

Aus der Medizinischen Klinik  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. H. Greten

**Entwicklung adenoviraler Vektoren  
zur regulierten Genexpression**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von

Florian Puls

aus Hamburg

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 11.2.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. D. Ameis

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. H. Will

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Pantel

## **Publikationen und Präsentationen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert und präsentiert:

### **Originalpublikation**

Block, A., Puls F., Müller, J., Milasinovic, D., Igelmann, D., Schafer, P., Kupfermann, N., Schmoldt, A., Ameis, D., Greten, H. (2003). "Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system." *J Gene Med* **5**(3): 190-200.

### **Präsentationen**

Puls, F., Müller, J., DeWeerth, A., Greten, H., Block, A. „Comparison of doxycycline-regulated to CMV-promoter driven interleukin-12 expression in adenoviral gene therapy of different human gastrointestinal cancer cell lines." Jahrestreffen der American Gastroenterological Association 2002, San Francisco.

Block, A., Puls, F., Müller J., DeWeerth, A., Greten, H. „Construction and characterization of innovative adenoviral vectors for highly efficient and doxycycline-regulated interleukin-12 expression in human colon cancer." Jahrestreffen der American Gastroenterological Association 2002, San Francisco.

Block, A., Puls, F., Wulff, H., Müller, J., Greten, H. „Entwicklung hocheffizienter adenoviraler Vektoren mit transkriptionaler Kontrolle der Genexpression für die Gentherapie gastrointestinaler Tumoren.“ Jahrestreffen der Deutschen Gesellschaft für Verdauung und Stoffwechsel 2002, Bonn.

Block, A., Puls, F., Milasinovic, D., Schäfer, P., Ameis, D., Windler, E., Greten, H. „Tetracycline regulated gene expression in adenoviral gene therapy of colon carcinoma." Jahrestreffen der American Association for Cancer Research 2001, New Orleans.

Block, A., Wulff, H., Puls, F., Müller, J., Greten, H. „Induzierbare Interleukin-18 Genexpression in Kolonkarzinom-Zellen durch neuartige tetracyclinregulierbare Vektoren.“ 107. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2001, Wiesbaden.

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Aufgabenstellung	1
1.2.	Gentherapie	1
1.2.1.	Gentransfer	2
1.2.2.	Genexpression	4
1.2.3.	Therapierte Erkrankung und Auswahl des therapeutischen Gens	5
1.3.	Adenovirale Vektoren	6
1.3.1.	Struktur	6
1.3.2.	Organisation des Genoms	8
1.3.3.	Lebenszyklus	9
1.3.4.	Virale Vektoren zum Gentransfer	11
1.3.5.	Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Erstgenerations-Vektoren in der Therapie maligner Erkrankungen	12
1.3.6.	Probleme der Therapie maligner Erkrankungen mit adenoviralen Vektoren	13
1.4.	Regulierbare Expressionssysteme	15
1.4.1.	Durch Tetracycline regulierbare Expressionssysteme	16
1.4.2.	Weiterentwicklung des Transaktivators	18
1.5.	Die Immunbiologie des Interleukin-12	21
1.5.1.	Struktur und Vorkommen	21
1.5.2.	Biologische Funktionen	22
1.5.3.	Antitumorale Aktivität von Interleukin-12	23
1.5.4.	Toxizität von Interleukin-12	24
1.5.5.	Interleukin-12 in klinischen Studien	25
1.5.6.	p40/p35 Fusionsproteine	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1.	Materialien	27
2.1.1.	Chemikalien	27
2.1.2.	dNTPs, Molekulargewichtsstandards und Proteine	28
2.1.3.	Enzyme	28
2.1.4.	IgG-Antikörper	29
2.1.5.	Puffer	29

---

2.1.6.	Bakterienmedien	29
2.1.7.	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	29
2.1.8.	Antibiotika	30
2.1.9.	Zusammensetzung sonstiger Lösungen	30
2.1.10.	Wasser	31
2.1.11.	Bakterien	31
2.1.12.	Reagenzienkits	31
2.1.13.	Weitere Materialien	31
2.1.14.	Geräte	31
2.1.15.	Zelllinien	32
<b>2.2.</b>	<b>Allgemeine Arbeitsmethoden</b>	<b>33</b>
2.2.1.	Sterilisation	33
2.2.2.	Absorptionsmessungen	33
2.2.3.	Zellkultur	33
<b>2.3.</b>	<b>Klonierung in bakteriellen Plasmidsystemen</b>	<b>34</b>
2.3.1.	Bakterienkultur	34
2.3.2.	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	34
2.3.3.	Restriktionsverdau	35
2.3.4.	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.3.5.	Isolierung einzelner DNA Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese	36
2.3.6.	Auffüllen der Enden	36
2.3.7.	Ligation	37
2.3.8.	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> Bakterien	38
2.3.9.	Kryokonservation der Bakterien	38
<b>2.4.</b>	<b>Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide</b>	<b>38</b>
2.4.1.	Klonierung von pAd.3i-luc	39
2.4.2.	Klonierung von pAd.3r-luc	40
2.4.3.	Klonierung von pAd.3i-scmIL-12	40
2.4.4.	Klonierung von pAd.3r-scmIL-12	41
2.4.5.	Klonierung von pAd.3i und pAd.3r	41
2.4.6.	Klonierung von pShuttle.3r und pShuttle.3i	42
<b>2.5.</b>	<b>Triton X-114 Endotoxinextraktion</b>	<b>42</b>
<b>2.6.</b>	<b>Generation der adenoviralen Vektoren durch Rekombination in 293 Zellen</b>	<b>43</b>

---

2.6.1.	Transfektion der 293 Zellen	44
2.6.2.	Overlay	44
2.6.3.	$\beta$ -Galaktosidase-Färbung	45
2.6.4.	CPE-Assay	45
2.6.5.	Grobe funktionelle Testung der induzierbaren Genexpression	46
2.6.6.	Isolation der viralen DNA im CPE Überstand	46
2.6.7.	Amplifikation der Übergangssequenzen zwischen inserierter und adenoviraler DNA	46
<b>2.7.</b>	<b>Produktion und Aufreinigung der Adenoviren</b>	<b>47</b>
2.7.1.	Vermehrung in 293 Zellen	47
2.7.2.	Cäsiumchloridzentrifugation und Dialyse	48
<b>2.8.</b>	<b>Titerung mittels Plaqueassay</b>	<b>49</b>
<b>2.9.</b>	<b>Infektion der Gewebekulturen</b>	<b>50</b>
<b>2.10.</b>	<b>Bestimmung der Aktivität des Reportergens Luciferase</b>	<b>51</b>
<b>2.11.</b>	<b>Proteinbestimmung</b>	<b>52</b>
<b>2.12.</b>	<b>ELISA zur Bestimmung der Konzentration der Zytokine Interleukin-12 und Interferon-<math>\gamma</math></b>	<b>52</b>
<b>2.13.</b>	<b><i>In vitro</i> Bioassay zur Funktionsbestimmung des murinen Interleukin-12</b>	<b>52</b>
<b>2.14.</b>	<b>Western Blots</b>	<b>54</b>
<b>2.15.</b>	<b>Blutserumgewinnung</b>	<b>55</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
<b>3.1.</b>	<b>Einführung</b>	<b>56</b>
<b>3.2.</b>	<b>Ergebnisse der Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide</b>	<b>56</b>
3.2.1.	pAd.3i-luc	56
3.2.2.	pAd.3r-luc	57
3.2.3.	pAd.3i-scmIL-12	57
3.2.4.	pAd.3r-scmIL-12	58
3.2.5.	pAd.3i/pAd.3r	59
3.2.6.	pShuttle.3i/pShuttle.3r	60
3.2.7.	Funktionelle Überprüfung der Plasmidvektoren pAd.3i-luc und pAd.3r-luc	60

<b>3.3. Adenovirale Vektoren</b>	<b>61</b>
3.3.1. Ad.3i-luc	62
3.3.2. Ad.3r-luc	62
3.3.3. Ad.CMV-luc	62
3.3.4. Ad.3r-scmIL-12	62
3.3.5. Ad.CMV-p40.IRES.p35	62
<b>3.4. Ergebnisse der Zellkulturexperimente der Reporter-genektoren</b>	<b>63</b>
3.4.1. Charakterisierung von Ad.3i-luc in HT-29 Zellen bei verschiedenen m.o.i.	63
3.4.2. Charakterisierung von Ad.3r-luc in HT-29 Zellen bei verschiedenen m.o.i.	64
3.4.3. Überprüfung von Ad.3i-luc und Ad.3r-luc in HT-29 Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin	65
3.4.4. Western Blots des Zelllysats aus 3.4.3.	66
3.4.5. Vergleich von Ad.3r-luc in HELA und HELA-tTA Zellen	67
3.4.6. Vergleich von Ad.3r-luc mit Ad.CMV-luc in HT-29 Zellen	68
3.4.7. Überprüfung von Ad.3r-luc in verschiedenen Zelllinien	69
3.4.8. Überprüfung von Ad.3r-luc und Ad.3i-luc in HT-29 Zellen bei humanem Serum verschiedener Probanden	70
<b>3.5. Ergebnisse der <i>in vitro</i> Versuche mit dem Interleukin-12 codierenden Vektor Ad.3r-scmIL-12</b>	<b>72</b>
3.5.1. Testung von Ad.3r-scmIL-12 in HT-29 Zellen bei verschiedenen m.o.i.	72
3.5.2. Vergleich von Ad.3r-scmIL-12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 in verschiedenen Zelllinien	73
<b>3.6. Funktionelle Testung der exprimierten Zytokine im Bioassay</b>	<b>74</b>
3.6.1. Interferon- $\gamma$ Ausschüttung der Splenozyten in An- und Abwesenheit von Doxycyclin	74
3.6.2. Interferon- $\gamma$ Ausschüttung der verschiedenen Subtypen des exprimierten murinen IL-12	75
<b>4. Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1. Einleitung: Regulierte Genexpression in der Gentherapie	77
4.2. Charakterisierung der Tetracyclin-regulierbaren adenoviralen Reporter-vektoren	78

4.2.1.	Das Tet-OFF System zeigt eine höhere Regulierbarkeit als das Tet-ON System	78
4.2.2.	Die Regulationskapazität ist m.o.i. abhängig	80
4.2.3.	Die Regulationskapazität des Ad.3r-luc ist abhängig von der Zelllinie	80
4.2.4.	Einflüsse auf die Regulationskapazitäten in adenoviralen Vektoren	81
4.2.5.	Vergleich der Regulationskapazität des vorliegenden Ansatzes mit anderen publizierten Ergebnissen	83
4.2.6.	Optimierung des Systems	84
<b>4.3.</b>	<b>Charakterisierung der Interleukin-12 exprimierenden Vektoren</b>	<b>85</b>
4.3.1.	Die Regulationskapazität des Ad.3r-scmIL-12	85
4.3.2.	Die Produktion des murinen single chain Interleukin-12 ist effizienter als die des heterodimeren Interleukin-12	86
4.3.3.	Das produzierte murine single chain IL-12 weist eine höhere Bioaktivität als das Heterodimer auf	87
<b>4.4.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>88</b>
4.4.1.	<i>In vivo</i> Anwendung im Tiermodell	88
4.4.2.	Sicherheit in der Gentherapie	89
4.4.3.	Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract</b>	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungs-und Tabellenverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>117</b>
9.1.	Abkürzungsverzeichnis und Erklärung von Fachbegriffen	117
9.2.	Abbildungen der Agarosegele	118
9.2.1.	pAd.3i-luc	118
9.2.2.	pAd.3r-luc	118
9.2.3.	pAd.3i-scmIL-12	119
9.2.4.	pAd.3r-scmIL-12	119
9.2.5.	pAd.3r/3i	119



9.2.6.	Amplifikate der viralen DNA _____	120
9.3.	Liste der verwendeten und generierten Plasmide _____	121
9.4.	Liste der genannten Firmen _____	122
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> _____	<b>124</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf</b> _____	<b>125</b>
<b>12.</b>	<b>Erklärung</b> _____	<b>126</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen adenovirale Vektoren zur Genterapie maligner Erkrankungen entwickelt werden, die eine regulierbare Transgenexpression besitzen und sich damit zum Transfer potentiell toxischer Gene eignen. Die Genexpression sollte zusätzlich zur Regulierbarkeit in ihrer maximalen Stärke der Expression durch herkömmliche Promotorsysteme überlegen sein. Die Regulationskapazitäten sind zunächst mit Hilfe des Reportergens Luciferase zu charakterisieren. Bei effizienter Kontrolle über die Transgenexpression *in vitro* soll weiterhin ein adenoviraler Vektor zur kontrollierten Expression des anti-tumoral wirksamen, jedoch potentiell toxischen, Zytokins Interleukin-12 (IL-12) konstruiert werden. Die Regulierbarkeit der Transgenexpression des murinen IL-12 sowie seine Bioaktivität *in vitro* ist anschließend aufzuzeigen. Weiterhin soll die Expression mit den bisher in Mausmodellen eingesetzten adenoviralen Vektoren verglichen werden.

Aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse zur regulierten Genexpression wird das durch Tetracycline regulierbare System in einer autoregulativen Konfiguration für diesen Zweck als am besten geeignet angesehen und soll zur regulierbaren Expression der Luciferase und des murinen IL-12 aus der E1 Region E1/E3 deletierter adenoviraler Vektoren benutzt werden. Die Regulierbarkeit der Tet-OFF und Tet-ON Variante des autoregulativen Systems ist bei unterschiedlichen Bedingungen zu charakterisieren. Als therapeutisches Gen wird ein IL-12 Fusionsprotein als optimal geeignet betrachtet, da es sehr effektiv exprimiert und eine Bildung von inhibitorischen p40 Homodimeren verhindert wird. Seine regulierbare Expression soll in verschiedenen Zelllinien bestimmt und seine Bioaktivität mit der eines adenoviral exprimierten Heterodimers und eines aufgereinigten rekombinanten Standards verglichen werden.

## 1.2. Genterapie

Bei der Genterapie handelt es sich um eine noch in der experimentellen Phase befindliche Therapieform. Sie wird häufig definiert als die Kombination verschiedener Ansätze zur Behandlung menschlicher Erkrankungen, welche auf dem Transfer von auf DNA basierendem genetischen Material beruhen (Kresina 2001). Der Gentransfer kann auf unterschiedlichen Wegen *in vivo* und *in vitro* unter Anwendung verschiedener Techniken erzielt werden. Es bestehen genterapeutische Ansätze in der Behandlung von hereditären, malignen, infektiösen, vaskulären und degenerativen Erkrankungen. 636 abgeschlossene oder laufende genterapeutische Phase I- und II-Studien, die insgesamt 3496 Patienten betreffen, sind

zur Zeit bekannt (National Institutes of Health 2003). 64% der gentherapeutischen Studien betreffen maligne Erkrankungen. 27% der Studien benutzen adenovirale Vektoren als Transfervehikel. Die durchgeführten Studien offenbarten verschiedene Schwächen der gentherapeutischen Ansätze, die meistens nicht im therapeutischen genetischen Material, sondern eher im benutzten Transfervehikel zu suchen sind (Romano *et al.* 1999). Aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeiten der Gentherapie sollten Anstrengungen in der Weiterentwicklung und Verbesserung der bisher verfügbaren Transfermethoden unternommen werden.

Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Ziele und Möglichkeiten der Gentherapie gegeben werden. Weiterhin werden Adenoviren in ihrem Aufbau, Lebenszyklus und Einsatz zum Gentransfer in der Gentherapie genauer vorgestellt. Da in dieser Arbeit die regulierte Genexpression nach adenoviralem Gentransfer im Vordergrund steht, werden im Anschluss regulierbare Genexpressionssysteme beschrieben. Mit dem IL-12 ist ein in der Gentherapie bereits eingesetztes Zytokin verfügbar, bei welchem neben hoher Bioaktivität aufgrund potentiell toxischer Nebenwirkungen eine Notwendigkeit zur regulierten Expression besteht. Die Eigenschaften und Wirkungen dieses Zytokins werden in der Einleitung ebenfalls erörtert.

### **1.2.1. Gentransfer**

Zu den beiden kritischen technischen Schritten einer gentherapeutischen Anwendung gehören der effiziente und zielgerichtete Transfer des genetischen Materials sowie die anschließende Expression des genetischen Materials auf dem für die Therapie erforderlichen Niveau. Der Gentransfer kann direkt (*in vivo*) oder durch genetische Manipulation entnommener Zellen (*in vitro*) und anschließende Reimplantation erfolgen. Verschiedene Gentransfersysteme mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen sind bereits in klinischen Studien eingesetzt worden. Dazu gehören die Verpackung des genetischen Materials in RNA bzw. DNA von Adenoviren, Retroviren, Vacciniaviren, adeno-assoziierten Viren sowie Herpesviren, die DNA-Injektion, die Injektion von Polylysin-DNA-Komplexen sowie die Verpackung des genetischen Material in kationische Liposomen (zusammenfassend in Romano *et al.* 2000). Der ideale Transfer benutzt eine Methode, die leicht und reproduzierbar anzuwenden ist, bei deren Applikation keine Nebenwirkung für den Patienten entstehen, die mit hoher Effektivität das genetische Material selektiv in die Zielzellen einschleust und eine den therapeutischen Anforderungen entsprechende Expression des genetischen Materials gewährleistet. Zur Zeit gibt es keine Transfermethode, die alle diese For-

derungen optimal erfüllt. Die verschiedenen physikalischen Methoden des Gentransfers weisen eine ineffiziente Transduktion der Zielzellen und eine mangelnde Stabilität des exprimierten genetischen Materials auf. Die viralen Transfersysteme unterscheiden sich hauptsächlich in der Effizienz und Selektivität der infizierten Zielzellen, in der Stabilität und Größe des transferierbaren genetischen Materials und in der Immunreaktion der Wirtsorganismen. Eine Übersicht über die vor- und nachteiligen Charakteristika der am häufigsten eingesetzten Vektoren bietet die Tabelle 1.

**Tabelle 1: Vor- und Nachteile verwendeter viraler Vektoren in der Gentherapie.**

<b>Viraler Vektor</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Adenoviral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infektion eines breiten Spektrums auch sich nicht teilender Zellen</li> <li>• Titerpräparation bis <math>10^{12}</math> pfu/ml möglich</li> <li>• hohe transiente Genexpression</li> <li>• 7-8 kb große Geninsertion möglich, bei Deletion essentieller Teile des adenoviralen Genoms bis über 30 kb</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Provokation einer wirtseigenen Immunantwort gegen die viralen Partikel und transduzierte Zellen</li> <li>• Verminderung der Transduktion und Expressionsdauer durch die wirtseigene Immunantwort</li> <li>• Keine Integration in das Wirtsgenom, daher für eine Langzeitexpression ungeeignet</li> </ul>
Retroviral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• breiter Zelltropismus</li> <li>• keine toxischen Effekte auf infizierte Zellen</li> <li>• stabile Expression aufgrund der Integration ins Wirtsgenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infektion nur von sich teilenden Zellen</li> <li>• Relativ niedrige Titer von <math>10^6</math>-<math>10^7</math> pfu/ml</li> <li>• Insertion ins Wirtsgenom kann zur malignen Transformation der Zielzelle führen</li> <li>• Instabilität der Virusgenome</li> <li>• Möglichkeit der Rekombination mit endogenen humanen Retroviren</li> </ul>
Vacciniaviral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sehr breiter Zelltropismus</li> <li>• bis zu 25 kb große Geninsertion möglich</li> <li>• Existenz von cytotoxischen und nicht cytotoxischen Vektoren</li> <li>• geringes Nebenwirkungsspektrum bei Immunkompetenten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• starke Immunantwort durch Expression von bis zu 100 viruseigener Proteine</li> <li>• geringes Nebenwirkungsspektrum bei Immunkompetenten</li> <li>• keine Langzeitexpression</li> </ul>
Adeno-assoziiert	<ul style="list-style-type: none"> <li>• breites Spektrum an infizierbaren, auch sich nicht teilenden Zellen</li> <li>• nicht pathogen und nicht toxisch für den Wirtsorganismus</li> <li>• stabile Expression aufgrund der Integration ins Wirtsgenom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insertion ins Wirtsgenom kann theoretisch zur malignen Transformation der Zielzelle führen</li> <li>• limitierte Kapazität von circa 4 kb</li> <li>• mögliche Kontamination der Virusaufreinigung mit einem Helfer-Adenovirus</li> </ul>

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Vektorsysteme werden sie in der Gentherapie zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Retroviren können durch Integration eines intakten Gens in das Wirtsgenom angeborene Gendefekte ausgleichen. Durch ihre niedrige Transduktionseffizienz eignen sie sich hingegen nur für eine *ex vivo* Infektion mit anschließender Replantation der Zellen. Die Insertion in das Wirtsgenom birgt weiterhin die Gefahr einer malignen Transformation der Zelle, auch Insertionsmutagenese ge-

nannt. Zwei durch diesen Mechanismus aufgetretene Fälle einer T-Zell-Leukämie bei Kindern mit einer schweren kombinierten Immundefizienzkrankung (SCID), welche durch retroviralen Gentransfer therapiert wurde, veranlasste die Food and Drug Administration, alle laufenden amerikanischen klinischen Studien einzufrieren, die einen retroviralen Transfer in hämatogene Stammzellen umfassen (European Society of Gene Therapy 2003). Adenoviren eignen sich durch ihre transiente, aber hohe Genexpression gut für die Expression toxischer Gene in Tumorzellen. Durch Weiterentwicklung sind in den letzten Jahren virale Vektoren mit verbesserten Eigenschaften für den Gentransfer geschaffen worden. Einige dieser Neuerungen werden in dem Abschnitt über adenovirale Vektoren vorgestellt.

### **1.2.2. Genexpression**

Die Expression des transferierten genetischen Materials soll die erforderliche Menge des therapeutischen Proteins bereitstellen. Die durch die verschiedenen viralen Vektoren vermittelten Expressionsmuster differieren stark voneinander und werden so zu unterschiedlichen Zwecken ausgenutzt. Die Expression von Retroviren und adeno-assoziierten Viren hält lange an, ist aber in ihrer Stärke abhängig von der chromosomalen Integrationsstelle des retroviralen Genoms. Weiterhin birgt sie durch transferierte Enhancer und Promotoren die Gefahr der Aktivierung zelleigener Onkogene. Die durch Adenoviren vermittelte Genexpression ist durch fehlende chromosomale Integration nur vorübergehend, da das episomal vorliegende adenovirale Genom bei einer Zellteilung nicht weitergegeben wird. Bei Verwendung von adenoviralen Vektoren der ersten Generation besteht weiterhin durch die Expression viraler Proteine eine starke Immunantwort gegen die transfizierten Zellen. Durch den breiten adenoviralen Zelltropismus ist die fehlende Restriktion der Expression auf eine bestimmte Zellpopulation ebenfalls ein Problem. Durch die Verwendung gewebespezifischer Promotoren wird versucht, die Expression auf eine bestimmte Zellpopulation zu beschränken. Ein weiteres Problem der Gentherapie ist die fehlende Kontrolle über die Genexpression nach einer Infektion. Dies ist besonders wichtig bei der Expression potentiell toxischer Gene mit systemischen Nebenwirkungen sowie bei Genen, deren Expression nur in einem bestimmten Zeitfenster erwünscht ist. Ideal wäre nicht nur eine An- und Abschaltbarkeit, sondern auch eine Einstellbarkeit der Genexpression in einen therapeutisch erforderlichen Bereich.

### **1.2.3. Therapierte Erkrankung und Auswahl des therapeutischen Gens**

Der klassische Ansatz der Gentherapie beruht auf dem Korrekturversuch einer angeborenen rezessiv monogenetisch bedingten Erkrankung. Angeborene Mutationen beider Allele führen hier zu dem krankheitsauslösenden Funktionsverlust eines Proteins. Der therapeutische Ansatz beruht auf dem Hinzufügen einer korrekten Kopie des mutierten Allels, welches korrekt exprimiert die Funktion des defekten Proteins ersetzen soll. Die ersten gentherapeutisch behandelten Erkrankungen waren autosomal-rezessive Erkrankungen dieser Kategorie wie die zystische Fibrose und x-chromosomal rezessive Erkrankungen wie der Adenosindeaminase-Mangel, welcher das schwere kombinierte Immundefizienzsyndrom (SCID) verursacht, sowie die Hämophilie A/B.

Die Ausdehnung gentherapeutischer Ansätze auf maligne Erkrankungen, deren Ursache nach heutigem Verständnis eine Anhäufung somatischer Mutationen in einem Zellklon darstellt, führte zu den Versuchen der Korrektur dieser erworbenen Mutationen, wie z. B. dem Ersatz mutierter Tumorsuppressor-Gene. Das Problem dieses Ansatzes ist eine vorausgesetzte Transduktionseffizienz von 100% der malignen Zellpopulation, keine Dominanz der somatischen Mutation und eine Reversibilität des malignen Phänotyps nach dem Gentransfer.

Indirekte gentherapeutische Ansätze verfolgen bei multifaktoriellen Erkrankungen keine „genetische Reparatur“, sondern versuchen durch die Expression von Proteinen Mechanismen anzustoßen, die in den Krankheitsverlauf eingreifen.

Hierzu gehört die Expression von Proteinen, welche eine Apoptose maligner Zellen vermitteln sollen, wie z. B. die sogenannte Enzyme-Prodrug-Therapie. Transduzierte maligne Zellen exprimieren hierbei Enzyme wie Thymidinkinase, welche nicht-toxische Prodrugs intrazellulär zu toxischen Antimetaboliten umwandelt. Weitere indirekte Ansätze bestehen in Versuchen, durch Gentransfer eine antitumorale Immunantwort zu provozieren. Dies soll durch die Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Tumorzellen oder durch Sekretion von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren der transfizierten Tumorzellen erreicht werden. Durch Expression der normalerweise auf dendritischen Zellen exprimierten Moleküle wie B7.1, B7.2, CD40L und VCAM-1 erlangen die neoplastischen Zellen die Fähigkeit, mit zytotoxischen T-Zellen in Kontakt zu treten. Da sie wie dendritische Zellen ebenfalls eine Vielzahl von Antigenen exprimieren, könnten sie zur Induktion antitumoraler T-Zellen an deren Stelle treten. Der Transfer von Zytokingenen wie IL-12 oder GM-CSF in Tumorzellen ist ebenfalls ein Ansatz, um die Immunogenität maligner Zellen und ihre Er-

kennung durch das Immunsystem zu verstärken. Hierauf wird weiterhin in dem Abschnitt über die Immunbiologie des IL-12 eingegangen.

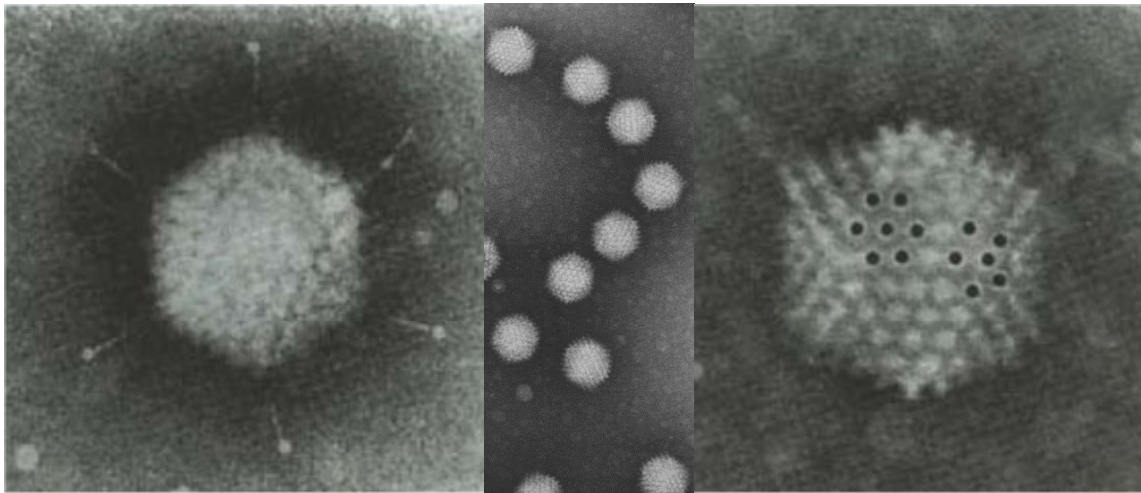
Weiterhin gab es in den letzten Jahren eine expandierende Zahl von indirekten Ansätzen in Tiermodellen, durch Expression transferierter Gene Einfluss auf den Verlauf unterschiedlicher Erkrankungen zu nehmen. Als Beispiele seien der Gentransfer des  $\beta_2$ -Adrenozeptors bei ischämischer Herzinsuffizienz (Tevaeai *et al.* 2002), die Expression des Zytokins IL-4 bei rheumatoider Arthritis (Tanner *et al.* 2002) und der Tyrosin-Hydroxylase bei Morbus Parkinson (Corti *et al.* 1999) genannt.

### **1.3. Adenovirale Vektoren**

In Menschen verursachen Adenoviren respiratorische, konjunktivale und gastroenteritische Infektionskrankheiten. Diese verlaufen in Immunkompetenten meist selbstlimitierend. Adenoviren wurden bei dem Versuch, primäre Zelllinien aus resezierten Adenoiden zu etablieren, als zytotoxische Effekte auslösende Partikel nachgewiesen. Aufgrund von Hämagglutinationseigenschaften sind beim Menschen 47 Serotypen beschrieben, welche in die Subgruppen A-F eingeteilt werden. Alle bekannten humanen Serotypen besitzen ähnliche strukturelle und biologische Eigenschaften. Die meisten für den Gentransfer benutzten Viren leiten sich von dem Serotyp 5 ab, da sie kein bekanntes onkogenes Potential besitzen. Die Durchseuchungsrate und somit eine vorbestehende humorale und zelluläre Immunität ist in der Bevölkerung zudem sehr hoch. Eine Entstehung replikationskompetenter Adenoviren des Serotyps 5 während einer gentherapeutischen Anwendung durch Rekombination oder Mutation in einem Wirt, der sich immunologisch zuvor mit diesem Serotyp auseinandergesetzt hatte, würde deshalb wahrscheinlich kontrolliert werden können.

#### **1.3.1. Struktur**

Adenoviren besitzen ein doppelsträngiges lineares DNA Genom von 30–40 Kilobasen (kb) Größe, welches an beiden Enden ein Inverted Terminal Repeat (ITR) besitzt. Das Genom ist in einem ikosaedrischen, nicht umhüllten Viruskapsid von 70–100 nm Größe verpackt (siehe Abb. 1).

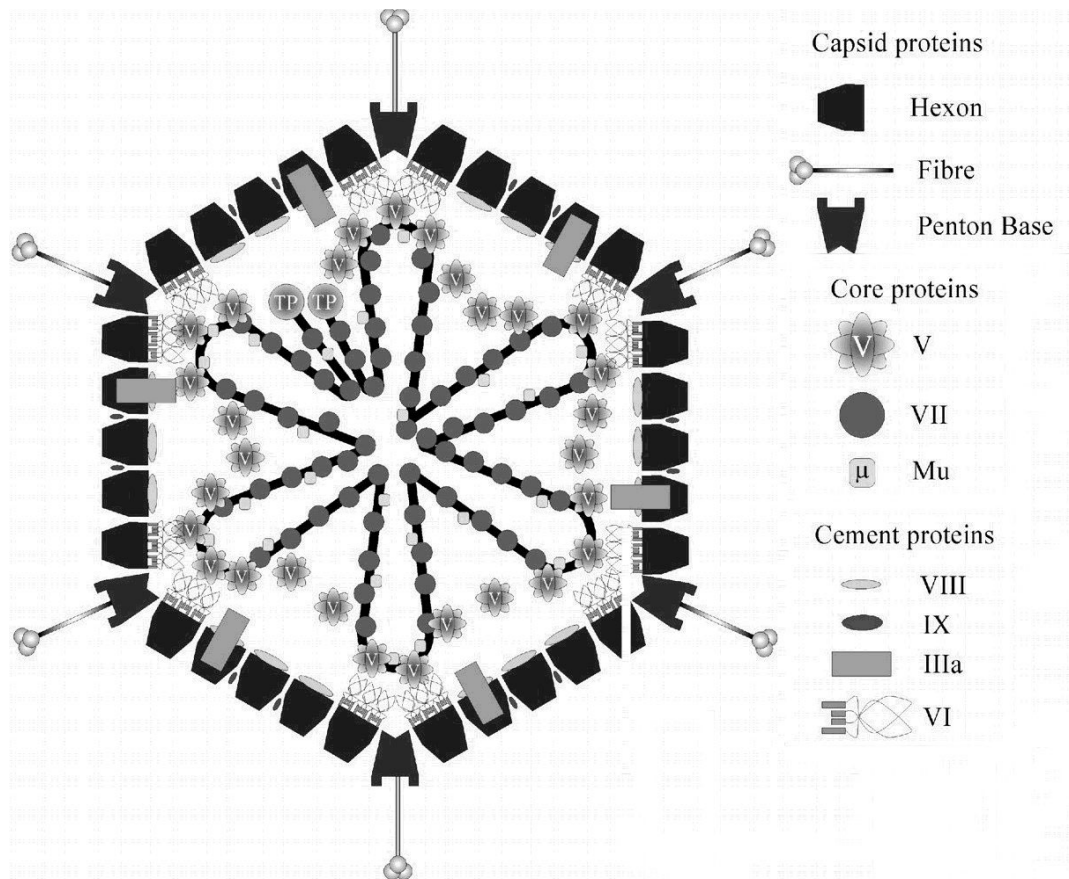


**Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen adenoviraler Kapside.**

Diese zeigen den typischen ikosaedrischen Aufbau des Viruskapsids (Quellen: Dr. A. Cann, University of Leicester, Großbritannien, Horwitz 2004).

Dieses für alle Adenoviren typische Kapsid ist aus 252 Kapsomeren, 240 Hexonen und 12 Pentonen zusammengesetzt. Ein Trimer der großen Hexonproteine (II) bildet ein Hexon. Der Hexonverbund wird von den kleineren Proteinen VI, VIII und IX stabilisiert. Ein Penton wird von fünf Pentonproteinen (III) gebildet, die mit dem kleineren IIIa Protein assoziiert sind. Ein sogenanntes Fiberprotein ragt aus dem Zentrum eines Pentons nach außen. Es ist für die Bindung des Virus an seinen zellulären Rezeptor verantwortlich (Kirby *et al.* 2000). Das kapsidummantelte Core enthält die virale DNA. Diese ist an ihren 5' ITR mit dem terminalen Protein (TP) assoziiert, welches eine wichtige Rolle bei der Replikation übernimmt. Weiterhin ist sie eng an die basischen Proteine V (180 Kopien/Partikel) und VII (1070 Kopien/Partikel) gebunden, die eine histonähnliche Funktion übernehmen. Protein V stellt weiterhin eine Verbindung zum Kapsid über Protein VI her. Zudem besitzt Protein V eine Proteasefunktion, die strukturelle Proteine bei der Produktion infektiöser Partikel prozessiert (Webster *et al.* 1989). Eine schematische Übersicht über den Aufbau des adenoviralen Kapsids und des Cores bietet die Abb. 2.





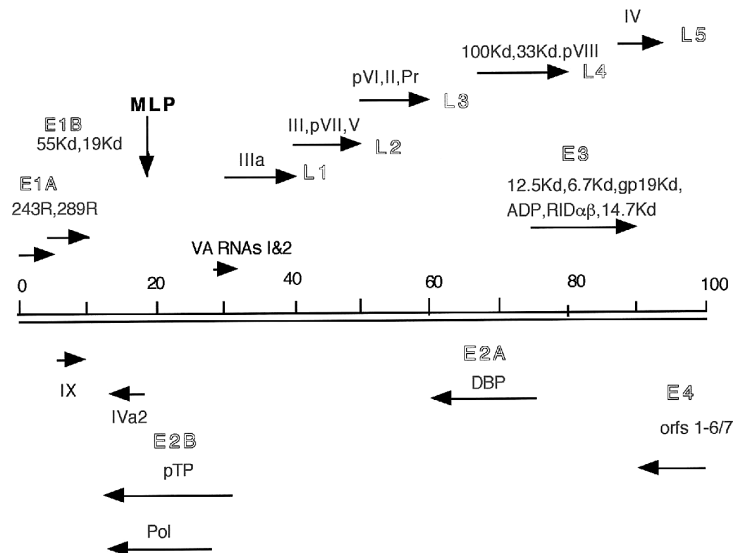
**Abbildung 2: Modell des adenoviralen Partikels.**

(Quelle: Russel 2000).

### 1.3.2. Organisation des Genoms

Das 36 kb lange adenovirale Genom wird in der Genkarte konventionsgemäss mit dem E1A Gen am linken Ende dargestellt und in 100 gleich große „map units“ eingeteilt. Die Nummerierung der Basenpaare beginnt mit dem ersten 5'-Nukleotid am linken Ende des Genoms. Basenpaare 1-380 enthalten das zur Replikation notwendige ITR und die sogenannten Verpackungssequenzen, welche auf einer DNA vorhanden sein müssen, damit diese in adenovirale Partikel verpackt werden kann (Schmid und Hearing 1998). Bei der Benutzung adenoviraler Vektoren zur Genterapie können diese Sequenzen nicht ersetzt werden.

Das Genom wird in Transkriptionseinheiten unterteilt, wobei zunächst Transkripte vor („early“) und nach („late“) der DNA-Replikation unterschieden werden. Es existieren 5 frühe (E1A, E1B, E2, E3 und E4), zwei verzögert frühe (IX und IVa2) und eine späte Transkriptionseinheit, welche posttranskriptionell prozessiert wird. Im Allgemeinen gilt, dass frühe Transkriptionseinheiten regulatorische und die späte Transkriptionseinheit strukturelle Proteine codieren.



**Abbildung 3: Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms.**

(ADP: adenovirus death protein, DBP: DNA bindendes Protein, MLP: major late promotor, Pol: DNA-Polymerase, pTP: terminales Protein, Quelle: Russel 2000).

### 1.3.3. Lebenszyklus

Der Lebenszyklus der Adenoviren kann in eine frühe und späte Phase eingeteilt werden. Die frühe Phase besteht aus der Adsorption, dem Eintritt des Virus, dem Transport zum Nukleus und der Expression der frühen Gene. Diese modulieren die zelluläre Aktivität, so dass es zu einer Erleichterung der viralen DNA-Replikation kommen kann. In der späten Phase der Infektion werden die strukturalen Proteine transkribiert und produziert, bevor es zur Zusammensetzung der infektiösen Partikel in Nukleus und Freisetzung aus der lytischen Zelle kommt. In einer permissiven Zelllinie dauert die frühe Phase sechs bis acht, die späte vier bis sechs Stunden.

Die Adsorption des Adenovirus an die Zielzelle erfolgt durch Interaktion des Kopfes des Fiberproteins an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson *et al.* 1997). Die meisten adenoviralen Serotypen benötigen CAR zur Adsorption (Russel 2000), welches physiologischerweise wahrscheinlich ein interzelluläres Adhäsionsmolekül und Bestandteil von epithelialen tight junctions darstellt (Brüning und Runnebaum 2003, Cohen *et al.* 2001). Einige Serotypen besitzen zusätzliche Bindungsspezifitäten. So benutzt Serotyp 11 ebenso wie das Masernvirus CD46 als zellulären Rezeptor (Segerman *et al.* 2003), und Serotyp 37 bindet an Sialoglycoproteinrezeptoren (Arnberg *et al.* 2000). Von dem MHC Klasse I Molekül konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls einen Rezeptor für den Serotyp 5 darstellt (Hong *et al.* 1997). In einem zweiten Adsorptionsschritt interagiert die Pentonbasis durch ein Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) Motiv mit dem  $\alpha_v$ -Integrin der Zelle. Die Restinfektiosität des Virus nach Ablation der CAR-bindenden Domäne des Fiberproteins ist wahrscheinlich der direkten Interaktion von Pentonbase und Integrinmolekül zuzu-

schreiben (Alemany und Curiel 2001). Es folgt die Internalisierung des Partikels in Endosomen, mediiert durch Clathrin und den coated pits Pfad, wobei das saure Milieu für eine stufenweise Degradierung des Partikels sorgt, die durch die viruseigene Protease unterstützt wird. Nach Freisetzung in das Zytoplasma erfolgt der Transport zum Nukleus und der Eintritt des Genoms durch Kernporen. Der Transport benötigt Mikrotubuli und Dynein, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist (Russell 2000). Die Transkription der frühen Gene beginnt bereits 1 Stunde nach Infektion.

Die ersten Genprodukte sind die E1A Proteine, 289R und 243R, deren Namen auf der Anzahl ihrer Aminosäuren beruhen. Simplifiziert gesehen bewirken sie den Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase durch Interferenz mit den Regulationsproteinen von E2F, p53, CyclinE und NF- $\kappa$ B und aktivieren die Transkription der weiteren frühen adenoviralen Gene. Weiterhin interagieren sie mit einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren (zusammenfassend in Russell 2000, Gallimore und Turnell 2001). Die E1A Proteine bestimmter Serotypen können eine Transformation der Zelle bewirken. Die Deletion der E1A Region verhindert den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus und eine Produktion infektiöser Partikel, so dass sie zur Generation replikationsdefizienter Viren benutzt wird. Trotz verlorener Replikationsfähigkeit kann ein E1 deletiertes Adenovirus nach Zellinfektion noch eine signifikante Expression von Struktur- und E2-Proteinen zeigen (Lusky *et al.* 1998).

Das E1B Protein verhindert die Apoptoseinduktion durch Inaktivierung von p53. Aufgrund dieser Interaktion wurde postuliert, dass ein E1B deletierter Vektor sich ausschließlich in p53 defizienten Zellen vermehren könne (Bischoff *et al.* 1996) und damit ein idealer Vektor für die Gentherapie p53 defekter Malignome darstelle. Eine Replikationsselektivität in Lungentumorzellen (p53<sup>-</sup>/p53<sup>wt</sup>) konnte jedoch nicht bestätigt werden (Hay *et al.* 1999).

Die E2 Genprodukte bestehen aus dem DNA-bindenden Protein (DBP, E2A), dem terminalen Protein (TP, E2B) und der DNA-abhängigen Polymerase (Pol, E2B). Sie werden neben zellulären Faktoren wie NFI, NFII und Topoisomerase I zur Replikation des adenoviralen Genoms gebraucht. Eine Deletion der E2 und E1 Regionen verhindert eine residuelle Expression der späten Strukturproteine (Lusky *et al.* 1998).

