 14:30-38.
86. Veterinärmedizinische Universität Wien. [www.wu-wien.ac.at](http://www.wu-wien.ac.at). (Januar 2007)
87. Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J.Biol.Chem.* 272:16010-16017.
88. Wybraniec, W. A., C. D. Gross, A. Phelan, P. O'Hare, M. Spiegel, F. Graepler, M. Bitzer, P. Stahler, M. Gregor, and U. M. Lauer. 2001. Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-cytosine deaminase (CD) fusion gene. *Gene Ther.* 8:1654-1664.
89. Wybraniec, W. A., F. Prinz, M. Spiegel, A. Schenk, M. Bitzer, M. Gregor, and U. M. Lauer. 1999. Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines. *J.Gene Med.* 1:265-274.
90. Zavaglia, D., M. C. Favrot, B. Eymin, C. Tenaud, and J. L. Coll. 2003. Intercellular trafficking and enhanced in vivo antitumor activity of a non-virally delivered P27-VP22 fusion protein. *Gene Ther.* 10:314-325.
91. Zavaglia, D., E. H. Lin, M. Guidetti, O. Pluquet, P. Hainaut, M. C. Favrot, and J. L. Coll. 2005. Poor intercellular transport and absence of enhanced antiproliferative activity after non-viral gene transfer of VP22-P53 or P53-VP22 fusions into p53 null cell lines in vitro or in vivo. *J.Gene Med.* 7:936-944.
92. Zender, L., F. Kühnel, R. Kock, M. Manns, and S. Kubicka. 2002. VP22-mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells in vitro and in vivo. *Cancer.Gene Ther.* 9:489-496.

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

5-FC	5-Fluorcytosin
5-FdUMP	5-Fluordesoxymonophosphat
5-FU	5-Fluoruracil
5-FUTP	5-Fluoruraciltriphosphat
ACS	zur chemischen Analyse
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
Ampr	Ampicillin-Resistenz-Gen
AntPs	Antennapedia homeodomain proteins
BCD	bakterielle Cytosindesaminase
bzgl.	bezüglich
bp	Basenpaar
C	Celcius
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CTNNB1	beta-1 Cateningen
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DsRed	red fluorescent protein
dTMP	Desoxy-Thymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUMP	Desoxy-Uracilmonophosphat
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced Chemiluminescence

---

---

EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Foetal Calf Serum
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSV 1	Herpes simplex Virus Typ 1
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K-FGF	Kaposi-fibroblast-growth-factor
kHz	Kilohertz
l	Liter
M	Morbus
MCS	multiple cloning site
MDB	Membrane Desalting Buffer
MH	Morris Hepatom
mM	milli Mol
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NCS	Newborn Calf Serum
OD-Werte	optische Dichte-Werte
Opti-MEM	modifiziertes Eagle Medium
PAI	perkutane Alkoholinjektion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii
PTG	Plasmidkassette
PVDF	Polyvinylindendifluorid
RFA	Radiofrequenzablation

---

---

RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
rt-PCR	reverse Polymerase-Ketten-Reaktion
SCD	Super Cytosindesaminase
SCD	Super-Cytosindesaminase (SuperCD)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
SRB	Sulforhodamin B
SV 40	Simian Virus 40
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPRT	Uracilphosphoribosyltransferase
USA	United States of America
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
YUPRT	Yeast Uracilphosphoribosyltransferase
YCD	Yeast Cytosindesaminase
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

### 6.3. Firmenverzeichnis

Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Bachofer Laboratoriumsgeräte	Reutlingen, Deutschland
Biohit	Helsinki, Finnland
Biometra	Göttingen, Deutschland
BioRad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Biosafe eco, Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Biotrend	Köln, Deutschland
Biozym Diagnostik GmbH	Odendorf, Deutschland
Cambrex bio science	Verviers, Belgien
Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Chemikon	Temecula, CA, USA

