

Universitätsklinik Ulm  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Kreienberg

**Etablierung eines Systems zur regulierbaren Expression des  
adenoviralen E1A zur Untersuchung seines Einflusses auf die  
Proliferation von Ovarialkarzinomzellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

*Nikolaus de Gregorio*  
*aus*  
*Villingen-Schwenningen*  
*2010*

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. Nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. Nat. Helmut Deissler

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Rainer Meierhenrich

Tag der Promotion: 11. Februar 2011

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	V
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.3 Histologische Typen und Stadieneinteilung	3
1.1.4 Klinik und Symptome	4
1.1.5 Standardtherapie	5
1.1.6 Prognosefaktoren	6
1.1.7 Probleme konventioneller Ovarialkarzinom-Therapie	7
1.1.8 Moderne Therapieansätze	7
1.2 Prinzipien der Gentherapie	8
1.3 Das adenovirale E1A Protein	10
1.3.1 Adenoviren	10
1.3.2 Das E1A Gen	12
1.3.3 Mechanismen der E1A-Wirkungen	13
1.3.4 E1A und Apoptose	14
1.3.5 E1A in klinischen Studien	15
1.4 Tet-off und In-Fusion System	16
1.5 Aufgabenstellung	18
<b>2. Materialien und Methoden</b>	20
2.1 Zelllinien und Bakterienstämme	20
2.2 Plasmide	21
2.3 Oligonukleotide	23
2.4 Antikörper	23
2.5 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien und Säugerzellen	24
2.6 Enzyme, Chemikalien, Lösungen, Kits, Verbrauchsmaterialien	25
2.7 Klonierungen mit dem Creator- und In-Fusion-System	26
2.7.1 Vermehrung und Analyse von Plasmiden	26
2.7.2 Anfügen der In-Fusion-Rekombinationsstellen	27
2.7.3 Einbringen von E1A in das Creator-System	28
2.8 Zellkultur und Analyse von Zellen	29

2.8.1 Zellkulturbedingungen	29
2.8.2 Aufbewahrung von Zellen	30
2.8.3 Herstellung von Tet-off-Zelllinien durch stabile Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit pTet-off	30
2.8.4 Auswahl der Klone	31
2.8.5 Ermittlung des HER-2-Status	32
2.8.6 Flusszytometrische Analyse der tetracyclinabhängigen EGFP-Expression	32
2.8.7 Transfektion von Zellen mit Plasmiden, die die für E1A kodierenden DNS enthalten, und Gewinnung stabiler Zellklone	33
2.8.8 Nachweis E1A-spezifischer RNS in den modifizierten Ovarialkarzinomzelllinien	34
2.8.9 Nachweis des E1A-Proteins durch Western Blotting	35
2.8.10 Proliferationsassay	37
<b>3. Ergebnisse</b>	38
3.1 Charakterisierung des Tet-off Systems	38
3.2 HER-2-Status	44
3.3 E1A Klonierung und Nachweis	45
3.4 Proliferationsassay	46
<b>4. Diskussion</b>	48
4.1 Tet-off: Ein geeignetes System zum Nachweis E1A spezifischer Effekte	48
4.2 Stabile regulierbare Expression des E1A	50
4.3 Optimierung der Bedingungen zur Induktion der E1A-Expression und des Nachweises durch Western Blot	52
4.4 Wirkung von E1A auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen	53
4.5 Ausblick	54
4.6 Schlussfolgerung	56
<b>5. Zusammenfassung</b>	57
<b>6. Literatur</b>	59
<b>Danksagung</b>	69

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
Ad 5	Adenovirus Serotyp 5
AS	Aminosäuren
BRCA	breast related cancer antigen
°C	Grad Celsius
Ca	Karzinom
CD	Leukozytenantigen (Cluster of differentiation)
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CR	Konservierte Regionen (Conserved regions)
CMV	Cytomegalie Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Doxy	Doxycyclin
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
E1A	Früh exprimierte Region 1A (Early region 1A)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
FACS	Flußzytometrie (Fluorescence-activated cell sorting)
FCS	Fötale Kälber Serum (fetal Calf serum)
G	Grading
g	Gramm
GnRH-Analoga	Gonadotropin Releasing hormone Analoga
h	Stunde
K	Klon
Kap.	Kapitel
l	Liter