Die E3 Genprodukte, die für die Vermehrung des Adenovirus in Zellkultur überflüssig sind, untergraben die Immunantwort des Wirtes *in vivo*. Das E3 19K Protein verhindert Expression und Oberflächentransport der MHC I Moleküle, wo diese, mit viralen Proteinen beladen, zytotoxische T-Zellen aktivieren können (Bennett *et al.* 1999). Die E3 Proteine RID $\alpha$ & $\beta$  und 14.7K blockieren die Signaltransduktion einer durch Tumor-Nekrose-

Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzierten Apoptose (Russell 2000). In zum Gentransfer benutzten rekombinanten Viren wird die E3 Region aus Kapazitätsgründen meist vollständig deletiert. Zur Replikation des Virus sind die meisten E4 Genprodukte essentiell. Sie bewirken über verschiedene Mechanismen eine Verstärkung der viralen mRNA Expression und hemmen die wirtseigene Transkription (Russell 2000). E1/E4 deletierte rekombinante adenovirale Vektoren zeigen eine stark verminderte Expression früher und später viraler Gene und weniger zytotoxische Effekte als E1 deletierte Vektoren (Gao *et al.* 1996).

Nach Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase und Akkumulation der E2 Proteine beginnt mit der Replikation der viralen DNA die späte Phase des Infektionszyklus. Die Replikation erfolgt semikonservativ durch die virale Polymerase mit Hilfe des an das ITR gebundenen terminalen Proteins, des DNA-bindenden Proteins und zellulärer Transkriptionsfaktoren.

Die späten Gene werden unter Aktivierung des Major Late Promotors durch das IVa2 Protein als 28 kb langes RNA Molekül, das mehrfach gespleißt wird, transkribiert. Die fünf Spleißprodukte codieren die Struktur- und Stabilitätsproteine. Die Anwesenheit von Verpackungssequenzen enthaltender DNA im Zellkern leitet die Zusammensetzung der Core- und Kapsidstrukturen ein (Hearing *et al.* 1987). Das Adenovirus Death Protein bewirkt eine Auflösung der Kernmembran und Zytolyse mit Freisetzung der verpackten Kapside. Es entstehen  $10^4$ - $10^5$  Viren pro Zelle.

#### **1.3.4. Virale Vektoren zum Gentransfer**

Die hohe Durchseuchungsrate in der Bevölkerung zeichnet Adenoviren als evolutionär sehr erfolgreich in der Infektion einer Vielzahl von Geweben, Vermittlung einer hohen Genexpression und transienten Produktion infektiöser Viruspartikel aus. Infektiosität und hohe Genexpression machen sie zu idealen Kandidaten einer gentherapeutischen Applikation. Das Fehlen eines schwerwiegenden Krankheitsverlaufs und bleibender Infektionen zeichnet das humane Immunsystem hingegen als sehr erfolgreich in der Kontrolle adenoviraler Infektionen aus und begrenzt gentherapeutischen Applikationsmöglichkeiten durch eine starke wirtseigene Immunantwort.

Das Prinzip der Generation replikationsdefizienter rekombinanter adenoviraler Vektoren besteht in der Deletion einzelner Regionen und der Ersetzung der essentiellen deletierten Regionen *in trans* durch Produktion in einer Verpackungszelllinie, in der sich das rekombinante Virus vermehren kann. Die publizierten Manipulationen des adenoviralen Genoms sind so vielfältig, dass in der Tabelle 2 nur ein kurzer Überblick gegeben werden kann.

**Tabelle 2: Einteilung der rekombinanten adenoviralen Vektoren.**

Generation	Deletion	Kapazität [kb]	Vorteile	Nachteile
1.	• E1, E1/E3	• 6,5	• Herstellung in hohen Titern ist schnell und leicht	• starke Immunantwort • theoretisch Bildung von RCAs möglich
2.	• E1/E2/E3 • E1/E3/E4	• 8,5 • 9,5	• stark reduzierte Expression von Strukturproteinen • keine Bildung von RCA möglich	• Verlängerung der Genexpression <i>in vivo</i> fraglich
3.	• E1-E4/L1-L5	• bis 36	• hohe Kapazität • verlängerte Genexpression <i>in vivo</i>	• Kontamination mit essentiellen Helper-Adenovirus • Herstellung in hohen Titern aufwendig
Replikations-kompetente Adenoviren	• E1B	• bis 2	• Replikation und Ausbreitung <i>in vivo</i> kann ineffizienten Transfer nach iatrogenen Inokulation ausgleichen	• Restriktion einer ausschließlichen Permissivität maligner Zellen fraglich

RCA: Replikations-kompetente Adenoviren

Die Nachteile der Erst-Generationsvektoren machen sie für die Korrektur genetisch bedingter Erkrankungen ungeeignet. Bei einer Therapie maligner Erkrankungen ist eine zelluläre Immunantwort gegen die transduzierten malignen Zellen ein Vorteil, wenngleich eine humorale Antwort durch Produktion neutralisierender Antikörper weitere Applikationen erschweren könnte. Auf die Gentherapie maligner Erkrankungen mittels adenoviraler Vektoren soll in dem nachfolgenden Abschnitt eingegangen werden.

### **1.3.5. Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von Erstgenerations-Vektoren in der Therapie maligner Erkrankungen**

Die Einsätze adenoviraler Vektoren bei der Therapie maligner Erkrankungen lassen sich nach Art der transferierten Gene in vier Gruppen unterteilen.

#### **1. Transfer von Tumorsuppressorgenen**

Der Ersatz von mutierten Tumorsuppressorgenen wie p53 durch das korrekte Gen in malignen Zellen soll die Apoptosebereitschaft und Empfänglichkeit der Zellen für Chemotherapeutika wiederherstellen. Erfolgreiche Versuche in Tiermodellen (Anderson *et al.* 1998, Putzer *et al.* 1998) führten zu ersten erfolgsversprechenden klinischen Studien, die eine Verträglichkeit und ein Ansprechen auf eine Therapie mit einem p53 exprimierenden Adenovirus und eine Radio- oder Chemotherapie vermuten lassen (Swisher und Roth 2002, Habib *et al.* 1998).

## **2. Suizidtherapie**

Die Strategie besteht aus dem selektiven Transfer eines Enzyms, welches ein nicht toxisches Prodrug in ein Zytostatikum umwandeln kann, in die Tumorzellen (Block *et al.* 1997). Der Transfer des Enzyms Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus wurde bereits in einer klinischen Phase I Studie getestet (Herman *et al.* 1999).

## **3. Selektiv replikative adenovirale Vektoren**

E1B deletierte adenovirale Vektoren besitzen eine umstrittene Restriktivität ihrer Vermehrungsfähigkeit auf p53-defekte Zelllinien (Dix 2001). Ein weiterer Ansatz ist die Expression der E1A Region unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors (Kurihara *et al.* 2000). Eine Zytolyse, eventuell in Kombination mit dem Transfer eines therapeutischen Gens, wäre daher nur auf die Tumorzellen beschränkt. Erste klinische Studien bescheinigen sich selektiv replizierenden Adenoviren synergistische Effekte in Kombination mit Chemotherapeutika (Kuri *et al.* 2000).

## **4. Gene, die eine antitumorale Immunantwort provozieren sollen**

Zur Provokation einer antitumoralen Immunantwort wurde der Transfer verschiedener immunmodulatorischer Gene benutzt. Hierzu gehören die Zytokine IL-2, IL-12, IL-7 und GM-CSF allein oder in Kombination mit co-stimulatorischen Molekülen dendritischer Zellen wie B7.1, B7.2 und CD40L. Andere Strategien verfolgen die subkutane oder intramuskuläre Expression tumorspezifischer Antigene (Rosenberg *et al.* 1998) *in vivo* oder die *in vitro* Transduktion humaner dendritischer Zellen mit anschließender Reimplantation (Wan *et al.* 1999). Eine klinische Studie mit einem IL-2 exprimierendem adenoviralen Vektor zeigte eine gute Verträglichkeit, aber aufgrund geringer IL-2 Expression mit Ausnahme eines Patienten keine Effekte auf den Krankheitsverlauf (Stewart *et al.* 1999).

### **1.3.6. Probleme der Therapie maligner Erkrankungen mit adenoviralen Vektoren**

Die Probleme der adenoviralen Genterapie maligner Erkrankungen liegen in verschiedenen Gebieten. Ein besonders in den ersten klinischen Studien deutlich zu Tage tretendes Problem besteht in dem adenoviralen Gentransfer selbst. Schon die ersten klinischen Studien zeigten eine Transduktionseffizienz von höchstens 5-10% nach intratumoraler Injektion in wenigen Biopsien, die 7 Tage später entnommenen wurden (Gahery-Segard *et al.* 1997, Clayman *et al.* 1999). Die unbefriedigende Transduktionseffizienz ist zu einem Teil für die bisher nur lokal dokumentierten biologischen Effekte der Suizidgen- und Tumorsuppressorgentherapiestudien verantwortlich (Swisher und Roth 2002), obwohl für beide Therapieansätze sogenannte „Bystander-Effekte“ auf nicht transduzierte Zellen dokumen-

tiert sind (McCormick 2001). Ein möglicher Mechanismus der niedrigen Transduktionseffizienz wäre die Herunterregulation der CAR-Expression, wie es bei humanen Blasenkarzinomen gezeigt worden ist (Li *et al.* 1999). Virusneutralisierende Antikörper, welche bei allen Patienten in unterschiedlichen Titern vorhanden waren, vermindern ebenfalls die Transduktionseffizienz (Gahery-Segard *et al.* 1997, Stewart *et al.* 1999). Weiterhin bestand die Nachweisbarkeit der adenoviralen DNA deutlich länger als die Nachweisbarkeit der Transgenexpression, was auf einen Aktivitätsverlust der verwendeten viralen Promotoren hindeutet. Es ist somit unwahrscheinlich, dass eine den präklinischen Tierversuchen äquivalente Genexpression erreicht wurde. Eine Optimierung der bisher verwendeten viralen und eukaryotischen Promotoren zum Erreichen einer stärkeren und langfristigeren Genexpression ist deshalb für einen Erfolg eines gentherapeutischen Ansatzes essentiell. Weitere Probleme bestehen in der Auswahl eines geeigneten Transgens. Trotz geringer Bystander-Effekte zeigen Tumorsuppressor- und Suizidgenansätze lokal begrenzte Wirkungen. Von immunstimulatorischen Ansätzen ist eine Wirksamkeit bei einzelnen Patienten auch in nicht-infizierten Metastasen dokumentiert (Stewart *et al.* 1999, Rosenberg *et al.* 1998, Kang *et al.* 2001). Über die Gesamtheit der Wirkungsmechanismen und idealen abgeleiteten Therapiestrategien der Immuntherapie maligner Erkrankungen herrscht weiterhin keine Klarheit. Möglicherweise ist das Kollektiv der für gentherapeutische Studien rekrutierten terminal Erkrankten aufgrund einer schwer zu überwindenen T-Zell-Anergie nicht das Kollektiv, das von einer gentherapeutischen Immuntherapie profitieren würde (Ochsenbein 2002).

Die Entwicklung selektiv Replikations-kompetenter Adenoviren stellt einen Lösungsansatz des Problems dar, nicht alle Zellen in einem Tumor infizieren zu können. Durch die Vermehrung eines sogenannten onkolytischen Virus würden Tumorzellen selektiv abgetötet, während sie gleichzeitig Viren zu Infektion ihrer Nachbarzellen produzierten (Biederer *et al.* 2002). In einer klinischen Studie zeigte ein selektiv E1B deletiertes Replikations-kompetentes Adenovirus in Kombination mit Chemotherapeutika Hinweise auf einen therapeutische Vorteil gegenüber einer Monotherapie mit den Chemotherapeutika Cisplatin und 5-Fluorouracil (Khuri *et al.* 2000).

Einen weiteren Ansatz stellt die Manipulation der Fiberproteine in der Weise dar, dass spezielle tumorspezifische Oberflächenmoleküle erkannt und so ein CAR-unabhängiger Infektionsmechanismus eine gezielte und effiziente Infektion ausschließlich der Tumorzellen erlaubt (Wickham 2000). Derart manipulierte („targeted“) Adenoviren könnten so sys-

temisch appliziert selbst für eine intratumorale Injektion unzugängliche Metastasen erreichen. „Targeted“ Adenoviren haben noch keinen Einzug in klinische Studien gehalten. Weitere Ansätze bestehen in der Weiterentwicklung der Transkriptionskontrolle adenoviraler Vektoren. Ein Promotor, der eine Spezifität für das maligne Gewebe besitzt, würde die Expression toxischer Transgene auf den Tumor beschränken und eine Schädigung des differenzierten Gewebes vermeiden. Ein weiterer Zuwachs an Sicherheit bestünde ebenfalls, wenn sich die Expression eines toxischen Gens nach Infektion des Adenovirus regulieren ließe. Eine Abschaltbarkeit der Genexpression würde auch einen Transfer von therapeutischen Genen ermöglichen, deren Produkte eine geringe therapeutische Breite besitzen. Die Stärke eines regulierbaren Promotors im aktivierten Zustand wäre idealerweise stärker als die der bisher verwendeten viralen Promotoren (Clackson 2000).

#### **1.4. Regulierbare Expressionssysteme**

Eine kontrollierbare Expression eines Gens ist nicht nur in der Gentherapie, sondern auch in der Erforschung von Genfunktionen und –regulationen sowie in der Produktion toxischer rekombinanter Proteine, die bei konstitutiver Expression schädigend auf die Adenovirus produzierenden Zellen wirken, ein sehr wichtiges Werkzeug. Ein regulierbares Expressionssystem für die Gentherapie sollte folgende Charakteristika besitzen:

1. **Spezifität:** Es sollte nicht mit zelleigenen Regulationsproteinen interagieren.
2. **Effektivität:** Es sollte im aktivierten Zustand eine hohe, im supprimierten Zustand eine sehr niedrige Expression aufweisen.
3. **schnelle, dosisabhängige Regulierbarkeit:** Der Wechsel vom aktivierten in den supprimierten Zustand und umgekehrt sollte schnell möglich sein, graduelle Aktivierungsmöglichkeiten sollten eine Feinjustierung der Expression erlauben können.

Im letzten Jahrzehnt wurde mit viel Aufwand die Entwicklung regulierbarer Systeme betrieben. In diesen Systemen reguliert ein kleines Induktionsmolekül, auch Effektor genannt, die Aktivität eines synthetischen Transkriptionsfaktors. Die Tabelle 3 gibt eine kurze Übersicht über die am häufigsten verwendeten regulierbaren Systeme. Weiterhin soll näher auf das Tetracyclin-induzierbare System eingegangen werden.



**Tabelle 3: Einteilung der induzierbaren Expressionssysteme.**

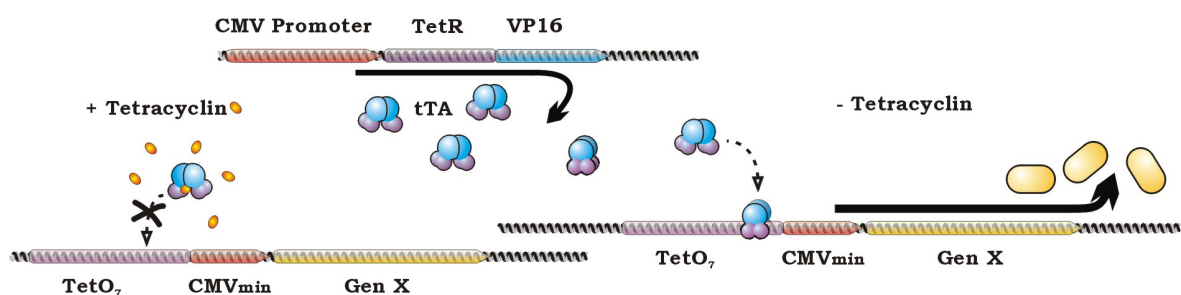
Induktionsmolekül	Komponenten und Prinzip	Vorteile	Nachteile
Ecdysone (Ec)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retinsäurerezeptor (RXR)</li> <li>• Ecdyson-Rezeptor/VP16 Fusionsprotein (EcR)</li> <li>• Ecdysone response element und Heat shock Minimalpromotor</li> <li>• In Anwesenheit von Ec heterodimerisieren RXR und ECR und aktivieren die Transkription vom respondiblen Promotor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sehr niedrige Basalexpression und hohe Induktion (No <i>et al.</i> 1996)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3-Komponenten System</li> <li>• Lange Halbwertszeit des Induktionsmoleküls, Interaktionen im humanen System nicht erforscht</li> </ul>
Rapamycin (Rm)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humanes Fusionsprotein ZFHD1 /FKBP12 (DNA-Bindung)</li> <li>• Humanes Fusionsprotein FRAP/NFκβp65 (Transkriptionsaktivator)</li> <li>• ZFHD1 respondibler Promotor</li> <li>• In Anwesenheit von Rm heterodimerisieren ZFHD1/FKBP12 und FRAP/p65 und aktivieren die Transkription vom respondiblen Promotor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komponenten bestehen aus humanen Proteinen und sind nicht immunogen</li> <li>• Regulation bis 1600fach <i>in vivo</i> (Rivera <i>et al.</i> 1996)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3-Komponenten System</li> <li>• Rapamycin wirkt immunsuppressiv und hat lange Halbwertszeiten</li> <li>• Wenig Erfahrung über den <i>in vivo</i> Einsatz in Tiermodellen</li> </ul>
RU 486	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gal4/VP16/Progesteronrezeptor Fusionsprotein (Transaktivator)</li> <li>• Respondibler Promotor aus 4 Gal4 binding sites und TATA-Box</li> <li>• In Anwesenheit von RU 486 kann der Transaktivator an den respondiblen Promotor binden und die Transkription aktivieren</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Komponenten System</li> <li>• gute Regulationsfähigkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lange Halbwertszeit des Induktionsmoleküls</li> </ul>
Pristinamycin (Pm)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fusionsprotein aus Pm induced Protein und VP16 oder KRAB-Domäne (OFF bzw. ON-Transaktivator)</li> <li>• Promotor aus Pm induced Protein binding sequence und Insekten-Heat shock Promotor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Komponenten System</li> <li>• es existieren eine ON- und eine OFF-Variante (Fussenegger <i>et al.</i> 2000)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komponenten des Systems sind <i>in vivo</i> möglicherweise immunogen</li> </ul>
Tetracyclin (Tet)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fusionsprotein aus Tetracyclin-abhängigem Repressor und VP16 (tTA)</li> <li>• Promotor aus 7 Tet binding sites und CMV-Promotor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-Komponenten System</li> <li>• effektive Regulationseigenschaften</li> <li>• es existieren ON und OFF Varianten</li> <li>• konsequente Verbesserung seit der Erstbeschreibung</li> <li>• Effektormoleküle besitzen eine günstige Pharmakokinetik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prokaryotische Komponenten des Systems sind <i>in vivo</i> möglicherweise immunogen</li> </ul>

#### 1.4.1. Durch Tetracycline regulierbare Expressionssysteme

Das durch Tetracycline regulierbare Expressionssystem basiert auf dem Tetracyclin-Resistenzoperon aus *E.coli*. Das Bakterium erreicht Resistenz gegenüber der Antibiotikumgruppe Tetracycline durch Expression des TetA-Proteins (TetA), dessen Multimere an

der inneren Membran einen Antiporter bilden und die Ausschleusung von Tetracyclin-Mg<sup>2+</sup> Komplexen im Austausch gegen ein Proton katalysieren. Liegt TetA aber in hohen Konzentrationen vor, werden Kationen in einem solchen Ausmaß hinausgeschleust, dass die Vitalität der Zelle bedroht ist (Eckert und Beck 1989). In Abwesenheit von Tetracyclinen verhindert deshalb die Bindung des Tetracyclin-Repressors (TetR) an die Operatorsequenz die Expression des TetA. Die Bindung von Tetracyclin an den TetR reduziert durch Konformationsänderung die Affinität des Repressors zu seinem Operator um 9 Logstufen (Kleinschmidt *et al.* 1988) und aktiviert so die Transkription des TetA, bevor translationshemmende Konzentrationen des Antibiotikums erreicht werden.

TetR kann in einen Tetracyclin-abhängigen Transkriptionsaktivator für Säugetierzellen umgewandelt werden, indem der Repressor mit der Transkriptionsaktivator-domäne des Herpes Simplex Virus Proteins VP16 fusioniert wird (Gossen und Bujard 1992). Das Fusionsprotein tTA bindet durch seinen TetR Anteil an eine von sieben hintereinander geschalteten Operatorsequenzen, so dass der VP16-Anteil die Transkription von einem minimalen CMV Promotor (Basenpaar -53 bis +75 relativ zum Transkriptionsstartnukleotid) initiieren kann. Minimaler CMV Promotor und sieben Operatorsequenzen werden als Tetracyclin-responsibles Element (TRE) bezeichnet. Durch Hinzugabe von Tetracyclin oder eines seiner Derivate wird diese Interaktion verhindert, so dass eine Transkription ausbleibt (siehe Abb. 4). Gossen und Bujard (1992) berichten von der Regulationsfähigkeit um 6 Logstufen in einem HELA Zellklon, stabil transfiziert mit tTA und dem Reportergen Luciferase unter Kontrolle des TRE.



**Abbildung 4: Funktionsweise des Tetracyclin-regulierbaren Systems.**

In der Abwesenheit von Tetracyclin vermag der Transaktivator an die Tet-Operatorsequenz zu binden und über die VP16 Domäne eine Transkription des Minimalpromoters zu aktivieren. Tetracyclin verhindert diese Interaktion, so dass der Promotor inaktiv bleibt (TetO<sub>7</sub>: 7 hintereinandergeschaltete Tetracyclin-Operatorsequenzen, TetR: Tetracyclin-abhängiger Repressor, VP16 Domäne des viralen Protein 16 des Herpes Simplex Virus. CMVmin Teil des I.E. Promotors der humanen CMV Basenpaare -53 bis +75 relativ zum Transkriptionsstartnukleotid).

Außer Tetracyclin (Tet) haben sich die Tetracyclinanaloga Doxycyclin (Dox), Minocyclin, Anhydrotetracyclin und Oxytetracyclin in der Transkriptionskontrolle als wirkungsvoll erwiesen, wobei Doxycyclin die Transkriptionsaktivität in stabil transfizierten Zelllinien am wirkungsvollsten unterdrückt (A-Mohammadi *et al.* 1997).

Seit der Erstbeschreibung des tTA und seines respondiblen Promotors hat das System Verbreitung zur Genregulation in einer Vielzahl von Organismen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gefunden (Kistner *et al.* 1996, Lamartina *et al.* 2003). Dabei sind zahlreiche Veränderungen sowohl am Transaktivator als auch am respondiblen Promotor vorgenommen worden, von denen die für diese Arbeit wichtigsten vorgestellt werden.

#### **1.4.2. Weiterentwicklung des Transaktivators**

Der Austausch von 4 Aminosäuren in der DNA-bindenden Domäne des tTA kehrt seine Affinität zur Operatorsequenz in der Anwesenheit von Doxycyclin und Anhydrotetracyclin um (Gossen *et al.* 1995). Dieser „reverse“ Transaktivator (rtTA) reagiert bei Doxycyclinkonzentrationen von 10-1000 µg/ml mit einer Aktivierung der Transkription vom Tetracyclin-responsiblen Promotor. Seine Verwendung wird deshalb im Gegensatz zum Tet-OFF System bei Verwendung des tTA als Tet-ON System bezeichnet. Das Doxycyclinkonzentrationsfenster, in dem die Affinitätsänderung des rtTAs erfolgt, liegt 100fach höher als die affinitätsmodulierenden Doxycyclinkonzentrationen des tTAs. Geringe Verunreinigungen des Antibiotikums interferieren deshalb nicht mehr mit der Transkriptionskontrolle durch den reversen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator. Der Einsatz des rtTA wird jedoch vermindert durch eine Restaffinität zur Operatorsequenz in der Abwesenheit von Dox. Diese führt zu einer erhöhten Basalexpression. Ein Tetracyclin-kontrollierter Transkriptionssilencer (tTS), durch Fusion des TetR mit der humanen Repressordomäne Kox1 konstruiert, unterdrückt diese Basalexpression (Forster *et al.* 1999). Eine weitere Verbesserung der Regulationseigenschaften des rtTA durch randomisierte Mutagenese in Verbindung mit effizienten Screeningmethoden führte zur Konstruktion von rtTA2<sup>S</sup>-M2, der im Vergleich zum rtTA eine verminderte Basisexpression zeigt (Urlinger *et al.* 2000). Die Kombination von tTA2<sup>S</sup>-M2 und tTS führt zu hohen Induktionsraten nach Zugabe von Doxycyclin (Salucci *et al.* 2001).

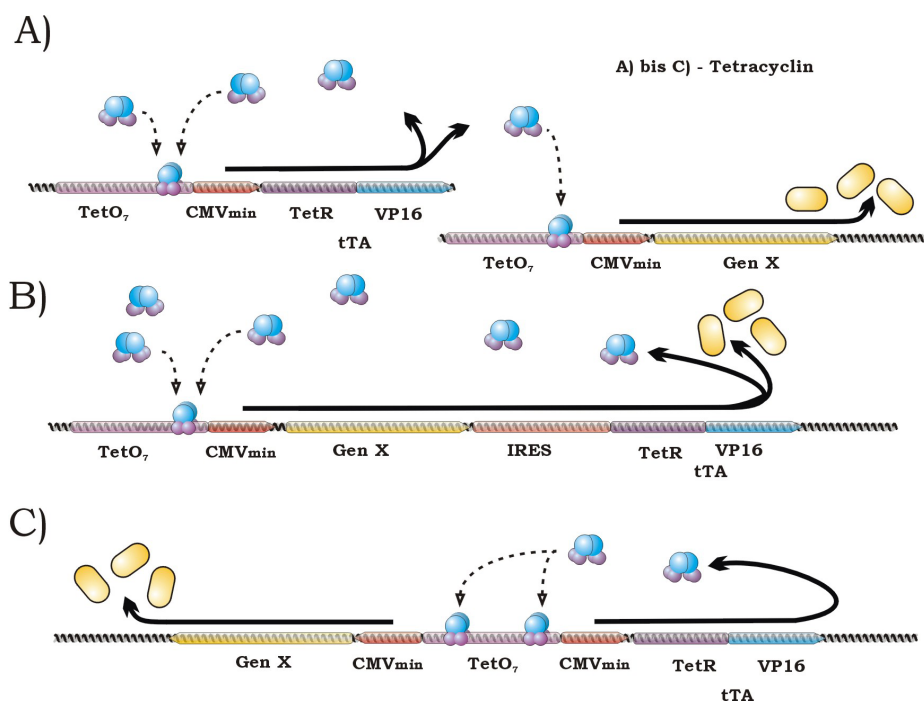
#### **1.4.3. Autoregulative Systeme**

Die Konstruktion Tetracyclin-abhängiger autoregulierbarer Systeme bietet mehrere Vorteile. Eine niedrige Expression des Transaktivators im abgeschalteten Zustand vermindert die

basale Expression und den sogenannten „squelching“ Effekt der VP16 Domäne. Darunter wird eine Verminderung der zelleigenen Transkriptionsfaktoren durch Abfangen endogener Transkriptionsfaktoren verstanden (Sadowski *et al.* 1988, Treizenberg *et al.* 1988, Baron *et al.* 1997). Im angeschalteten Zustand eines autoregulativen Systems kann der Level des Transaktivators und somit die Aktivierung des respondiblen Promotors kurzfristig stärker als durch konstitutive Expression erhöht werden (Shockett *et al.* 1995). Autoregektivität wird durch die Kontrolle des Transaktivatorgens durch den Transaktivator bindenden Promotor erreicht. Hierzu wurden verschiedene Konfigurationen ausgenutzt:

1. Transgen und Transaktivator stehen jeweils separat unter Kontrolle eines Tetracyclin-responsiblen Promotors (Abb. 5A, Shockett *et al.* 1995).
2. Expression einer bi-cistronischen mRNA, die Transgen und Transaktivator codiert, unter Kontrolle eines Tetracyclin-responsiblen Promotors (Abb. 5b, Hofman *et al.* 1996, Fussenegger *et al.* 1997).
3. Expression von einem bi-direktionalen Tetracyclin-responsiblen Promotor (Abb. 5c, Baron *et al.* 1995, A-Mohammadi und Hawkins 1998).

Die Voraussetzung der autoregulativen Konfiguration ist ein gewisses Maß an basaler Expression („Leakiness“), welche die zur Aktivierung einer positiven Feedbackschleife notwendige Menge des Transaktivators bereitstellt. Die unabhängige Lokalisation beider Komponenten der Konfiguration in Abb. 5A ermöglicht gegenüber den anderen die Platzierung der Transaktivatorkassette dort, wo eine basale Leakiness z. B. durch Enhancer-Mechanismen besteht, während das zu regulierende Gen an einer, transkriptionell gesehen, ruhigeren Stelle platziert werden kann, um eine Leakiness in der Expression des interessierenden Gens zu vermeiden.

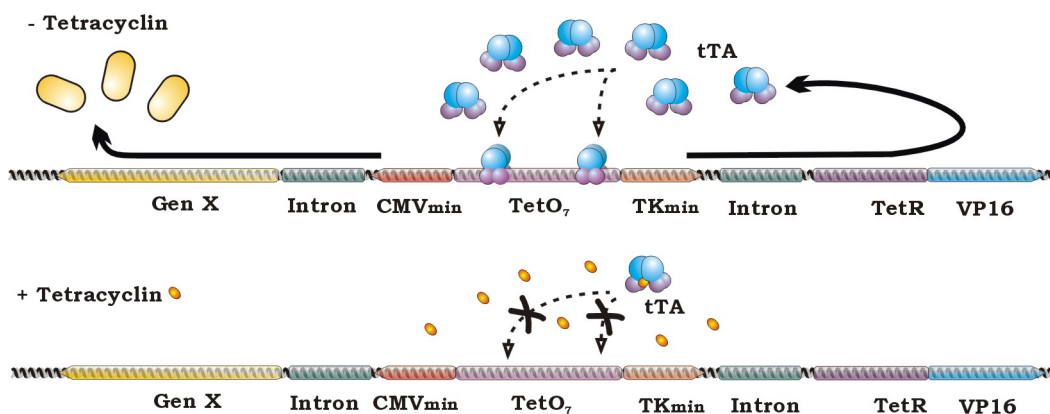


**Abbildung 5: Konfigurationsvarianten, die eine Autoregularität des Tetracyclin-abhängigen Systems zulassen.**

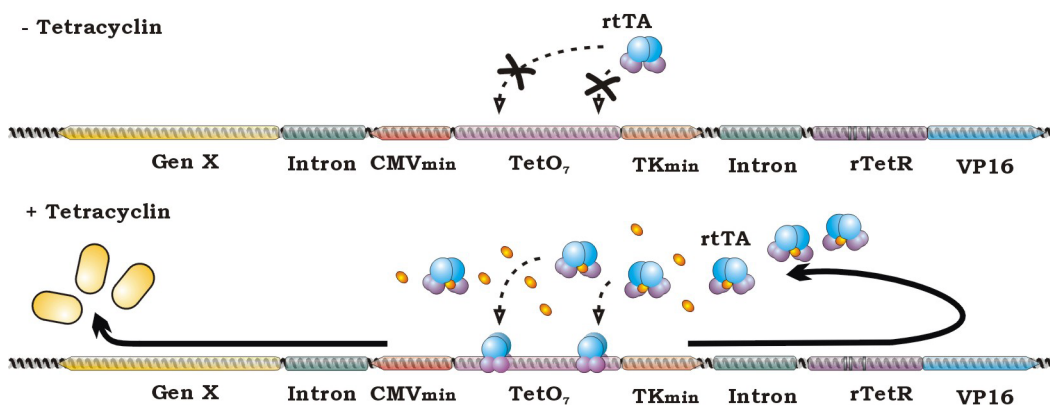
Es ist nur das Tet-OFF System in der Abwesenheit von Tetracyclin dargestellt. A) Separate Platzierung von Transaktivator und Transgen jeweils unter Kontrolle des induzierbaren Promotors. B) Expression einer bicistronischen mRNA unter Kontrolle des induzierbaren Promotors mit Hilfe einer IRES (internal ribosome entry side). C) Bi-direktionaler induzierbarer Promotor.

Das von Strathdee *et al.* (1999) beschriebene bi-direktionale autoregulative System benutzt einen minimalen Thymidinkinase (TK) Promotor (-81 bis +52 bp relativ zum Transkriptionsstartnukleotid) zur Expression des Transaktivators. In Zusammenhang mit einem an den Transaktivator gekoppelten nukleären Lokalisationssignal zeigte sich diese Konfiguration in der Regulationskapazität in 293 Zellen einem bi-direktionalen CMV Minimalpromotor überlegen (Strathdee *et al.* 1999). Weitere Modifikationen sind die Insertionen von zwei Introns vor Transaktivator und Transgen zur effizienteren Transgenexpression. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses autoregulierbare System wegen seiner guten Regulationskapazitäten und des relativ geringen Kapazitätsbedarfes zur Insertion in die E1 Region E1/E3 deletierter Adenoviren benutzt.

## A) TetOFF (pBIG3r)



## B) TetON (pBIG3i)



**Abbildung 6: Konfigurationen und Funktionsweisen des Tetracyclin-abhängigen autoregulativen Systems nach Strathdee *et al.* 1999.**

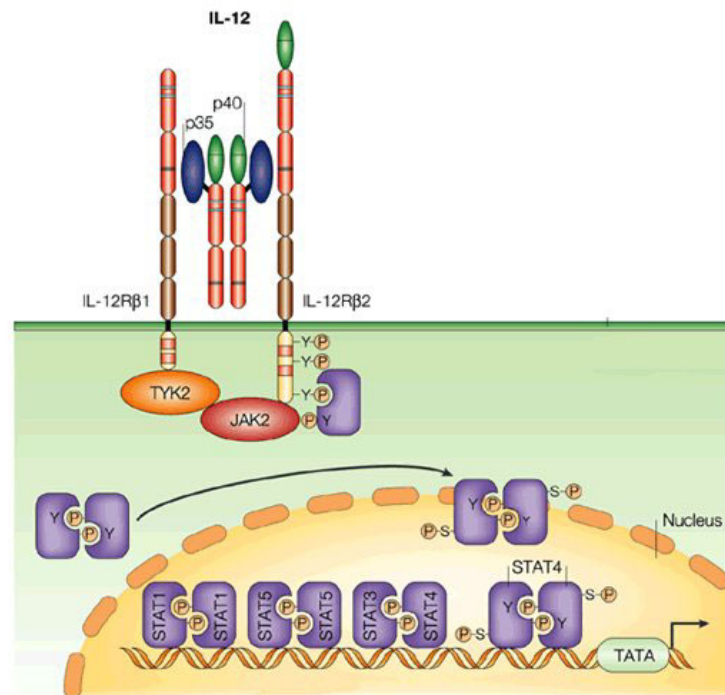
Die tTA (Tet-OFF) und rtTA (Tet-ON) codierenden Plasmide werden pBIG.3r bzw. pBIG.3i genannt. Die schematisierte Darstellung der Komponenten entspricht nicht ihrer tatsächlichen relativen Größe (TKmin: Teil des Thymidinkinasepromotors des Herpes Simplex Virus, -81 bis +52 bp relativ zum Transkriptionsstartnukleotid).

## 1.5. Die Immunbiologie des Interleukin-12

### 1.5.1. Struktur und Vorkommen

IL-12 wurde aus dem Überstand transformierter humaner B-Zellen isoliert, durch den natürliche Killerzellen aktiviert werden konnten (Kobayashi *et al.* 1989). Es ist ein heterodimeres, durch Disulfidbrücken stabilisiertes Protein, das aus einer 35 kDa (p35) und einer 40 kDa (p40) schweren Kette besteht. Die p35 Untereinheit besitzt Homologien zu IL-6, während die p40 Untereinheit Ähnlichkeiten mit der extrazellulären Domäne der Rezeptoren von IL-6 und IL-11 besitzt (zusammenfassend in Trinchieri 2003). Die p40 Untereinheit ist gleichzeitig Untereinheit von IL-23, einem kürzlich beschriebenen, ebenfalls proinflammatorischen Zytokin, das mit IL-12 weiterhin eine Rezeptoruntereinheit teilt

(Trinchieri 2003). Der IL-12 Rezeptor ist ebenfalls aus zwei Untereinheiten, IL-12R $\beta$ 1 und IL-12R $\beta$ 2 aufgebaut, welche bei Bindung des Zytokins dimerisieren und den JAK-STAT Pfad (Janus kinase - Signal transducer and activator of transcription) aktivieren (siehe Abb. 7). Die für IL-12 spezifischen Effekte entstehen hauptsächlich durch Phosphorylierung von STAT4.

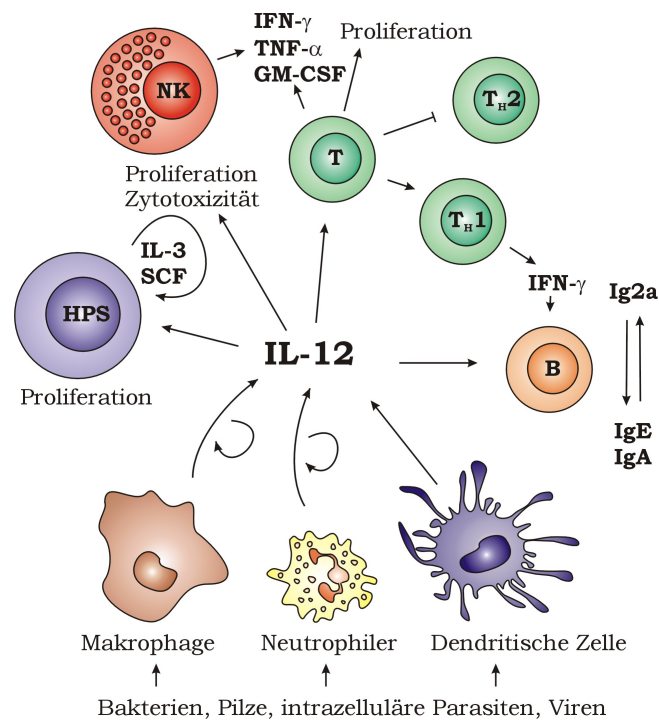


**Abbildung 7: Signaltransduktion des IL-12 Heterodimers.**

(JAK: Janus Kinase, STAT: Signal transducer and activator of transcription, TATA: TATA-Box, TYK: Tyrosinkinase, Y: Tyrosinreste, Quelle: Trinchieri 2003).

### 1.5.2. Biologische Funktionen

Als proinflammatorisches Zytokin stimuliert IL-12 während der Abwehr infektiöser Pathogene eine Differenzierung der Th-1 Helferzellen und Aktivierung der natürlichen Killerzellen und Phagozyten, die hauptsächlich den IL-12 Rezeptor exprimieren. Es wird dabei initial von dendritischen Zellen und anschließend durch positive Rückkopplungsmechanismen von Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen sezerniert (Trinchieri 2003). Durch IL-12 induziertes Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mediiert die wichtigsten proinflammatorischen Effekte wie Proliferation und Aktivierung von natürlichen Killer- und Th1-Zellen sowie die Verstärkung einer IgG2a/b Antikörperantwort. Die IFN- $\gamma$  Ausschüttung bewirkt IL-12 synergistisch mit anderen Zytokinen wie IL-18 (Nakahira *et al.* 2002) und IL-2 (Hodge *et al.* 2002) sowie co-stimulatorischen Molekülen wie B7.1 (Kubin *et al.* 1994). IL-12 knock out Mäuse besitzen für infektiöse Pathogene wie *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* eine erhöhte Anfälligkeit (Trinchieri 2003).



**Abbildung 8: Die physiologischen Produzenten von IL-12 und ihre Effektorzellen.**

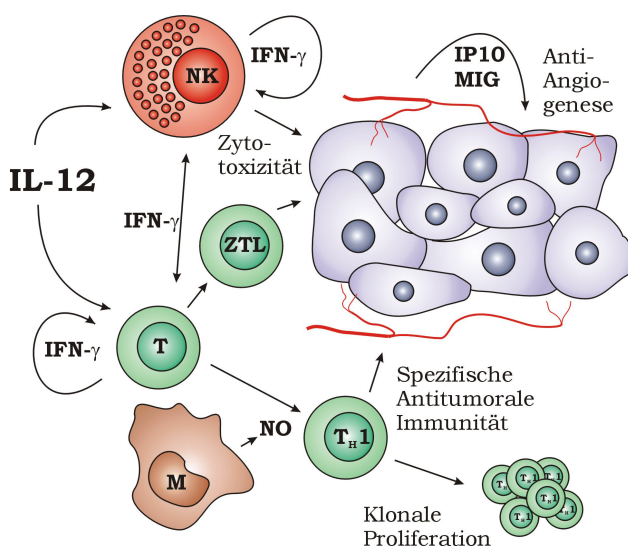
(HPS: Hämatopoetische Stammzelle, NK: zusammenfassend für: natürliche Killerzellen, natürliche Killer T-Zellen, CD8<sup>+</sup>-zytotoxische Killerzellen, SCF: Stammzellfaktor, T: T-Zelle, B: B-Zelle, GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen stimulierender Wachstumsfaktor).

### 1.5.3. Antitumorale Aktivität von Interleukin-12

In verschiedenen Tiermodellen konnte die antitumorale Aktivität von IL-12 in einer großen Anzahl demonstriert werden. IL-12-p40 knock out Mäuse zeigen keine erhöhte Entstehung spontaner Tumoren (Street *et al.* 2002). Die endogene IL-12 Produktion ist jedoch wichtig zur Abstoßung transplantierte syngener Malignome (Fallarino *et al.* 1996) und zur Unterdrückung Methylcholanthren-induzierter Tumore (Smyth *et al.* 2000). Eine BCG Immuntherapie inokulierter Blasenkarzinome hat in IL-12 knock out Mäusen im Gegensatz zu Wildtypmäusen keinen Effekt (Riemensberger *et al.* 2000). Die exogene Zufuhr von IL-12 hemmt die Entstehung von induzierten Tumoren (Noguchi *et al.* 1996) und führt zur Regression etablierter Tumore (Brunda *et al.* 1993, Tannenbaum *et al.* 1996, Boggio *et al.* 1998, Cavallo *et al.* 1999). Auch die Sezernierung von IL-12 durch mit der cDNA beider Untereinheiten transfizierten Tumorzellen führt zur Regression und teilweisen Eradikation etablierter Tumore (Tahara *et al.* 1995, Caruso *et al.* 1996, Bramson *et al.* 1996). Der Cotransfer des co-stimulatorischen Moleküls B7.1 wirkt synergistisch und führt in mehreren Modellen zu einer systemischen antitumoralen Immunität (Pützer *et al.* 1997, Tatsumi *et al.* 1999, Hull *et al.* 2000). IL-12 entfaltet seine antitumorale Aktivität, die durch IFN- $\gamma$  neutralisierende Antikörper unterdrückt werden kann (Nastala *et al.* 1994), durch eine Vielzahl von Mechanismen. Die antimetastatischen Effekte werden sowohl von NK- als



auch NK-T-Zellen mediiert (Smith *et al.* 2000). Die Fähigkeit von IL-12, eine antitumorale Immunität zu induzieren, beruht auf der Aktivierung von (zytotoxischen) CD8<sup>+</sup> und (T<sub>H</sub>1) CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Brunda *et al.* 1993, Nastala *et al.* 1994). IFN- $\gamma$  und seine sekundären proinflammatorischen Chemokine, wie das IFN induzierbare Protein (IP-10) und das durch IFN- $\gamma$  induzierbare Monokin (MIG), wirken in etablierten Tumoren antiangiogenetisch (Coughlin *et al.* 1998). Von der durch IFN- $\gamma$  induzierten NO-Synthetase in Makrophagen ist beschrieben, dass sie ebenfalls zur Tumoreradikation beiträgt (Yu *et al.* 1996), obwohl NO eine temporäre Unterdrückung der Entwicklung einer T<sub>H</sub>1 spezifischen Immunantwort bewirken kann (Trinchieri 2003).