Costar, Corning GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Dynex Technologies	Denkendorf, Deutschland
Eppendorf GmbH	Hamburg, Deutschland
Eurogentec	Seraing, Belgien
Fedegari, Integra biosciences	Fernwald, Deutschland
Fortuna, Poulten & Graf GmbH	Wertheim, Deutschland
GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Greiner Labortechnik GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Hecht-Assistent	Sondheim, Deutschland
Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland
Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland
Invitrogen Corporation	Carlsbad CA, USA
Janke & Kunkel IKA Labortechnik	Staufen i. Br., Deutschland
Kendro Laboratory Products	Asheville, USA
Kimberly-Clark	Koblenz, Deutschland
Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Merck KG aA.	Darmstadt, Deutschland
Molecular Probes	Eugene OR, USA
MWG–Biotech AS	Ebersberg, Deutschland
Nunc GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
Olympus Optical Co. GmbH	Hamburg, Deutschland
Owl Scientific Inc.	Woburn MA, USA
Perkin Elmer	Wellesley MA, USA
Probst Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
Quiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Roche Diagnostics Corporation	Indianapolis, USA
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
SAS Institute Inc.	Cary NC, USA
Schleicher und Schnell	Kassel, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Transgène	Straßburg, Frankreich
Vector Laboratories Inc.	Burlingame CA, USA
Zeiss	Göttingen, Deutschland
A. Phelan, Marie-Curie-Research-Institut, MCRI	Oxford, UK
G. Frommer, Institut für Zellbiologie	Tübingen, Deutschland
P. O’Hare, Marie-Curie-Research-Institut, MCRI	Oxford, UK
C. Richards, Glaxo Wellcome	TRP, NC, USA

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen, die diese Arbeit ermöglicht und unterstützt haben bedanken.

Herrn Professor Dr. med. M. Gregor danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung I der Inneren Medizin.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. U. M. Lauer für die Vergabe der Doktorarbeit, für sein Interesse, seine Unterstützung und die ehrlichen und ermutigenden Worte.

Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in der Forschungsgruppe und die angenehme Atmosphäre und für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Betreuerin Dr. M.-L. Lemken danke ich für ihre Geduld, ihre wissenschaftlichen Anregungen sowie die fachkundige Hilfe bei allen möglichen und unmöglichen Fragen.

Weiter möchte ich mich bei Frau I. Smirnow, Frau A. Schenk und Frau U. Schmidt herzlich für ihre Hilfe beim Erlernen von Methoden und stets hilfreichen Anregungen bei technischen oder methodischen Problemen, und für alle Aufmerksamkeiten, die darüber hinausgingen, bedanken.

Herrn Dr. R. Vonthein danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Meinen Geschwistern, Verwandten und Freunden danke ich für ihren Zuspruch und die Anteilnahme an den kleinen und großen Problemen des Doktorandenalltags. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützt und ermuntert haben und Jesus Christus, der versprochen hat, jeden Tag dabei zu sein.

## Lebenslauf

**Name, Vorname:** Wolf, Claudia Irene

**Geburtsdatum:** 3. Januar 1982

**Geburtsort:** Freudenstadt

**Eltern:** Friedrich Wolf, Elektromeister im eigenen Betrieb  
Sieglinde Wolf, Bürokauffrau

**Geschwister:** Thekla Wolf, 32 Jahre, Dipl. Ing. FH Elektrotechnik  
Master of Science Mechatronik (MME)  
Sylvia Wolf, 31 Jahre, Apothekerin  
Margit Wolf, 28 Jahre, Bürokauffrau  
Bettina Wolf, 19 Jahre, Auszubildende zur Bankkauffrau  
Philipp Wolf, 13 Jahre, Schüler

### Beruflicher Werdegang:

1988 – 1992 Grundschule Dietersweiler

1992 – 1998 Falken–Realschule in Freudenstadt

1998 – 2001 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium der Luise–Büchner–Schule in Freudenstadt mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife im Juni 2001

ab WS 2001 Studium der Humanmedizin  
an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen

Praktika: 10.09.2001 - 30.09.2001 in der Chirurgie im KKH Freudenstadt  
25.02.2002 - 15.03.2002 in der Pädiatrie im KKH Freudenstadt  
22.02.2003 - 19.03.2003 in der Pädiatrie im KKH Freudenstadt

Ärztliche Vorprüfung am 04.09.2003

Ärztliche Prüfung am 08.05.2008

Famulaturen: vom 8.3.2004 bis zum 7.4.2004 in der Pädiatrie im KKH Freudenstadt  
vom 28.2.2005 bis zum 1.4.2005 in der Orthopädie Praxis de Jager/  
Schwarz Freudenstadt  
vom 29.8.2005 bis zum 12.9.2005 in der Gynäkologie im KKH  
Forchheim  
vom 8.8.2006 bis zum 30.9.2006 in der Chirurgie im Tenwek Hospital,  
Kenia

Doktorarbeit: Annahme als Doktorandin am 5.7.2006.  
Thema: Effizienzsteigerung der therapeutischen Suizidgentherapie durch Kopplung mit Zellpermeabilitäts- vermittelnden Motiven  
Abschluss des Promotionsverfahren 11.06.2008

Friedrichshafen, 2008