LB Medium	Luria Bertani Medium
MammaCa	Mammakarzinom
MA	milliAmpere
μ	mikro
ml	Mililiter
mM	millimolar
min	Minute
mRNS	(messenger) Boten-ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OvCa	Ovarialkarzinom
OVMZ	Ovarzelllinie aus Mainz (Eigennamen)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PVDF-Membran	Polyvinylidene Fluorid
R1	Residualtumor mikroskopisch vorhanden
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
Tq	Thermophilus aquaticus
Tris-HCL	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-Hydrochlorid
tTA	tetracyclinkontrollierter Transaktivator
TRE	tetracycline response element
u. a.	unter anderem
UFK	Universitätsfrauenklinik Ulm
UV	Ultraviolett
upm	Umdrehungen per Minute
WST-1	water-soluble tetrazolium salt
wtE1A	Wildtyp E1A
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid

## 1. Einleitung

### 1.1 Ovarialkarzinom

#### 1.1.1. Allgemeines

Das Ovarialkarzinom steht in der Häufigkeit der Krebserkrankungen der Frau an sechster Stelle (dritthäufigstes Genitalneoplasma (Schmidt-Matthiesen et al. 2000)), ist jedoch mit einem Anteil von 6,6 % die vierthäufigste Krebstodesursache Westdeutscher Frauen. Im Vergleich aller gynäkologischer Malignome ist das Ovarialkarzinom mit der schlechtesten Prognose verbunden, wodurch die Erforschung der Ursachen und Therapie dieser Erkrankung seit Jahren unverändert enorme Herausforderungen darstellen.

Die durchschnittliche Mortalität der Erkrankung betrug Ende der neunziger Jahre in verschiedenen europäischen Ländern 3,6-15 (durchschnittlich 6)/100 000, am niedrigsten war sie in Mittelmeerländern, am höchsten in Dänemark und Großbritannien. Im Vergleich hierzu lag die weibliche Mortalität für Bronchialkarzinom bei 10/100 000, für Dickdarmkarzinome bei 13/100 000 und für das Mammakarzinom bei 20/100 000 (Levi et al. 2004). Vergleicht man jedoch die Fünfjahres-Überlebensraten der gynäkologischen Malignome Corpuskarzinom (76,5 %), Mammakarzinom (69,2 %) und Zervixkarzinom (61,1 %), so erkennt man beim Ovarialkarzinom einen mit 33,9 % deutlich geringeren Anteil aller Erkrankten (DKFZ Heidelberg Krebsatlas 2004).

#### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das Ovarialkarzinom ist eine typische Alterserkrankung mit einem Durchschnittsalter der an serösen Ovarialkarzinomen erkrankten Frauen zwischen 60 und 70 Jahren. Dazukommende Risikofaktoren sind zum Beispiel Mutationen in den Brustkrebs susceptibilitäts genen BRCA1 und BRCA2, belegt durch einen Zusammenhang zwischen einer familiären Häufung von Brustkrebs und einem nachfolgend erhöhten Risiko am Ovarialkarzinom zu erkranken (Chang-Claude et al. 1995; Claus et al. 1996). Tab. 1 zeigt das Risiko für die Entstehung von Ovarial- und Mammakarzinomen bei solchen Mutationen.

Tab. 1: Risiko für die Entstehung von Mammakarzinom (MaCa) und Ovarialkarzinom (OvCa) bis zu Lebensaltern von 50 bzw. 80 Jahren bei auffälligem BRCA1/2 (breast related cancer antigen) Befund (Schmutzler et al. 1999)

	MaCa (%)	OvCa (%)
<b>BRCA1</b>		
bis 50 Jahre	50	20
bis 80 Jahre	80-90	60
<b>BRCA2</b>		
bis 50 Jahre	30	0,4
bis 80 Jahre	80	30

Einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko scheint die Reproduktionsvorgeschichte zu haben; so scheinen mehrere durchgemachte Schwangerschaften sowie die dauerhafte Einnahme oraler Kontrazeptiva protektiv zu wirken. Die Langzeiteinnahme von Ovulationshemmern kann das Ovarialkarzinom-Risiko um 50 % und die Mortalität um 80 % senken (Whittemore et al. 1992; Vessey et al. 1995; Beral al.1999). Dies gilt insbesondere auch für die Fälle, in denen eine erbliche Komponente zum Erkrankungsrisiko beiträgt. So reduziert eine Pilleneinnahme von mehr als zwei Jahren das Risiko allgemein um 49 %, bei Frauen mit positiver Familienanamnese für Ovarialkarzinom sogar um 88 %. Auch die Verringerung der OvarialCa-bedingten Sterblichkeit bei Frauen im Alter von 35-64 Jahren im Zeitraum 1970-2000 wird ursächlich im Zusammenhang mit dem Einsatz oraler Kontrazeptiva gesehen (Bosetti et al. 2002).



### 1.1.3 Histologische Typen und Stadieneinteilung

Maligne Ovarialtumoren (Tab. 2) gehen meist vom Deckepithel aus (epitheliale Ovarialkarzinome, z. B. seröse Ovarialkarzinome), oder sind Keimstrang- bzw. Keimzelltumoren.

Tab. 2: Histologische Typen ovarieller Malignome und ihre Häufigkeit  
(Schmidt-Matthiesen et al. 2000)

<b>Epitheliale Ovarialtumore</b>	
Seröses Karzinom	40-53 %
Muzinöses Karzinom	7-15 %
Endometrioides Karzinom	15-20 %
Klarzelliges Karzinom	4-10 %
Undifferenzierte Tumoren	5-17 %
<b>Keimstrang/Keimdrüsenstroma-Tumore</b>	
Granulosazell-Tumore (gemischte Malignität)	3-4 %
Keimzell-Tumore	5 %
Dysgerminom	selten
Endodermaler Sinustumor	
Malignes Teratom	
Chorionkarzinome	

Die Stadieneinteilung ergibt sich aus der typischen Ausbreitung des Karzinoms vom kleinen Becken aus in den Peritonealraum (Tab. 3).

Tab. 3: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (Schmidt-Matthiesen et al. 2000)

I	begrenzt auf Ovarien
Ia	einseitig, Oberfläche frei
Ib	beidseitig, Oberfläche frei
Ic	Kapselruptur, Aszites oder positive Lavage
II	Ausbreitung im kleinen Becken
IIa	Beteiligung von Uterus und Tuben
IIb	weitere Lokalisation kleines Becken
IIc	Aszites-positive Lavage
III	Ausbreitung über kleines Becken hinaus
IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen, auch Leberkapsel
IIIb	Makroskopische Peritonealkarzinose, $\leq 2$ cm
IIIc	Peritonealkarzinose $> 2$ cm u./o. Lymphknotenbefall
IV	Fernmetastasen

#### 1.1.4 Klinik und Symptome

Neben unspezifischen Frühsymptomen sind es oft erst die Zunahme des Leibesumfangs durch Aszites und Tumor, Subileus, Ileus und Gewichtsabnahme, die zur Erkennung führen. Daraus folgt die meist späte Diagnose des Ovarialkarzinoms in späten, mit ungünstiger Prognose verbundenen Stadien: 40-50 % Stadium III, 15-20 % Stadium IV.

Das klassische epitheliale Ovarialkarzinom hat keine diagnoseweisende endokrine Aktivität, im Gegensatz zu den selteneren Granulosazelltumoren (östrogene Aktivität) oder Androblastomen (androgene Aktivität). Aufgrund des lange Zeit stummen Verlaufes und mangelnder Spezifität und Sensitivität prinzipiell geeigneter Verfahren (Tumormarker Ca 12-5, Vaginalsonographie) ist bis heute eine wirkungsvolle Früherkennung für diese Erkrankung nicht etabliert (van Nagell et al. 1990). Ein Großteil der Ovarialkarzinome geht früher oder später mit einer Erhöhung von CA12-5 einher (Berchuk et al. 1999), aber nur 50 % der frühen Stadien. Da andererseits auch nicht maligne Erkrankungen zu einer Erhöhung

dieses Tumormarkers führen können, dient er weniger zur Diagnosesicherung, sondern hauptsächlich zur Verlaufskontrolle oder für die Rezidivdiagnostik.