### Abbildung 9: Die antitumorale Aktivität von IL-12.

(IP10: IFN induzierbares Protein, MIG: IFN- $\gamma$  induzierbares Monokin, M: Makrophage NK: zusammfassend für: natürliche Killerzellen, natürliche Killer T-Zellen, ZTL: zytotoxische T-Lymphozyten).

#### 1.5.4. Toxizität von Interleukin-12

IL-10 ist ein effektiver Unterdrücker der IL-12 Ausschüttung (D'Andrea *et al.* 1993). Die Toxizität des IL-12 wurde daher in IL-10 knock out Mäusen demonstriert, die mit einem avirulenten Stamm von *Toxoplasma gondii* infiziert wurden. Diese Mäuse erliegen der unkontrollierter Ausschüttung des IL-12 unter dem Bild einer Hepatitis (Gazzinelli *et al.* 1996). Ein weiteres Mausmodell zur Toxizität des IL-12 ist die durch Endotoxininjektion ausgelöste Schwartzman-Reaktion. Die Gabe von Antikörpern gegen IL-12 und IFN- $\gamma$  verhindert hier die Letalität (Ozmen *et al.* 1994). Weitere IL-12 Administrationen in IFN- $\gamma$  Rezeptor knock out Mäusen deuten ebenfalls auf eine IFN- $\gamma$  mediierte Toxizität hin (Car *et al.* 1999).

Die letalen Nebenwirkungen einer IL-12 Gabe in Menschen traten während einer Phase II Studie der systemischen Injektion von IL-12 bei Krebspatienten auf. Im Gegensatz zur Phase I Studie war auf eine einwöchige Pause nach der ersten Injektion verzichtet worden, von der später gezeigt wurde, dass sie die Toxizität nachfolgender Injektionen vermindert

(„priming effect“). Von 17 Patienten verstarben zwei an einem hypovolämischen Schock bei hämorrhagischer Kolitis bzw. einer Sepsis, ebenfalls assoziiert mit einer schweren ulzerierenden Kolitis. Weitere Nebenwirkungen waren Leukopenie (65%), Hyperbilirubinämie (47%), Transaminasenerhöhung (47%), Abgeschlagenheit (35%) und Atemnot (29%) (Leonard *et al.* 1999). Der „priming effect“ des IL-12 ist wahrscheinlich auf eine Reduktion des Signalproteins STAT4 mit konsekutiver Reduktion der IFN- $\gamma$  Produktion zurückzuführen (Wang *et al.* 2001). Folgende klinische Studien nutzten einige Tage vor Beginn der eigentlichen Therapie den „priming effect“ des IL-12 zur Desensibilisierung und Reduktion der toxischen Nebenwirkungen aus. Da auch der antitumorale Effekt des IL-12 hauptsächlich durch IFN- $\gamma$  mediiert wird, ist eine Verminderung der IFN- $\gamma$  Ausschüttung nach vorheriger Desensibilisierung wahrscheinlich auch mit der Verminderung der biologischen Aktivität verbunden (Coughlin *et al.* 1997).

#### **1.5.5. Interleukin-12 in klinischen Studien**

Nachfolgende Phase II Studien der systemischen IL-12 Applikation in Patienten mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen zeigten einen geringen Anteil an Patienten, in denen die Tumormasse unter Therapie zurückging. Der Anteil betrug 7% bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen und 4% bei Patienten mit Karzinomen des Ovars (Portielje *et al.* 2003). Analog zu Tiermodellen, in denen eine lokale IL-12 Expression sich der systemischen Gabe überlegen gezeigt hatte (Colombo *et al.* 1996), wurden Phase I Studien zur Testung dieses Ansatzes durchgeführt. Die peritumorale Injektion von IL-12 zeigte bei kutanen T-Zell-Lymphomen eine Tumorantwort in 56% der Patienten, die intratumorale Injektion autologer IL-12 exprimierender Fibroblasten führte bei 44% der Patienten mit Hautmetastasen von Melanomen und Brustdrüsenkarzinomen zu einer Reduktion der Tumorgöße (Rook *et al.* 1999, Kang *et al.* 2001). Mehrere Phase I Studien, die intratumoral injizierte Viren oder Plasmid-DNA zum Gentransfer des IL-12 benutzen, werden zur Zeit durchgeführt (National Institutes of Health 2003).

#### **1.5.6. p40/p35 Fusionsproteine**

Die heterodimere Struktur des IL-12, dessen Untereinheiten von unterschiedlichen Chromosomen codiert und auf unterschiedliche Weise in ihrer Expression kontrolliert werden (Trinchieri 2003), kompliziert die Konstruktion von Expressionseinheiten für einen gentherapeutischen Ansatz. Zur Expression eines bioaktiven Heterodimers wurden verschiedene Strategien angewandt:

1. Cotransfektion von 2 Plasmiden, von denen jedes eine Untereinheit exprimiert (Tahara *et al.* 1994).
2. Integration von zwei Expressionskassetten in ein Plasmid/Virus (Bramson *et al.* 1996).
3. Expression einer bi-cistronischen mRNA, von der beide Untereinheiten mit Hilfe einer „internal ribosome entry side“ (IRES) exprimiert werden (Qiao *et al.* 1999).

Diese Ansätze setzen die korrekte Prozessierung beider Untereinheiten, ihr Zusammenfügen und die Sekretion durch - im Falle einer Immuntherapie maligner Erkrankungen - entdifferenzierte Tumorzellen voraus. Werden beide Untereinheiten nicht im äquimolaren Verhältnis exprimiert und zusammengesetzt, kann überschüssig sezerniertes p40 Homodimere bilden (Gillissen *et al.* 1995). p40 Homodimere antagonisieren die Wirkung des Heterodimers durch Bindung an die  $\beta 1$  Untereinheit des IL-12 Rezeptors (Mattner *et al.* 1993). Im Vergleich mit dem Heterodimer besitzt das p40 Homodimer eine ähnliche Affinität zum Rezeptor, jedoch eine längere Halbwertszeit (Wang *et al.* 1999).

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, besteht in der Expression von IL-12 Fusionsproteinen. Hierbei werden die cDNA der beiden Untereinheiten durch einen 7-15 „Verbindungsaminosäuren“ codierenden Abschnitt gekoppelt. Die Aminosäuren dieses Linkerproteins („Linker“) sind so gewählt, dass eine möglichst große Flexibilität in der Anordnung der Untereinheiten zueinander gewährleistet wird. Lieschke und Mitarbeiter (1997) berichten von der Expression eines murinen IL-12 p40-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>Linker-p35 Fusionsproteins, in dessen p35 Untereinheit die ersten 22 Aminosäuren deletiert sind, die eine für die Sekretion notwendige Signalsequenz darstellen (Schoenhaut *et al.* 1992). Dieses Fusionsprotein besitzt eine spezifische Bioaktivität und zeigt starke antitumorale Effekte *in vivo* (Lieschke *et al.* 1997). Eine besondere Eigenschaft des Fusionsproteins ist die effiziente Sekretion im Vergleich zu dem in analoger Weise konstruierten p35-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-p40 Fusionsprotein und einer p35.IRES.p40 Expressionskassette durch transfizierte Tumorzellen, die sich durch die unterschiedliche Regulation der Expression der Untereinheiten erklären lassen (siehe Diskussion). Ein ähnlich konstruiertes p40-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-p35 Fusionsprotein zeigt therapeutische Effektivität gegen experimentelle Infektion mit *Coccidioides immitis* (Jiang *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde das p40-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-p35 Fusionsprotein wegen seiner effektiven Sekretion und Bioaktivität für eine adenoviral vermittelte, regulierbare Expression benutzt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Agarose, für die Gelelektrophorese	(Merck: #1.01236)
Agarose, Sea Plaque	(BioZym: #840101)
Borsäure	(Merck: #1.12015)
Bromphenolblau	(Merck: #1.11746)
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galacto-Pyranosid (X-Gal)	(Merck: #1.24655)
Calciumchlorid	(Merck: #1.02083)
Calciumchlorid-dihydrat	(Merck: #1.02382)
N,N-Dimethylformamid	(Merck: #1.03053)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck: #1.02950)
Ethanol	(Merck: #1.00983)
Ethidiumbromid	(Merck: #80330704)
Ethylendiamintetraessigsäure	(Merck: #1.12029)
Ficoll 400	(Merck: #1.00498)
Glucose	(Merck: #1.08337)
Glutaraldehyd 25%	(Merck: #8.20603)
Glycerin, wasserfrei	(Merck: #1.04093)
Hefeextrakt	(Merck: #1.03753)
Isopropanol	(Merck: #1.02950)
Kaliumchlorid	(Merck: #1.05001)
Kaliumferricyanid ( $K_3Fe[CN]_6$ )	(Merck: #1.04984)
Kaliumferrocyanid ( $K_4Fe[CN]_6$ )	(Merck: #1.04973)
LB-Agar, für Bakterienplatten	(Invitrogen: #22700025)
2-Mercaptoethanol	(Merck: #1.15433)
Magnesiumchlorid-hexahydrat	(Merck: #1.05835)
Magnesiumsulfat-heptahydrat	(Merck: #1.05886)
Natriumchlorid	(Baker: #2781000)
Di-Natriumcarbonat	(Merck: #1.06392)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck: #1.06329)
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	(Merck: #1.06580)
Natriumacetat	(Merck: #1.01539)
Ammoniumchlorid	(Merck: #1.01146)

Phenol Rot (Histo)	(Merck: #1.07241)
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	(Gibco: #15504-020)
Trypton	(Merck: #1.10859)
Tween 20	(Fluka: #93773)
Xylenecyanol	(Merck: #1.10590)

### 2.1.2. dNTPs, Molekulargewichtsstandards und Proteine

rekombinante Luciferase	(Promega:#E1701)
rekombinantes murines IL-12	(R&D Systems: #419-ML)
Oligonukleotide	(MWG-Biotech AG)
DNA-Marker II	(Boehringer: #236250)
DNA-Marker VII	(Boehringer: #1209264)
dATP	(Boehringer: #1934511)
dGTP	(Boehringer: #1934538)
dCTP	(Boehringer: #1934520)
dTTP	(Boehringer: #1934546)
Proteinmolekulargewichtstandard Rainbow Markers	(Amersham: #RPN 756)

### 2.1.3. Enzyme

#### Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden ohne Ausnahme von Boehringer-Roche bezogen.

AviII	(#1481444)	KpnI	(#899 186)	PvuII	(#642 690)
BamHI	(#567 604)	NcoI	(#835 323)	SalI	(#567 663)
BglII	(#567 639)	NdeI	(#1040227)	SmaI	(#656 348)
ClaI	(#656 291)	NheI	(#885 851)	SpeI	(#1008951)
EcoRI	(#1175084)	NotI	(#1014714)	XbaI	(#674 257)
EcoRV	(#667 153)	NsiI	(#909 840)	XhoI	(#899 194)
HindIII	(#656 321)	PvuI	(#650 137)		

**DNA-Polymerasen**

T4 DNA-Polymerase	(Gibco: #18005-017)
Taq-Polymerase 50U/ $\mu$ l	(Q·Biogene: #ETQA100)

**DNA-Ligasen**

T4 DNA-Ligase	(Boehringer: #799009)
---------------	-----------------------

**2.1.4. IgG-Antikörper**

polyklonaler Kaninchen anti-VP16-IgG	(Clontech #3844-1)
polyklonaler Kaninchen anti-Aktin-IgG	(Sigma: #A2066)
Peroxidasekonjugierter Ziegen anti-Kaninchen-IgG	(Sigma: #111-035-045)
Polyklonaler Ziegen anti-human CD28-IgG	(R&DSys: #AF-342-PB)
Hamster anti-murin CD3 $\epsilon$ -IgG	(R&DSys: #MAB484)

**2.1.5. Puffer**

1x TBE Puffer	(90 mM Tris-Borsäure, 2mM EDTA)
6x Gel Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylenecyanol und 15% (w/v) Ficoll 400

**2.1.6. Bakterienmedien**

LB-Medium (pH: 7,0):	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Sterilisation bei 121°C, 15 Minuten
SOC-Medium (pH: 7,0):	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 0,4% Glukose, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM KCl

**2.1.7. Puffer und Lösungen für die Zellkultur**

Fetales Kälberserum (FBS)	(Gibco: #10084-168)
Fetales Kälberserum (FBS) ohne Tetracyclin	(Clontech: #8630-1)
Dulbecco's Phosphate-buffered saline w/o Ca Mg, (PBS)	(Gibco: #14190-169)
Dulbecco's Modified Eagle Medium with high Glucose (HGDMEM)	(Gibco: #41965-039)
L-Glutamin 200 mM (100x)	(Gibco: #25030-024)
McCoy's 5A Medium	(Gibco: #26600-023)
RPMI 1640	(Gibco: #41965-025)

Trypsin-EDTA	(Gibco: #25300-096)
HEPES (1 M)	(Gibco: #15630-056)
Modified Eagle Medium 2x	(Gibco: #21935-028)

### 2.1.8. Antibiotika

Ampicillin	(Boehringer: #835269)
Penicillin/Streptomycin (100x)	(Gibco: #15140-114)
Doxycyclin (Vibrovenös®)	(Pfizer:Reg.-Nr.343341)

### 2.1.9. Zusammensetzung sonstiger Lösungen

2,5 M CaCl <sub>2</sub>	36,75 g CaCl <sub>2</sub> in 100 ml H <sub>2</sub> O
Dialysepuffer	(10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10% Glycerol, autoklaviert)
Gey's Lsg. zur Erythrozytenlyse	besteht aus 20 Teilen der steril filtrierten Lsg. A (17,5 g NH <sub>4</sub> Cl, 0,925 g KCl, 0,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O, 0,0595 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> unhydriert, 2,5 g Glucose, 0,025 g Phenol Rot, Aqua dest. ad 500 ml), 5 Teilen der Lsg. B (0,42 g MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O, 0,14 g MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 0,26 g CaCl <sub>2</sub> , Aqua dest. ad 100 ml), 5 Teilen der Lsg. C (2,25 g NaHCO <sub>3</sub> , Aqua dest. ad 100 ml) sowie 70 Teilen Aqua dest.
Glutaraldehydlösung	(0,5% Glutaraldehyd in PBS)
HEPES buffered saline	(5 g HEPES, 8 g NaCl, 0,37 g KCl, 0,125 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, 1 g Glucose, H <sub>2</sub> O ad 1000 ml, autoklaviert)
Stufengradientlösung A	(30 g CsCl zu einem endgültigen Volumen von 42,5 ml in PBS, anschließende Einstellung mit PBS auf 1,5 g/ml, maximale Toleranz. 0,005 g/ml)
Stufengradientlösung B	(Verdünnung von 35 ml von Lösung A mit 14 ml PBS, Einstellung mit PBS auf 1,35 g/ml)
Stufengradientlösung C	(Verdünnung von 11 ml von Lösung B mit 9 ml PBS, Einstellung mit PBS auf 1,25 g/ml)
X-Gal	1,3 mM MgCl <sub>2</sub> , 3 mM NaCl, 3 mM Kaliumferrocyanid, 3 mM Kaliumferricyanid, 2,5% X-gal-Lösung

(bestehend aus 20 mg 5-Brom-4-Clor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galacto-Pyranosid in 1 ml N,N-Dimethylformamid) und 44 mM HEPES pH 7,3

#### 2.1.10. Wasser

Wasser wurde mit einem Destillator Bi-Dest 2304 der Firma GFL Burgwedel doppelt destilliert und autoklaviert oder sterilfiltriert verwendet. Aqua ad iniectabilia (Braun: #25/12211273/1100) wurde für die Zellkultur verwendet.

#### 2.1.11. Bakterien

*E. coli DH5 $\alpha$* , supercompetent cells (Gibco: #18258-012)

#### 2.1.12. Reagenzienkits

Luciferase Assay Kit	(Promega: #E1501)
Murines IL-12 p70 ELISA Kit	(Pharmingen: #2661K1)
Murines IFN- $\gamma$ ELISA Kit	(Pharmingen: #555138)
Plasmid Preparation Maxi Kit	(Qiagen: #12263)
Gel Extraction Kit	(Qiagen: #28704)
Qiamp DNA Blood Kit	(Qiagen: #51164)
DC-Protein Assay	(Biorad: #500-0114)

#### 2.1.13. Weitere Materialien

Sterile Labormaterialien für die Kultivierung von Zelllinien und Bakterien wurden von den Firmen Nunc, Falcon, Nalgene und Greiner bezogen.

Dialysemembranen Slide-A-Lyzer	(Pierce)
Einwegspritzen 1 ml, 10 ml, 50 ml	(Braun, Melsungen)
Sterilfilter, Porenweite 0,22 $\mu$ m	(Schleicher & Schuell)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	(Eppendorf)
Pipetten (0,1-2 $\mu$ l, 0,5-20 $\mu$ l, 5-100 $\mu$ l, 2-200 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l)	(Gilson)
Pipetten, 8fach und 12fach Multichannel	(Eppendorf)
Ultrazentrifugenröhrchen ultra clear, 14 x 95 mm	(Beckman)

#### 2.1.14. Geräte

Auflichtmikroskop	(Hund)
-------------------	--------



Autoklav Sanoclav	(Wolf)
Brutschränke Zellkultur HeraCell	(Heraeus)
Brutschränke Bakterienkulturen	(Köttermann)
Elektrophoresegelkammern und Powersupply	(BioRad)
ELISA-Spektralphotometer Titertek Multiskan <sup>®</sup> Plus	(MKII)
Feinwaage HR-120	(AND)
Luminometer Lumat LB 9507	(EG&G Berthold)
Magnetrührer	(Cenco)
PCR-Thermozykler PCR Sprint	(ThermoHybaid)
pH-Meter pH 358	(WTW)
Schüttler 3005	(GFL)
Spektralphotometer	(BioRad)
Sterilwerkbank HeraSafe	(Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge pico	(Heraeus)
Ultrazentrifuge Typ L7-35	(Beckman-Coulter)
UV-Kammer zu Gelanalyse und Software Geldoc 2000	(Bio-Rad)
Vortexer	(Braun)
Wasserbad	(Braun)
Zentrifuge Type 5804R	(Eppendorf)

### 2.1.15. Zelllinien

**Tabelle 4: Übersicht über verwendete Zelllinien.**

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Kulturmedium</b>
293 HEK	Die Zelllinie 293 wurde aus humanen embryonalen Nierenzellen gewonnen, welche die Basenpaare 1-4344 des adenoviralen Genoms integriert haben.	HGDMEM, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 10 mM HEPES
AsPC-1	gewonnen durch Xenotransplantation aus Asziszellen einer 62jährigen Frau mit einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes in eine atymische Maus (Chen <i>et al.</i> 1982).	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
BT-20	etabliert aus dem soliden Tumorgewebe eines intraduktalen Mammacarcinoms.	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
Colo 205	etabliert aus dem Aszitis eines 70jährigen Mannes mit einem Kolonkarzinom (Semple <i>et al.</i> 1978).	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
HELA	Cervixcarinomzellenlinie von einer 31 jährigen Frau (Hay 1994).	HGDMEM, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 10 mM HEPES
HELA-tTA	HELA Zellen, stabil transfiziert mit der cDNA des tTA unter Kontrolle des CMV Promotors (Gossen und Bujard 1992).	HGDMEM, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 10 mM HEPES

HepG-2	etabliert aus einem Leberbiopsat eines 15 Jährigen mit einem gut differenzierten Hepatoblastom (Hay 1994).	MEM:Waymouth 1:3, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep,
HT-29	Primärtumorzellen aus dem kolorektalen Karzinom einer 44jährigen Frau (Hay 1994).	McCoy's 5a, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
MCF-7	aus dem Pleurapunktat einer 69jährigen Frau mit einem duktalem Mammakarzinom etabliert (Soule <i>et al.</i> 1973).	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
RT-4	Urothelkarzinomzelllinie von einem 63 jährigen Mann mit einem papillären Blasenkarzinom (Hay 1994).	McCoy's 5a, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
SkCO-1	aus dem Aszitis eines 65jährigen Mannes mit einem Kolonkarzinom (Hay 1994).	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 10% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES
U 266	U 266 Zellen wurden von einem 53jährigen Mann mit einem IgE-Myelom gewonnen (Hay 1994).	RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 20% FBS, 1% Penstrep, 10 mM HEPES

Bezugsquellen: 293 HEK: F.L. Graham, McMaster University, Toronto, Canada; HELA-tTA: Clontech, Heidelberg; alle anderen Zelllinien: ATCC, Manasas, USA.

## 2.2. Allgemeine Arbeitsmethoden

### 2.2.1. Sterilisation

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden in einem Autoklaven (Sanoklav, Wolf) in feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar für 45 Minuten sterilisiert. Lösungen hitzeempfindlicher Substanzen wurden mit einem 0,22 µm Filter sterilisiert.

### 2.2.2. Absorptionsmessungen

Die Konzentration der DNA Lösungen wurde photometrisch (Photometer SmartSpec™ 3000, Biorad) bestimmt. Hierbei wurde die Absorption einer Verdünnung der DNA-Lösung sowie einer Lösung mit gleicher Salzkonzentration bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Eine doppelsträngige DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50 ng/µl weist bei 260 nm eine Absorption von 1 auf, so dass eine Konzentrationsbestimmung möglich ist. Eine hohe Absorption bei 280 nm ist ein Hinweis auf eine Proteinverunreinigung, da aromatische Aminosäuren bei 280 nm absorbieren. Der 260 nm/280 nm Quotient sollte deshalb über 1,8 betragen. Eine hohe Absorption im Bereich um 320 nm wird meist durch Lichtstreuung von Partikeln hervorgerufen.

### 2.2.3. Zellkultur

Die oben aufgelisteten Zelllinien wurden mit Standardtechniken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und passagiert. Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer sowie die Trypanblaufärbung verwendet. Der Umgang mit rekombinanten Adenoviren erfolgte gemäss Sicherheitsstufe 2.

### 2.3. Klonierung in bakteriellen Plasmidsystemen

Plasmide sind ringförmige, extrachromosomale Moleküle aus doppelsträngiger DNA mit einer Größe von 1–200 Kilobasen (kb). Sie sind bei Bakterien weit verbreitet und tragen oft Gene für eine Antibiotikaresistenz, Toxine oder Restriktionsenzyme. In Bakterien vermehren sie sich extrachromosomal und werden bei Teilung zu gleicher Anzahl auf beide Tochterzellen verteilt. Es ist möglich, DNA Fragmente zwischen verschiedenen Plasmiden auszutauschen und so Plasmide mit neuen Eigenschaften zu generieren. Dieser Vorgang wird Klonieren genannt. Dabei wird die zirkuläre DNA des Plasmids mit Restriktionsenzymen verdaut, *in vitro* mit einem DNA Fragment mit kompatiblen Enden ligiert und in *E. coli* Bakterien transformiert.

Das Prinzip des Klonierens in bakteriellen Plasmidsystemen besteht aus der Aufreinigung der Plasmide aus der Bakterienkultur, dem Verdau mit Restriktionsenzymen, dem Aufreinigen der gewünschten Fragmente, einer Modifikation der Enden und einer Ligation der Fragmente *in vitro*. Danach folgt eine Transformation in *E. coli* und eine Selektion der erwünschten Klone (zur weiteren Information über die folgenden Techniken siehe Sambrook und Russell 2001).

#### 2.3.1. Bakterienkultur

Die Vermehrung der *E. coli* vom Genotyp DH5 $\alpha$  zur nachfolgenden Plasmidpräparation erfolgte in LB-Medium. Nach dem Autoklavieren wurde es mit Ampicillin (Endkonzentration: 50  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt, da alle verwendeten Plasmide als Selektionsmarker eine  $\beta$ -Lactamase codieren. Für die Plasmidpräparation zur eukaryotischen Transfektion wurden Volumina von 0,25-1 Liter (Maxi-Prep), zum Überprüfen einzelner Klone Volumina von 4-8 ml (Mini-Prep) verwendet. Die Kulturen wurden mittels einer Pipettenspitze mit dem entsprechenden Klon angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden morgens durch Zentrifugation 2000 UpM (536 x g) pelletiert und in einem dem Pellet entsprechenden Volumen des Puffers 1 der alkalischen Lyse aufgenommen.

#### 2.3.2. Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

##### Prinzip

Die Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly 1979) macht sich das unterschiedliche Verhalten von Plasmid- und chromosomaler DNA bei einem pH von 12-12,5 zunutze. Während die chromosomale DNA ihre Wasserstoffbrückenbindungen verliert, nach einer Neutralisation irreversibel denaturiert und mit Zellproteinen ausfällt, bleibt

die Plasmid-DNA aufgrund ihres Vorliegens in einer überspiralisierten Konformation stabil und ist nach dem Zentrifugieren im Überstand zu finden, so dass sie durch Hinzugabe von Isopropanol ausgefällt werden kann.

### **Durchführung**

Zunächst werden die pelletierten Bakterien in Puffer 1 bei pH 8 (50 mM Tris Cl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Diese Suspension wird durch Natronlauge des Puffer 2 alkalisiert und die Bakterienwände durch das Zugeben von SDS aufgebrochen (200 mM NaOH, 1% SDS). Danach wird das Lysat durch Hinzugabe eines dritten Puffers wieder neutralisiert (3 M Kaliumacetat pH 5,5). Alle drei Puffer werden im gleichen Mengenverhältnis eingesetzt. Das Lysat wird nach Hinzugabe des 4°C kalten dritten Puffers 5-15 Minuten auf Eis gelagert, bevor ausgefallene Proteine, Zellwand und chromosomale DNA bei 8000 UpM (8578 x g) abzentrifugiert werden können. Die Plasmid-DNA wird anschließend mit einem Isovolumen Isopropanol oder der zweifachen Menge Ethanol ausgefällt, erneut zentrifugiert (10000 UpM, 13404 x g, 10-13 Minuten, 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen und kann schließlich in Wasser oder TE-Buffer pH 7,6 (10 mM Tris-Cl pH 7,6, 1 mM EDTA pH 8) resuspendiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die zur eukaryotischen Transfektion benutzte Plasmid-DNA nach dem Ausfällen über eine kommerziell erhältliche Säule (Qiagen-tip 500) nach Protokollen des Herstellers aufgereinigt (Qiagen Plasmid Purification Handbook) und danach ausgefällt. Das Säulenmaterial besteht hier aus Diethylaminoethanol (DEAE) beschichtetem Silicagel, welches eine pH-abhängige Wechselwirkung mit den Phosphatresten der DNA eingeht. Dies erlaubt eine gründliche chromatographische Auftrennung der DNA von verbliebenen Proteinen und Polysacchariden.

### **2.3.3. Restriktionsverdau**

#### **Prinzip**

Restriktionsendonucleasen sind doppelsträngige DNA durchtrennende Enzyme. Sie erkennen eine genaue, meist palindromische Basenabfolge. Der Verdau durch Restriktionsendonucleasen wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Plasmide anhand ihres Fragmentmusters nach dem Verdau zu identifizieren, um bestimmte Fragmente zu gewinnen und um kohäsive Enden, sog. „sticky ends“ zu erzeugen.

#### **Durchführung**

Die Protokolle für Temperatur, Dauer der einzelnen Restriktionsverdaue und Puffer richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

### **2.3.4. Agarose-Gelelektrophorese**

#### **Prinzip**

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung unterschiedlich großer DNA Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Agarosegel in einem elektrischen Feld. Durch den planaren Aromaten Ethidiumbromid, der vor dem Polymerisieren zur Agarose hinzugegeben wird, können die DNA Fragmente sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA (Waring 1965). Durch die fixierte Position innerhalb des Moleküls erhöht sich die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, das Licht der Wellenlängen 302 nm und 366 nm absorbiert und im sichtbaren Bereich bei 590 nm emittiert.

#### **Durchführung**

Es wurden 1% Agarosegele in 1x TBE Laufpuffer verwendet. Die Gele enthielten 500 ng/ml Ethidiumbromid. Als Standards dienten die Molecular Weight Marker II oder VII (BII oder BVII). Die Proben wurden mit ca. 15% Ladepuffer versetzt. Die Spannung in der Gelelektrophoresekammer betrug 80-130 V. Mit einer Digitalkamera wurden die Gele unter Durchleuchtung bei 302 nm aufgenommen und mit einer Software (Quantaty One, BioRad) weiterverarbeitet.

### **2.3.5. Isolierung einzelner DNA Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese**

#### **Prinzip**

Die DNA enthaltenden Agarosespots werden ausgeschnitten, und die DNA durch Zentrifugation durch eine DEAE-Membran hindurch gebunden und anschließend eluiert.

#### **Durchführung**

Zu isolierende Fragmente wurden mit einem sauberen, scharfen Skalpell unter Durchleuchtung mit 366 nm UV Licht ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA Fragmente aus der Agarose erfolgte durch das Gel Extraction Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen Gel Extraction Kit).

### **2.3.6. Auffüllen der Enden**

#### **Prinzip**

Die isolierten Fragmente weisen als Schnittstellen der bestimmten Restriktionsenzyme charakteristische Enden auf. Man unterscheidet zwischen überhängenden und nicht überhängenden Enden. Die überhängenden Enden unterscheidet man nach der Orientierung des überhängenden Stranges und der Länge des Überhanges. Bei einer Klonierung ist darauf zu

achten, dass mit Restriktionsenzymen geschnitten wird, die zueinander komplementäre überhängende Enden produzieren. Ist dies nicht möglich, werden die Enden zu kompatiblen, nicht überhängenden Enden, den sogenannten blunt ends, aufgefüllt. Hierzu bedient man sich der DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4. In der Anwesenheit hoher Konzentrationen von dATP, dTTP, dGTP, dCTP sowie  $Mg^{2+}$  besitzt diese eine  $5' \rightarrow 3'$  Polymerase Aktivität, so dass es zur Verlängerung des zurückliegenden  $3'$ -Endes kommt. Als Matrice dient das überstehende  $5'$ -Ende.

### Durchführung

Die Reaktionen wurden nach Anweisung des Hersteller ausgeführt (Gibco).

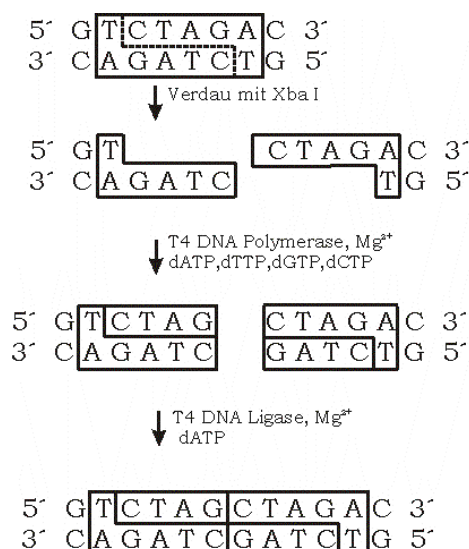
### 2.3.7. Ligation

#### Prinzip

Um ein DNA Fragment in ein mit Restriktionsenzymen geöffnetes Plasmid einzufügen, müssen die beiden aufeinanderpassenden Enden durch Phosphosphodiesterbindungen zwischen den  $3'$ -Hydroxyl- und den  $5'$ -Phosphatenden an beiden Strängen verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch die T4 Ligase katalysiert.

#### Durchführung

Die Reaktionen wurden nach Anweisung des Hersteller ausgeführt (Gibco). Das molare Verhältnis von Vektorenden zu Fragmentenden betrug bei den durchgeführten Ligationen 1:0, 1:3 und 1:5. Die Inkubationszeiten betragen bei einer Ligation kohäsiver Enden 1-2 Stunden bei  $25^\circ\text{C}$ , bei einer Ligation mit aufgefüllten Enden 16-20 Stunden bei  $16^\circ\text{C}$ . Abb. 10 zeigt schematisiert die beschriebenen Manipulationen an einem DNA-Strang, der die palindromische Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease XbaI enthält.



**Abbildung 10: Prinzip des Auffüllens überhängender Enden mittels der T4 DNA-Polymerase und anschließende Ligation.**

### 2.3.8. Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien

#### Prinzip

Kompetente *E. coli* werden durch die in der Ligation geschlossenen Plasmide transformiert. Transformation bedeutet in diesem Fall die Umwandlung von ampicillinsensiblen in ampicillinresistente Bakterien durch Aufnahme des eine  $\beta$ -Lactamase codierenden Plasmids mit der Möglichkeit der Selektion auf Ampicillinagarplatten. Kompetenz bedeutet die Fähigkeit zur Aufnahme von DNA. Kompetente *E. coli* wurden von einem kommerziellen Hersteller bezogen. Die Kompetenz wird durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  und Schockgefrieren hergestellt. Sie beruht wahrscheinlich darauf, dass die DNA an der Außenseite der Zellen ausfällt. Das Eindringen in die Zelle entsteht durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf  $42^\circ\text{C}$  von 45 Sekunden.

#### Durchführung

Zur Transformation wurden  $40\ \mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, mit dem halben Ligationsansatz vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock folgten weitere 5 Minuten auf Eis, bevor die *E. coli* in  $500\ \mu\text{l}$  SOC Medium für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  zur Expression der  $\beta$ -Lactamase inkubiert wurden. Dann wurden diese  $550\ \mu\text{l}$  auf Ampicillinagarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag können die Kolonien der transformierten Klone durch Inokulation von ampicillinhaltigem LB-Medium weiter vermehrt und die Plasmide durch Restriktionsverdau getestet werden.

### 2.3.9. Kryokonservierung der Bakterien

Zur Lagerung plasmidtragender Bakterien wurden  $1,2\ \text{ml}$  Aliquots einer Flüssigkultur in Eppendorf-Gefäße mit  $0,3\ \text{ml}$  50% Glycerin versetzt, gut vermischt und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

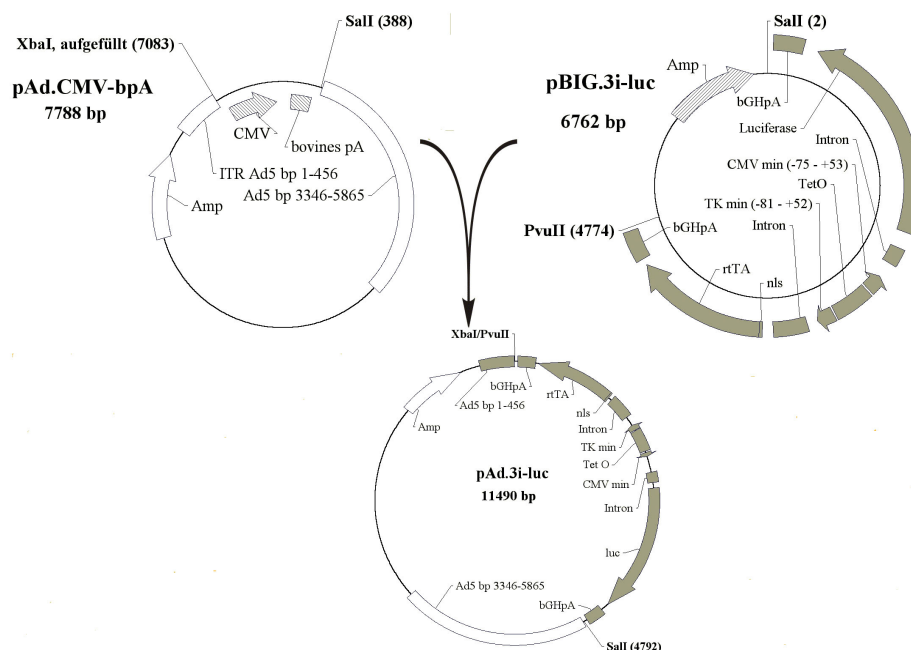
## 2.4. Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide

Adenovirale Expressionsplasmide sind Plasmide, die verschiedene Fragmente des adenoviralen Genoms enthalten. Diese stammen aus dem 5'-Ende des adenoviralen Genoms, welches wichtig für eine Verpackung in die Viruskapsiden ist (bei den hier verwendeten Plasmiden die Ad5-Basenpaare 1-456). Weiterhin besitzen sie ein mehrere Kilobasen langes Fragment, durch das es durch Rekombination mit homologen Frequenzen in 293 Zellen zu Formation adenoviraler Genome kommen kann (bei den hier verwendeten Plasmiden Ad5-Basenpaare 3346-5865). Ein in die „Lücke“ zwischen Basenpaar 456 und 3346 inseriertes Fragment wäre so in einem rekombinanten Adenovirus enthalten. Als Ausgangsplasmid

bei den in dieser Arbeit klonierten Plasmiden diente pAd.CMV-pA (freundlicherweise überlassen von S. Woo, Mt. Sinai School of Medicine, NY, USA).

#### 2.4.1. Klonierung von pAd.3i-luc

pAd.CMV-pA wurde mit der Restriktionsendonuklease XbaI geschnitten. Die generierten 5'-Überhänge von 4 Basen wurden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase aufgefüllt und das linearisierte Plasmid mit der Restriktionsendonuklease SalI geschnitten. Das so generierte DNA Fragment besitzt ein aufgefülltes (blunt) Ende und ein Ende mit dem 5'-Überhang 5'-TCGA-3' (sticky). Das Plasmid pBIG.3i-luc (freundlicherweise überlassen von C.S. Strathdee, J. P. Robarts Research Institute, London, Kanada) wurde mit den Restriktionsendonukleasen PvuII und SalI geschnitten. Dadurch, dass PvuII beim Schneiden keinen Überhang generiert, besitzen die entstehenden zwei Fragmente ebenfalls ein nicht überhängendes (blunt) Ende und ein Ende mit dem 5'-Überhang 5'-TCGA-3' (sticky). Die in Abb. 11 nicht schraffierten Fragmente wurden geextrahiert und miteinander ligiert. Die entstandenen transformierten *E.coli*-Klone, die auf ampicillinhaltigen Agarplatten wuchsen, wurden durch Mini-preps und Restriktionsverdau mit NdeI auf das entstandene Plasmid pAd.3i-luc geprüft. Ein positiver Klon wurde weiteren Restriktionsverdauen durch die Restriktionsendonucleasen BamHI, EcoRV, NheI, NotI, PvuI, SalI (je ein 11490 bp großes Fragment) unterzogen. Abbildungen der durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennten Fragmente befinden sich im Anhang unter 7.2.



**Abbildung 11: Klonierung von pAd.3i-luc.**

Die grau gezeichneten Abschnitte aus pBIG.3i-luc wurden anstelle der gestrichelt dargestellten Segmente in pAd.CMV-bpA kloniert.



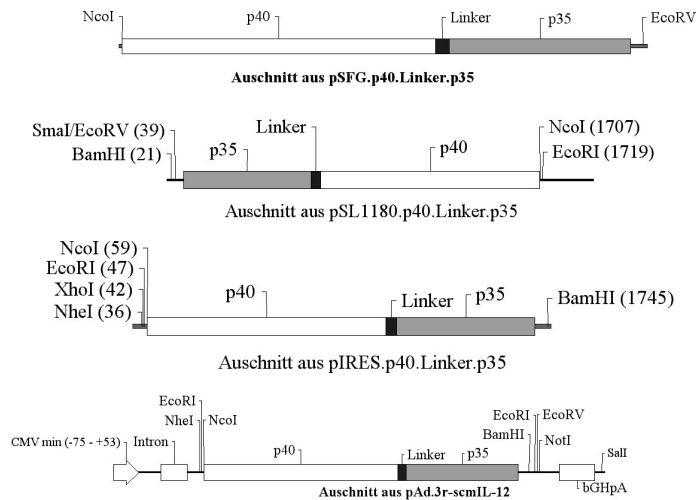
### 2.4.2. Klonierung von pAd.3r-luc

Das cDNA Fragment der firefly-Luciferase wurde aus dem Plasmid pGL3basic (Clontech) durch Verdau mit den Restriktionsendonucleasen BglII und XbaI gewonnen. Es konnte durch eine Ligation in den mit SpeI und BamHI geschnittenen pBIG.3r (freundlicherweise überlassen von C.S. Strathdee, J. P. Robarts Research Institute, London, Kanada) eingefügt werden, da BglII den gleichen Überhang (5'-GATC-3') wie BamHI und XbaI den gleichen Überhang wie SpeI (5'-CTAG-3') generiert. Das so entstandene Plasmid pBIG.3r-luc wurde durch Restriktionsverdau mit XhoI, sowie dem Kombinationsverdau PvuII/SalI identifiziert. Es wurde analog der unter 2.4.1. beschriebenen Klonierung von pAd.3i-luc mit SalI und PvuII geschnitten und in das mit XbaI geschnittene, aufgefüllte und mit SalI geschnittene pAd.CMV-pA ligiert. Die Plasmide ampicillinresistenter Klone wurden durch alkalische Lyse gewonnen und mit dem Restriktionsenzym NdeI verdaut. Ein Klon mit den erwarteten Fragmentgrößen wurde ausgewählt und durch Verdau mit den Restriktionsendonucleasen XhoI (Fragmente von 9691 bp und 1793 bp), XbaI (Fragmente von 8330 bp und 3154 bp), AviII (Fragmente 9252 bp, 2134 bp und 98 bp), NdeI (Fragmente 3330 bp und 8154 bp) und den sogenannten „single cuttern“ (je ein Fragment 11484 bp) EcoRV, KpnI, NheI, NotI und SalI geprüft (siehe 7.2.2.). Eine Plasmidkarte findet sich unter 3.2.2.

### 2.4.3. Klonierung von pAd.3i-scmIL-12

Eine graphische Übersicht über die Klonierungen gibt die Abb. 12. Ein 1672 bp großes Fragment, das die für das murine single chain IL-12 (scmIL-12) codierende Sequenz enthielt, wurde durch den Verdau des retroviralen Expressionsvektors pSFG-p40.Linker.p35 (freundlicherweise überlassen R.C. Mulligan, Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, Boston, USA) mit den Restriktionsendonucleasen EcoRV, NheI und NcoI und anschließender elektrophoretischer Auftrennung gewonnen. Es konnte in den mit SmaI und NcoI geschnittenen Klonierungsvektor pSL1180 ligiert werden, da sowohl EcoRV als auch SmaI nicht überhängende Enden erzeugen. Das entstandene Plasmid pSL1180-scmIL-12 wurde mit EcoRI und BamHI verdaut und das scmIL-12 codierende Fragment in das mit EcoRI und BamHI verdaute Plasmid pIRES (Clontech) ligiert. Das generierte Plasmid pIRES-scmIL-12 enthält am 5'-Ende des single chain IL-12 codierenden Fragmentes eine NheI Schnittstelle und am 3'-Ende eine BamHI Schnittstelle. Durch einen NheI/BamHI Verdau des Plasmids pAd.3i-luc lässt sich ein die cDNA für Luciferase enthaltendes Fragment herauslösen. Anstelle dessen wurde das aus pIRESscmIL-12 mit NheI/BamHI Verdau herausgelöste Fragment in den Plasmidvektor hineinligiert. Das neu

entstandene Plasmid pAd.3i-scmlL-12 wurde durch Restriktionsverdau mit MunI, NdeI und XbaI überprüft (siehe 7.2.3. und 3.2.3. für die Plasmidkarte).



### Abbildung 12: Subklonierungen des murinen single chain IL-12.

Wegen unpassender Schnittstellen war eine mehrfache Subklonierung des Fragmentes aus pSFG.p40.Linker.p35 in pAd.3i-scmlL-12 notwendig (siehe 2.4.3.).

#### 2.4.4. Klonierung von pAd.3r-scmlL-12

Durch Verdau des Plasmids pAd.3i-scmlL-12 mit den Enzymen NheI und Sall wurde das murine scIL-12 codierende Fragment mitsamt dem bovinen polyA herausgelöst und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Plasmidvektor pAd.3r-luc eingesetzt, aus dem durch den Verdau das Luciferasegen mitsamt dem bovinen polyA herausgelöst worden war. Die Identifikation des Plasmids erfolgte durch Restriktionsfragmentanalyse nach Verdau durch EcoRI und NsiI (siehe 7.2.4. und 3.2.4. für die Plasmidkarte).

#### 2.4.5. Klonierung von pAd.3i und pAd.3r

Die Plasmide pBIG.3r und pBIG.3i (freundlicherweise überlassen von C.S. Strathdee, J. P. Robarts Research Institute, London, Kanada) wurden mit den Restriktionsendonucleasen PvuII und Sall verdaut und in das mit XbaI verdaute, aufgefüllte und anschließend mit Sall verdaute Plasmid pAd.CMV-pA ligiert. Diese Klonierung erfolgte analog zu der unter 2.4.1. beschriebenen Klonierung von pAd.3i-luc. Eine Identifizierung der Plasmide erfolgte durch die Analyse der Fragmente nach Verdau durch die Restriktionsenzyme EcoRI, NdeI, und NsiI (siehe 7.2.5. und 3.2.5. für die Plasmidkarten).

#### **2.4.6. Klonierung von pShuttle.3r und pShuttle.3i**

Der Plasmidvektor pShuttle wurde mit der Restriktionsendonuklease KpnI verdaut, mit der T4 DNA-Polymerase aufgefüllt und schließlich mit der Restriktionsendonuklease Sall verdaut. Die entstehenden Enden sind kompatibel zu den Enden der mit PvuII und Sall verdauten Plasmide pBIG.3r und pBIG.3i, so dass durch Ligation die Plasmide pShuttle.3r und pShuttle.3i entstehen. Diese wurden durch Fragmentanalyse nach Restriktionsverdau durch EcoRI und NsiI überprüft (siehe 3.2.6. für die Plasmidkarten).

### **2.5. Triton X-114 Endotoxinextraktion**

#### **Prinzip**

Endotoxin ist ein Lipopolysaccharid, das ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien ist. Durch die Plasmidgewinnung aus *E.coli* durch alkalische Lyse kontaminiert es Plasmidaufreinigungen. Systemisch appliziert kann es eine inflammatorische Immunantwort mit Ausschüttung von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auslösen (Xing *et al.* 1994). In Gewebekultur kann es toxische Effekte verursachen und die Transfektionseffizienz vermindern (Weber *et al.* 1995). Um eine bestmögliche Vitalität der transfizierten 293 Zellen für eine Rekombination zu gewährleisten, wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA einer Endotoxinextraktion durch Triton X-114 unterzogen (Cotten *et al.* 1994). Triton X-114 bindet Lipopolysaccharide. Bei 0°C ist es mit Wasser mischbar, während es bei 30°C eine eigene Phase bildet (Bordier 1981). So ist eine Extraktion des Endotoxins möglich.

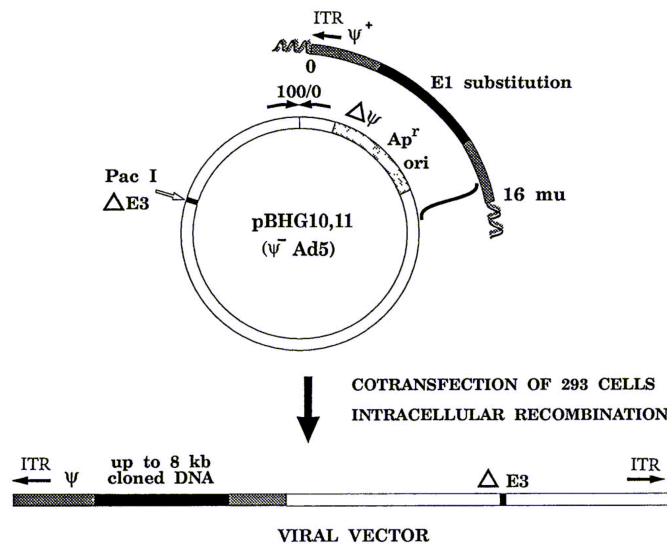
#### **Durchführung**

Triton X-114 wurde 3 0°C/30°C Zyklen ausgesetzt, um ein möglichst homogenes Detergenz zu erhalten (Bordier 1981). Die DNA-Lösung (0,5-1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 7,5) auf eine Natriumacetatkonzentration von 0,3 M gebracht. 3  $\mu\text{l}$  Triton X-114/100  $\mu\text{l}$  wurden hinzugegeben, das Gemisch für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 5 Minuten bei 30°C im Wasserbad gehalten. Es folgte eine Zentrifugation in einer Tischzentrifuge im Inkubator bei 30°C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde ein zweites und drittes Mal wiederholt, die wässrige Phase in ein endotoxinfreies Reaktionsgefäß (Eppendorf) aufgenommen, schließlich die DNA mit 0,6 Volumenanteilen Isopropanol ausgefällt, zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und in endotoxinfreies H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der DNA-Verlust lag bei 10-40%.

## 2.6. Generation der adenoviralen Vektoren durch Rekombination in 293 Zellen

### Prinzip

Die generierten Adenoviren besitzen Deletionen in der E1 Region zwischen den Basenpaaren 456–3346 und in der E3 Region zwischen den Basenpaaren 28133 und 30181. Diese erlauben eine Insertion von fremder DNA von bis zu 7,8 kb. Durch die Deletion in der E1 Region ist eine Permissivität dieser Viren nur in 293, 911 oder PER.C6 Zellen möglich, weil diese die Genprodukte der E1 Region *in trans* zur Verfügung stellen. Die in dieser Arbeit benutzte Methode zur Generierung der adenoviralen Vektoren beruht auf der Rekombination in 293 Zellen. Das adenovirale Expressionsplasmid enthält anstelle der E1 Region die gewünschte Insertions-DNA. Diese ist flankiert von den adenoviralen Sequenzen, welche 5' und 3' die E1 Region flankieren. Es sind die Basenpaare 1-456 des adenoviralen Genoms, welche das Inverted Terminal Repeat (bp 1-103), sowie die Verpackungssequenz (bp 194-358) enthalten und zur Generation infektiöser Partikel essentiell sind (Grable und Hearing 1992). Weiterhin enthält das Expressionsplasmid die Basenpaare 3346-5865 des adenoviralen Genoms. Durch Rekombination zwischen diesen und subgenomischen adenoviralen Sequenzen, denen die zur Verpackung essentiellen Sequenzen fehlen, kommt es zur Ausbildung E1 deletierter adenoviraler Genome. In der vorliegenden Arbeit wurden die subgenomischen Sequenzen durch den Plasmidvektor pBHG10 codiert. Dieses nach den Initialen seiner Erstbeschreiber benannte Plasmid enthält alle zur Produktion infektiöser Partikel essentiellen adenoviralen Sequenzen mit Ausnahme der Verpackungssequenz. Weiterhin besitzt es Deletionen in der E3 Region (Basenpaar 28133-30848, Bett *et al.* 1994). Eine Rekombination zwischen den homologen Sequenzen von pBHG10 und dem adenoviralen Expressionsplasmid kann zu einem adenoviralen Genom mit Deletionen in der E1 (Basenpaar 456-3346) und der E3 Region (Basenpaar 28133-30848) führen, welches die ins Expressionsplasmid inserierte DNA in der E1 Region enthält. Findet diese Rekombination in Zellen statt, die die E1 Genprodukte *in trans* zur Verfügung stellen, kommt es zu einem lytischen Virusinfektionszyklus.



**Abbildung 13: Verwendetes Prinzip der Generation rekombinanter Adenoviren.**  
(Quelle: Bett *et al.* 1994).

### Durchführung

Zur Aufnahme der Plasmide pBHG10 und des adenoviralen Expressionsplasmid in 293 Zellen wurde die Calciumphosphatpräzipitationmethode angewandt (Graham und van der Eb 1973). Dabei fällt die DNA als Copräzipitat von Calciumphosphat aus und wird von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

#### 2.6.1. Transfektion der 293 Zellen

Die 293 Zellen wurden 24-48 Stunden vor der Transfektion auf 94 mm Zellkulturplatten ausgesät. Die Transfektion wurde durchgeführt, als 80-90% Konfluenz erreicht war. 20 µg adenovirales Expressionsplasmid und 60 µg pBHG10 (~1 µg/µl in H<sub>2</sub>O) wurden in Polystyrolröhrchen mit 1,5 ml HEPES buffered saline gegeben. Tropfenweise wurden 75 µl von 2,5 M CaCl<sub>2</sub> unter leichtem Mixen dazugegeben, so dass Calciumphosphat unter Bildung eines milchigen Niederschlages ausfiel. Der Inhalt eines Polysterolröhrchens wurde auf eine 94 mm Zellkulturplatte gegeben. Normalerweise wurden 20 94 mm Zellkulturplatten transfiziert. Eine Platte wurde zur ungefähren Abschätzung der Transfektionseffizienz mit 20 µl des Plasmids pRC.CMV-β-Gal transfiziert, welches zur Expression der bakteriellen β-Galactosidase unter Kontrolle des CMV Promotors führt.

#### 2.6.2. Overlay

Das Präzipitat wurde 4,5 Stunden auf der Platte belassen. Danach wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 10 ml 37°C temperierte Overlay-Lösung ersetzt. Sie bestand zu gleichen Teilen aus 1% autoklavierter Seaplaque-Agarose und 2 x MEM Vollmedium (MEM-

Medium, 10% hitzeinaktiviertes Pferdeserum, 2% Penstrep, 400 mM Glutamin, 0,1% Hefeextrakt, 1% HEPES Puffer). Nach Erstarren der Agarose bei ungefähr 23°C wurden die Platten bei 37°C weiter inkubiert und nach 5 Tagen mit 8 ml der Overlaylösung, die auf den ersten Overlay aufpipettiert wurde, nachgefüttert. Ab dem 10. Tag wurden die Platte auf Plaques untersucht. Entsteht durch Rekombination in einer 293 Zelle ein Adenovirus, lysiert es die Zelle und infiziert nur die Nachbarzellen, da die Agarose eine Verbreitung über die gesamte Platte verhindert. Nach 10-15 Tagen wird makroskopisch eine Aufhellung im Zellrasen mit einem weißen Randsaum, eine Plaque, sichtbar. Mit Hilfe einer abgeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze wurde die die Plaque enthaltende Agarose ausgestanzt, in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 3 Einfrier-Auftauzyklen in Trockenis-Ethanol- bzw. 37°C Wasserbad ausgesetzt.

### 2.6.3. β-Galaktosidase-Färbung

#### Prinzip

Das lacZ Gen aus *E.coli*, welches eine β-Galactosidase codiert, ist ein klassisches Reportergen. Die β-Galactosidase spaltet die glykosidische Bindung in X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). Das gebildete blaue 5-bromo-4-chloro-indoxyl dimerisiert nicht-enzymatisch unter Oxidation zu dem unlöslichen blauen Farbstoff 5',5-dibromo-4',4-dichloro-indigo. Die Elektronen werden von Fe<sup>3+</sup> in der Färbelösung aufgenommen. Die durch pRC.CMV-β-Gal transfizierten Zellen können so sichtbar gemacht werden und erlauben eine Orientierung über den Anteil der transfizierten Zellen und entsprechend über die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination.

#### Durchführung

Von der pRC.CMV-β-Gal transfizierten Platte wurde ebenfalls nach 4,5 Stunden das präzipitathaltige Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit eiskalter 0,5% Glutaraldehydlösung fixiert, erneut mit PBS gewaschen und schließlich mit 4 ml X-Gal Lösung 24 Stunden inkubiert. Der Anteil der angefärbten 293 Zellen lag zwischen 0,5% und 10%.

### 2.6.4. CPE-Assay

Nach kurzem Zentrifugieren bei 13000 UpM (18877 x g) wurden 500-700 µl des die Agarose enthaltenen Zellkulturmediums durch einen 0,22 µm Sterilfilter auf eine 50-60% konfluente 24-Well Zellkulturplatte mit 293 Zellen gegeben. Nach 2-5 Tagen zeigten die Zel-

len bei einer positiven Plaque im Gegensatz zu den Negativkontrollen einen zytopathischen Effekt. Das zu erwartende Transgenprodukt wurde im Überstand nachgewiesen.

#### **2.6.5. Grobe funktionelle Testung der induzierbaren Genexpression**

400 µl des Überstandes aus dem CPE-Assay wurden zur groben Prüfung der Induzierbarkeit der Genexpression 1:10 verdünnt. Anschließend wurden je 500 µl der Verdünnung auf sechs mit je  $1 \times 10^6$  HT-29 Zellen bewachsene Wells einer 6-Well Zellkulturplatte gegeben. Nach einer Stunde wurde der Zellkulturüberstand durch Vollmedium ersetzt und nach 24 Stunden die Transgenexpression bestimmt.

#### **2.6.6. Isolation der viralen DNA im CPE Überstand**

##### **Prinzip**

Die Isolation der adenoviralen DNA erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch das Qiamp Blood Kit. Die viralen Kapsidproteine wurden hierbei durch SDS denaturiert und durch Protease K verdaut, so dass die virale DNA durch Zentrifugation an eine mit Silicagel beschichtete Membran gebunden und durch einen pH-Umschwung eluiert werden konnte. Sie diente der PCR-Amplifikation als Matrize.

##### **Durchführung**

400 µl aus dem Zellkulturüberstand der lytischen 293 Zellen wurden zur Isolation eingesetzt. Die Isolation der adenoviralen DNA erfolgte nach den Protokollen des Herstellers (Qiagen).

#### **2.6.7. Amplifikation der Übergangssequenzen zwischen inserierter und adenoviraler DNA**

##### **Prinzip**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation eines Teilstücks der adenoviralen DNA genutzt. Durch die Amplifikation liegt das Teilstück schließlich in so einer Menge vor, dass es in einem Ethidiumbromidgel sichtbar gemacht und seine Größe beurteilt werden kann. Amplifiziert wird ein DNA Abschnitt, der zwischen zwei Oligonucleotiden liegt. Diese dienen, wenn sie mit der komplementären Matrize gepaart sind, der DNA-Polymerase als Synthesestartpunkt. Die Amplifikation verläuft in einem Zyklus aus drei Schritten. Zunächst werden die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 94°C gespalten. Eine Abkühlung auf 50°C erlaubt es den 21 bp langen Oligonukleotiden, an die komplementäre Matrizensequenz zu

binden. Beim Syntheseschritt werden mit Hilfe der DNA-Polymerase in Anwesenheit der Desoxyribonucleotid-triphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP die Oligonukleotidprimer bei 72°C verlängert. Der PCR-Zyklus wiederholt sich mehrfach, wobei in weiteren Zyklen auch der bereits synthetisierte Strang als Matrize dient, so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Segmente kommt.

### **Durchführung**

Die gewünschten Oligonukleotidprimerpaare wurden so gewählt, dass eine Amplifikation der Übergangsegmente der inserierten Expressionskassette in das adenovirale Genom am 5'- und am 3'-Ende erreicht wurde.

Sequenz der Primerpaare:

Primer 1 sense	5'-taa ttc tgt gtt act cat agc-3'
Primer 1 antisense	5'-gca tcg cat tgt ctg agt agg tg-3'
prognostizierte Amplikongröße	289 bp
Primer 2 sense	5'-ttg cat cgc att gtc tga gta gg-3'
Primer 2 antisense	5'-cct caa tct gta tct tca tca tcg-3'
prognostizierte Amplikongröße	338 bp

Im PCR-Ansatz wurden pro Reaktionsansatz 10 µl Eluat aus der viralen DNA-Aufreinigung eingesetzt. Die Konzentration der Primer betrug 1 µM, die MgCl<sub>2</sub> Konzentration 2,5 mM, und die Nukleotidkonzentration 200 µM pro Nukleotid. Nach einer dreiminütigen Denaturierungsphase am Beginn wurden pro Reaktionsansatz 50 U Taq-Polymerase hinzugegeben. Weiterhin wurden 30 dreistufige Zyklen gewählt, wobei jeder Zyklus aus einem einminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C, einem einminütigen Anlagerungsschritt bei 50°C, und einem einminütigen Elongationsschritt bei 72°C bestand. Nach 30 Zyklen folgte nochmals ein fünfminütiger Elongationsschritt bei 72°C, bevor die Temperatur auf 4°C abgesenkt wurde. 10 µl des 50 µl Reaktionsansatzes wurden dann auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

## **2.7. Produktion und Aufreinigung der Adenoviren**

### **2.7.1. Vermehrung in 293 Zellen**

Der Überstand aus dem CPE-Assay sowie die zytopathischen Zellen wurden erneut in verschließbare Reaktionsgefäße aufgenommen, 3 Einfrier-Auftauzyklen ausgesetzt, filtriert und auf eine 70% konfluent bewachsene 94 mm Zellkulturplatte gegeben. In weiteren Schritten wurden mit dem Überstand der vorherig infizierten zytopathischen Platte zu-



nächst eine, dann fünf und schließlich 50 140 mm Zellkulturplatten, die 70% konfluent mit 293 Zellen bewachsen waren, infiziert. 48 Stunden nach Infektion der 50 Platten zeigten sich 90-95% der Zellen abgerundet und nur noch leicht anhaftend, so dass sie nach Absaugen eines Großteils des Mediums mit der Zellkulturpipette abgespült werden konnten. In 50 ml Gefäßen wurden die Zellen bei 2000 UpM (536 x g) und 4°C für 10 Minuten pelletiert, nochmals in PBS gewaschen und resuspendiert in 2 x 5 ml PBS drei Einfrier-Auftauschritten unterzogen. Hiernach wurde die gesamte Suspension auf 36 ml mit PBS aufgefüllt, bei 2500 UpM (838 x g) 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand für die Cäsiumchloridzentrifugation verwendet.

### **2.7.2. Cäsiumchloridzentrifugation und Dialyse**

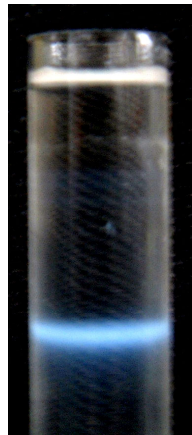
#### **Prinzip**

Wegen der Schwere der Cäsiumionen bildet sich nach mehrstündiger Zentrifugation konzentrierter Cäsiumchloridlösungen ein Dichtegradient aus. Grosse Moleküle reichern sich an dem Ort gleicher Dichte in dem Gradienten an (Meselson *et al.* 1957). Diese Methode wurde früher zur Aufreinigung von Plasmid-DNA verwendet. In der vorliegenden Arbeit wird zunächst durch Übereinanderschichtung von CsCl-Lösungen verschiedener Dichte ein diskontinuierlicher dreistufiger Gradient präformiert. Dies erlaubt eine kurze Zentrifugationszeit mit einer groben Aufreinigung der intakten, DNA enthaltenen Viruskapside. In einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde ein kontinuierlicher, sich während der Zentrifugation ausbildender CsCl-Gradient zur weiteren Aufreinigung verwendet. Aufgrund der Toxizität der Cäsiumionen müssen diese durch eine anschließenden Dialyse möglichst vollständig entfernt werden.

#### **Durchführung**

Zur Herstellung des Stufengradienten wurden drei steril filtrierte CsCl-Lösungen (A-C) in 6 Beckmann Zentrifugenröhrchen vorsichtig übereinandergeschichtet. Jeweils 0,5 ml der Lösung A wurden von 3 ml der Lösung B und 3 ml der Lösung C überschichtet. Dieser Gradient wurde von jeweils 6 ml Überstand des zentrifugierten Zelllysates überschichtet. Die Röhrchen wurden mit PBS austariert, wobei die maximal erlaubte Toleranz 0,5 g betrug. Es folgte eine einstündige Zentrifugation in der Beckman Zentrifuge Typ L7-35 im Vakuum bei 10°C und 34.000 UpM (206600 x g). Die in Abb. 14 gezeigte Virusbande wurde mit einer 20 G Kanüle und einer 10 ml Spritze abgenommen, indem 0,5 cm unterhalb der Bande eingestochen wurde. Die virushaltige CsCl-Lösung wurde mit Lösung B auf 24 ml aufgefüllt und in zwei neue Röhrchen gefüllt, die gegeneinander austariert wur-

den. Die vier übrigen Röhrcchen des Rotors wurden mit PBS gefüllt. Sie wurden 18 Stunden im Vakuum bei 10°C und 34.000 UpM (206600 x g) zentrifugiert. Die Virusbande wurde erneut abgenommen. Da die Kapside bei einer hohen Ausbeute während der Dialyse präzipitieren können, wurde 1 ml Dialysepuffer in die abgenommene virushaltige CsCl-Lösung (circa 4-5 ml) gegeben. Sie wurde in den Dialyserahmen gegeben, der zuvor mit Dialysepuffer benetzt wurde. Zur Dialyse schwamm der Dialyserahmen für 24 Stunden bei 4°C lichtgeschützt in 1 Liter Dialysepuffer. Der Dialysepuffer wurde alle 8 Stunden gewechselt und mit Hilfe eines Magnetrührers ständig bewegt. Nach 24 Stunden wurde das Dialysat dem Rahmen entnommen und in 50-200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgefäßen im Trockeneis-Ethanol-Bad eingefroren.



**Abbildung 14: Virusbande nach der Ultrazentrifugation.**

Das Ultrazentrifugenröhrchen nach der ersten Zentrifugation. Die intakten Adenoviruskapside formen eine leicht blaue Virusbande, die abgenommen wird (Quelle: Dr. A. Block).

## 2.8. Titerung mittels Plaqueassay

### Prinzip

Zur Konzentrationsbestimmung der infektiösen Adenoviren in der Aufreinigung wurde sich in der vorliegenden Arbeit des Plaqueassays bedient. Das Prinzip besteht aus der stufenweisen Verdünnung der Virusaufreinigung. 293 Zellen werden unter standardisierten Bedingungen mit verschiedenen Verdünnungen inkubiert und nach der Exposition mit Agarose überschichtet, so dass bei Lyse der Zelle nur die Nachbarzellen infiziert werden und sich eine Plaque bildet. Diese Plaques werden bei der Verdünnung ausgezählt, bei der man sie gut voneinander abgrenzen kann. Die Einheit der Konzentrationsangabe ist folglich Plaque formierenden Einheiten („plaque forming units“)/ml (pfu/ml).

### Durchführung

200 µl der Virusaufreinigung wurden in 1,8 ml Zellkulturmedium 1:10 verdünnt. Die weitere Verdünnung erfolgte ebenfalls in 1:10 Schritten nach gründlicher Durchmischung und Pipettenspitzenwechsel. Je 500 µl der 1:10<sup>7</sup> bis 1:10<sup>12</sup> Verdünnungen wurden auf je drei 60 mm Zellkulturschalen pipetiert, welche 90% konfluent mit 293 Zellen bewachsen sind. Die

Schalen wurden für 1 Stunde in den Inkubator gestellt und alle 15 Minuten geschwenkt. Nach einer Stunde erfolgte das Absaugen des Mediums und der Agaroseoverlay wie bei der Generation der Adenoviren. Ab dem 7. bis zum 14. Tag wurden die Plaques gezählt und markiert. Es wurden die Verdünnung mit 30-300 Plaques berücksichtigt und der Durchschnittswert der drei infizierten Platten gebildet. Die Konzentration in pfu/ml ergab sich durch folgende Gleichung:

$$\frac{\text{Durchschnitt der Plaques pro Platte} \times \text{Verdünnung}}{0,5 \text{ ml (Menge der Viruslösung pro Platte)}} = \frac{\text{pfu}}{\text{ml}}$$

## 2.9. Infektion der Gewebekulturen

### Prinzip

Bei der Infektion gibt die multiplicity of infection (m.o.i.) das Verhältnis zwischen infektiösen Partikeln (in pfu) und zu infizierenden Zellen an. Die pfu wurde unter oben beschriebenen Bedingungen (Plaqueassay) bestimmt. Um andere nicht permissive humane Zelllinien mit einer pfu zu infizieren, die der bestimmten möglichst nahe kommt, müssen möglichst gleiche Bedingungen wie beim Plaqueassay gewählt werden.

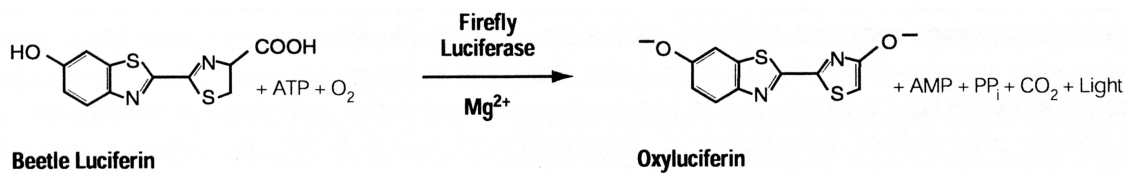
### Durchführung

Die verschiedenen Zelllinien wurden 6 Stunden vor der Infektion in 6-Well Zellkulturschalen in der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/Well in 3 ml Vollmedium ausgesät. Die größeren HELA, RT-4, und 293 Zellen wurden in der Konzentration  $5 \times 10^5$  Zellen/Well, die kleineren U266 Zellen in 24-Well Platten in 1 ml Vollmedium ausgesät. Die Virusaufreinigung wurde so im Zellkulturmedium ohne Zusätze aufgenommen, dass 500 µl die gewünschte m.o.i. enthielten. Die in Suspension wachsenden U266 Zellen wurden nach 6 Stunden abzentrifugiert und in 1 ml Zellkultur der entsprechenden m.o.i. ausgesetzt. Die Platten wurden für 1 Stunde mit dem infektiösen Medium in den Inkubator gestellt und alle 15 Minuten vorsichtig geschwenkt. Nach einer Stunde wurde der infektiöse Überstand abgesaugt und 3 ml Vollmedium auf die Platten gegeben. Die U266 Zellen wurden pelletiert und in Vollmedium resuspendiert. Zum Vollmedium wurden bei Bedarf verschiedene Konzentrationen Doxycyclin (Vibravenös®) gegeben. Zur Testung humaner Seren auf Tetracyclin und seine Derivate wurde das fetale Kälberserum im Vollmedium durch Probandenserum ersetzt.

## 2.10. Bestimmung der Aktivität des Reportergens Luciferase

### Prinzip

Luciferase ist eines der am häufigsten verwendeten Reporter gene (Naylor 1999). Es ist die modifizierte Version der Luciferase cDNA des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (de Wet *et al.* 1985). In der Anwesenheit von ATP, O<sub>2</sub> und Mg<sup>2+</sup> katalysiert Luciferase unter Lichtemission (562 nm) die oxidative Decarboxylierung von D-(-)Luciferin (Bronstein *et al.* 1994). Die in dieser Arbeit verwendete Luciferase cDNA stammt aus dem pGL3basic. Ihre Sequenz ist in der Weise verändert, dass es zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des nicht mehr glycolisierbaren 62 kDa Proteins kommt, das in Säugetierzellen eine Halbwertszeit von ungefähr 3 Stunden besitzt (Promega). Die Lichtemission ist in einem Bereich von 8 Log-Stufen linear und kann in einem Luminometer quantifiziert werden.



**Abbildung 15: Von der Luciferase katalysierte biolumineszente Reaktion.**

(Quelle: Promega).

### Durchführung

Die Zellen wurden mit 3 ml kaltem PBS gewaschen und mit 150 µl des Cell Culture Lysis Reagent (CCLR, Promega) lysiert. Das Lysat wurde mit Zellkratzern von der Platte gekratzt, bei 4°C und 13000 UpM (18877 x g) abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei -80°C eingefroren. Die Messung am Luminometer erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers (Promega) in Duplikaten aus je 20 µl Lysat, die bei Bedarf in CCLR verdünnt wurden. Die Einstellungen des Luminometers wurden so gewählt, dass pro Messung 100 µl Substrat (Promega) injiziert wurden und die Lumineszenz nach einer 1 Sekunde Verzögerung für 10 Sekunden gemessen wurde. Die Durchschnittslumineszenz des Lysats von drei nicht infizierten Wells wurde von dem Durchschnittswert jedes infizierten Triplikats abgezogen. Eine generierte Standardkurve mit rekombinanter Luciferase (Promega) in Konzentrationen von 1 pg/ml bis 300 ng/ml ergab eine Sättigungskinetik bei Luciferasekonzentrationen über 30 ng/ml. Um eine direkte Umrechnung von relativen Lichteinheiten auf die Luciferasekonzentration im Zelllysate zu ermöglichen, wurde mit Hilfe der Software Prism (Graphpad) eine Kurvenannäherung erstellt. Nach Konzentrationsbestim-

mung des Proteingehalts im Lysat konnte so die Luciferasekonzentration pro mg herausgelöstes Zellprotein angegeben werden.

### **2.11. Proteinbestimmung**

#### **Prinzip**

Die Proteinquantifizierung nach Bradford (1976) beruht auf der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm zu 595 nm, wobei die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung ist. Der DC-Proteinassay (BioRad) funktioniert nach dem gleichen Prinzip, wird im Gegensatz zum Bradford-Assay jedoch nicht durch das im CCLR enthaltene Triton X-100 gestört.

#### **Durchführung**

Der DC-Proteinassay wurde nach Empfehlung des Herstellers (BioRad) durchgeführt.

### **2.12. ELISA zur Bestimmung der Konzentration der Zytokine Interleukin-12 und Interferon- $\gamma$**

#### **Prinzip**

Die Konzentration der Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand der adenoviral infizierten Zellen bzw. der murinen Splenozyten wurde mit kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISAs (Pharmingen) bestimmt.

#### **Durchführung**

Die Durchführung der ELISA erfolgte nach den Protokollen des Herstellers (Pharmingen).

### **2.13. *In vitro* Bioassay zur Funktionsbestimmung des murinen Interleukin-12**

#### **Prinzip**

Es gibt keine international festgelegte Einheit der IL-12 Aktivität. Die Fähigkeiten von IL-12, Lymphokin-aktivierte Killerzellen zu aktivieren, Proliferation in aktivierten T-Lymphoblasten zu induzieren, sowie eine IFN- $\gamma$  Sekretion zu stimulieren, sind zur Quantifizierung der IL-12 Bioaktivität genutzt worden (Gately *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit des IL-12 enthaltenen Zellkulturüberstandes der adenoviral infizierten Zelllinien geprüft, in murinen Splenozyten eine IFN- $\gamma$  Sekretion zu stimulieren (Caruso *et al.* 1996). Als interner Standard diente rekombinantes, >97% reines murines IL-12 (R&D Systems). Um im Vergleich zum IL-12 Fusionsprotein ein adenoviral exprimier-

tes, heterodimeres IL-12 auf seine Bioaktivität zu testen, wurde das Virus Ad.CMV-p40.IRES.p35 in die Versuche miteinbezogen.

### **Durchführung**

HT-29 Zellen wurden wie oben beschrieben mit den Adenoviren Ad.CMV-p40.IRES.p35 und Ad.3r-scmIL-12 in An- und Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände eines Triplikates abgenommen, vereint und bei -80°C in mehreren Aliquots eingefroren. Der Überstand nicht infizierter Zellen diente als Negativkontrolle. Die IL-12 Konzentrationen in den vereinten Zellkulturüberständen und in der Negativkontrolle wurden mit dem oben beschriebenen murinen IL-12 Sandwich-ELISA (Pharmingen) bestimmt. Da die Konzentration des kommerziell erworbenen rekombinanten IL-12 nach seiner Fähigkeit gemessen wurde, Proliferation von murinen durch Phytohämagglutinin aktivierten Splenozyten auszulösen (R&D Systems, Mattner *et al.* 1993), wurde seine Konzentration ebenfalls noch einmal im Sandwich-ELISA bestimmt, um eine immunoreaktiv äquivalente Menge einzusetzen.

Die Splenozyten stammten aus der Milz einer durch zervikale Dislokation getöteten, weiblichen, 6-12 Wochen alten Balb/c Maus. Die frisch entnommene Milz wurde zweimal in PBS gewaschen, in eine sterile Nytexnetztasche gegeben und in 10 ml Lymphozytenmedium (RPMI 1640 mit 10% FBS, 1% Glutamin, 1% Penstrep, 50 µM 2-Mercaptoethanol) mit einer spitzen Pinzette durch das Netz hindurch perforiert und ausgestrichen. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 1000 UpM (178 x g) 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Erythrozyten mit 10 ml 1x Gey's Lösung lysiert (5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur). Es folgten eine weitere sechsminütige Zentrifugation bei 1500 UpM (402 x g) und ein Waschen mit PBS.  $1,6 \times 10^7$  Zellen wurden in 2 ml Kulturmedium, welches Ziegen-Anti-human CD28 Antikörper (R&D Systems) (5 µg/ml) enthielt, in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben. Diese war 2 Stunden zuvor mit Hamster-Anti-mouse CD3ε Antikörpern (R&D Systems) (50 µg in 5 ml) beschichtet worden. Beide Antikörper vermitteln eine proliferative Wirkung auf T-Lymphozyten. Nach 3 Tagen wurden  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well in 100 µl auf eine 96-Well Zellkulturplatte gegeben. 25 µl des gepoolten, eingefrorenen Zellkulturüberstandes (1:0 halblogarithmisch bis 1:10<sup>5</sup> in Vollmedium verdünnt) wurden ebenso wie Verdünnungen des rekombinanten murinen IL-12 in Triplikaten hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes abgenommen, 1:1 mit Lymphozytenmedium verdünnt und auf einer 96-Well Zellkulturplatte bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die IFN-γ Konzentration bestimmt. Es konnten so die IFN-γ Produktion (in pg/ml) und die eingesetzte IL-12 Menge

(in pg/ml) der drei verschiedenen IL-12 Typen (rekombinant, adenoviral produziertes Fusionsprotein, sowie adenoviral produziertes Heterodimer) gegeneinander aufgetragen werden. Die Kurvennäherung wurde mit Hilfe des Programms „SigmaPlot“ (SPSS Inc.) durchgeführt. Weiterhin wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion von  $4 \times 10^4$  Splenozyten angegeben, welche 24 Stunden dem 1:50 verdünnten Zellkulturüberstand der infizierten HT-29 Zellen ausgesetzt waren.

## 2.14. Western Blots

### Prinzip

Der Western Blot ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen mittels Gelelektrophorese, der anschließenden punktgenauen Übertragung und Fixierung der Proteinbanden vom Gel auf eine Membran, sowie dem anschließenden immunologischen Nachweis der Proteine durch spezifische Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden im durch CCLR hergestellten Zelllysate Aktin (als quantitatives Maß für das Gesamtprotein) und VP16 (als Maß für die Expression der Transaktivatoren tTA und rtTA) mittels polyklonaler Kaninchen- und sekundären enzymmarkierten Ziegenantikörpern nachgewiesen.

### Durchführung

Eine 25  $\mu$ g Gesamtprotein enthaltende Menge Zelllysate aus Ad.3i-luc und Ad.3r-luc infizierten HT-29 Zellen, die nach der Infektion verschiedenen Konzentrationen Doxycyclin ausgesetzt worden waren, wurden mit 3x Probenpuffer (Lämmli) versetzt. Zur Denaturierung wurden die Ansätze 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Neben einem Proteinmolekulargewichtstandard (Amersham) wurden die Proben bei 60 V in einem 15% Acrylamid-SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden danach auf eine 0,45  $\mu$ m PVDF-Membran (Immobilion-P, Millipore) transferiert (Wulff 2001). Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen mit Blockierlösung (5% Uelzena Magermilchpulver, 0,1% Tween 20 in 1x TBS) für 1 Stunde geblockt. Aktin und die Transaktivatoren tTA und rtTA wurden mit den primären Kaninchenantikörpern anti-Aktin (Sigma) bzw. anti-VP16 (Clontech) detektiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Blots dreimal mit TBS gewaschen und mit Peroxidase gekoppelten sekundären anti-Kaninchen Sekundärantikörpern (Dianova) in TBS für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde mittels Chemilumineszenz mit Substratlösungen aus dem ECL-Kit (Amersham) ein Hyperfilm belichtet. Es wurden zunächst die Transaktivatoren detektiert und nachgewiesen. Vor der Detektion der Aktinbanden mit primären und

sekundären Antikörpern wurde der Blot eine Stunde im sogenannten „Stripping buffer“ inkubiert. Der Western Blot wurde freundlicherweise von Herrn J. Müller aus der Arbeitsgruppe Dr. A. Block ausgeführt.

### **2.15. Blutserumgewinnung**

Das Blutserum der gesunden Probanden, welche sich durch eine normale Erstweltdiät ernährten, wurde durch Kubitalvenenpunktion, Gerinnung und Abzentrifugation gewonnen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es wurde statt FBS zum Zellkulturmedium von Ad.3r-luc und Ad.3i-luc (m.o.i.:30) infizierten HT-29 gegeben.



## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Einführung**

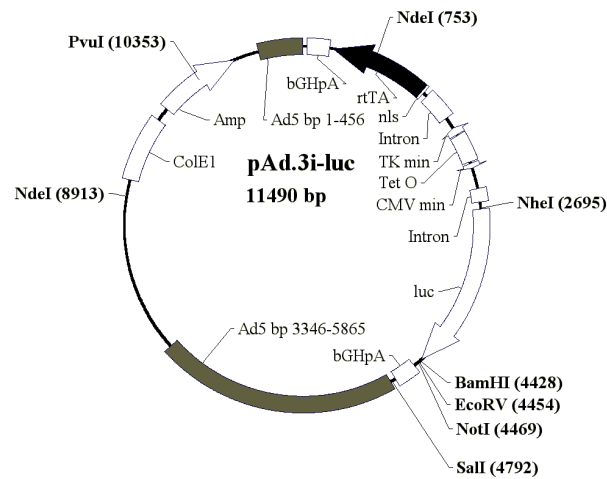
Zur Generation der rekombinanten adenoviralen Vektoren wurden zunächst die adenoviralen Expressionsplasmide kloniert und anhand ihres Restriktionsfragmentmusters identifiziert. Die rekombinanten adenoviralen Vektoren Ad.3i-luc, Ad.3r-luc und Ad.3r-scmIL-12 wurden durch Copräzipitation korrespondierender adenoviraler Expressionsplasmide mit pBHG10 in 293 Zellen generiert. Diese wurden *in vitro* hauptsächlich in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 funktionell charakterisiert. Ad.3i-luc und Ad.3r-luc wurden in Bezug auf ihre Regulationskapazität bei variablen m.o.i. und auf die Genexpression bei halblogarithmisch gesteigerten Konzentrationen von Doxycyclin untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss humaner Seren statt tetracyclinfreiem fetalen Kälberserum sowie die Bedeutung der autoregulatorischen Schleife auf die Regulierbarkeit der Genexpression untersucht.

Da sich in den adenoviralen Vektoren das mit dem Transaktivator tTA arbeitende sogenannte Tet-OFF System überlegen zeigte, wurde der dieses System enthaltende adenovirale Vektor Ad.3r-scmIL-12 generiert und in Bezug auf die regulierte Expression von murinem single chain IL-12 in verschiedenen Zelllinien und Bioaktivität untersucht.

### **3.2. Ergebnisse der Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide**

#### **3.2.1. pAd.3i-luc**

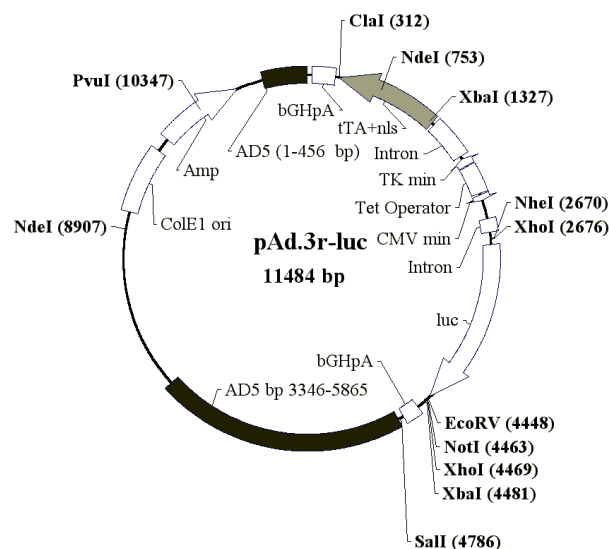
Das generierte Plasmid pAd.3i-luc enthält das Reportergen Luciferase unter Kontrolle der autoregulativen Tetracyclin-abhängigen Expressionskassette aus dem Plasmid pBIG.3i mit dem Transaktivator rtTA. Diese wird 5' von den Basenpaaren 1-456 und 3' von den Basenpaaren 3346-5855 des adenoviralen Genoms flankiert. Der CMV Minimalpromotor, der die Luciferase kontrolliert, ist nach rechts im Hinblick auf die konventionelle Einteilung des adenoviralen Genoms orientiert. Die Plasmide mehrerer ampicillinresistenter Kolonien wurden durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease NdeI getestet. Ein Klon mit dem erwarteten Fragmentmuster wurde durch weitere Restriktionsverdaue getestet (siehe 7.2.1.).



**Abbildung 16: Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3i-luc.**  
Zur Restriktionsfragmentanalyse siehe 7.2.1.

### 3.2.2. pAd.3r-luc

Das Plasmid pAd.3r-luc enthält analog zu pAd.3i-luc die Expressionskassette aus pBIG.3r mit dem Transaktivator tTA, welcher das Reportergen Luciferase kontrolliert. Der Größenunterschied von 6 bp zwischen beiden Plasmiden erklärt sich durch verschiedene Klonierungsstrategien beim Hineinklonieren der Luciferase cDNA (Strathdee *et al.* 1999, 2.4.2.). Das korrekte rekombinante Plasmid wurde durch Restriktionsverdau ermittelt.

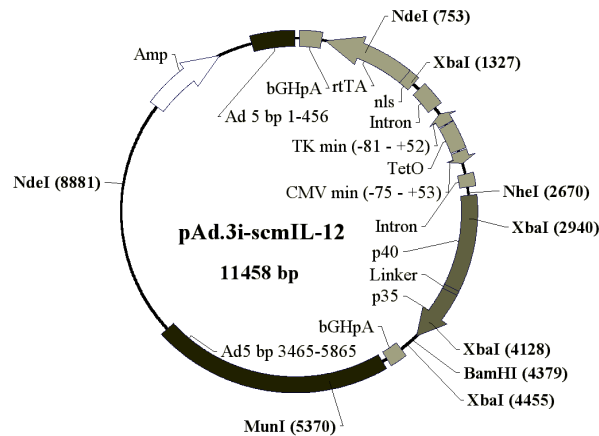


**Abbildung 17: Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3r-luc.**  
Zur Restriktionsfragmentanalyse siehe 7.2.2.

### 3.2.3. pAd.3i-scmIL-12

Das adenovirale Expressionsplasmid pAd.3i-scmIL-12 entstand durch die Subklonierung des Fusionszytokins in das Plasmid pAd.3i-luc, aus dem die Luciferase cDNA durch BamHI und NheI Verdau entfernt worden war. Es enthält somit das murine single chain

IL-12 unter Kontrolle des Tetracyclin-abhängigen Minimalpromotors. Der Verdau mit der Restriktionsendonuklease *MunI*, welche in der cDNA der Luciferase mehrfach und der cDNA des Fusionzytokins nicht schneidet, erlaubt eine Unterscheidung zwischen Ad.3i-luc und pAd.3i-scmIL-12 (siehe 7.2.4.).

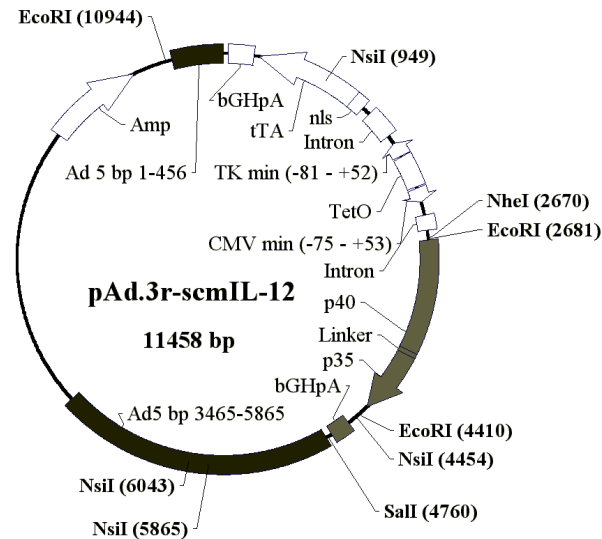


**Abbildung 18: Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3i-scmIL-12.**

Zur Restriktionsfragmentanalyse siehe 7.2.3.

### 3.2.4. pAd.3r-scmIL-12

Das Plasmid pAd.3r-scmIL-12 enthält die cDNA des murinen single chain IL-12, welche durch *NheI*/*SalI* Verdau aus dem pAd.3i-scmIL-12 gewonnen und in die korrespondierenden Schnittstellen von pAd.3r-luc eingesetzt wurde. Minipräparationen der Plasmide ampicillinresistenter Klone wurden zunächst durch *EcoRI* Verdau, positive Klone schließlich durch einen *MunI* Verdau identifiziert. Eine Unterscheidung zu pAd.3i-scmIL-12 ist durch Restriktionsverdau mit *NsiI* möglich, da dieses Enzym in der Sequenz des Transaktivators tTA, nicht aber in der des rtTA schneidet (siehe 7.2.4.).

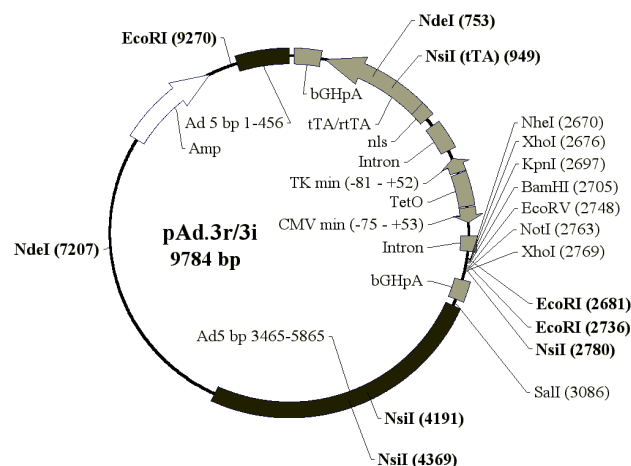


**Abbildung 19: Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3r-scmIL-12.**

Zur Restriktionsfragmentanalyse siehe 7.2.4.

### 3.2.5. pAd.3i/pAd.3r

Für den Fall, dass es später noch einmal erwünscht sein sollte, andere Gene adenoviral und unter Kontrolle eines Tetracyclin-regulierbaren Systems zu exprimieren, ist es von Vorteil, über eine flexible sogenannte „multiple cloning side“ zu verfügen. Diese offeriert mehrere im Plasmid einmalige Restriktionsschnittstellen zwischen Promotor und polyA. Sie könnten dann dazu benutzt werden, beliebige proteincodierende Sequenzen einzufügen. Zur Translation benötigen sie noch ein eigenes ATG Codon. Die Restriktionsschnittstellen sind 5'- NheI – XhoI – KpnI – BamHI – EcoRV – NotI – XhoI –3'. Positive Klone wurden durch EcoRI, NsiI und NdeI Verdaue getestet.

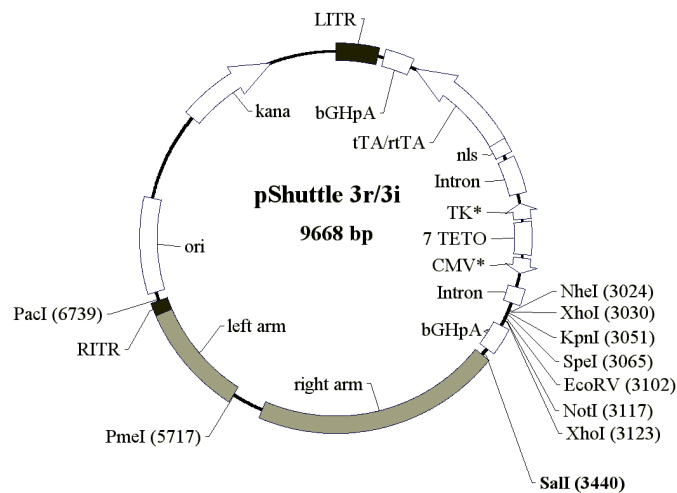


**Abbildung 20: Plasmidkarte des Expressionsplasmide pAd.3i/3r.**

Zur Restriktionsfragmentanalyse siehe 7.2.5.

### 3.2.6. pShuttle.3i/pShuttle.3r

Eine sich in den letzten Jahren weiter verbreitende Methode der Generation rekombinanter adenoviraler Vektoren nutzt zur Rekombination nicht 293 Zellen, sondern den rekombinationskompetenten *E.coli*-Stamm BJ5183 (He *et al.* 1998). In diesem „Adeasy“ genannten System können Rekombinanten anhand einer Kanamycinresistenz selektioniert werden. Das Äquivalent zu den adenoviralen Expressionsplasmiden ist das Plasmid pShuttle. Um auch das „Adeasy“ System zur induzierbaren adenoviralen Genexpression nutzen zu können, wurden die Expressionskassetten aus pBIG.3i/3r in pShuttle kloniert. Sie verfügen ebenfalls über eine „multiple cloning side“, die die Restriktionsschnittstellen 5'-NheI - XhoI - KpnI - SpeI - EcoRV - NotI - XhoI-3' bereitstellt. Positive Klone wurden durch EcoRI und NsiI Verdaue getestet.

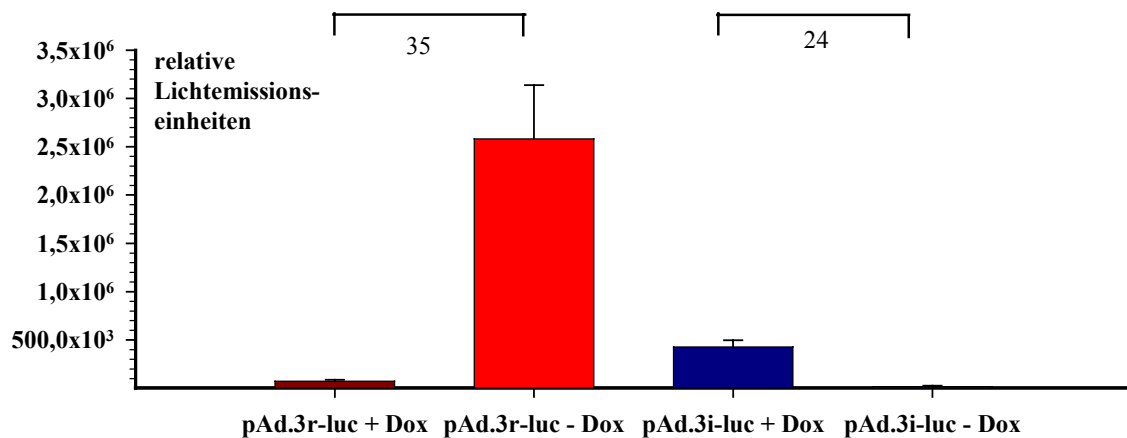


**Abbildung 21: Plasmidkarte des Expressionsplasmide pShuttle.3i/3r.**

### 3.2.7. Funktionelle Überprüfung der Plasmidvektoren pAd.3i-luc und pAd.3r-luc

Zur funktionellen Überprüfung der Tetracyclin-regulierbaren Expressionskassette in den adenoviralen Expressionsplasmiden wurden 293 Zellen mit den Luciferase codierenden Plasmiden transfiziert. Die Testung diente nur zu einer funktionellen Bestätigung der Klonierung sowie einer Bestätigung der von Strathdee (1999) erzielten Ergebnisse, so dass keine Optimierung der  $\text{CaCl}_2$  vermittelten Transfektion erfolgte und auf eine aufwendige Transfektionskorrelation durch ein zweites Reportergenkonstrukt verzichtet wurde. Die Suppression der in relativen light units gemessenen Genexpression der Luciferase in Anwesenheit von Doxycyclin war bei pAd.3r-luc transfizierten 293 Zellen 35fach. pAd.3i-luc transfizierte 293 Zellen zeigten in Anwesenheit von Doxycyclin eine 24fach höhere Genexpression der Luciferase. Die Genexpression beider Plasmide ist folglich regulierbar. Da beide Plasmide zu unterschiedlichen Zeiten unter nicht optimierten Transfektionsbedingungen getestet wurden, war der Unterschied in der maximalen Genexpression nicht

zwangsläufig auf eine stärkere Genexpression des Tet-OFF Systems des pAd.3r-luc zurückzuführen, sondern könnte auch durch eine höhere Transfektionseffizienz verursacht gewesen sein.



**Abbildung 22: Luciferaseexpression nach Transfektion der Plasmide pAd.3r-luc und pAd.3i-luc.**

### 3.3. Adenovirale Vektoren

Die verschiedenen adenoviralen Vektoren der ersten Generation wurden durch Copräzipitation mit pBHG10 in 293 Zellen generiert. Sich unter der Agarose bildende Plaques wurden gepickt und auf die Auslösung eines zytopathischen Effektes in 293 Zellen in Flüssigkultur überprüft. Zur weiteren Prüfung wurde das Transgenprodukt im Überstand nachgewiesen. Virushaltiger Überstand wurde schließlich auf HT-29 Zellen gegeben. Zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit des induzierbaren Systems wurden die Unterschiede in der Transgenexpression in der An- und Abwesenheit von Doxycyclin in den HT-29 Zellen gemessen. Bestand eine Regulierbarkeit der Genexpression (Daten nicht dargestellt), wurde virale DNA aus dem Zellkulturüberstand isoliert. Um zu prüfen, ob beide Enden der inserierten Transgenexpressionskassette im adenoviralen Genom enthalten waren, wurden die Übergänge zwischen inserierten und adenoviralen Sequenzen amplifiziert. Die Amplifikate zeigten die erwarteten Größen von 289 bp und 338 bp (siehe 7.2.7.). Eine Übersicht über die in die E1 Region inserierten Expressionskassetten der während dieser Arbeit generierten adenoviralen Vektoren Ad.3i-luc, Ad.3r-luc und Ad.3r-scmIL-12 bietet die Abb. 23. Die weiteren benutzten Vektoren Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35 sind ebenfalls abgebildet.

### **3.3.1. Ad.3i-luc**

Ein funktioneller Virusklon wurde in 293 Zellen vermehrt und aus den 50 mit zytopathischen 293 Zellen bewachsenen 140 mm Zellkulturplatten aufgereinigt. Die Bestimmung des infektiösen Titers der Aufreinigung durch den Plaqueassay ergab eine Konzentration von  $3,9 \times 10^9$  PFU/ml in einem Gesamtvolumen von 4,5 ml.

### **3.3.2. Ad.3r-luc**

Es wurde ebenfalls ein funktioneller Virusklon aus 50 140 mm Zellkulturschalen aufgereinigt. Im Plaqueassay ergab sich ein Titer von  $1 \times 10^{10}$  PFU/ml in einem Gesamtvolumen von 5 ml.

### **3.3.3. Ad.CMV-luc**

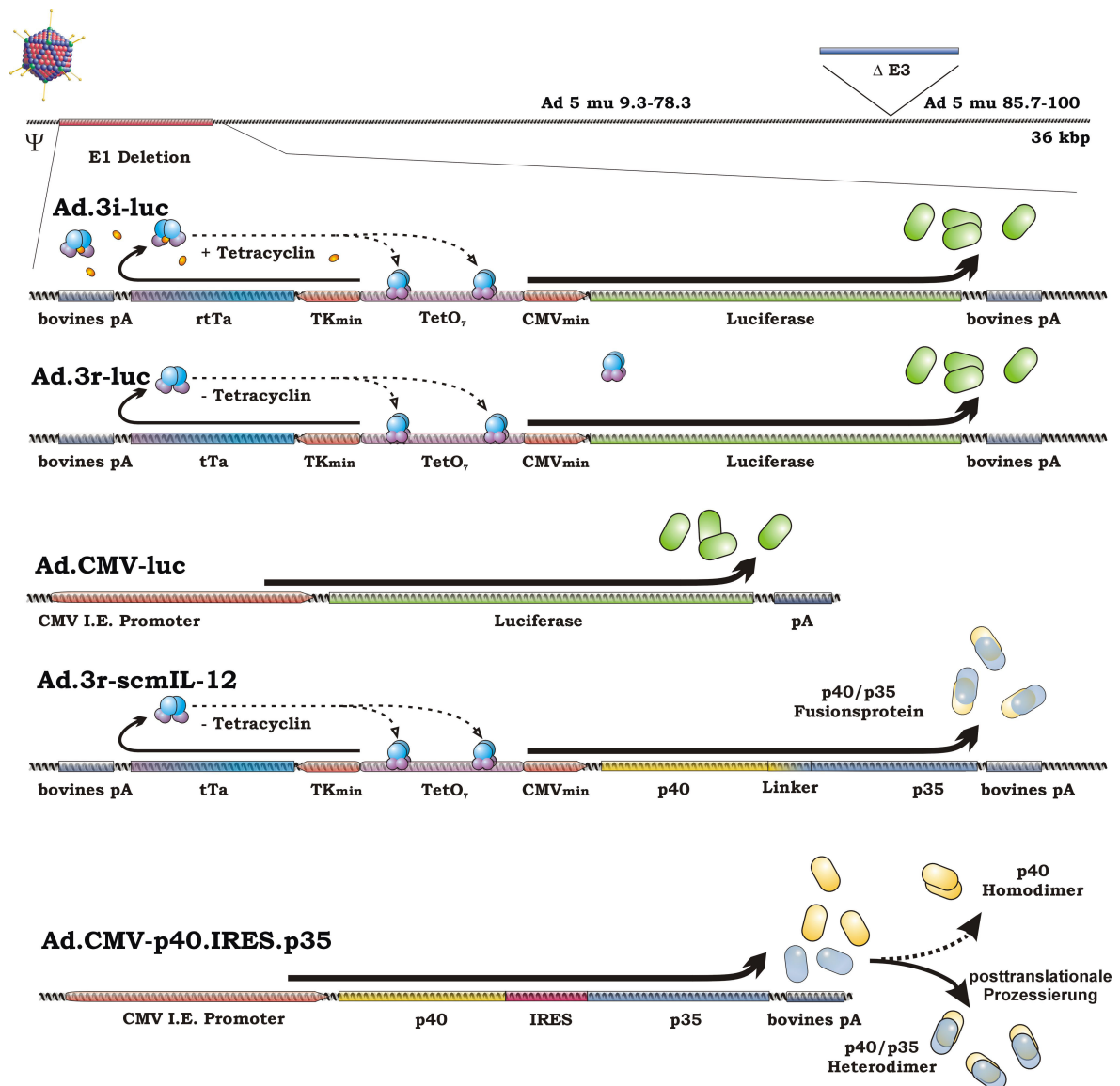
Das Virus Ad.CMV-luc wurde von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe im Rahmen einer Promotionsarbeit generiert (Milasinovic, Dissertation in Vorbereitung). Es enthält das Luciferasegen unter Kontrolle des immediate early Promotorelements des humanen Cytomegalievirus (bp -601 bis -14 relativ zum Transkriptionsstartnukleotid), von dem bereits gezeigt wurde, dass es im adenoviralen Kontext effizient Genexpression mediiert (Tong *et al.* 1998). Die Konzentration der Aufreinigung betrug  $7,5 \times 10^9$  pfu/ml.

### **3.3.4. Ad.3r-scmIL-12**

Die Aufreinigung des Virus Ad.3r-scmIL-12 erfolgte ebenfalls aus 50 140 mm Zellkulturschalen. Sie ergab 4,5 ml Aufreinigung mit einem Titer von  $6,7 \times 10^9$  PFU/ml im Plaqueassay.

### **3.3.5. Ad.CMV-p40.IRES.p35**

Das Virus Ad.CMV-p40.IRES.p35 wurde ebenfalls von einem weiteren Mitglied der Arbeitsgruppe im Rahmen einer Promotionsarbeit generiert (Igelmann 2003). Beide Unterheiten des murinen IL-12 werden hier durch eine bi-cistronische mRNA exprimiert, die über eine „internal ribosome entry side“ verfügt. Es ist also noch eine intrazelluläre Prozessierung zur Formation des Heterodimers notwendig. Dieses Virus wurde im Vergleich zum Ad.3r-scmIL-12 im Bioassay getestet. Der Titer im Plaqueassay betrug  $8 \times 10^9$  pfu/ml.



**Abbildung 23: Genome und inserierte Expressionskassetten der verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektoren.**

Tet-ON und Tet-OFF System sind jeweils im „eingeschaltet“ Zustand dargestellt. Die dargestellten Abschnitte sind ihrer tatsächlichen relativen Größe nur angenähert.

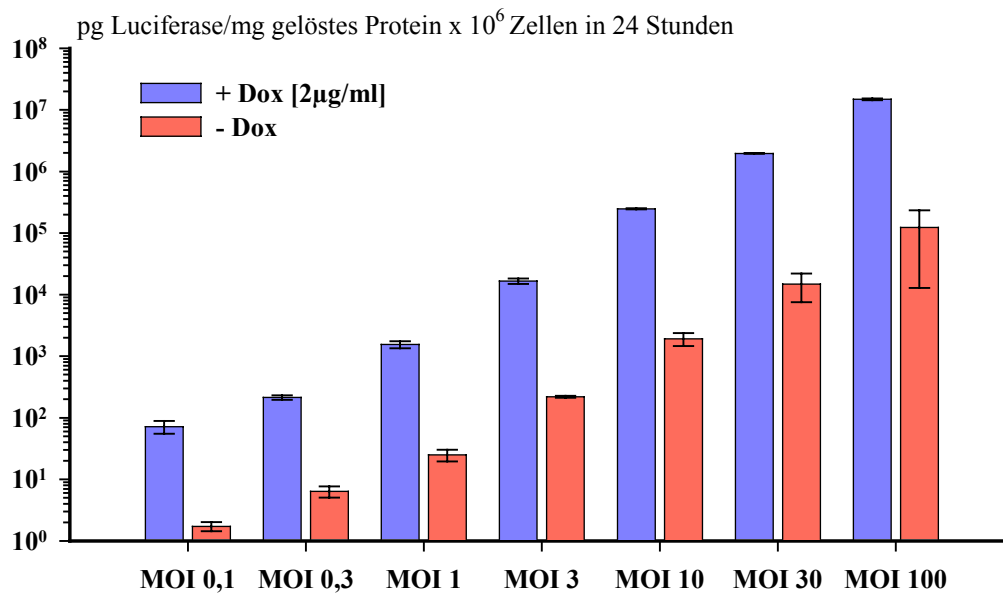
### 3.4. Ergebnisse der Zellkulturexperimente der Reporter-genvektoren

#### 3.4.1. Charakterisierung von Ad.3i-luc in HT-29 Zellen bei verschiedenen m.o.i.

Zur Evaluierung der Regulationskapazität des bi-direktionalen Tet-ON Expressionssystems wurden humane HT-29 Zellen mit halblogarithmisch gesteigerten m.o.i. (0,1-100) durch Ad.3i-luc infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen 24 Stunden in An- und Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) kultiviert, bevor die Genexpression der Luciferaseaktivität im Zelllysat bestimmt wurde. Die m.o.i. abhängige Expression ist in der Anwesenheit von Doxycyclin im Durchschnitt 85fach höher als in der Abwesenheit von Doxycyclin. Die Induktion der Genexpression durch das Antibiotikum ist bei einer m.o.i. von 0,3 mit



34fach am niedrigsten und erreicht bei einer m.o.i. von 30 mit 132fach ein Optimum (siehe Abb. 24).

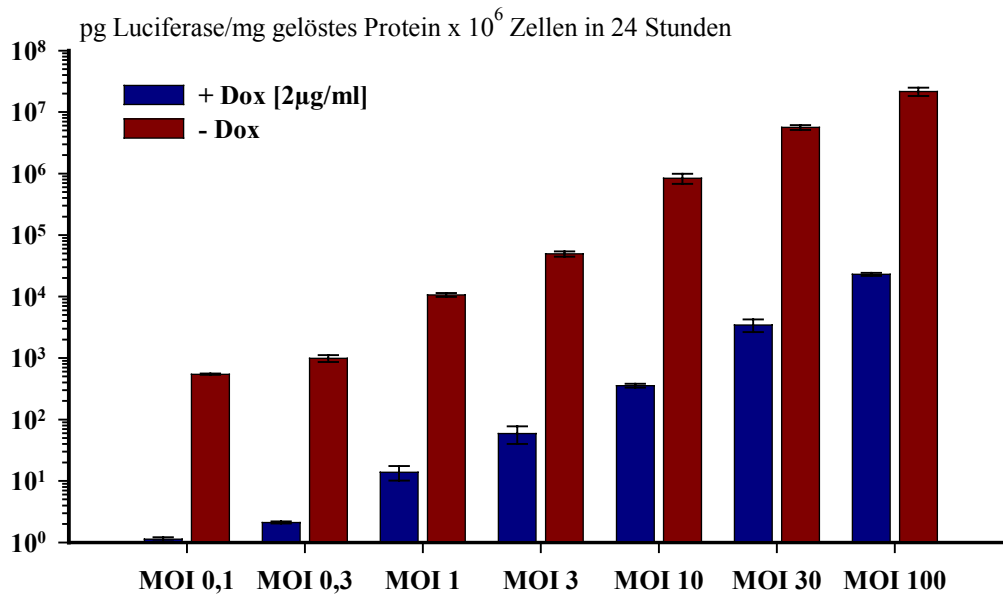


**Abbildung 24: Luciferaseexpression in Ad.3i-luc infizierten HT-29.**

HT-29 Zellen wurden mit ansteigenden m.o.i. Ad.3i-luc infiziert und die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden in der An- und Abwesenheit von Doxycyclin gemessen. Die höchste gemessene Induktion betrug 132fach bei einer m.o.i. von 30, die niedrigste 34fach bei einer m.o.i. von 0,3.

### 3.4.2. Charakterisierung von Ad.3r-luc in HT-29 Zellen bei verschiedenen m.o.i.

Um die Regulationskapazität des autoregulativen Tet-OFF Systems in den generierten adenoviralen Vektoren zu testen, wurden analog zu 3.4.1. HT-29 Zellen mit dem adenoviralen Vektor Ad.3r-luc mit den m.o.i. 0,1 bis 100 infiziert. Je ein Triplikat einer m.o.i. wurde nach der Infektion 24 Stunden in der Anwesenheit von Doxycyclin inkubiert, bevor die Luciferaseaktivität des Zelllysats bestimmt wurde. Im Vergleich zu der durch Ad.3i-luc vermittelten Genexpression zeigte sich das Adenovirus Ad.3r-luc in Bezug auf die Regulationskapazität überlegen. Die Suppression der Genexpression in Anwesenheit des Antibiotikums lag bei der m.o.i. 10 mit 2352fach am höchsten, bei der m.o.i. 0,3 mit 482fach am niedrigsten. Die durchschnittliche Suppression aller m.o.i. betrug 1070fach. Wie auch bei den Ad.3i-luc infizierten HT-29 Zellen nimmt die Regulationskapazität bei Steigerung der m.o.i. zunächst zu, um nach einem Optimum wieder zu leicht abzusinken (siehe Abb. 25).

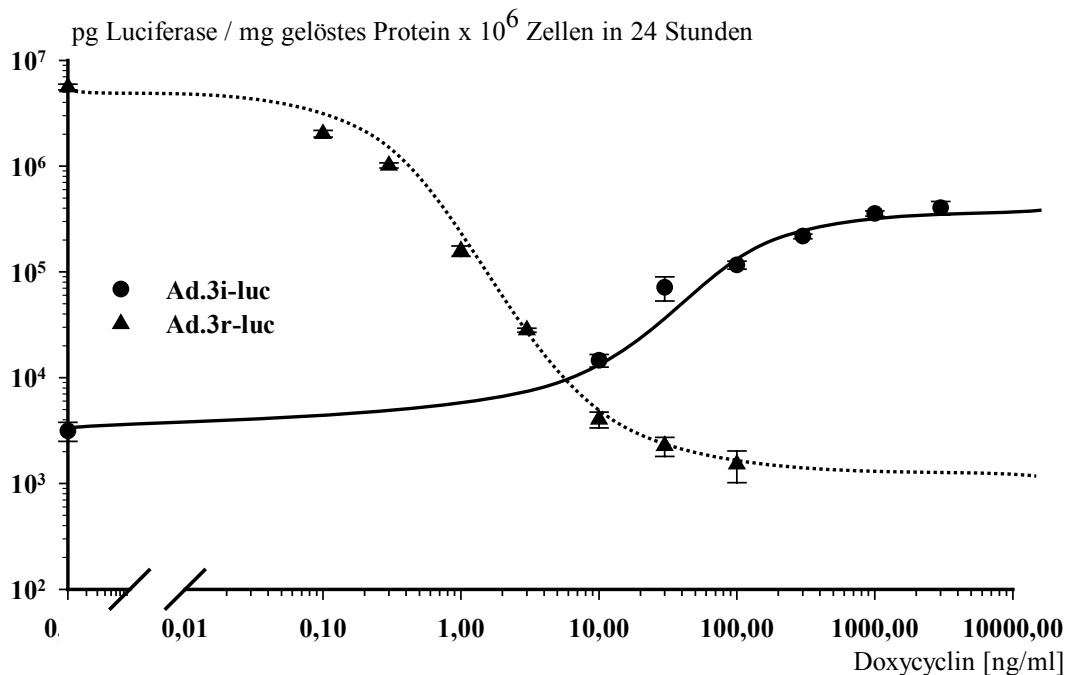


**Abbildung 25: Luciferaseexpression in Ad.3r-luc infizierten HT-29.**

HT-29 Zellen wurden mit ansteigenden m.o.i. Ad.3r-luc infiziert und die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden in der An- und Abwesenheit von Doxycyclin gemessen. Die höchste gemessene Suppression betrug 2352fach bei einer m.o.i. von 10, die niedrigste 482fach bei einer m.o.i. von 0,3.

### 3.4.3. Überprüfung von Ad.3i-luc und Ad.3r-luc in HT-29 Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin

Die Transaktivatoren tTA und rtTA reagieren bei verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen mit einer Affinitätsveränderung zum Operator (Gossen *et al.* 1995). Die Affinitätsänderung erfolgt in einem schmalen Konzentrationsintervall graduell, so dass die Transkriptionsaktivität der Transaktivatoren innerhalb eines Konzentrationsfensters des Antibiotikums eingestellt werden kann. Die Transkriptionsaktivierung des tTAs vom minimalen CMV Promotor sinkt im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 ng/ml Doxycyclin von 95% auf 5% ab, während die des rtTAs im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml auf 1000 ng/ml von 5% auf 100% steigt (Baron *et al.* 1999). Bei unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums müsste es so auch zu einer graduellen Aktivierung der autoregulativen Schleife des Systems kommen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden mit einer m.o.i. von 30, dem ungefähren Regulationsoptimum, Ad.3r-luc und Ad.3i-luc infizierte HT-29 Zellen halblogarithmisch ansteigenden Konzentrationen Doxycyclin ausgesetzt. Nach 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Zelllysat bestimmt. Tet-ON als auch Tet-OFF System ließen sich dosisabhängig graduell durch Hinzugabe von Doxycyclin aktivieren bzw. supprimieren. Die Aktivierung und Suppression zeigten dabei einen sigmoidalen Verlauf.

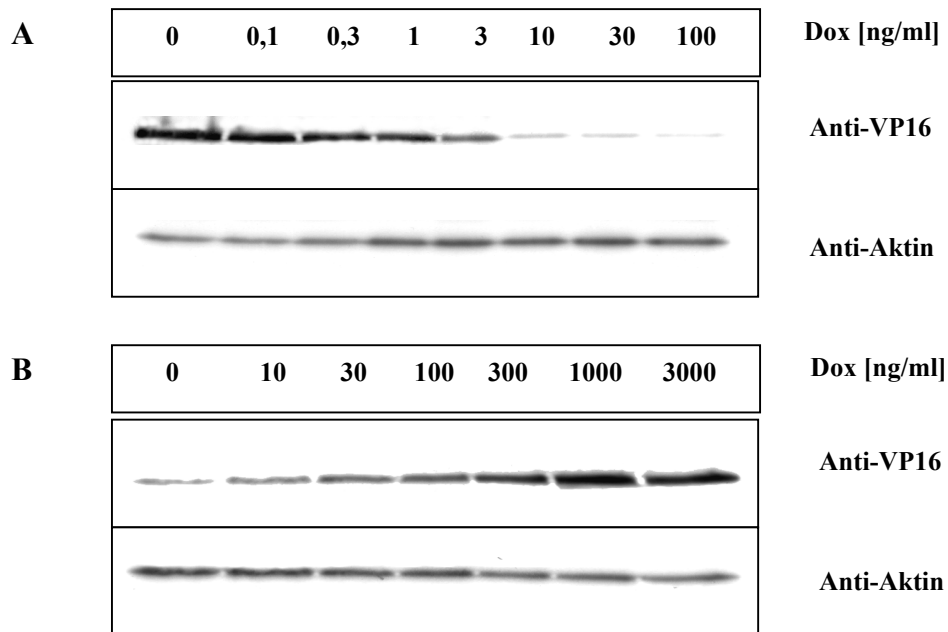


**Abbildung 26: Konzentrationsabhängige Luciferaseexpression in Ad.3r-luc/Ad.3i-luc infizierten HT-29.**

HT-29 Zellen wurden mit Ad.3r-luc und Ad.3i-luc bei einer m.o.i. von 30 infiziert und die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden in der Anwesenheit verschiedener Doxycyclinkonzentrationen gemessen. Die Abb. zeigt die sigmoidale konzentrationsabhängige Suppression und Induktion der Genexpression. Eine Doxycyclinkonzentration von 2 ng/ml führte zu einer Suppression von 50% der Luciferaseaktivität in Ad.3r-luc infizierten Zellen, während bei einer Doxycyclinkonzentration von 30 ng/ml eine Induktion von 50% der maximalen Genexpression in den Ad.3i-luc infizierten Zellen erreicht wurde.

#### 3.4.4. Western Blots des Zelllysats aus 3.4.3.

Bei der dosisabhängigen Aktivierung der Genexpression zeigte die Messung der Luciferaseexpression nur eine Richtung des bi-direktionalen Promotorsystems. Um die Konzentrationen der Transaktivatoren tTA und rtTA im ein- und ausgeschalteten Zustand des autoregulativen Systems sowie bei der graduellen Aktivierung zu dokumentieren, wurden die Transaktivatoren im Zelllysats aus dem Versuch 3.4.3. durch einen Western Blot semiquantitativ nachgewiesen. Der verwendete Antikörper detektiert den Anteil des Transaktivators, der aus dem VP16 des Herpes Simplex Virus besteht. Hierbei wurde die Funktionalität der autoregulativen Schleife dokumentiert. Der Transaktivator tTA war in der Anwesenheit von 100 ng Doxycyclin nicht mehr detektierbar. Seine intrazelluläre Konzentration stieg entsprechend der Luciferaseexpression mit der stufenweisen Erniedrigung der Doxycyclinkonzentration an. Im Gegensatz hierzu war der Transaktivator rtTA in Abwesenheit seines Effektors Doxycyclin noch in geringem Ausmaß detektierbar, passend zu der höheren basalen Luciferaseexpression des Tet-ON Systems im abgeschalteten Zustand. Die Detektion des Aktins diente zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge.



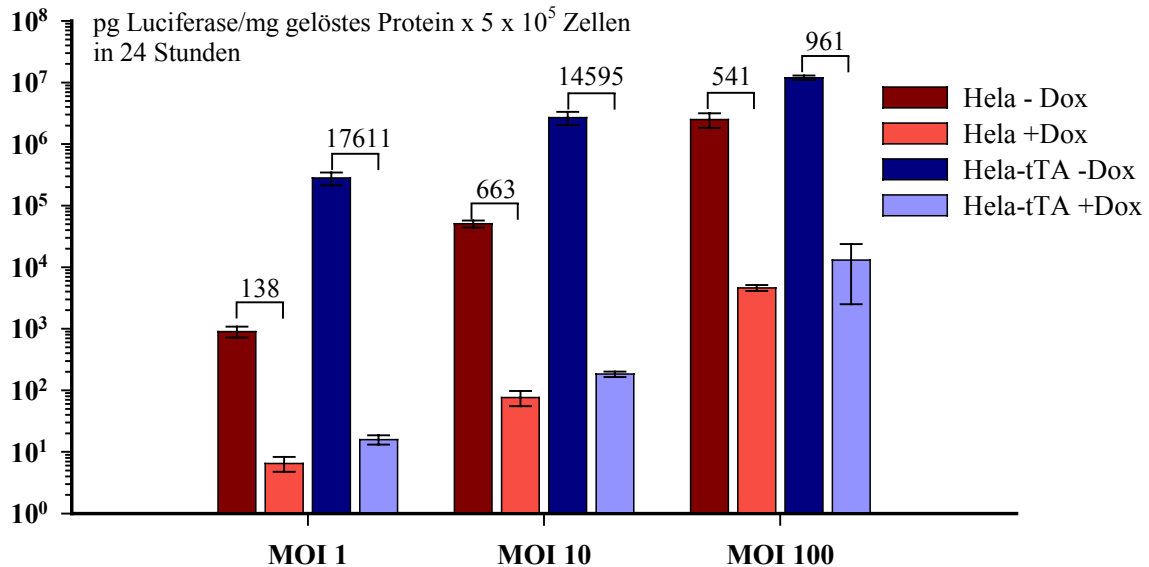
### Abbildung 27: Konzentrationsabhängige Transaktivatorexpression.

In den Zelllysaten aus 3.4.3. wurden die Transaktivatoren durch Detektion der VP16 Domäne im Westernblot nachgewiesen. **A:** Ad.3r-luc infizierte HT-29. **B:** Ad.3i-luc infizierte HT-29. Hier ist genau wie bei der Luciferaseexpression eine graduelle Induktion und Suppression der Transaktivatorexpression zu beobachten. Die Detektion des Aktins diente zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge.

### 3.4.5. Vergleich von Ad.3r-luc in HELA und HELA-tTA Zellen

Das autoregulative System zeigte eine geringe Expression der Transaktivatoren im abgeschalteten Zustand (Abb. 27). Um zu prüfen, ob die fehlende Expression des tTA in der Anwesenheit von Doxycyclin, also im abgeschalteten Zustand, auch zu einer Erniedrigung der basalen Expression des Systems im Vergleich zur konstitutiven Transaktivatorexpression und damit zu einer besseren Regulierbarkeit führen würde, wurden HELA-tTA Zellen mit dem Ad.3r-luc (m.o.i. 1, 10, 100) infiziert. HELA-tTA sind stabil mit der cDNA des tTA unter Kontrolle des CMV Promotors transfiziert. Die Konzentration des ständig produzierten Transaktivators wird auf 4000 Moleküle/Zelle geschätzt (Baron *et al.* 1997). Bei einer Infektion mit Ad.3r-luc wurde also der Transaktivator auch im abgeschalteten Zustand von der Zelle bereitgestellt und der autoregulative Arm des Expressionssystems ausgeschaltet. Gleichzeitig wurden normale HELA Zellen mit dem Adenovirus Ad.3r-luc infiziert, um die Auswirkung der konstitutiven Transaktivatorexpression auf die Regulationskapazität beurteilen zu können. Die Anzahl der Zellen pro Well betrug  $5 \times 10^5$  und der Lysezeitpunkt war 24 Stunden nach Infektion. Die Abb. 28 zeigt, dass die Basalexpression in Anwesenheit von Doxycyclin in normalen HELA Zellen tatsächlich nur ein Drittel der Expression in den Transaktivator produzierenden Zellen betrug. Auffallend waren jedoch die Unterschiede in den maximalen Genexpressionen in Abwesenheit von Doxycyclin zwischen den Transaktivator produzierenden und normalen HELA Zellen. Sie lagen bei einer

m.o.i. von 1 309fach, bei einer m.o.i. von 10 52fach und bei einer m.o.i. von 100 nur noch 4fach höher und resultierten in hohen Induktionsquotienten. Dieser Unterschied deutete auf einen relativen Mangel an Transaktivatorexpression durch den schwächeren TK Promotor bei niedrigen m.o.i. hin, welcher erst bei höheren m.o.i. in HELA Zellen ausgeglichen wurde.

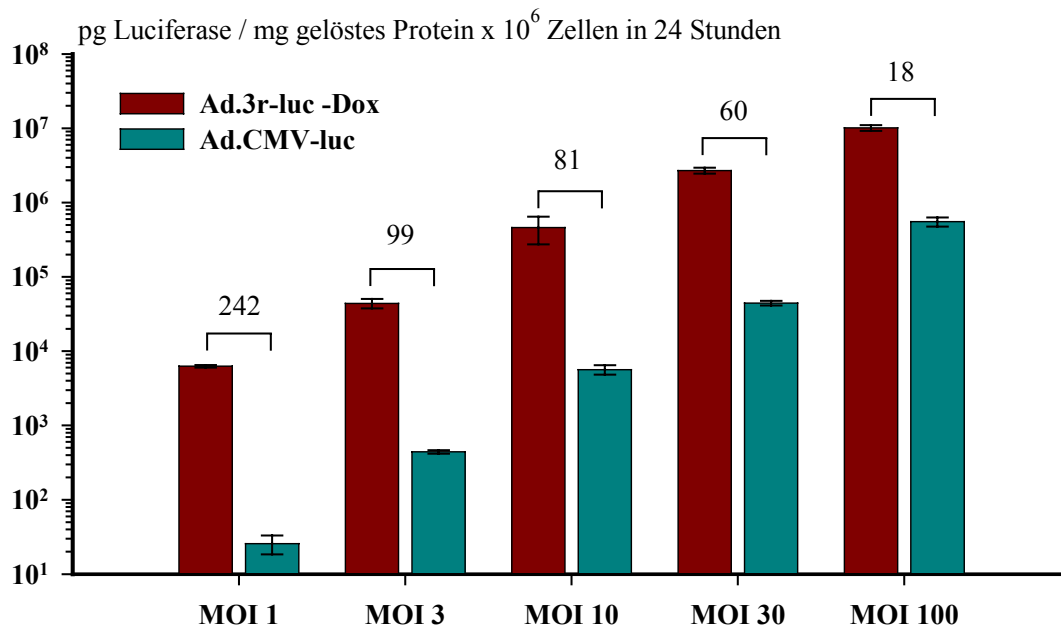


**Abbildung 28: Luciferaseexpression in Ad.3r-luc infizierten HELA und HELA-tTA.**

In Hela-tTA Zellen, die den Transaktivator tTA stabil exprimieren, zeigt sich eine höhere Regulierbarkeit der Luciferaseexpression besonders bei niedrigen m.o.i. nach Infektion mit Ad.3r-luc. In HELA Zellen zeigt sich durch die fehlende konstitutive Transaktivatorexpression im Vergleich mit HELA-tTA Zellen eine niedrigere basale Luciferaseaktivität im supprimierten Zustand.

### 3.4.6. Vergleich von Ad.3r-luc mit Ad.CMV-luc in HT-29 Zellen

Der immediate early (I. E.) Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV) gehört zu den in der Gentherapie am häufigsten verwendeten Promotoren, da er in einer Vielzahl von Geweben eine starke und schnelle Genexpression mediiert. Um die maximale Genexpression der induzierbaren Vektoren zur der des CMV Promotors in Relation zu setzen, wurden die Luciferaseexpressionen in Ad.3r-luc und Ad.CMV-luc (Milasinovic, Dissertation in Vorbereitung) infizierten HT-29 Zelllinien gemessen und verglichen. Da in diesem Fall nur die maximale Genexpression interessierte, wurde auf eine Suppression durch Doxycyclingabe verzichtet. Das Diagramm der Abb. 29 zeigt in den durch Ad.3r-luc infizierten HT-29 Zellen eine deutlich stärkere Genexpression als in den Ad.CMV-luc infizierten. Für die niedrigeren m.o.i. galt dies besonders. Die CMV Promotor kontrollierte Genexpression wuchs bei einer Steigerung der m.o.i. stärker an als bei gleicher Erhöhung der Infektionsdosis des autoregulativen Vektors.

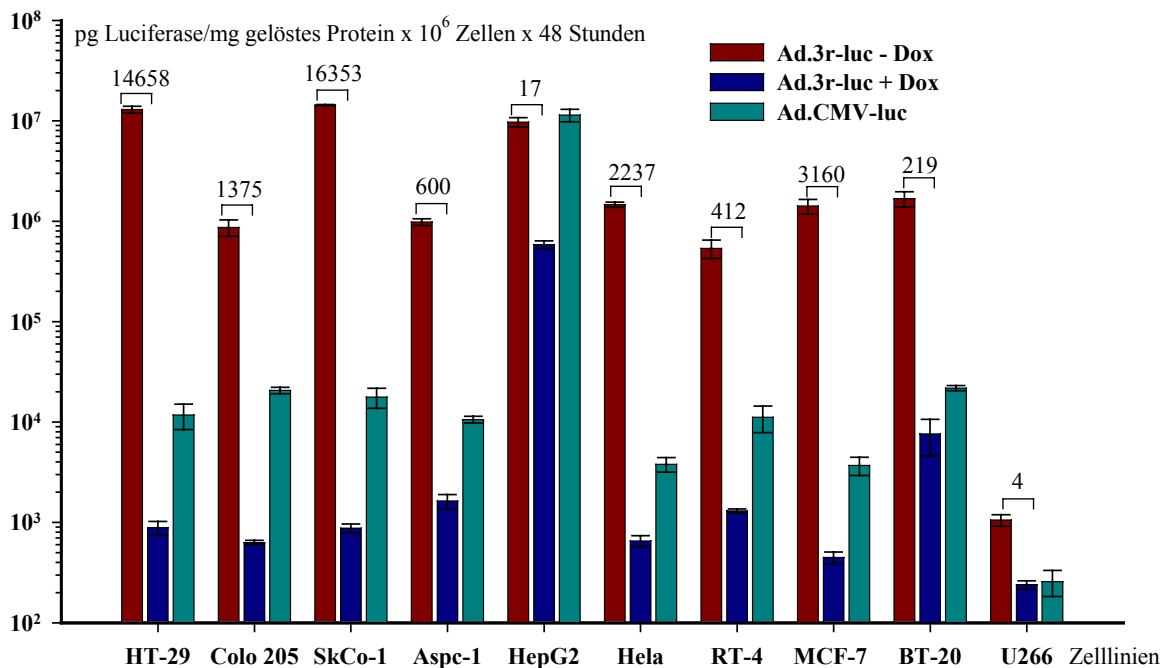


**Abbildung 29: Luciferaseexpression in Ad.3r-luc und Ad.CMV-luc infizierten HT-29.** Die maximale Expression des Ad.3r-luc in HT-29 ist im Vergleich mit der durch den humanen CMV Promotor vermittelten Expression um ein Vielfaches höher. Eine Abnahme der Überlegenheit bei höheren m.o.i. deutet möglicherweise auf ein „squelching“, eine unspezifische Transkriptionshemmung durch hohe Transkriptionskonzentrationen, hin.

### 3.4.7. Überprüfung von Ad.3r-luc in verschiedenen Zelllinien

Die Regulationskapazität des durch Tetracycline regulierbaren Systems erwies sich in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich (Howe *et al.* 1995, Ackland-Berglund und Leib 1995). Weiterhin hängt die Genexpression eines in einem Adenovirus integrierten Expressionssystems zusätzlich von der Empfänglichkeit einer Zelllinie für eine adenovirale Infektion ab. Diese zeigt sich vornehmlich abhängig von der Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (Hidaka *et al.* 1999). Um die Regulationskapazitäten des generierten adenoviralen Vektors Ad.3r-luc in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen und gleichzeitig in Relation zur konstitutiven Genexpression kontrolliert durch den CMV Promotor zu setzen, wurden verschiedene humane Karzinomzelllinien mit den Adenoviren Ad.3r-luc und Ad.CMV-luc bei einer m.o.i. von 10 infiziert. Ad.3r-luc infizierte Zellen wurden entweder in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin gehalten und die Luciferaseaktivität 48 Stunden später nach Zelllyse bestimmt. Das Ausmaß der Regulationskapazität ebenso wie die CMV Promotor kontrollierte Genexpression schwankten erheblich (siehe Abb. 30). In den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und SkCo-1 fanden sich mit 14658fach bzw. 16354fach die höchsten Regulationskapazitäten. Die Unterschiede zu den in Versuch 3.4.2. erzielten Ergebnissen lässt sich möglicherweise auf die längere Genexpressionszeit von 48 statt 24 Stunden zurückführen. Die niedrigsten Regulationskapazitäten wurden in

der Myelomzelllinie U266 (vierfach) und die Hepatomzelllinie HepG2 (16fach) gemessen. Bei der humanen Myelomzelllinie U266, die sich sehr schlecht durch Adenoviren infizieren lässt (Wen *et al.* 2001), zeigte sich mit vierfach höherer Genexpression die geringste Regulierbarkeit in Abwesenheit von Doxycyclin. Die hohe basale Genexpression in der Anwesenheit von Doxycyclin verursacht in HepG2 Zellen eine schlechte Regulierbarkeit. Die HepG2 Zelllinie war zudem die einzige, in der der CMV Promotor eine stärkere Genexpression als das Tetracyclin-regulierbare System aufweist. Dies könnte auf eine vom inserierten Promotor unabhängige Aktivierung der Genexpression durch das „inverted terminal repeat“ in diesen Zellen hinweisen, welches multiple Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren aufweist (Hatfield *et al.* 1991, siehe hierzu 4.2.4.).



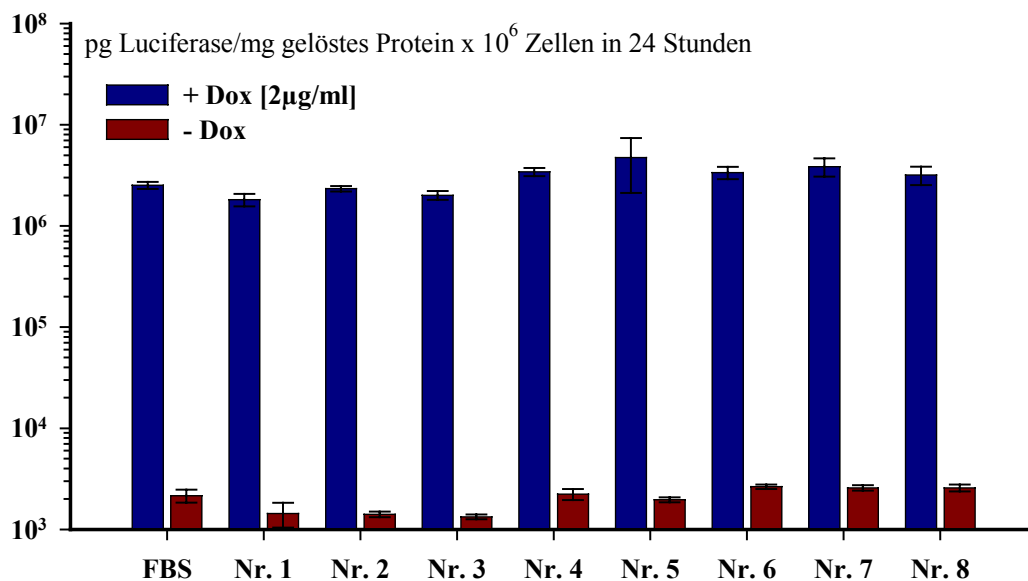
**Abbildung 30: Regulation der Luciferaseexpression durch Ad.3r-luc und Vergleich mit Ad.CMV-luc in verschiedenen Zelllinien.**

Verschiedene Zelllinien wurden durch Ad.3r-luc und Ad.CMV-luc mit einer m.o.i. von 10 (U266: m.o.i.: 200) infiziert und Regulationskapazitäten und Promotorenverhältnisse nach 48 Stunden bestimmt. Die höchste Regulationskapazität fand sich in SkCo-1 Zellen, die niedrigste in U266. Die höchste CMV Promoter vermittelte Genexpression fand sich in HepG2 Zellen.

### 3.4.8. Überprüfung von Ad.3r-luc und Ad.3i-luc in HT-29 Zellen bei humanem Serum verschiedener Probanden

Durch den Einsatz von Tetracyclin und seinen Derivaten in der Nutztierhaltung ist es potentiell möglich, dass tierische Lebensmittel mit Tetracyclinen kontaminiert und diese durch Verzehr aufgenommen werden. Einige zu Beginn der vorliegenden Arbeit erzielte

Ergebnisse ließen sich durch eine Kontamination des für die Zellkultur verwendeten fetalen Kälberserums erklären und deckten sich mit den Beobachtungen anderer Wissenschaftler (Prof. Bujard, persönliche Mitteilung). Sie führten zur ausschließlichen Verwendung von getestetem tetracyclinfreien FBS. Bei einer möglichen gentherapeutischen Anwendung von Tetracyclin-regulierbaren Vektoren würden mit der Nahrung aufgenommene Tetracycline eine Transgenexpression unterdrücken. Um zu testen, ob bei einer nicht-vegetarischen westlichen Diät mit einer interferierenden Tetracyclinkonzentration zu rechnen ist, wurden Seren aus Blutproben freiwilliger Probanden gewonnen. Das FBS des Vollmediums wurde durch humane Seren ersetzt. Ad.3r-luc infizierte HT-29 Zelllinien (m.o.i. 30) wurden in diesem Medium kultiviert. Einem Teil des humanen Serums wurde nach Gewinnung Doxycyclin zugesetzt und auch diese Proben zur Kultivierung genutzt, um die Suppression der Genexpression zu dokumentieren. Die Luciferaseaktivität wurde nach 24 Stunden Kultivierung bestimmt. Wie in Abb. 31 gezeigt, hatte die Verwendung humanen Serums für die Zellkultur keinen Einfluss auf die Regulationskapazität. Die Probandenserum wurden in gleicher Weise auf Ad.3i-luc infizierten HT-29 Zelllinien getestet. Auch hier kam es zu keiner Beeinflussung der Regulationskapazität (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 31: Inkubation in humanem Serum.**

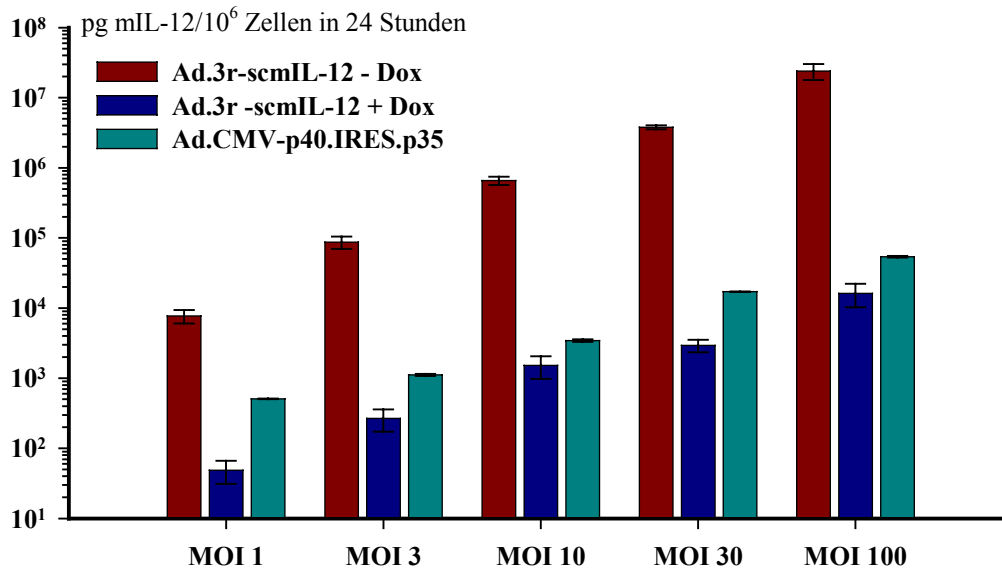
Luciferaseexpression in Ad.3r-luc infizierten HT-29 (moi:30) mit anschließender Inkubation in humanem Serum, welches keinen Einfluss auf die Regulationskapazitäten zeigte.



### 3.5. Ergebnisse der *in vitro* Versuche mit dem Interleukin-12 codierenden Vektor Ad.3r-scmIL-12

#### 3.5.1. Testung von Ad.3r-scmIL-12 in HT-29 Zellen bei verschiedenen m.o.i.

Das Adenovirus Ad.3r-scmIL-12, welches das murine Fusionszytokin unter Kontrolle des Tetracyclin-regulierbaren Systems exprimiert, wurde in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 auf die Regulationskapazität der Genexpression getestet. Jeweils 6 Wells mit je  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit der gleichen m.o.i. infiziert. Nach Infektion wurde ein Triplikat mit Doxycyclin enthaltenen Vollmedium ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) und eines mit Vollmedium ohne Antibiotikum kultiviert. Gleichzeitig wurden HT-29 Zellen mit den gleichen m.o.i. des Adenovirus Ad.CMV-p40.IRES.p35 infiziert. Nach 24 Stunden wurden die IL-12 Konzentrationen im Überstand mit einem mIL-12 p70 spezifischen ELISA bestimmt und so die Gesamtmenge des produzierten Zytokins festgestellt. Die Mengenangabe des Interleukins erfolgte in der Einheit pg murines IL-12/ $1 \times 10^6$  Zellen x 24 Stunden. Im Gegensatz zum Reporter gen Luciferase, das in eukaryotischen Zellen eine Halbwertszeit von 3 Stunden hat, akkumuliert das Zytokin IL-12 im Zellkulturüberstand und ergibt so die Gesamtsumme der Genexpression der letzten 24 Stunden. Da beide Adenoviren eine unterschiedliche Form des murinen IL-12, Heterodimer und das Fusionsprotein, codieren, wurde zur Vergleichbarkeit der Expressionen die gleiche Immunoreaktivität im IL-12 ELISA vorausgesetzt. Abb. 32 zeigt die produzierten IL-12 Mengen pro  $1 \times 10^6$  HT-29 Zellen in 24 Stunden. Die Regulationskapazität des Ad.3r-scmIL-12 war mit der des Luciferase codierenden Adenovirus Ad.3r-luc vergleichbar. Die höchste Regulationskapazität fand sich bei einer m.o.i. von 100 (1477fach), die niedrigste bei einer m.o.i. von 1 (199fach). Bei einem Vergleich mit der durch das Adenovirus Ad.CMV-p40.IRES.p35 vermittelten Expression des heterodimeren murinen IL-12 war der geringere Anstieg der IL-12 Expression bei einer Erhöhung der Menge der eingesetzten infektiösen Partikel auffällig. Dies ist möglicherweise Ausdruck der ineffizienteren Produktion des Heterodimers, bei der die beiden Untereinheiten prozessiert und verknüpft werden müssen (siehe Diskussion 4.3.2.).



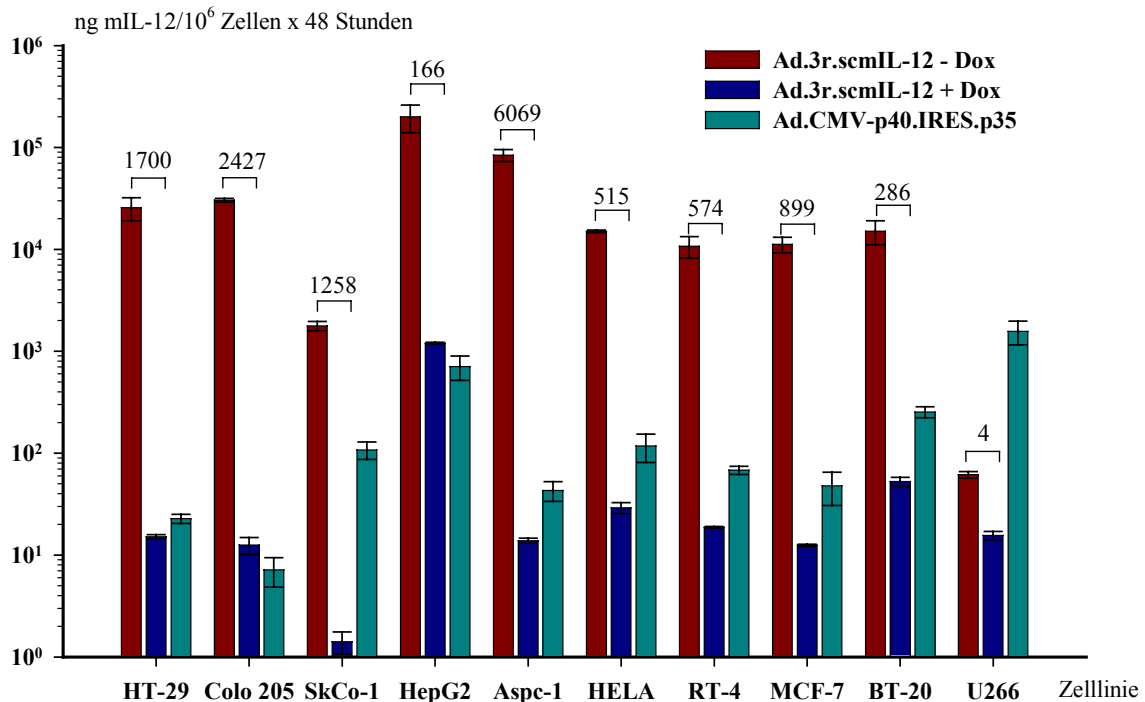
**Abbildung 32: Expression des murinen Interleukin-12.**

HT-29 Zellen wurden mit ansteigenden m.o.i. mit Ad.3r.scmIL-12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 infiziert. Es zeigte sich eine den Luciferaseexperimenten vergleichbare Regulationskapazität durch Doxycyclin. Die Expression des Heterodimers durch den CMV Promoter erwies sich als ineffizient im Vergleich zur induzierbaren Expression des single chain IL-12.

### 3.5.2. Vergleich von Ad.3r-scmIL-12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 in verschiedenen Zelllinien

Um die regulierbare Expression des Zytokins in verschiedenen transformierten humanen Zelllinien zu demonstrieren, wurden die unter 3.4.7. infizierten verschiedenen Zelllinien mit den Adenoviren Ad.3r-scmIL-12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei einer m.o.i. von 10 infiziert. Von den Ad.3r-scmIL-12 infizierten Zellen wurde jeweils ein Triplikat in doxycyclinhaltigem und nicht Doxycyclin enthaltenem Vollmedium kultiviert. Nach der Infektion wurden die Zellen für 48 Stunden inkubiert, wobei nach 24 Stunden die 3 ml Kulturmedium ausgetauscht wurden und ein Aliquot bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde. In beiden Überständen wurden die IL-12 Konzentrationen mit einem murinen IL-12 p70 ELISA bestimmt. Die in einem Well in 48 Stunden produzierte Menge an murinem IL-12 wurde bestimmt und in  $\text{ng}/10^6$  Zellen  $\times$  48 Stunden angegeben, wobei ebenfalls erneut gleiche Immunoreaktivität im ELISA und gleiches Molekulargewicht für beide produzierten Unterformen des Interleukins angenommen wurden. Diese Mengenangabe erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Die Regulationskapazitäten in den einzelnen Zelllinien bestätigen die unter 3.4.7. erzielten Ergebnisse der Luciferaseexpression. Die niedrigsten Regulationskapazitäten fanden sich erneut in der Myelomzelllinie U266 (vierfach) und in der Hepatomzelllinie HepG2 (166fach). In den Myelom-

zellen lag die Expression des Heterodimers reproduzierbar höher als die des single chain IL-12 (siehe Abb. 33).



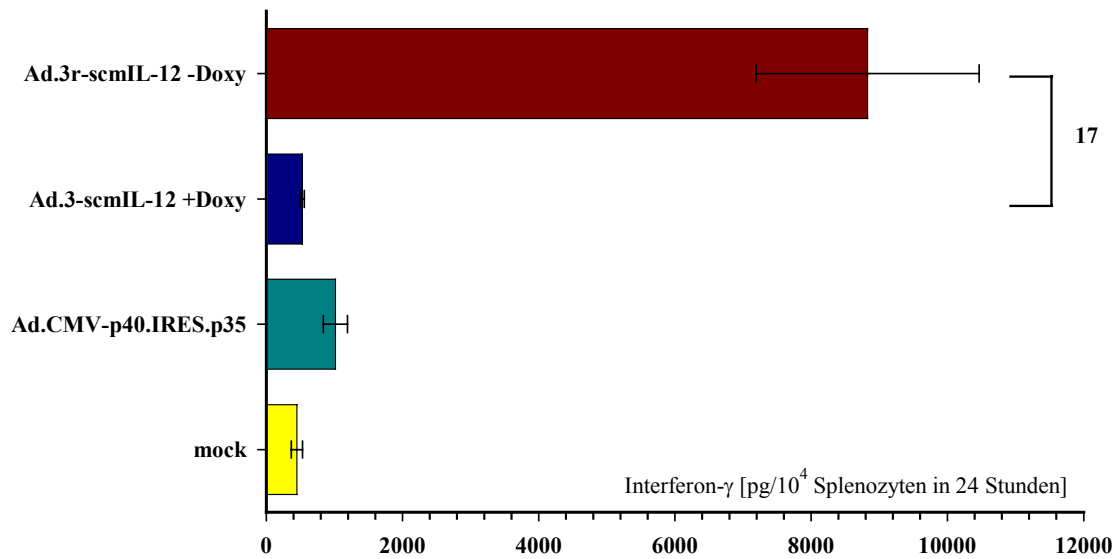
**Abbildung 33: Regulation der IL-12 Expression durch Ad.3r.scmIL-12 und Vergleich mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 in verschiedenen Zelllinien.**

Verschiedene Zelllinien wurden durch Ad.3r.scmIL-12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 mit einer m.o.i. von 10 (U266: m.o.i.: 200) infiziert und Regulationskapazitäten und Promotorenverhältnisse nach 48 Stunden bestimmt. Im Vergleich zu den Luciferaseexperimenten (Abb. 30) zeigt sich eine leicht geringere Regulationskapazität.

### 3.6. Funktionelle Testung der exprimierten Zytokine im Bioassay

#### 3.6.1. Interferon- $\gamma$ Ausschüttung der Splenozyten in An- und Abwesenheit von Doxycyclin

Zum Nachweis der Bioaktivität des exprimierten murinen IL-12 wurde der Überstand infizierter HT-29 Zellen 1:50 verdünnt, mit  $1 \times 10^4$  Splenozyten inkubiert und die IFN- $\gamma$  Ausschüttung nach 24 Stunden gemessen. Beide Varianten des IL-12 zeigten Bioaktivität. Die durch das Fusionszytokin vermittelte IFN- $\gamma$  Ausschüttung lag neunmal höher als die des Heterodimers und 17fach über der des doxycyclinhaltigen Überstandes. Diese Unterschiede sind hauptsächlich Ausdruck der unterschiedlichen Konzentration des Zytokins in den einzelnen Überständen.

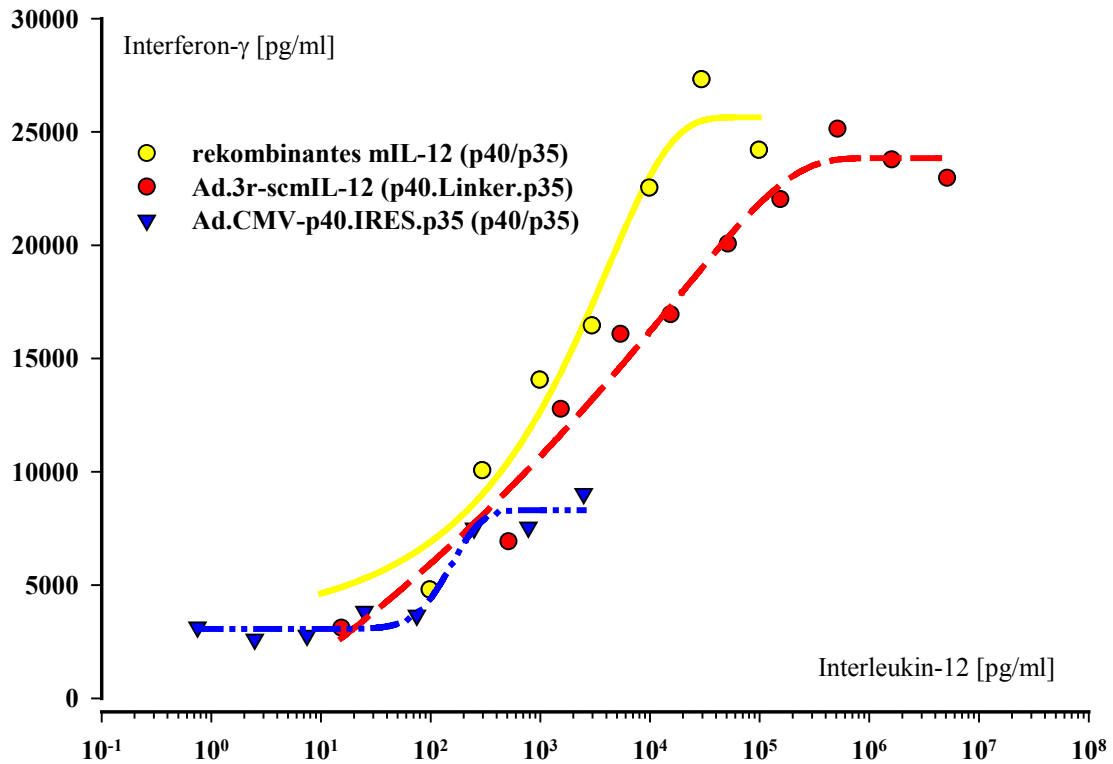


### Abbildung 34: Bioassay.

Murine Splenozyten wurden mit 1:50 verdünntem Überstand aus Ad.3r-scmIL-12 infizierten HT-29 Zellen (m.o.i.: 30) inkubiert. Die INF- $\gamma$  Ausschüttung der Splenozyten beweist die *in vitro* Bioaktivität des murinen single chain IL-12. Im OFF-Status besteht im *in vitro* System eine mit der Negativkontrolle vergleichbare INF- $\gamma$  Ausschüttung. Das Heterodimer zeigt eine im Vergleich zum single chain IL-12 schwache Bioaktivität.

### 3.6.2. Interferon- $\gamma$ Ausschüttung der verschiedenen Subtypen des exprimierten murinen IL-12

Um die Effektivität der IFN- $\gamma$  Ausschüttung darzustellen, wurde die produzierte IFN- $\gamma$  Menge in Abhängigkeit zur IL-12 Konzentration des eingesetzten halblogarithmisch verdünnten Überstandes aufgetragen (Abb. 35). Von einem in Vollmedium aufgelösten purifizierten rekombinanten IL-12 wurde als Standard ebenfalls die Konzentration im p70 ELISA und die ausgeschüttete IFN- $\gamma$  Menge bestimmt. Der lineare Bereich des Bioassays besteht zwischen 100 und 10000 pg/ml des eingesetzten Standards. Die Verdünnungen des single chain IL-12 durchschreiten im Gegensatz zu den Verdünnungen des exprimierten Heterodimers diesen linearen Bereich. Die durchgeführte Kurvenannäherung gibt Hinweise auf die geringere biologische Effektivität des Fusionsproteins gegenüber dem aufgereinigtem Standard. Die durch das exprimierte Heterodimer vermittelte IFN- $\gamma$  Ausschüttung am unteren Ende des linearen Spektrums erlaubt die Schlussfolgerung auf eine geringere Bioaktivität als bei dem Fusionszytokin.



### Abbildung 35: Spezifische Bioaktivität.

Die Relation von ausgeschüttetem murinen IFN- $\gamma$  und eingesetztem murinen IL-12 im Bioassay für die drei unterschiedlichen eingesetzten IL-12 Formen. Das exprimierte fusionierte IL-12 besitzt eine spezifischere Bioaktivität als das exprimierte Heterodimer. Das rekombinante purifizierte murine IL-12 besitzt die effektivste Bioaktivität.

## 4. Diskussion

### 4.1. Einleitung: Regulierte Genexpression in der Gentherapie

In einem gentherapeutischen Ansatz bietet eine regulierte gegenüber einer konstitutiven Genexpression eine Reihe von Vorteilen. Eine regulierbare Expression ist essentiell, wenn das therapeutische Gen einen weiteren Parameter steuert, der in einem konstanten Bereich gehalten werden muss (wie z. B. exprimiertes Erythropoetin den Hämotokrit), die Wirkung eines therapeutischen Gens nur in einem kurzen Zeitfenster erwünscht ist (wie z. B. Somatotropin) oder das therapeutische Gen toxische Nebenwirkungen besitzt (wie z. B. IL-2, TNF- $\alpha$  oder IL-12). Auch für die Evaluierung eines gentherapeutischen Ansatzes im Tiermodell kann eine reversible An- und Abschaltung der Genexpression für das Verständnis des Wirkmechanismus vorteilhaft sein. Die Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression ist somit von großem Interesse für die Gentherapie.

Die Komponenten eines idealen regulierbaren Expressionssystems wären nicht toxisch, interagierten nicht mit den zellulären Komponenten der Wirtszelle und besäßen eine Pharmakokinetik, die eine rasche Einstellung der erwünschten Genexpression ermöglichte. Im abgeschalteten Zustand zeigte das System keine relevante basale Expression.

In adenoviralen Vektoren wurden verschiedene Ansätze zum Erzielen einer regulierbaren Genexpression verfolgt. Hierzu wurden durch das Antiprogesteron Mifepriston (Burcin *et al.* 1999), durch Rapamycin (Rivera *et al.* 1999) sowie durch Zinkionen (Steinwaerder und Lieber 1999) regulierbare Systeme genutzt. Die größte Erfahrung besteht jedoch mit dem durch Tetracycline regulierbaren Systemen. Ihre Vorteile bestehen in der hohen Regulierbarkeit, der spezifischen Interaktion der Tetracycline mit ihren Rezeptoren ohne Interaktionen mit weiteren Zellproteinen und der Möglichkeit, zwischen dem sogenannten Tet-ON und dem Tet-OFF System auswählen zu können.

Die ersten Berichte über durch Tetracycline regulierbare Genexpression in adenoviralen Vektoren benutzten einen auf zwei synthetisierten Viren beruhenden Ansatz. Das eine Virus enthielt den Transaktivator, der konstitutiv exprimiert wurde. Das zweite Virus enthielt das interessierende Gen unter Kontrolle des respondiblen Minimalpromotors. Dieser Ansatz führte zu 7-1600fachen Induktionsraten *in vitro* (Neering *et al.* 1996, Harding *et al.* 1997, Molin *et al.* 1998, Nakagawa *et al.* 2001). Ein Vergleich ist hier wegen unterschiedlicher Reportergene nur eingeschränkt möglich. Dieser Ansatz wird kompliziert durch die notwendige Doppelinfektion der Zielzelle und ist wegen der relativ niedrigen Transduktionseffizienz der Zielzellen für einen gentherapeutischen Ansatz *in vivo* nicht praktikabel. In den ersten beschriebenen Experimenten einer Integration von konstitutiv exprimiertem

Transaktivator und Minimalpromotor in ein Adenovirus wurde die Expression nur semi-quantitativ auf ihre Regulationskapazität charakterisiert (Corti *et al.* 1999, Rubinchik *et al.* 2000). Die Platzierung eines starken konstitutiven Promotors wie des I.E. CMV Promotors zur Transaktivatorexpression in die Nähe des Tetracyclin-responsiblen Minimalpromotors, der die Transgenexpression kontrolliert, birgt jedoch die Gefahr dessen unspezifischer Aktivierung durch die Enhancerelemente des konstitutiven Promotors (Rubinchik *et al.* 2000). Die Folge ist eine erhöhte basale Expression. Um diese Interaktion zu vermeiden, wurden in verschiedenen Arbeiten die beiden Komponenten Transaktivator und responsibler Promotor aus den voneinander distanzierten Regionen E1 und E3 des adenoviralen Genoms exprimiert (Rubinchik *et al.* 2000, Mizuguchi und Hayakawa 2002). Eine autoregulative Expression des Transaktivators in adenoviralen Vektoren würde das Einbringen eines konstitutiven Promotors vermeiden, welcher einen Enhancereffekt auf den minimalen CMV Promotor ausüben könnte. Sie würde außerdem zu einer Vermeidung des durch die VP16 Domäne vermittelten, sogenannten „squelchings“ im abgeschalteten Zustand führen (Baron *et al.* 1997, Strathdee *et al.* 1999). Zur Konstruktion eines autoregulativen Expressionssystems werden verschiedene Ansätze verfolgt (siehe 1.4.3.). Die Regulationskapazitäten des bi-direktionalen Ansatzes zeigte sich in einem retroviralen Kontext dem unidirektionalen Ansatz aufgrund der niedrigen Transaktivatorexpression durch die IRES überlegen (Unsinger 2001). Da in der vorliegenden Arbeit eine kompakte Expressionskassette in der E1 des adenoviralen Vektors untergebracht werden sollte, wurde deshalb ein modifizierter bi-direktionaler Tetracyclin-responsibler Promotor ausgewählt und charakterisiert. Die Modifikationen bestanden in der Nutzung des minimalen Thymidinkinase Promotors zur Kontrolle des Transaktivators, der Insertion von Introns vor beiden Cistronen und in dem Anfügen von Zellkernlokalisationsignalen an die Transaktivatoren. Diese Modifikationen verbessern die Regulationseigenschaften in Plasmidtransfektionsversuchen in 293 Zellen unter Verwendung des Reportergens Luciferase (Strathdee *et al.* 1999).

## **4.2. Charakterisierung der Tetracyclin-regulierbaren adenoviralen Reportervektoren**

### **4.2.1. Das Tet-OFF System zeigt eine höhere Regulierbarkeit als das Tet-ON System**

Die generierten Adenoviren Ad.3i-luc und Ad.3r-luc enthalten die autoregulierbaren Tetracyclin-abhängigen Expressionskassetten in der E1 Region. In humanen Kolonkarzinomzellen (HT-29) zeigen sie eine maximale Regulationskapazität von >130 (Ad.3i-luc) und >2350fach (Ad.3r-luc) bei einer m.o.i. von 30 bzw. 10. Obwohl die Transaktivator- und TRE-Sequenzen, ebenso wie die Sequenzen des Reportergens Luciferase der generierten

adenoviralen Vektoren während der Arbeit nicht sequenziert wurden und deshalb Mutationen als Ursachen der Regulationskapazitätsunterschiede nicht vollständig ausgeschlossen werden können, deckt sich diese Beobachtung mit Ergebnissen anderer Untersuchungen in adenoviralen Vektoren (Fender *et al.* 2002, Mizuguchi und Hayakawa 2002). Grund für die geringere Regulationskapazität des Ad.3i-luc ist eine Restaffinität des durch artifizielle Mutationen generierten reversen Transaktivators (rtTA) zu seiner Bindungssequenz (Urlinger *et al.* 2000). Auch im adenoviralen System lässt sich die Expression des rtTA nicht ganz abschalten, wie im Western Blot gezeigt wurde (siehe 3.4.4.). Diese beobachteten Defizite des reversen Transaktivators führten zum experimentellen Einbringen weiterer Mutationen und zu Beschreibung eines neuen reversen Transaktivators, rtTA<sup>S</sup>-M2 genannt, der besseren Regulationseigenschaften aufweist (Urlinger *et al.* 2000). Ein anderer Ansatz zur Verminderung der residuellen Affinität des rtTA an seine Bindungssequenz besteht im „Tet-Silencer“ (tTS), der durch Ersatz der VP16 Domäne des tTa durch den Transkriptionsrepressor Kox-1 entstand (Forster *et al.* 1999). tTS bindet in der Abwesenheit von Doxycyclin oder Tetracyclin an die Operatorsequenzen, blockiert diese für rtTA und führt so zu einer Verbesserung der Regulationseigenschaften des Tet-ON Systems (Freundlieb *et al.* 1999). Es wäre deshalb zu prüfen, ob der Austausch des rtTA durch rtTA<sup>S</sup>-M2 in Kombination mit dem tTS zu einer Verbesserung der Regulationseigenschaften in einem adenoviralen System führen würde. Ein Nachteil hierbei wäre die konstitutive Expression der zusätzlichen Komponente tTS, z. B. aus der E3 Region.

Auch der Unterschied in der maximalen Genexpression, welcher in Versuch 3.4.4. das 13,8fache beträgt, kann als eine Folge der schwächeren Regulationseigenschaft des rtTAs interpretiert werden, welche zu einer geringeren Konzentration von VP16 Domänen am minimalen Promotor im „ON-Status“ führt (Abb. 26).

Der in Versuch 3.4.6. durchgeführte Vergleich von humanem CMV Promotor (Ad.CMV-luc) zum Tet-OFF System zeigt, dass der regulierbare Promoter bei gleicher m.o.i. wesentlich effizienter eine Genexpression mediiert als der CMV Promotor. Der Expressionsunterschied beträgt bei einer m.o.i. von 1 noch das 242fache bei einer m.o.i. von 100 nur noch das 18fache. Dies könnte Folge des unten diskutierten „Squelching effects“ in Anwesenheit hoher intrazellulärer VP16-Konzentrationen sein. Weiterhin ist anzunehmen, dass sich die adenoviral vermittelte Genexpression bei einer m.o.i. von 100 im Näherungsbereich an ein Maximum befindet. Die gemessene Luciferasemenge beträgt fast 1/100 der Gesamtmenge des im CCLR gelösten Proteins (Abb. 29).



#### 4.2.2. Die Regulationskapazität ist m.o.i. abhängig

Die Regulationskapazitäten in den infizierten HT-29 und HELA Zellen zeigen ein Optimum bei einer m.o.i. von 10 (Ad.3r-luc) und 30 (Ad.3i-luc). In HELA-tTA Zellen, die den Transaktivator produzieren, verschiebt sich durch stärkere maximale Genexpression im angeschalteten Zustand die optimale m.o.i. auf 1, bei der die Regulierbarkeit gegenüber HELA Zellen ohne tTA zehnfach erhöht war (Abb. 28). Ein Teil dieses Effektes kann dadurch erklärt werden, dass in HELA-tTA Zellen der Transaktivator bei Infektion bereits vorliegt und nicht erst durch einen positiven Feedbackmechanismus produziert werden muss. Es deutet allerdings auch darauf hin, dass eine niedrige Konzentration an Transaktivatormolekülen in HELA Zellen für die schlechteren Regulationseigenschaften verantwortlich ist. Dieser Mangel wird bei Infektion der HELA-tTA mit Ad.3r-luc behoben (siehe Abb. 28). Gleichzeitig wird die Autoregulation des Expressionssystems ausgeschaltet. Hierdurch erhöht sich die basale Expression des bi-direktionalen Promotors um den Faktor 3, wahrscheinlich aufgrund einer ebenfalls vorhandenen residuellen Affinität des tTA an die Operatorsequenz in der Gegenwart von Doxycyclin. Bei der humanen Myelomzelllinie U266, die sich sehr schlecht durch Adenoviren infizieren lässt (Wen *et al.* 2001), war möglicherweise wie bei HELA Zellen bei niedriger m.o.i. eine niedrige Transaktivatorexpression für die geringe maximale Genexpression in der Abwesenheit von Doxycyclin verantwortlich (Abb. 30). Über die Gründe für die Abnahme der Regulierbarkeit bei höheren m.o.i. ist bei den vorliegenden experimentellen Ergebnissen nur zu spekulieren. Gründe hierfür könnten eine Erhöhung der Basalexpression durch Enhancer-Mechanismen beim Vorliegen mehrerer adenoviraler Genome in einem Zellkern (Miralles *et al.* 1989) und eine Erniedrigung der maximalen Genexpression durch den „Squelching effect“ der VP16 Domäne des Transaktivators sein (Baron *et al.* 1997, Sadowski *et al.* 1988, Triezenberg *et al.* 1988). Darunter wird eine zelluläre Toxizität durch das Abfangen zellulärer Transkriptionsfaktoren verstanden.

#### 4.2.3. Die Regulationskapazität des Ad.3r-luc ist abhängig von der Zelllinie

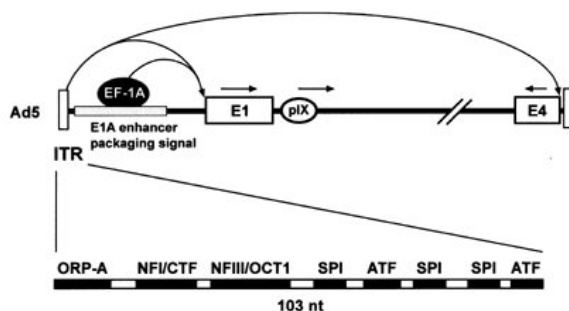
Die Regulationskapazität des Ad.3r-luc zeigt in verschiedenen Zelllinien große Differenzen. Obwohl eine m.o.i. von 10 benutzt wurde, die sich in HT-29 und HELA Zellen als optimal erwiesen hatte, ist diese m.o.i. aufgrund der unterschiedlichen Empfänglichkeit der Zelllinien für Adenoviren durch rezeptorvermittelte Aufnahme vermutlich nicht in allen Zellen die optimale. Die Zelllinien-abhängige Regulationskapazität des Tetracyclin-regulierbaren Systems wurde schon früh beschrieben (Ackland-Berglund und Leib 1995,

Howe *et al.* 1995), wenn auch nicht ursächlich aufgeklärt. In adenoviralen Systemen könnte eine unspezifisch erhöhte basale Expression durch einen Enhancereffekt der linken ITR auf den minimalen CMV Promotor entstehen. Dieser Effekt wurde in verschiedenen Zelllinien in unterschiedlicher Ausprägung gefunden (Rubinchik *et al.* 2001). In dem prokaryotischen Anteil des tTA wurden „kryptische“ Splicesignale (Urlinger *et al.* 2000) gefunden, die für eine verminderte Transaktivatorexpression verantwortlich sein könnten. Der humane CMV Promotor im Ad.CMV-luc zeigt in den durchgeführten Experimenten mit Ausnahme der HepG2 und U266 Zellen eine geringere Abhängigkeit der Genexpression von der Zelllinie. Auch für den CMV Promotor sind Zelltyp-abhängige Unterschiede der vermittelten Genexpression beschrieben worden (Baskar *et al.* 1996, Baldwin *et al.* 1997). Obwohl die Messung des Reportergens Luciferase sehr reproduzierbare und über weite Konzentrationen lineare Ergebnisse liefert, ist berichtet worden, dass sich die optimalen ATP-Konzentrationen zur Messung der Aktivität in Zelllysaten zwischen verschiedenen Zelllinien unterscheiden. Dieser Effekt könnte Unterschiede in der Genexpression der Luciferase zwischen den einzelnen Zelllinien vortäuschen (Nguyen *et al.* 1988, Brasier *et al.* 1989). Auf eine Optimierung der ATP-Konzentration in der Substratlösung ist in der vorliegenden Arbeit verzichtet worden. Der Vergleich unterschiedlicher Vektoren unterliegt weiterhin der Ungenauigkeit des Plaqueassays, der in dieser Arbeit zur Feststellung des adenoviralen Titers benutzt wurde. Bei dieser Methode ist eine exakte Adsorptionszeit des viralen Überstandes und Inkubation der mit Agarose überschichteten 293 Zellen für mindestens 14 Tage zum Erzielen reproduzierbarer Ergebnisse notwendig (Mittereder *et al.* 1999). Nach Bewig und Schmidt (2000) liegt der Variationskoeffizient des Plaqueassays bei 9,9%. Nyberg-Hoffman *et al.* (1997) halten den Plaqueassay zur Feststellung eines adenoviralen Titers nicht für empfehlenswert und schlagen andere Methoden wie den CPE Assay in Kombination mit Zentrifugationsschritten vor.

#### **4.2.4. Einflüsse auf die Regulationskapazitäten in adenoviralen Vektoren**

Es wurden eine Reihe von Mechanismen beschrieben, wie die Promotoraktivität nach Integration in einen adenoviralen Vektor beeinflusst werden kann. Die Integration in einen adenoviralen Vektor kann den Verlust der Gewebespezifität eines Promotors zur Folge haben (Imler *et al.* 1997, Ring *et al.* 1997, Shi *et al.* 1997). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine rechtswärtige Orientierung des CMV Promotors im Hinblick auf das adenovirale Genom zu einer siebenfach höheren Genexpression als bei der linkswärtigen Orientierung führt (Addison *et al.* 1997). Die Ursache hierfür sind das Inverted Terminal Repeat (ITR,

bp 1-103) sowie der E1A Enhancer (bp 190-320) des adenoviralen Genoms. In rekombinanten Adenoviren können beide nicht deletiert werden, da das ITR zur Replikation in den 293 Zellen benötigt wird und der E1A Enhancer die zur Verpackung wichtigen Sequenzen enthält (packaging domains bp 194-380, Schmid und Hearing 1998). Das ITR selbst enthält Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (Buvoli *et al.* 2002) und kann entsprechend auch als Enhancer fungieren (Miralles *et al.* 1989). Es wurde gezeigt, dass die E1A Enhancerregion (bp 190-320) die Transkription der viralen E1A Region durch das zelluläre Protein EF-1A aktiviert (Abb. 36, Hearing und Schenk 1986). In einem Plasmid-system in HELA Zellen kann der E1A Enhancer die Basisaktivität des minimalen Tetracyclin-responsiblen CMV Promotors in der E1 Region auf das 7,3fache, die Aktivität des Prostata spezifischen Antigen (PSA) Promotors um das 2fache erhöhen. Dieser Effekt war unabhängig von der Orientierung des Promotors und deutet deshalb auf einen Enhancer-mechanismus hin (Rubinchik *et al.* 2001).

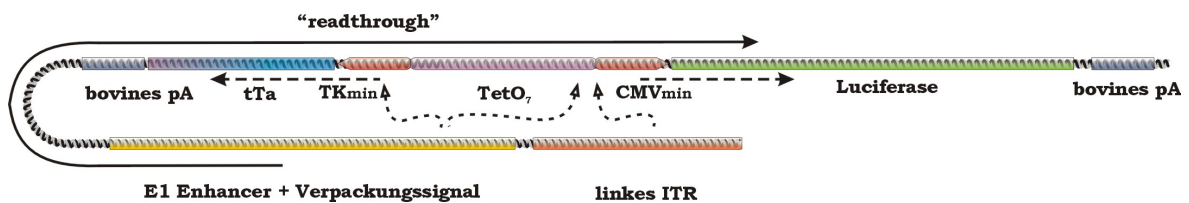


**Abbildung 36: Bindungsstellen zellulärer Transkriptionsfaktoren im adenoviralen ITR und Transkriptionsaktivierung.**

(Quelle: Buvoli *et al.* 2001).

Durch RNase protection assays in HELA Zellen konnte nachgewiesen werden, dass im E1A Enhancer zusätzlich ein Transkriptionsstart (ab bp 231 des AD5 Genoms) initiiert werden kann (Buvoli *et al.* 2002). Als Folge kann es zu einem passiven „readthrough“ durch einen rechtswärtig in die E1 Region inserierten Promotor mit Expression des Transgens kommen. Dies könnte den Verlust von Gewebespezifität inserierter gewebespezifischer Promotoren in der adenoviralen E1 Region sowie die stärkere Genexpression rechtswärtig gegenüber linkswärtig orientierten Promotoren erklären. Durch die Insertion von Transkriptionsterminatoren des bovinen Wachstumshormons downstream der E1A Region konnte die Gewebespezifität des ERBB2 Promotors wiederhergestellt werden (Vassaux *et al.* 1999). Das Einfügen eines Insulatorelements des Hühner  $\beta$ -Globin Locus (HS-4) führte zu einer Verbesserung der Regulationskapazität eines metallinduzierbaren Promotors (Steinwaerder und Lieber 2000). Hierbei bleibt unklar, ob diese Effekte durch Blockade eines „readthrough-“ oder eines Enhancereffektes erreicht wurden.

Obwohl in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht, haben diese beschriebenen Effekte wahrscheinlich Einfluss auf die Regulierbarkeit des autoregulierbaren Systems der Adenoviren Ad.3i-luc, Ad.3r-luc und Ad.3r-scmIL-12. Die unterschiedlich starke Basisexpression in den verschiedenen Zelllinien, besonders in HepG2, könnte auf eine Aktivierung des minimalen CMV Promotors durch einen Enhancermechanismus zurückzuführen sein, von dem gezeigt wurde, dass er in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Rubinchik *et al.* 2001). Die linkswärtig orientierte Transaktivatorexpression in der E1 Region der in dieser Arbeit generierten adenoviralen Vektoren würde mit einem eventuellen rechtswärtigen „readthrough“ durch Transkriptionsinitiation in der E1 Region interferieren. Dies könnte eine Erklärung für die niedrige Transaktivatorexpression sein. Vom E1 Enhancer ist die Transaktivatorkassette durch ein bovines Polyadenylierungssignal abgeschirmt, welches in dieser Position die Gewebespezifität des humanen ERBB2 Promotors wiederhergestellt hatte (Vassaux *et al.* 2000). Die Orientierung des Polyadenylierungssignal ist in Ad.3r-luc und Ad.3i-luc im Vergleich zu den von Vassaux beschriebenen Versuchen jedoch umgekehrt. Eine Isolation durch das bovine Polyadenylierungssignal des Transaktivators ist deshalb fraglich.



**Abbildung 37: Illustration der Transkriptionsaktivierung durch adenovirale Elemente.** Am Beispiel des Ad.3r-luc ist der „readthrough“ Effekt mit einem ausgestrichenen, die Enhancereffekte mit gestrichelten Pfeilen dargestellt.

#### 4.2.5. Vergleich der Regulationskapazität des vorliegenden Ansatzes mit anderen publizierten Ergebnissen

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit beruhten die meisten Ansätze zur regulierten adenoviralen Genexpression auf einem Zwei-Vektor System, wobei der eine adenovirale Vektor den Transaktivator, der andere den minimalen CMV Promotor in der E1 Region codierte. Sie benutzten sowohl das Tet-ON als auch das Tet-OFF System und erzielten Regulationskapazitäten von 190fach (Neering *et al.* 1996) bis 330fach (Harding *et al.* 1997) im Tet-OFF und 190fach (Harding *et al.* 1997) bis 1800fach (Molin *et al.* 1998) im Tet-ON System. Wegen des identischen Ansatzes liegen die Ursachen für die Unterschiede wahrscheinlich in den verschiedenen verwendeten Zelllinien, Reporter genen und Nachweismetho-

thoden. Die unterschiedliche Sensibilität der Nachweismethoden führt wahrscheinlich ebenfalls zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen bei der Regulation von Nichtreportergenen. In den verwendeten Ein-Vektor Systemen wurde von einer Basalexpression unterhalb (Hu *et al.* 1997, Corti *et al.* 1999) und „knapp“ oberhalb (Rubinchik *et al.* 2000) der Nachweisgrenze der regulierten Genprodukte berichtet.

Mizuguchi und Hayakawa (2002), die eine Ein-Vektor-Strategie verfolgten, in der der Transaktivator konstitutiv aus der E3 und das Reportergen Luciferase unter Kontrolle des Tetracyclin-responsiblen Promotors aus der E1 Region exprimiert wurden, berichteten von Regulationskapazitäten von 28fach für das Tet-ON und von 500fach für das Tet-OFF System *in vitro*. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten deutlich höheren Regulationskapazitäten von bis zu 16350fach sind wahrscheinlich auf die Autoregulation des bi-direktionalen Expressionssystems zurückzuführen, welches durch die sehr niedrige Transaktivatorexpression im unregulierten Zustand die basale Expression um den Faktor 3 reduziert (Abb. 28). Zudem ist eine Abschirmung vor einem „readthrough“ durch den linkswärtig gerichteten Anteil der bi-direktionalen Expressionskassette mit seinem bovinen Polyadenylierungssignal nicht auszuschließen. Dies würde vor allem die Basalexpression des Systems erniedrigen.

Ein von Unsinger (2001) beschriebenes bi-direktionales Promotorsystem weist eine ähnlich hohe Regulationskapazität auf.

#### 4.2.6. Optimierung des Systems

Durch Nutzung neuerer während der laufenden Arbeit publizierter Ergebnisse ließe sich eventuell eine Verbesserung der Regulationskapazität des beschriebenen Systems erreichen. So würde die Nutzung des neuen reversen Transaktivators rtTA2<sup>s</sup>-M2 (Urlinger *et al.* 2000) in Kombination mit dem tTS (Deutschle *et al.* 1995), der aus der E3 Region exprimiert werden könnte, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Verbesserung der Regulationseigenschaften ergeben. Eine Kombination dieser beiden Komponenten in einem sog. „gutless“ Vektor erzielte eine 600–90000fache Regulation in der Expression des Reportergens „sezernierte alkalische Phosphatase“ (Salucci *et al.* 2001). Ferner wäre zu prüfen, ob die Umkehrung der Orientierung der Expressionskassette in der E1 Region eine Erhöhung der Regulationskapazität nach sich zieht. Falls in den Vektoren ein „readthrough“ existiert, würde sich bei einer Orientierungsumkehr die basale ebenso wie die maximale Expression erniedrigen. Fender und Mitarbeiter (2002) berichten über eine geringere basale Expression des minimalen TK Promotors im Vergleich zum minimalen CMV Promotor in einem

E1/E4 deletierten adenoviralen Vektor. So könnte eine Umkehr des minimalen bidirektionalen Promotors in der Weise, dass der TK-Anteil die Expression des interessierenden Gens kontrolliert, für eine geringere basale Expression sorgen, während eine höhere Expression des Transaktivators unter Kontrolle des minimalen CMV Promotors aufgrund des nachgewiesenen relativen Transaktivatormangels durchaus erwünscht ist. Eine Aussage, ob sich die Insertion von Insulationselementen positiv auf die Regulationseigenschaften auswirkt ist, sehr spekulativ, da kontroverse Beobachtungen über ihre Verwendung in adenoviralen Vektoren existieren (Buvoli *et al.* 2002, Vassaux *et al.* 2000).

### **4.3. Charakterisierung der Interleukin-12 exprimierenden Vektoren**

#### **4.3.1. Die Regulationskapazität des Ad.3r-scmIL-12**

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin mit großem therapeutischen Potential sowohl bei malignen als auch bei infektiösen Erkrankungen. Die systemische IL-12 Therapie maligner Erkrankungen hat wegen ihrer schwierigen Dosierung Rückschläge erlitten (Cohen 1995). Die maximal tolerierbare Dosis bei einer systemischen IL-12 Gabe ist abhängig von dem Applikationsplan. Dies führte in präklinischen Studien zu unerwarteten Toxizitätserscheinungen und Todesfällen (Leonard *et al.* 1997). Phase-I Studien haben gezeigt, dass die Nebenwirkungen ebenso wie die IFN- $\gamma$  Produktion sich bei mehrmaliger Verabreichung des IL-12 vermindern (Sacco *et al.* 1997, Portielje *et al.* 1999). Eine prolongierte IL-12 Stimulation geht *in vitro* mit einer Herunterregulation der IL-12 Signalkomponente STAT4 einher. Dies führte zur reduzierten Expression von IFN- $\gamma$ , dessen Expression STAT4 durch Bindung an den Promotor stimuliert (Wang *et al.* 2001). Angesichts der potentiell letalen Nebenwirkungen des IL-12 ergibt sich aus der Regulierbarkeit der Genexpression ein großer Zuwachs an Sicherheit. Hierbei erwies sich die Verwendung des Tet-OFF System nicht nur aus Gründen der erhöhten Regulierbarkeit, sondern auch aus pharmakokinetischen Gründen als vorteilhaft. Aufgrund der Halbwertszeit von Doxycyclin von 15 Stunden gelingt es schneller, die Genexpression durch intravenöse Gabe des Antibiotikums abzuschalten, als bei Verwendung des Tet-ON Systems auf die Elimination des Antibiotikums zur Abschaltung warten zu müssen. In HT-29 Zellen, die durch Ad.3r-scmIL-12 infiziert wurden, zeigt sich eine Regulationskapazität von bis zu 1426fach bei einer m.o.i. von 100. Die Erhaltung der Regulationskapazität bei hohen m.o.i. ist wichtig, da hier bei hoher Genexpression *in vivo* Nebenwirkungen erwartet werden müssen. Die in dieser Arbeit demonstrierte Regulationsfähigkeit von über 1000fach würde, *in vivo* erzielt, einen großen Sicherheitszuwachs in der Gentherapie mit IL-12 exprimierenden Adenoviren bedeuten.

Die *in vitro* bestimmte Regulationsfähigkeit lässt nur indirekte Schlüsse auf die tatsächliche Regulierbarkeit in einem Gesamtorganismus zu. Insofern wäre eine Charakterisierung der Regulationsfähigkeit sowie eine Bestimmung der Expressionskinetik in einem Tiermodell anzustreben. Angesichts der nach systemischer Applikation in Menschen bestimmten langen Halbwertszeit von 12 Stunden für IL-12 (Portielje *et al.* 2003) wäre eine Untersuchung von Kinetik und Reversibilität von auftretenden toxischen Erscheinungen sinnvoll.

#### **4.3.2. Die Produktion des murinen single chain Interleukin-12 ist effizienter als die des heterodimeren Interleukin-12**

Bei gleicher m.o.i. zeigte sich nach Infektion mit Ad.3r-scmIL-12 in Abwesenheit von Doxycyclin eine um mindestens 2 Logstufen höhere Expression des intakten IL-12 als nach Infektion mit Ad.CMV-p40.IRES.p35, wenn für beide IL-12 Formen die gleiche Immunoreaktivität im murinen p70 spezifischen ELISA angenommen wird.

Bei einer Steigerung der m.o.i. mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 stieg die Menge des produzierten murinen IL-12 langsamer an als bei einer Infektion mit Ad.3r-scmIL-12. Zudem lag in den meisten untersuchten Zelllinien das Expressionsverhältnis Ad.3r-luc/Ad.CMV-luc deutlich unter dem Ad.3r-scmIL-12/Ad.CMV-p40.IRES.p35, was darauf hinweist, dass die Ursache für die niedrigere Transgenexpression nicht im Promotor, sondern im Transgen liegt. Die niedrigere Expression des IL-12 im Vergleich zur Luciferase kann durch mehrere Ursachen ausgelöst werden. Bedingt durch die Positionierung im zweiten Cistron der bicistronischen mRNA kann es zu einer schwächeren Expression der p35 Untereinheit kommen. Dirks und Mitarbeiter (1993) zeigten eine dreifach schwächere Expression aus dem zweiten Cistron bei einer systematischen Untersuchung der IRES abhängigen Expression der Reportergene Luciferase und sezernierter alkalischen Phosphatase. Weiterhin unterliegt die p35 Untereinheit unterschiedlichen posttranslatorischen Modifikationen. Hierzu gehören das zweiseitige Abtrennen eines *N*-terminalen Signalpeptids sowie eine *N*-Glykosylierung, welches für die Sezernierung als mit p40 assoziiertes Heterodimer essentiell zu sein scheint (Carra *et al.* 2000, Murphy *et al.* 2000). Die p40 Untereinheit wird hingegen posttranslational nicht modifiziert. Nach Abspaltung eines sekretorischen Signalpeptids nimmt sie den Weg eines sezernierten Proteins, dessen Expression auf Transkriptionsebene kontrolliert wird (Carra *et al.* 2000). Physiologisch wird p40 im 10–1000fachen Überschuss zum heterodimeren p70 sezerniert, während p35 nicht als Monomer sezerniert wird (Abdi 2003). Die ineffizientere Expression des Heterodimers ist daher durch die notwendige Glykosylierung in den entdifferenzierten Karzinomzelllinien erklärbar. Durch die

Deletion der *N*-terminalen 22 Aminosäuren des p35, welche das vermutete Sekretionssignal bilden, und die Verknüpfung an das *C*-terminale Ende der p40 Untereinheit (Lieschke *et al.* 1997) vollzieht das Fusionszytokin den Sekretionsweg des p40 nach und benötigt so keine zur Sekretion essentielle Glykosylierung. Bei einem in analoger Weise konstruierten p35-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-p40 Fusionsprotein konnte eine effiziente Sekretion nur durch Insertion einer  $\kappa$ -Ketten-Signalsequenz des monoklonalen HIV p24 Antikörpers am 5'-Ende der p35 codierenden Sequenz erreicht werden (Lode *et al.* 1998, Erratum 2000). Dies erklärt die effizientere Expression nach Infektion mit dem das Fusionsprotein codierenden Virus. Eine Untersuchung der Glykosylierung der p35 Untereinheit des exprimierten Fusionszytokins auf seine Glykosylierung und deren Einfluss auf seine Bioaktivität könnte die Frage klären, ob die Glykosylierung für die Bioaktivität als notwendig oder eher als ein sekretionsregulatorischer Prozess angesehen werden kann. Die im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien reproduzierbare sehr effiziente IL-12 Expression der Ad.CMV-p40.IRES.p35 infizierten U266 lässt sich schwierig erklären. Zwar sezernieren U266 Zellen das mit dem p35 eng verwandte und stark glykosylierte IL-6 (Schwab *et al.* 1991, Merberg *et al.* 1992), so dass die posttranslatorische Modifikation dieser Untereinheit eventuell effektiver abläuft. Es erklärt jedoch nicht die schwache Expression des Fusionszytokins, weil der CMV Promotor in U266 in den Luciferaseexperimenten eine schwächere Expression als das Tetracyclin-regulierbare System zeigt. Ob die Expression des spezie fremden murinen IL-12 Einfluss auf die Expression in humanen Zelllinien ausübt, ist schwer abzuschätzen.

#### **4.3.3. Das produzierte murine single chain IL-12 weist eine höhere Bioaktivität als das Heterodimer auf**

Aufgrund seiner effizienteren Expression vermittelt das in höheren Konzentrationen vorliegende Fusionszytokin eine stärkere IFN- $\gamma$  Ausschüttung der murinen Splenozyten als das Heterodimer, welches mit Hilfe der bi-cistronischen mRNA exprimiert wurde (Abb. 34). Wird jedoch die IL-12 Konzentration der Verdünnung gegen die vermittelte IFN- $\gamma$  Ausschüttung aufgetragen, zeigt sich bei dem Fusionszytokin auch eine effizientere IFN- $\gamma$  Ausschüttung im Verhältnis zum eingesetzten IL-12 (Abb. 35). Aufgrund der niedrigeren IL-12 Konzentrationen im Zellkulturüberstand der Ad.CMV-p40.IRES.p35 infizierten HT-29 kann dieser Effekt nicht im gesamten linearen Bereich des Bioassays demonstriert werden. Eine Erklärung für die niedrigere Effektivität ist die mögliche Formation von p40 Homodimeren, die bei der unabhängigen Expression beider Untereinheiten möglich ist. Murine p40 Homodimere konkurrieren mit dem p40/p35 Heterodimer um die Bindung am



IL-12 Rezeptor (Gillessen *et al.* 1995, Wang *et al.* 1999) und haben antagonistische Aktivität. Ob p40 Homodimere in Mäusen und Menschen eine physiologische Funktion als natürliche IL-12 Antagonisten besitzen, wird kontrovers diskutiert (Abdi 2003). Eine Formation von p40 Homodimeren ist bei Expression des Fusionszytokins nicht mehr möglich. Verglichen mit dem rekombinanten p40/p35 Heterodimer zeigt das Fusionszytokin eine wenig geringere Effektivität, eine IFN- $\gamma$  Ausschüttung aus murinen Splenozyten zu stimulieren. Es wäre weiterhin zu untersuchen, ob im Überstand der Ad.CMV-p40.IRES.p35 infizierten HT-29 Zellen p40 Homodimere nachzuweisen sind.

#### 4.4. Ausblick

##### 4.4.1. *In vivo* Anwendung im Tiermodell

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten über die Regulation der Expression des Reportergens Luciferase und des IL-12 p40/p35 Fusionszytokins nach adenoviralem Gentransfer wurden ausschließlich *in vitro* gewonnen. Für eine abschließende Bewertung werden die adenoviralen Vektoren in einem Tiermodell auf ihre Regulationseigenschaften geprüft werden müssen. Außer der maximalen und minimalen Genexpression in der Ab- und Anwesenheit von Doxycyclin ist hier die Kinetik der An- und Abschaltung der Genexpression interessant. Weiterhin kann der Einfluss der Benutzung unterschiedlicher Effektoren mit unterschiedlichen Halbwertszeiten (Tetracyclin, Anhydrotetracyclin, Minocyclin oder Doxycyclin) auf die Kinetik der Genexpression beurteilt werden. Das p40/p35 Fusionszytokin exprimierende Adenovirus Ad.3r-scmIL-12 sollte weiterhin *in vivo* auf seine biologische Effektivität geprüft werden. Es sollte untersucht werden, ob durch das IL-12 verursachte Toxizitätssymptome durch eine Suppression der Genexpression nach Gabe eines Tetracyclins schnell reversibel sind. Sollte die Genexpression effektiv durch Tetracyclin oder seine Derivate supprimiert werden können, würde sich dieses System dazu eignen, die biologische Halbwertszeit des Fusionszytokins, über die noch keine Daten vorliegen, zu bestimmen. Besteht eine schnelle Progression toxischer Symptome, die sich durch Tetracyclingabe als nicht reversibel erweisen, ist die Überprüfung zusätzlicher Maßnahmen, wie z. B. die Gabe von Antikörpern gegen IL-12 notwendig. Ein potentieller Nachteil der Expression nicht körpereigener Proteine wie den Komponenten des regulierbaren Systems mit dem Fusionszytokin ist das Einbringen neuer immunogener Epitope *in vivo*. Die Entwicklung einer Immunantwort mit humoraler und zellulärer Antwort könnte die Effektivität des beschriebenen Systems stark vermindern. Eine Untersuchung über die Induktion von Antikörpern *in vivo* gegen das sezernierte Fusionszytokin wäre daher von großem Interesse.

Über die Immunogenität des Transaktivators in Primaten bestehen kontroverse Beobachtungen (Favre *et al.* 2002, Lamartina *et al.* 2002, Latta-Mahieu *et al.* 2002).

#### 4.4.2. Sicherheit in der Gentherapie

Die Verwendung des bi-direktionalen Tetracyclin-regulierbaren Systems zeigt sich im Vergleich zu anderen publizierten Ansätzen der regulierten und konstitutiven adenoviralen Genexpression als sehr effizient. Verbesserungsmöglichkeiten liegen vor allem in der Expression des Transaktivators und der Reduktion der basalen Expression. Die Kombination des starken Promotors mit dem IL-12 p40/p35 Fusionszytokin, welches sich im Vergleich mit dem Heterodimer durch eine effizientere Sekretion auszeichnet und eine höhere Bioaktivität besitzt, erlaubt, in einen *in vivo* Ansatz übertragen, die Reduktion des applizierten adenoviralen Vektors um den Faktor 100 bei Expression der gleichen Menge an IL-12. Da die Applikation großer Mengen adenoviraler Vektoren beim Vorliegen von Antikörpern gegen diesen adenoviralen Serotyp zu einer unkontrollierten Aktivierung des Komplementsystems mit letalen Folgen führen kann (Cichon *et al.* 2001), ist diese mögliche Reduktion der Menge an applizierten adenoviralen Vektoren ein großer Sicherheitsgewinn. Die Expression kann durch Hinzugabe eines nicht-toxischen Antibiotikums *in vitro* auf unter 1/1000, in der Zelllinie AsPC-1 auf 1/6000, reduziert werden. Das in dieser Arbeit beschriebene adenovirale Expressionssystem erlaubt somit eine Verminderung der durch Vektor und Transgen vermittelten Toxizität.

#### 4.4.3. Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren

Die Weiterentwicklungen der Vektoren für die Gentherapie sind breit gefächert und vollziehen sich in einem rasanten Tempo. Es ist deshalb zur Zeit nicht abzusehen, welche Vektoren einen Einzug in die klinische Anwendung halten werden. Eine Regulierbarkeit ihrer Genexpression in Kombination mit anderen Modifikationen wie einem selektiven Tropismus und verlängerter Expressionspersistenz bleiben ein wichtiger Bestandteil der wünschenswerten Eigenschaften. Das in dieser Arbeit vorgestellte autoregulative System erweist sich in einem adenoviralen Kontext als sehr effizient zur Regulation der Genexpression. Andere Autoren berichten von einer effizienten Regulation durch autoregulative Systeme in adeno-assoziierten und lentiviralen Vektoren (Fitzsimons *et al.* 2001, Verhoef *et al.* 2001). Es ist deshalb denkbar, dass eine Tetracyclin-regulierbare Genexpression zum Standard künftiger Generationen von gentherapeutischen Vektoren werden wird. Diese Arbeit zeigt die Nutzbarkeit des Tetracyclin-regulierbaren Systems in einer autoregulativen

Konfiguration zur effizienten Kontrolle der Transgenexpression in adenoviralen Vektoren. Diese Nutzung kann eventuell auch das therapeutische Potential von Adenoviren verstärken, die für eine gentherapeutische Nutzung in ihren Infektions- und Replikationseigenschaften verändert worden sind.

## 5. Zusammenfassung

Eine regulierbare Expression nach dem Transfer von Genen stellt sowohl für die Erforschung von Genfunktionen als auch für die Gentherapie einen großen Nutzen dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit der Integration aller Komponenten des Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystems in einen adenoviralen Vektor getestet und auf ihre Regulationskapazität untersucht werden. Es wurde eine autoregulative Konfiguration sowohl des durch Tetracycline induzierbaren (Tet-ON) als auch des durch Tetracycline supprimierbaren Systems (Tet-OFF) zur Insertion in die E1 Region von E1/E3 deletierten adenoviralen Vektoren gewählt. Die generierten Adenoviren Ad.3i-luc (Tet-ON) und Ad.3r-luc (Tet-OFF) zeigten eine Regulationskapazität für die Expression des Reportergens Luciferase von bis zu 132fach bzw. 2352fach in humanen HT-29 Kolonkarzinomzellen. Die Regulationseigenschaften des Adenovirus Ad.3r-luc wurden weiterhin in verschiedenen transformierten humanen Zelllinien bestimmt und der Einfluss der autoregulativen Konfiguration auf die Expressionseigenschaften untersucht. Hierbei konnte eine Suppression der Luciferaseexpression um den Faktor 16532 in SkCo-1 Zellen nachgewiesen werden. Im nicht-supprimierten Zustand zeigte sich der regulierbare Promotor gegenüber dem humanen CMV Promotor um bis zu 242fach überlegen. Verglichen mit einer konstitutiven Transaktivatorexpression bedingt die autoregulative Anordnung der Expressionskassette in HELA Zellen eine niedrigere Basalexpression im supprimierten, jedoch auch eine niedrigere Maximalexpression im angeschalteten Zustand.

Aufgrund seiner potentiell letalen Nebenwirkungen wäre eine Regulierbarkeit der Expression des stark antitumoral wirkenden IL-12 in einem gentherapeutischen Ansatz wünschenswert. Das konstruierte Adenovirus Ad.3r-scmIL-12 codiert ein Fusionsprotein aus beiden Untereinheiten des murinen IL-12 unter Kontrolle des Tet-OFF Systems, dessen Expression in humanen Karzinomzelllinien sich bis um den Faktor 6069 supprimieren ließ. Im Vergleich zu dem Adenovirus Ad.CMV-p40.IRES.p35, das das murine heterodimere IL-12 unter Kontrolle des CMV Promotors exprimiert, zeigte sich das Fusionszytokin in Expression und Bioaktivität um ein Vielfaches effizienter. Die Expressionseffizienz und Regulierbarkeit des neu konstruierten adenoviralen Vektors erlauben eine Reduktion der Vektordosis und tragen durch die Expressionskontrolle zur Sicherheit eines gentherapeutischen Ansatzes unter Verwendung des IL-12 bei. Das charakterisierte Tetracyclin-abhängige autoregulative Expressionssystem bietet die Möglichkeit der Expressionskontrolle anderer adenoviral transduzierter Gene in Forschung und experimentellen therapeutischen Ansätzen.

## 6. Abstract

The ability to regulate gene expression externally after adenoviral gene transfer is a desirable goal in investigating gene functions as well as in gene therapy. During this thesis all components of the tetracycline-regulated systems for gene expression were to integrate into a single adenoviral vector. Its capacity of regulation of gene expression was to be investigated. An autoregulated configuration of the tetracycline-inducible (Tet-ON) as well as of the tetracycline-suppressive (Tet-OFF) system were chosen for integration into the E1 region of E1/E3 deleted adenoviral vectors. Gene expression of generated adenoviral vectors Ad.3i-luc (Tet-ON) and Ad.3r-luc (Tet-OFF) was shown to be regulated 132-fold and 2352-fold respectively in human HT-29 colon carcinoma cells. The capacity of regulated gene expression of Ad.3r-luc was further characterized in various human cancer cell lines. Luciferase expression could be downregulated 16532-fold in SkCo-1 cells. A 242-fold higher gene expression of the non-suppressed autoregulated system was measured in comparison to adenoviral gene expression driven by the human CMV-promoter. The contribution of the autoregulated configuration to regulation was investigated in HELA cells. In comparison to constitutional transactivator expression the autoregulated configuration exhibited less leakiness but also a lower maximal level of gene expression.

A regulated gene expression of interleukin-12 (IL-12), a cytokine with strong antitumor potency but potentially lethal side effects, is a desirable goal in an anticancer gene therapeutic approach. The generated adenoviral vector Ad.3r-scmIL-12 expresses a fusion protein of both murine IL-12 subunits under control of the autoregulated Tet-OFF system. Expression of the fusion protein could be downregulated 6069-fold in human cancer cell lines. In comparison to Ad.CMV-p40.IRES.p35, an adenoviral vector expressing the heterodimeric murine IL-12 driven by the CMV promoter, the Ad.3r-scmIL-12 was more efficient regarding expression and bioactivity. The efficiency of expression and regulation of this new adenoviral vector allow a reduction of vector dose in a gene therapeutic setting. The ability to control gene expression further contributes to safety of a IL-12 gene therapeutic approach. The characterized tetracyclin-regulated gene expression system allows controlled expression of other adenoviral transduced genes in experimental or therapeutic settings.

## 7. Literaturverzeichnis

A-Mohammadi, S., Alvarez-Vallina, L., Ashworth, L. J., Hawkins, R. E. (1997). "Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues." *Gene Ther* **4**(9): 993-7.

A-Mohammadi, S., Hawkins, R. E. (1998). "Efficient transgene regulation from a single tetracycline-controlled positive feedback regulatory system." *Gene Ther* **5**(1): 76-84.

Abdi, K. (2002). "IL-12: the role of p40 versus p75." *Scand J Immunol* **56**(1): 1-11.

Ackland-Berglund, C. E., Leib, D. A. (1995). "Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type." *Biotechniques* **18**(2): 196-200.

Addison, C. L., Hitt, M., Kunsken, D., Graham, F. L. (1997). "Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors." *J Gen Virol* **78**(7): 1653-61.

Aleman, R., Curiel, D. T. (2001). "CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors." *Gene Ther* **8**(17): 1347-53.

Anderson, S. C., Johnson, D. E., Harris, M. P., Engler, H., Hancock, W., Huang, W. M., Wills, K. N., Gregory, R. J., Sutjipto, S., Wen, S. F., Lofgren, S., Shepard, H. M., Maneval, D. C. (1998). "p53 gene therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma: intra-arterial delivery of a recombinant adenovirus." *Clin Cancer Res* **4**(7): 1649-59.

Arnberg, N., Edlund K., Kidd, A. H., Wadell, G. (2000). "Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor." *J Virol* **74**(1): 42-8.

Baldwin, H. S., Mickanin, C., Buck, C. (1997). "Adenovirus-mediated gene transfer during initial organogenesis in the mammalian embryo is promoter-dependent and tissue-specific." *Gene Ther* **4**(11): 1142-9.

Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., Bujard, H. (1995). "Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter." *Nucleic Acids Res* **23**(17): 3605-6.

Baron, U., Gossen, M., Bujard, H. (1997). "Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential." *Nucleic Acids Res* **25**(14): 2723-9.

Baron, U., Schnappinger, D., Helbl, V., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H. (1999). "Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(3): 1013-8.

Baskar, J. F., Smith, P. P., Nilaver, G., Jupp, R. A., Hoffmann, S., Peffer, N. J., Tenney, D. J., Colberg-Poley, A. M., Ghazal, P., Nelson, J. A. (1996). "The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice." *J Virol* **70**(5): 3207-14.

Bennett, E. M., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Brodsky, F. M. (1999). "Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression." *J Immunol* **162**(9): 5049-52.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., Finberg, R. W. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science* **275**(5304): 1320-3.

Bett, A. J., Haddara, W., Prevec, L., Graham, F. L. (1994). "An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8802-6.

Bewig, B., Schmidt, W. E. (2000). "Accelerated titering of adenoviruses." *Biotechniques* **28**(5): 870-3.

Biederer, C., Ries, S., Brandts, C. H., McCormick, F. (2002). "Replication-selective viruses for cancer therapy." *J Mol Med* **80**(3): 163-75.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.

Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., McCormick, F. (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." *Science* **274**(5286): 373-6.

Block, A., Chen, S. H., Kosai, K., Finegold, M., Woo, S. L. (1997). "Adenoviral-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer: regression of hepatic metastasis of pancreatic tumors." *Pancreas* **15**(1): 25-34.

Block, A., Milasinovic, D., Mueller, J., Schaefer, P., Schaefer, H., Greten, H. (2002). "Amplified Muc1-specific gene expression in colon cancer cells utilizing a binary system in adenoviral vectors." *Anticancer Res* **22**(6): 3285-92.

Boggio, K., Nicoletti, G., Di Carlo, E., Cavallo, F., Landuzzi, L., Melani, C., Giovarelli, M., Rossi, I., Nanni, P., De Giovanni, C., Bouchard, P., Wolf, S., Modesti, A., Musiani, P., Lollini, P. L., Colombo, M. P., Forni, G. (1998). "Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice." *J Exp Med* **188**(3): 589-96.

Bordier, C. (1981). "Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution." *J Biol Chem* **256**(4): 1604-7.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Bramson, J. L., Hitt, M., Addison, C. L., Muller, W. J., Gauldie, J., Graham, F. L. (1996). "Direct intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-12 induces regression and long-lasting immunity that is associated with highly localized expression of interleukin-12." *Hum Gene Ther* **7**(16): 1995-2002.

Brasier, A. R., Tate, J. E., Habener, J. F. (1989). "Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines." *Biotechniques* **7**(10): 1116-22.



- Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S., Kricka, L. J. (1994). "Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays." *Anal Biochem* **219**(2): 169-81.
- Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F., Gately, M. K. (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors." *J Exp Med* **178**(4): 1223-30.
- Bruning, A., Runnebaum, I. B. (2003). "CAR is a cell-cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta." *Gene Ther* **10**(3): 198-205.
- Burcin, M. M., Schiedner, G., Kochanek, S., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W. (1999). "Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 355-60.
- Buvoli, M., Langer, S. J., Bialik, S., Leinwand, L. A. (2002). "Potential limitations of transcription terminators used as transgene insulators in adenoviral vectors." *Gene Ther* **9**(3): 227-31.
- Car, B. D., Eng, V. M., Lipman, J. M., Anderson, T. D. (1999). "The toxicology of interleukin-12: a review." *Toxicol Pathol* **27**(1): 58-63.
- Carra, G., Gerosa, F., Trinchieri, G. (2000). "Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12." *J Immunol* **164**(9): 4752-61.
- Caruso, M., Pham-Nguyen, K., Kwong, Y. L., Xu, B., Kosai, K. I., Finegold, M., Woo, S. L., Chen, S. H. (1996). "Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11302-6.
- Cavallo, F., Di Carlo, E., Butera, M., Verrua, R., Colombo, M. P., Musiani, P., Forni, G. (1999). "Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12." *Cancer Res* **59**(2): 414-21.

Cichon, G., Boeckh-Herwig, S., Schmidt, H. H., Wehnes, E., Muller, T., Pring-Akerblom, P., Burger, R. (2001). "Complement activation by recombinant adenoviruses." *Gene Ther* **8**(23): 1794-800.

Clackson, T. (2000). "Regulated gene expression systems." *Gene Ther* **7**(2): 120-5.

Clayman, G. L., Frank, D. K., Brusio, P. A., Goepfert, H. (1999). "Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers." *Clin Cancer Res* **5**(7): 1715-22.

Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T., Bergelson, J. M. (2001). "The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15191-6.

Cohen, J. (1995). "IL-12 deaths: explanation and a puzzle." *Science* **270**(5238): 908.

Colombo, M. P., Vagliani, M., Spreafico, F., Parenza, M., Chiodoni, C., Melani, C., Stoppacciaro, A. (1996). "Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression." *Cancer Res* **56**(11): 2531-4.

Corti, O., Sanchez-Capelo, A., Colin, P., Hanoun, N., Hamon, M., Mallet, J. (1999). "Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 12120-5.

Cotten, M., Baker, A., Saltik, M., Wagner, E., Buschle, M. (1994). "Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus." *Gene Ther* **1**(4): 239-46.

Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., Liao, F., Farber, J. M., Pestka, S., Trinchieri, G., Lee, W. M. (1998). "Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." *Immunity* **9**(1): 25-34.

Coughlin, C. M., Wysocka, M., Trinchieri, G., Lee, W. M. (1997). "The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12." *Cancer Res* **57**(12): 2460-7.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G. (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells." *J Exp Med* **178**(3): 1041-8.

de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R., DeLuca, M. (1985). "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 7870-3.

Deuschle, U., Meyer, W. K., Thiesen, H. J. (1995). "Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1907-14.

Dirks, W., Wirth, M., Hauser, H. (1993). "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells." *Gene* **128**(2): 247-9.

Dix, B. R., Edwards, S. J., Braithwaite, A. W. (2001). "Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway?" *J Virol* **75**(12): 5443-7.

Eckert, B., Beck, C. F. (1989). "Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential." *J Bacteriol* **171**(6): 3557-9.

Fallarino, F., Uyttenhove, C., Boon, T., Gajewski, T. F. (1996). "Endogenous IL-12 is necessary for rejection of P815 tumor variants in vivo." *J Immunol* **156**(3): 1095-100.

Favre, D., Blouin, V., Provost, N., Spisek, R., Porrot, F., Bohl, D., Marme, F., Cherel, Y., Salvetti, A., Hurtrel, B., Heard, J. M., Riviere, Y., Moullier, P. (2002). "Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term

doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus." *J Virol* **76**(22): 11605-11.

Fender, P., Jeanson, L., Ivanov, M. A., Colin, P., Mallet, J., Dedieu, J. F., Latta-Mahieu, M. (2002). "Controlled transgene expression by E1-E4-defective adenovirus vectors harbouring a "tet-on" switch system." *J Gene Med* **4**(6): 668-75.

Fitzsimons, H. L., McKenzie, J. M., During, M. J. (2001). "Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain." *Gene Ther* **8**(22): 1675-81.

Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N., Hillen, W. (1999). "Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **27**(2): 708-10.

Freundlieb, S., Schirra-Muller, C., Bujard, H. (1999). "A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells." *J Gene Med* **1**(1): 4-12.

Fussenegger, M., Morris, R. P., Fux, C., Rimann, M., von Stockar, B., Thompson, C. J., Bailey, J. E. (2000). "Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells." *Nat Biotechnol* **18**(11): 1203-8.

Fussenegger, M., Moser, S., Mazur, X., Bailey, J. E. (1997). "Autoregulated multicistronic expression vectors provide one-step cloning of regulated product gene expression in mammalian cells." *Biotechnol Prog* **13**(6): 733-40.

Gahery-Segard, H., Molinier-Frenkel, V., Le Boulaire, C., Saulnier, P., Opolon, P., Lengagne, R., Gautier, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L., Venet, A., Schatz, C., Courtney, M., Le Chevalier, T., Tursz, T., Guillet, J. G., Farace, F. (1997). "Phase I trial of recombinant adenovirus gene transfer in lung cancer. Longitudinal study of the immune responses to transgene and viral products." *J Clin Invest* **100**(9): 2218-26.

Gallimore, P. H., Turnell, A. S. (2001). "Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience." *Oncogene* **20**(54): 7824-35.

Gao, G. P., Yang, Y., Wilson, J. M. (1996). "Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy." *J Virol* **70**(12): 8934-43.

Gately, M. C., Chizzonite, R., Presky, D. H. (2001). "Measurement of Human and Mouse Interleukin-12." *Current Protocol in Immunology* John Wiley & Sons, New York: Unit 6.16.

Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., Sher, A. (1996). "In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha." *J Immunol* **157**(2): 798-805.

Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S., Gately, M. K. (1995). "Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist." *Eur J Immunol* **25**(1): 200-6.

Gossen, M., Bujard, H. (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-51.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* **268**(5218): 1766-9.

Grable, M., Hearing, P. (1992). "cis and trans requirements for the selective packaging of adenovirus typ 5 DNA." *Journal of virology* **66**(2): 723-731.

Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology* **52**(2): 456-67.

Habib, N. A., Ding, S. F., el-Masry, R., Mitry, R. R., Honda, K., Michail, N. E., Dalla Serra, G., Izzi, G., Greco, L., Bassyouni, M., el-Toukhy, M., Abdel-Gaffar, Y. (1996).

“Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas.” *Cancer Detect Prev* **20**(2): 103-7.

Harding, T. C., Geddes, B. J., Noel, J. D., Murphy, D., Uney, J. B. (1997). “Tetracycline-regulated transgene expression in hippocampal neurones following transfection with adenoviral vectors.” *J Neurochem* **69**(6): 2620-3.

Hatfield, L., Hearing, P. (1991). “Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo.” *Virology* **184**(1): 265-76.

Hay, J. G., Shapiro, N., Sauthoff, H., Heitner, S., Phupakdi, W., Rom, W. N. (1999). “Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: the importance of the adenoviral E1b-55kD gene.” *Hum Gene Ther* **10**(4): 579-90.

Hay, R. J. (1994). "Atlas of human tumor cell lines." Acad. Press: San Diego.

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998). “A simplified system for generating recombinant adenoviruses.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2509-14.

Hearing, P., Samulski, R. J., Wishart, W. L., Shenk, T. (1987). “Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome.” *J Virol* **61**(8): 2555-8.

Hearing, P., Shenk, T. (1986). “The adenovirus type 5 E1A enhancer contains two functionally distinct domains: one is specific for E1A and the other modulates all early units in cis.” *Cell* **45**(2): 229-36.

Herman, J. R., Adler, H. L., Aguilar-Cordova, E., Rojas-Martinez, A., Woo, S., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., Scardino, P. T. (1999). “In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial.” *Hum Gene Ther* **10**(7): 1239-49.

Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P. L., Bergelson, J. M., Hackett, N. R., Finberg, R. W., Wickham, T. J., Kovesdi, I., Roelvink, P., Crystal, R. G. (1999). "CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts." *J Clin Invest* **103**(4): 579-87.

Hodge, D. L., Martinez, A., Julias, J. G., Taylor, L. S., Young, H. A. (2002). "Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control." *Mol Cell Biol* **22**(6): 1742-53.

Hofmann, A., Nolan, G. P., Blau, H. M. (1996). "Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5185-90.

Hong, S. S., L. Karayan, et al. (1997). "Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells." *Embo J* **16**(9): 2294-306.

Horwitz, M. S. (2004). "Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins." *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S172-83.

Howe, J. R., Skryabin, B. V., Belcher, S. M., Zerillo, C. A., Schmauss, C. (1995). "The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines." *J Biol Chem* **270**(23): 14168-74.

Hu, S. X., Ji, W., Zhou, Y., Logothetis, C., Xu, H. J. (1997). "Development of an adenovirus vector with tetracycline-regulatable human tumor necrosis factor alpha gene expression." *Cancer Res* **57**(16): 3339-43.

Hull, G. W., McCurdy, M. A., Nasu, Y., Bangma, C. H., Yang, G., Shimura, S., Lee, H. M., Wang, J., Albani, J., Ebara, S., Sato, T., Timme, T. L., Thompson, T. C. (2000). "Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated expression of interleukin 12 with interleukin 12 plus B7-1 for in situ gene therapy and gene-modified, cell-based vaccines." *Clin Cancer Res* **6**(10): 4101-9.

- Igelmann, D. (2003). "Synthese eines neuen rekombinanten Adenovirus zur Transgenexpression des Zytokins Interleukin 12 und die in-vitro-Charakterisierung seiner biologischen Funktionalität." Medizinische Dissertation, Universität Hamburg: 74 S.
- Imler, J. L., Dupuit, F., Chartier, C., Accart, N., Dieterle, A., Schultz, H., Puchelle, E., Pavirani, A. (1996). "Targeting cell-specific gene expression with an adenovirus vector containing the lacZ gene under the control of the CFTR promoter." *Gene Ther* **3**(1): 49-58.
- Jiang, C., Magee, D. M., Cox, R. A. (1999). "Construction of a single-chain interleukin-12-expressing retroviral vector and its application in cytokine gene therapy against experimental coccidioidomycosis." *Infect Immun* **67**(6): 2996-3001.
- Kang, W. K., Park, C., Yoon, H. L., Kim, W. S., Yoon, S. S., Lee, M. H., Park, K., Kim, K., Jeong, H. S., Kim, J. A., Nam, S. J., Yang, J. H., Son, Y. I., Baek, C. H., Han, J., Ree, H. J., Lee, E. S., Kim, S. H., Kim, D. W., Ahn, Y. C., Huh, S. J., Choe, Y. H., Lee, J. H., Park, M. H., Kong, G. S., Park, E. Y., Kang, Y. K., Bang, Y. J., Paik, N. S., Lee, S. N., Kim, S., Robbins, P. D., Tahara, H., Lotze, M. T., Park, C. H. (2001). "Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study." *Hum Gene Ther* **12**(6): 671-84.
- Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R. H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A. M., Brusio, P., Kaye, S. B., Hong, W. K., Kim, D. H. (2000). "A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer." *Nat Med* **6**(8): 879-85.
- Kirby, I., Davison, E., Bevil, A. J., Soh, C. P., Wickham, T. J., Roelvink, P. W., Kovessi, I., Sutton, B. J., Santis, G. (2000). "Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein." *J Virol* **74**(6): 2804-13.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., Bujard, H. (1996). "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10933-8.



- Kleinschmidt, C., Tovar, K., Hillen, W., Porschke, D. (1988). "Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control." *Biochemistry* **27**(4): 1094-104.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." *J Exp Med* **170**(3): 827-45.
- Kresina, T. F. (2001). "An introduction to molecular medicine and gene therapy." Wiley-Liss: New York.
- Kubin, M., Kamoun, M., Trinchieri, G. (1994). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells." *J Exp Med* **180**(1): 211-22.
- Kurihara, T., Brough, D. E., Kovesdi, I., Kufe, D. W. (2000). "Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen." *J Clin Invest* **106**(6): 763-71.
- Lamartina, S., Silvi, L., Roscilli, G., Casimiro, D., Simon, A. J., Davies, M. E., Shiver, J. W., Rinaudo, C. D., Zampaglione, I., Fattori, E., Colloca, S., Paz, O. G., Laufer, R., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G., Toniatti, C. (2003). "Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-Based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and Non-Human primates." *Mol Ther* **7**(2): 271-80.
- Latta-Mahieu, M., Rolland, M., Caillet, C., Wang, M., Kennel, P., Mahfouz, I., Loquet, I., Dedieu, J. F., Mahfoudi, A., Trannoy, E., Thuillier, V. (2002). "Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression." *Hum Gene Ther* **13**(13): 1611-20.
- Leonard, J. P., Sherman, M. L., Fisher, G. L., Buchanan, L. J., Larsen, G., Atkins, M. B., Sosman, J. A., Dutcher, J. P., Vogelzang, N. J., Ryan, J. L. (1997). "Effects of single-dose

interleukin-12 exposure on interleukin-12- associated toxicity and interferon-gamma production." *Blood* **90**(7): 2541-8.

Li, Y., Pong, R. C., Bergelson, J. M., Hall, M. C., Sagalowsky, A. I., Tseng, C. P., Wang, Z., Hsieh, J. T. (1999). "Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy." *Cancer Res* **59**(2): 325-30.

Lieschke, G. J., Rao, P. K., Gately, M. K., Mulligan, R. C. (1997). "Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo." *Nat Biotechnol* **15**(1): 35-40.

Lode, H. N., Dreier, T., Xiang, R., Varki, N. M., Kang, A. S., Reisfeld, R. A. (1998). "Gene therapy with a single chain interleukin 12 fusion protein induces T cell-dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2475-80.

Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A., Mehtali, M. (1998). "In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted." *J Virol* **72**(3): 2022-32.

Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E., Germann, T. (1993). "The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer." *Eur J Immunol* **23**(9): 2202-8.

McCormick, F. (2001). "Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?" *Nat Rev Cancer* **1**(2): 130-41.

Merberg, D. M., Wolf, S. F., Clark, S. C. (1992). "Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family." *Immunol Today* **13**(2): 77-8.

Meselson, M., Stahl, F. W., Vinograd, J. (1957). "Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **43**(:): 581-588.

Milasinovic, D. "Entwicklung adenoviraler Vektoren zur tumorspezifischen Genexpression." Medizinische Dissertation in Vorbereitung, Universität Hamburg.

Miralles, V. J., Cortes, P., Stone, N., Reinberg, D. (1989). "The adenovirus inverted terminal repeat functions as an enhancer in a cell-free system." *J Biol Chem* **264**(18): 10763-72.

Mittereder, N., March, K. L., Trapnell, B. C. (1996). "Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy." *J Virol* **70**(11): 7498-509.

Mizuguchi, H., Hayakawa, T. (2002). "The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector." *J Gene Med* **4**(3): 240-7.

Molin, M., Shoshan, M. C., Ohman-Forslund, K., Linder, S., Akusjarvi, G. (1998). "Two novel adenovirus vector systems permitting regulated protein expression in gene transfer experiments." *J Virol* **72**(10): 8358-61.

Nakagawa, S., Massie, B., Hawley, R. G. (2001). "Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: pharmacologic properties and clinical potential." *Eur J Pharm Sci* **13**(1): 53-60.

Nakahira, M., Ahn, H. J., Park, W. R., Gao, P., Tomura, M., Park, C. S., Hamaoka, T., Ohta, T., Kurimoto, M., Fujiwara, H. (2002). "Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1." *J Immunol* **168**(3): 1146-53.

National Institutes of Health. (2003). Clinical Trials in Human Gene Transfer, Office of Biotechnology Activities. <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/clinicaltrial.htm>

Nastala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A., Brunda, M. J., Gately, M. K., Wolf, S. F., Schreiber, R. D., Storkus, W. J., et al. (1994). "Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production." *J Immunol* **153**(4): 1697-706.

- Naylor, L. H. (1999). "Reporter gene technology: the future looks bright." *Biochem Pharmacol* **58**(5): 749-57.
- Neering, S. J., Hardy, S. F., Minamoto, D., Spratt, S. K., Jordan, C. T. (1996). "Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors." *Blood* **88**(4): 1147-55.
- Nguyen, V. T., Morange, M., Bensaude, O. (1988). "Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells." *Anal Biochem* **171**(2): 404-8.
- No, D., Yao, T. P., Evans, R. M. (1996). "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3346-51.
- Noguchi, Y., Jungbluth, A., Richards, E. C., Old, L. J. (1996). "Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11798-801.
- Nyberg-Hoffman, C., Shabram, P., Li, W., Giroux, D., Aguilar-Cordova, E. (1997). "Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination." *Nat Med* **3**(7): 808-11.
- Ochsenbein, A. F. (2002). "Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy." *Cancer Gene Ther* **9**(12): 1043-55.
- Ozmen, L., Pericin, M., Hakimi, J., Chizzonite, R. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Gately, M., Garotta, G. (1994). "Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction." *J Exp Med* **180**(3): 907-15.
- Portielje, J. E., Kruit, W. H., Schuler, M., Beck, J., Lamers, C. H., Stoter, G., Huber, C., de Boer-Dennert, M., Rakhit, A., Bolhuis, R. L., Aulitzky, W. E. (1999). "Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer." *Clin Cancer Res* **5**(12): 3983-9.

- Portielje, J. L., Gratama, J. W., Van Ojik, H. L., Stoter, G., Kruit, W. L. (2003). "IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination." *Cancer Immunol Immunother* **52**(3): 133-44.
- Pützer, B. M., Bramson, J. L., Addison, C. L., Hitt, M., Siegel, P. M., Muller, W. J., Graham, F. L. (1998). "Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer." *Hum Gene Ther* **9**(5): 707-18.
- Pützer, B. M., Hitt, M., Muller, W. J., Emtage, P., Gauldie, J., Graham, F. L. (1997). "Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10889-94.
- Qiao, J., Chen, S. H., Pham-Nguyen, K. B., Mandeli, J., Woo, S. L. (1999). "Construction and characterization of a recombinant adenoviral vector expressing human interleukin-12." *Cancer Gene Ther* **6**(4): 373-9.
- Quiagen (2001). "Quiagen Plasmid Purification Handbook."
- Riemensberger, J., Bohle, A., Brandau, S. (2002). "IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer." *Clin Exp Immunol* **127**(1): 20-6.
- Ring, C. J., Blouin, P., Martin, L. A., Hurst, H. C., Lemoine, N. R. (1997). "Use of transcriptional regulatory elements of the MUC1 and ERBB2 genes to drive tumour-selective expression of a prodrug activating enzyme." *Gene Ther* **4**(10): 1045-52.
- Rivera, V. M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J. F., Keenan, T., Magari, S. R., Phillips, T., Courage, N. L., Cerasoli, F., Jr., Holt, D. A., Gilman, M. (1996). "A humanized system for pharmacologic control of gene expression." *Nat Med* **2**(9): 1028-32.
- Rivera, V. M., Ye, X., Courage, N. L., Sachar, J., Cerasoli, F., Jr., Wilson, J. M., Gilman, M. (1999). "Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8657-62.

Romano, G., Michell, P., Pacilio, C., Giordano, A. (2000). "Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications." *Stem Cells* **18**(1): 19-39.

Romano, G., Pacilio, C., Giordano, A. (1999). "Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals." *Stem Cells* **17**(4): 191-202.

Rosenberg, S. A., Zhai, Y., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., Roberts, B., White, D. E. (1998). "Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens." *J Natl Cancer Inst* **90**(24): 1894-900.

Rubinchik, S., Ding, R., Qiu, A. J., Zhang, F., Dong, J. (2000). "Adenoviral vector which delivers FasL-GFP fusion protein regulated by the tet-inducible expression system." *Gene Ther* **7**(10): 875-85.

Rubinchik, S., Lowe, S., Jia, Z., Norris, J., Dong, J. (2001). "Creation of a new transgene cloning site near the right ITR of Ad5 results in reduced enhancer interference with tissue-specific and regulatable promoters." *Gene Ther* **8**(3): 247-53.

Rubinchik, S., Wang, D., Yu, H., Fan, F., Luo, M., Norris, J. S., Dong, J. Y. (2001). "A complex adenovirus vector that delivers FASL-GFP with combined prostate-specific and tetracycline-regulated expression." *Mol Ther* **4**(5): 416-26.

Russell, W. C. (2000). "Update on adenovirus and its vectors." *J Gen Virol* **81**(Pt 11): 2573-604.

Sacco, S., Heremans, H., Echtenacher, B., Buurman, W. A., Amraoui, Z., Goldman, M., Ghezzi, P. (1997). "Protective effect of a single interleukin-12 (IL-12) predose against the toxicity of subsequent chronic IL-12 in mice: role of cytokines and glucocorticoids." *Blood* **90**(11): 4473-9.

Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988). "GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator." *Nature* **335**(6190): 563-4.

- Salucci, V., Scarito, A., Aurisicchio, L., Lamartina, S., Nicolaus, G., Giampaoli, S., Gonzalez-Paz, O., Toniatti, C., Bujard, H., Hillen, W., Ciliberto, G., Palombo, F. (2002). "Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system." *Gene Ther* **9**(21): 1415-21.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*.
- Schmid, S. I., Hearing, P. (1998). "Cellular components interact with adenovirus type 5 minimal DNA packaging domains." *J Virol* **72**(8): 6339-47.
- Schoenhaut, D. S., Chua, A. O., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., McComas, W., Familletti, P. C., Gately, M. K., Gubler, U. (1992). "Cloning and expression of murine IL-12." *J Immunol* **148**(11): 3433-40.
- Schwab, G., Siegall, C. B., Aarden, L. A., Neckers, L. M., Nordan, R. P. (1991). "Characterization of an interleukin-6-mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line, U266." *Blood* **77**(3): 587-93.
- Segerman, A., J. P. Atkinson, et al. (2003). "Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor." *J Virol* **77**(17): 9183-91.
- Shi, Q., Wang, Y., Worton, R. (1997). "Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector." *Hum Gene Ther* **8**(4): 403-10.
- Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N., Schatz, D. G. (1995). "A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6522-6.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., Godfrey, D. I. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." *J Exp Med* **191**(4): 661-8.

Steinwaerder, D. S., Lieber, A. (2000). "Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo." *Gene Ther* **7**(7): 556-67.

Stewart, A. K., Lassam, N. J., Quirt, I. C., Bailey, D. J., Rotstein, L. E., Krajden, M., Des-sureault, S., Gallinger, S., Cappe, D., Wan, Y., Addison, C. L., Moen, R. C., Gauldie, J., Graham, F. L. (1999). "Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial." *Gene Ther* **6**(3): 350-63.

Strathdee, C. A., McLeod, M. R., Hall, J. R. (1999). "Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector." *Gene* **229**(1-2): 21-9.

Street, S. E., Trapani, J. A., MacGregor, D., Smyth, M. J. (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." *J Exp Med* **196**(1): 129-34.

Swisher, S. G., Roth, J. A. (2002). "p53 Gene therapy for lung cancer." *Curr Oncol Rep* **4**(4): 334-40.

Tahara, H., Zitvogel, L., Storkus, W. J., Zeh, H. J., 3rd, McKinney, T. G., Schreiber, R. D., Gubler, U., Robbins, P. D., Lotze, M. T. (1995). "Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector." *J Immunol* **154**(12): 6466-74.

Tannenbaum, C. S., Wicker, N., Armstrong, D., Tubbs, R., Finke, J., Bukowski, R. M., Hamilton, T. A. (1996). "Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12." *J Immunol* **156**(2): 693-9.

Tarner, I. H., Nakajima, A., Seroogy, C. M., Ermann, J., Levicnik, A., Contag, C. H., Fathman, C. G. (2002). "Retroviral gene therapy of collagen-induced arthritis by local delivery of IL-4." *Clin Immunol* **105**(3): 304-14.



Tatsumi, T., Takehara, T., Kanto, T., Kuzushita, N., Ito, A., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., Hayashi, N. (1999). "B7-1 (CD80)-gene transfer combined with interleukin-12 administration elicits protective and therapeutic immunity against mouse hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **30**(2): 422-9.

Tevaearai, H. T., Eckhart, A. D., Walton, G. B., Keys, J. R., Wilson, K., Koch, W. J. (2002). "Myocardial gene transfer and overexpression of beta2-adrenergic receptors potentiates the functional recovery of unloaded failing hearts." *Circulation* **106**(1): 124-9.

Tong, X., Engehausen, D. G., Freund, C. T., Agoulnik, I., Guo, Z., Oehler, M. K., Kim, T. E., Hasenburg, A., Contant, C. F., Woo, S. L., Kieback, D. G. (1998). "The efficacy of adenovirus-mediated gene therapy of ovarian cancer is enhanced by using the cytomegalovirus promoter." *Anticancer Res* **18**(2): 719-25.

Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C., McKnight, S. L. (1988). "Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression." *Genes Dev* **2**(6): 718-29.

Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." *Annu Rev Immunol* **13**: 251-76.

Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 133-46.

Unsinger, J. (2001). Entwicklung regulierbarer retro- und adenoviraler Vektoren für die Gentherapie. Naturwissenschaftliche Dissertation. Braunschweig, Technische Universität Carolo-Wilhelms Braunschweig: 176 S.

Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., Hillen, W. (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7963-8.

- Vassaux, G., Hurst, H. C., Lemoine, N. R. (1999). "Insulation of a conditionally expressed transgene in an adenoviral vector." *Gene Ther* **6**(6): 1192-7.
- Verhoef, K., Marzio, G., Hillen, W., Bujard, H., Berkhout, B. (2001). "Strict control of human immunodeficiency virus type 1 replication by a genetic switch: Tet for Tat." *J Virol* **75**(2): 979-87.
- Wan, Y., Emtage, P., Zhu, Q., Foley, R., Pilon, A., Roberts, B., Gauldie, J. (1999). "Enhanced immune response to the melanoma antigen gp100 using recombinant adenovirus-transduced dendritic cells." *Cell Immunol* **198**(2): 131-8.
- Wang, K. S., Zorn, E., Ritz, J. (2001). "Specific down-regulation of interleukin-12 signaling through induction of phospho-STAT4 protein degradation." *Blood* **97**(12): 3860-6.
- Wang, X., Wilkinson, V. L., Podlaski, F. J., Wu, C., Stern, A. S., Presky, D. H., Magram, J. (1999). "Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits." *Eur J Immunol* **29**(6): 2007-13.
- Waring, M. J. (1965). "Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids." *J Mol Biol* **13**(1): 269-82.
- Weber, M., Moller, K., Welzeck, M., Schorr, J. (1995). "Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells." *Biotechniques* **19**(6): 930-40.
- Webster, A., Russell, S., Talbot, P., Russell, W. C., Kemp, G. D. (1989). "Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity." *J Gen Virol* **70**(Pt 12): 3225-34.
- Wen, X. Y., Mandelbaum, S., Li, Z. H., Hitt, M., Graham, F. L., Hawley, T. S., Hawley, R. G., Stewart, A. K. (2001). "Tricistronic viral vectors co-expressing interleukin-12 (IL-12) and CD80 (B7-1) for the immunotherapy of cancer: preclinical studies in myeloma." *Cancer Gene Ther* **8**(5): 361-70.
- Wickham, T. J. (2000). "Targeting adenovirus." *Gene Ther* **7**(2): 110-4.

Wulff, H. (2001). "Induzierbare adenovirale Genexpression von murinem Interleukin 18." Naturwissenschaftliche Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg: 90 S.

Xing, Z., Jordana, M., Kirpalani, H., Driscoll, K. E., Schall, T. J., Gauldie, J. (1994). "Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation." *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**(2): 148-53.

Yu, W. G., Yamamoto, N., Takenaka, H., Mu, J., Tai, X. G., Zou, J. P., Ogawa, M., Tsutsui, T., Wijesuriya, R., Yoshida, R., Herrmann, S., Fujiwara, H., Hamaoka, T. (1996). "Molecular mechanisms underlying IFN-gamma-mediated tumor growth inhibition induced during tumor immunotherapy with rIL-12." *Int Immunol* **8**(6): 855-65.

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	<b>Vor- und Nachteile verwendeter viraler Vektoren in der Gentherapie.</b>	3
<b>Abbildung 1:</b>	<b>Elektronenmikroskopische Aufnahmen adenoviraler Kapside.</b>	7
<b>Abbildung 2:</b>	<b>Modell des adenoviralen Partikels.</b>	8
<b>Abbildung 3:</b>	<b>Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms.</b>	9
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Einteilung der rekombinanten adenoviralen Vektoren.</b>	12
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Einteilung der induzierbaren Expressionssysteme.</b>	16
<b>Abbildung 4:</b>	<b>Funktionsweise des Tetracyclin-regulierbaren Systems.</b>	17
<b>Abbildung 5:</b>	<b>Konfigurationsvarianten, die eine Autoregularität des Tetracyclin-abhängigen Systems zulassen.</b>	20
<b>Abbildung 6:</b>	<b>Konfigurationen und Funktionsweisen des Tetracyclin-abhängigen autoregulativen Systems nach Strathdee <i>et al.</i> 1999.</b>	21
<b>Abbildung 7:</b>	<b>Signaltransduktion des IL-12 Heterodimers.</b>	22
<b>Abbildung 8:</b>	<b>Die physiologischen Produzenten von IL-12 und ihre Effektorzellen.</b>	23
<b>Abbildung 9:</b>	<b>Die antitumorale Aktivität von IL-12.</b>	24
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Übersicht über verwendete Zelllinien.</b>	32
<b>Abbildung 10:</b>	<b>Prinzip des Auffüllens überhängender Enden mittels der T4 DNA-Polymerase und anschließende Ligation.</b>	37
<b>Abbildung 11:</b>	<b>Klonierung von pAd.3i-luc.</b>	39
<b>Abbildung 12:</b>	<b>Subklonierungen des murinen single chain IL-12.</b>	41
<b>Abbildung 13:</b>	<b>Verwendetes Prinzip der Generation rekombinanter Adenoviren.</b>	44
<b>Abbildung 14:</b>	<b>Virusbande nach der Ultrazentrifugation.</b>	49
<b>Abbildung 15:</b>	<b>Von der Luciferase katalysierte biolumineszente Reaktion.</b>	51
<b>Abbildung 16:</b>	<b>Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3i-luc.</b>	57
<b>Abbildung 17:</b>	<b>Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3r-luc.</b>	57
<b>Abbildung 18:</b>	<b>Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3i-scmIL-12.</b>	58
<b>Abbildung 19:</b>	<b>Plasmidkarte des Expressionsplasmides pAd.3r-scmIL-12.</b>	59
<b>Abbildung 20:</b>	<b>Plasmidkarte des Expressionsplasmide pAd.3i/3r.</b>	59
<b>Abbildung 21:</b>	<b>Plasmidkarte des Expressionsplasmide pShuttle.3i/3r.</b>	60
<b>Abbildung 22:</b>	<b>Luciferaseexpression nach Transfektion der Plasmide pAd.3r-luc und pAd.3i-luc.</b>	61

---

<b>Abbildung 23: Genome und inserierte Expressionskassetten der verwendeten rekombinanten adenoviralen Vektoren.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 24: Luciferaseexpression in Ad.3i-luc infizierten HT-29. ....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 25: Luciferaseexpression in Ad.3r-luc infizierten HT-29.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 26: Konzentrationsabhängige Luciferaseexpression in Ad.3r-luc/Ad.3i-luc infizierten HT-29. ....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 27: Konzentrationsabhängige Transaktivatorexpression. ....</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 28: Luciferaseexpression in Ad.3r-luc infizierten HELA und HELA-tTA. ....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 29: Luciferaseexpression von Ad.3r-luc und Ad.CMV-luc in HT-29. ....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 30: Regulation der Luciferaseexpression durch Ad.3r-luc und Vergleich mit Ad.CMV-luc in verschiedenen Zelllinien. ....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 31: Inkubation in humanem Serum. ....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 32: Expression des murinen Interleukin-12. ....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 33: Regulation der IL-12 Expression durch Ad.3r-scmlL-12 und Vergleich mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 in verschiedenen Zelllinien. .</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 34: Bioassay. ....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 35: Spezifische Bioaktivität. ....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 36: Bindungsstellen zellulärer Transkriptionsfaktoren im adenoviralen ITR und Transkriptionsaktivierung. ....</b>	<b>82</b>
<b>Abbildung 37: Illustration der Transkriptionsaktivierung durch adenovirale Elemente. ....</b>	<b>83</b>

## 9. Anhang

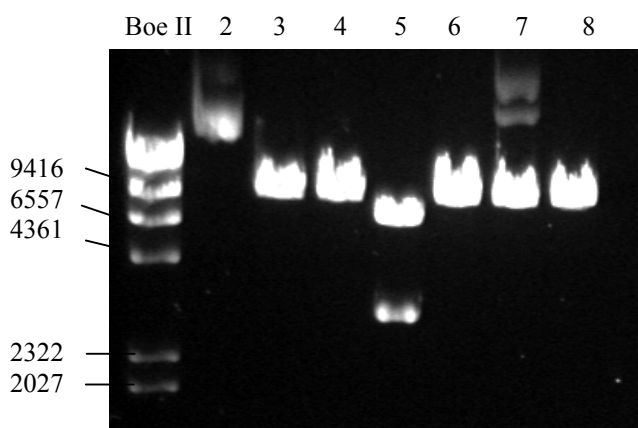
### 9.1. Abkürzungsverzeichnis und Erklärung von Fachbegriffen

#	Artikelnummern	M	Molar
°C	Grad Celsius	μ	Mikro
A	Adenosin	MCS	Multiple cloning side
Ad	Adenovirus	m.o.i.	multiplicity of infection
Abb.	Abbildung	MEM	Mod. Eagle Medium
Amp	Ampicillinresistenz	Min	Minute
bp	Basenpaare	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
bzw.	beziehungsweise	mu	Map units
β-Gal	β-Galaktosidase	n	nano
c	Centi	NK	natürliche Killer (Zellen)
C	Cytosin	Nls	nuclear localisation signal
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor	n/v	nicht vorhanden
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent	p	Pico, Plasmid
CD	cluster of differentiation	pA	poly Adenosin
cDNA	copy DNA	PBS	Phosphate-buffered saline
CMV	Cytomegalievirus	PCR	Polymerase Kettenreaktion
CPE	cytopathic effect	pH	negativer Dekad. Log. der H <sup>+</sup> -Konzentration
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RCA	Replikations kompetente Adenoviren
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5-triphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
E	early	rtTA	Reverser Tetracyclin abhängiger Transaktivator
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	sc	Single chain
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	T	Thymin
<i>et al.</i>	et alii (und andere)	Tet	Tetracyclin
FBS	fetales Rinderserum	Tet-OFF	Tetracyclin reguliertes System mit Verwendung des tTA
g x g	Gramm relative Erdbeschleunigung	Tet-ON	Tetracyclin reguliertes System mit Verwendung des rtTA
G	Guanin	TetR	Repressordomäne des tTA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Th	T-Helfer (Zellen)
HGDMEM	High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium	TK	Thymidinkinase
IE	Immediate early	TNF-α	Tumor Nekrosis Faktor-alpha
IFN-γ	Interferon-gamma	TP	Triphosphat, Terminales Protein
Ig	Immunglobulin	TRE	Tetracyclin-responsibles Element
IL	Interleukin	tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
IRES	internal ribosome entry side	U	Units
ITR	Inverted terminal repeat	UpM	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobasen	VP	Virales Protein
kDa	Kilodalton	V	Volt
L	Liter	v/w	Volumen/Gewicht
L	Ligand	w/o	without
LB	Luria-Bertani	wt	wildtyp
Log	logarithmisch	w/v	Gewicht/Volumen
Lsg	Lösung	X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid
m	Milli, Meter, murin	z. B.	zum Beispiel

## 9.2. Abbildungen der Agarosegele

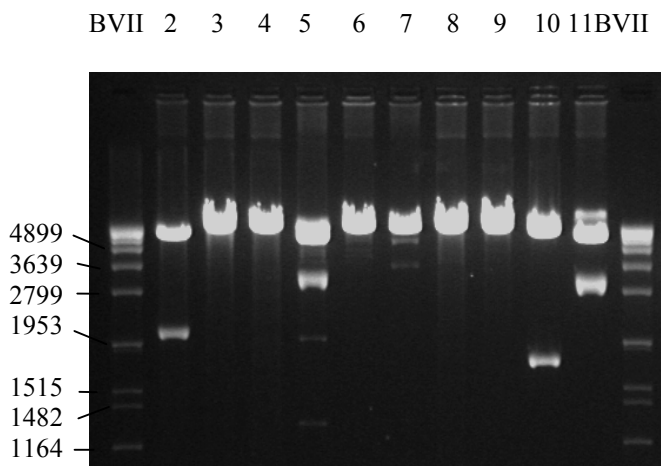
Die DNA Längenmarker II und VI der Firma Boehringer (Boe II und Boe VII) dienen zur Identifikation der Fragmente.

### 9.2.1. pAd.3i-luc



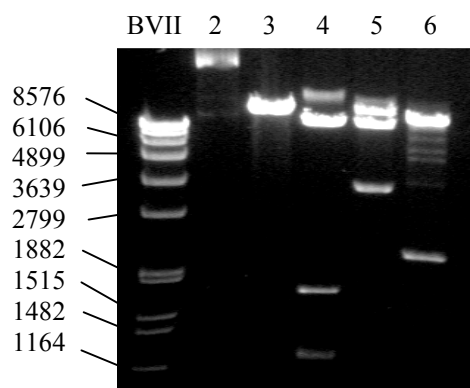
Enzym	Fragmentlänge [bp]	Lane
KeinVerdau	spiralisiert	2
BamHI	11490	3
EcoRV	11490	4
NdeI	3330 + 8160	5
NheI	11490	6
NotI	11490	7
PvuI	11490	8
SallI	11490	9

### 9.2.2. pAd.3r-luc



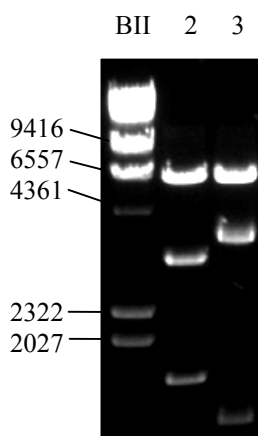
Enzym	Fragmentlänge [bp]	Lane
AviII	9252 + 2138 + 98	2
KpnI	11484	3
EcoRV	11484	4
NdeI	3330 + 8154	5
NheI	11484	6
NotI	11484	7
PvuI	11484	8
SallI	11484	9
XhoI	9691 + 1793	10
XbaI	8330 + 3154	11

## 9.2.3. pAd.3i-scmIL-12



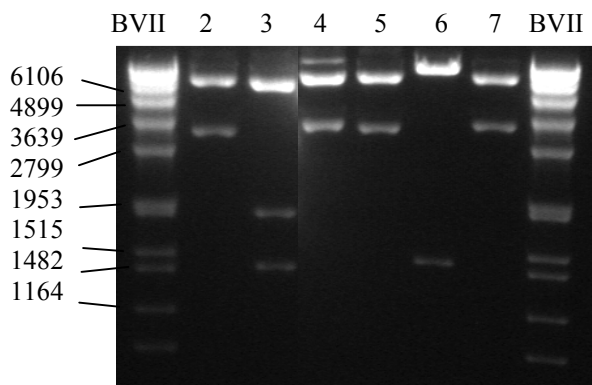
Enzym	Fragmentlänge [bp]	Lane
Kein Verdau	spiralisiert	2
MunI	11458	3
XbaI	8330 + 1613 + 1188 + 327	4
NdeI	8128 + 3330	5
NheI / SalI	9368 + 2090	6

## 9.2.4. pAd.3r-scmIL-12



Enzym	Fragmentlänge [bp]	Lane
EcoRI	6534 + 3195 + 1729	2
NsiI	6364 + 3505 + 1411 + 178	3

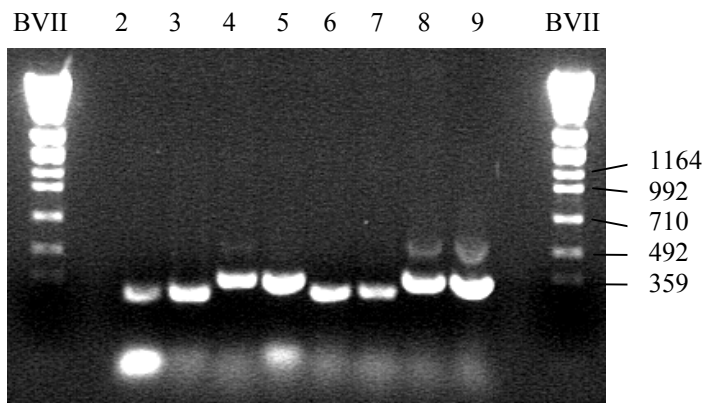
## 9.2.5. pAd.3r/3i



Plasmid	Enzym	Fragmentlänge [bp]	Lane
pAd.3r	EcoRI	6534 + 3195 + 55	2
pAd.3r	NsiI	6364 + 1831 + 1411 + 178	3
pAd.3r	NdeI	6454 + 3330	4
pAd.3i	EcoRI	6534 + 3195 + 55	5
pAd.3i	NsiI	8195 + 1411 + 178	6
pAd.3i	NdeI	6454 + 3330	7



### 9.2.6. Amplifikate der viralen DNA



Lane	Amplikon
2/3	Ad.3rluc, linker Übergang
4/5	Ad.3r-luc, rechter Übergang
6/7	Ad.3r-scmIL-12, linker Übergang
8/9	Ad.3r-scmIL-12, rechter Übergang

### 9.3. Liste der verwendeten und generierten Plasmide

Name	Quelle	Beschreibung der Sequenzen	Plasmidkarte
pAd.3i	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, autoregulatives Tet-ON System, MCS	3.2.5.
pAd.3i-luc	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, autoregulatives Tet-ON System, Luciferase	3.2.1.
pAd.3i-scmIL-12	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, autoregulatives Tet-ON System, murines single chain IL-12	3.2.3.
pAd.3r	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, autoregulatives Tet-OFF System, MCS	3.2.5.
pAd.3r-luc	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, autoregulatives Tet-OFF System, Luciferase	3.2.2.
pAd.3r-scmIL-12	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, autoregulatives Tet-OFF System, murines single chain IL-12	3.2.4.
pAd.CMV-pA	S. Woo, Mt. Sinai School of Medicine, NY, USA	Adenovirales Expressionsplasmid, CMV Promotor, bovines pA	2.4.1.
pBHG10	F. Graham, McMaster University, Hamilton, Kanada	Ad5 Genom mit Deletion der packaging signals und der E3 Region (bp 189-1338 bzw. 28134-30817)	n/v
pBIG.3i	C.S. Strathdee, J. P. Robarts Research Institute, London, Kanada	autoregulatives Tet-ON System, MCS	n/v
pBIG.3i-luc	C.S. Strathdee	autoregulatives Tet-ON System, Luciferase	n/v
pBIG.3r	C.S. Strathdee	autoregulatives Tet-OFF System, MCS	n/v
pBIG.3r-luc	selbst erstellt	autoregulatives Tet-OFF System, Luciferase	n/v
pIRES	Clontech, Heidelberg	Expressionsplasmid, 2 MCS, IRES	n/v
pIRES-scmIL-12	selbst erstellt	murines single chain IL-12	2.4.3.
pRC $\beta$ -Gal	Perricaudet, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France	CMV Promotor, $\beta$ -Galactosidase	n/v
pSFG.p40.Linker.p35	R.C. Mulligan, Department of Genetics, Children's Hospital, Boston, USA	Retrovirales Verpackungsplasmid, murines single chain IL-12	n/v
pShuttle	B. Vogelstein, Johns Hopkins University, Baltimore, USA	Adenovirales Expressionsplasmid, AdEasy System	n/v
pShuttle.3i	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, AdEasy System, autoregulatives Tet-ON System, MCS	3.2.6.
pShuttle.3r	selbst erstellt	Adenovirales Expressionsplasmid, AdEasy System, autoregulatives Tet-OFF System, MCS	3.2.6.
pSL1180	Amersham Biosciences, GB	Klonierungsvektor	n/v
pSL1180-scmIL-12	selbst erstellt	murines single chain IL-12	2.4.3.

**9.4. Liste der genannten Firmen**

1. Amersham International, Amersham, Großbritannien
2. American Tissue Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
3. Beckman-Coulter, München, Deutschland
4. Bio-Rad, München, Deutschland
5. Boehringer-Roche, Mannheim, Deutschland
6. BioZym, Hess. Oldendorf, Deutschland
7. Braun Diessel Biotech International, Melsungen, Deutschland
8. Clontech, Heidelberg, Deutschland
9. Dianova, Hamburg, Deutschland
10. EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
11. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland
12. Fluka, Ulm, Deutschland
13. GFL, Burgwedel, Deutschland
14. Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
15. Gilson, Middleton, USA
16. Greiner, Frickenhausen, Deutschland
17. Heraeus, Hanau, Deutschland
18. Hybaid, Ashford, England
19. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
20. J. T. Baker, Deventer, Holland
21. Köttermann, Uetze, Deutschland
22. Labor Optik (Neubauer Zählkammer)
23. Merck, Darmstadt, Deutschland

24. Milipore, Eschborn, Deutschland
25. MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
26. Nalge Nunc, Wiesbaden-Biebrecht, Deutschland
27. Nalgene, Rochester, NY, USA
28. New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Deutschland
29. Pfizer, Zürich, Schweiz
30. Pharmingen über Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
31. Pierce, über KMF, St. Augustin, Deutschland
32. Promega, Mannheim, Deutschland
33. Qiagen, Hilden, Deutschland
34. Qbiogene, Heidelberg, Deutschland
35. R&D Systems, Minneapolis, USA
36. Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
37. Stratagene, Heidelberg, Deutschland
38. Wolf, Geislingen, Deutschland

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiner Greten für die Möglichkeit, die beschriebene Arbeit an seiner Klinik anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Detlev Ameis danke ich dafür, dass er diese Arbeit vor der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vertritt. Den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission möchte ich für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit danken.

Diese wurde unter Leitung von Herrn Dr. Andreas Block in seiner Arbeitsgruppe für Gentherapie gastrointestinaler Tumoren an der medizinischen Kernklinik des UKE angefertigt. Herrn Dr. Andreas Block möchte ich für die interessante Aufgabenstellung, seine technische Betreuung und seine Motivation zum selbstständigen experimentellen Denken danken. Ich danke ihm besonders für die vielen Diskussionen, die diese Arbeit vorangebracht haben, sowie für die Förderung und Kritik während der Zeit der Experimente und Präsentation der Ergebnisse.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für das gute Arbeitsklima, die gegenseitige Hilfs- und Motivationsbereitschaft danken, ohne die meine Frustrationsschwelle deutlich tiefer gelegen hätte. Vielen Dank für die große Spendebereitschaft humanen Serums. Besonders erwähnen möchte ich Dragan Milasinovic, der mir die ersten Techniken beibrachte, Philipp Breuch und Henning Ortlepp, mit denen man ernst und heiter diskutieren konnte, und Holger Wulff, auf dessen Hilfe und Unterstützung immer Verlass war. Viele Grafiken in dieser Arbeit sähen ohne ihn deutlich schlechter aus.

Aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Detlev Ameis möchte ich Herrn Dr. Oliver Zschenker und Frau Dr. Stephanie Mayet für ihre Ratschläge bei methodischen Problemen sowie Frau Dr. Sabine Trautwein für die „Starthilfe“ beim Verfassen der Dissertation danken.

Herrn Jürgen Müller danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des Western Blots, Herrn Dr. Peter Schäfer für seine Hilfe beim Primer-Design.

Meinen Freunden danke ich für das studentische Leben und dafür, dass während der gesamten Zeit der Sport immer ein guter Ausgleich geblieben ist.

Meiner Freundin Julia Schatz danke ich für ihre Existenz.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Florian Puls  
Geburtsdatum 25.1.1975  
Geburtsort Hamburg

### Schulbildung

1985-1994 Abitur, Sachsenwaldgymnasium Reinbek

### Zivildienst

1994-1995 Krankenhaus St. Adolf-Stift, Reinbek

### Hochschulbildung

1995-2002 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg

### Wissenschaftliche Tätigkeiten

1999-2003 Promotionsarbeit: „Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierten Genexpression“, Leitung: Dr. A. Block und Prof. Dr. H. Greten, Labor für Gentherapie gastrointestinaler Tumoren an der Medizinischen Kernklinik, UKE

### Klinische Tätigkeit

2003-2004 Arzt im Praktikum, Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Leitung: Prof. Dr. M. P. Manns, MH Hannover

seit 8/2004 Senior House Officer, Department of Histopathology, University Hospitals Leicester, Großbritannien

## 12. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Florian PWS

Hannover, den 4.01.2004