#### 1.1.5 Standardtherapie

Die primäre Progredienz oder das Rezidiv stellen immer eine therapeutisch problematische Situation dar, woraus folgt, dass der Erfolg der Primär-Therapie entscheidend ist. Die Behandlung des Ovarialkarzinoms gemäß Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe beginnt in der Regel mit der operativen Beurteilung und Entfernung des größten Teils der Tumormasse:

Die Staging-Laparotomie durch Längsschnitt mit Peritoneallavage und Abstrichen von den Zwerchfellkuppeln erlaubt die Beurteilung der Ausdehnung, worauf sich eine radikale Operation mit Hysterektomie, Entfernung beider Adnexe, Netzresektion, Appendektomie und Resektion von Peritoneum des kleinen Beckens mit dem Ziel der maximalen Tumorreduktion anschließt. In diesem Sinne kann auch die pelvine und paraaortale Lymphknotenentfernung (wenn eine R0-Resektion möglich ist) sowie gegebenenfalls eine erweiterte Chirurgie, zum Beispiel mit Darm- oder Milzresektion, erfolgen. Bei jungen Frauen und Stadium Ia kann zur Fertilitätserhaltung nur eine einseitige Adnexextirpation durchgeführt werden. Im Falle einer primären R1-Resektion und gutem Ansprechen auf die postoperative Chemotherapie kann darüber hinaus eine vollständige Tumorentfernung durch eine so genannte Interventionslaparotomie angestrebt werden. Eine Rezidiv-Operation wird nur bei einem Spätrezidiv (nach >12 Monaten) als sinnvoll betrachtet.

Bei den Stadien II–IV erfolgt in der Regel eine primäre postoperative Chemotherapie mit dem Standard Paclitaxel/Carboplatin. Eine Rezidiv-Chemotherapie ist palliativ, weshalb dabei die Beachtung der Lebensqualität wichtig ist. Bei Platin- oder Taxan-Resistenz (rezidivfreies Intervall nach Therapieende <6 Monate oder primärer Progress) kann eine zweite Alternativtherapie erfolgreich sein.

Die endokrine Therapie (Gestagene, Tamoxifen, GnRH-Analoga) wird nur als Zweittherapie eingesetzt mit Ansprechraten von maximal 20 %, allerdings verbunden mit vergleichsweise niedriger Toxizität.

Zum Einsatz einer Ganzabdomenbestrahlung ergibt sich angesichts der vergleichsweise schlechten Ergebnisse und stärkeren Nebenwirkungen keine Indikation.

#### 1.1.6 Prognosefaktoren

Das Rezidivrisiko wird in erster Linie von klinischen Faktoren bestimmt. Hierbei ist der wichtigste Faktor das Stadium und damit zusammenhängend der postoperative Tumorrest, dessen Größe direkt proportional zum Überleben ist (Bristow et al. 2002). So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium I 80-90 %, verschlechtert sich aber in den fortgeschrittenen Stadien dramatisch (Stadium III: 25-40 %, IV: 1 %) (Brun et al. 2000).

Als Patientenfaktoren gelten das Alter sowie der Allgemeinzustand, da ältere Frauen oft weniger radikal operiert werden und seltener die Standard-Chemotherapie erhalten. Weitere Faktoren sind der Nodalstatus und die präoperative Aszitesmenge: Patientinnen mit retroperitonealem Befall und großer Aszitesmenge haben eine deutlich schlechtere Prognose und profitieren von der retroperitonealen Lymphnodektomie (Benedetti-Panici et al. 1999).

Auf zellulärer Ebene spielt der histologische Differenzierungsgrad eine Rolle; G1 Tumoren haben ein nur minimales Rezidivrisiko (Dembo et al. 1990; Makar et al. 1995). Eine Mutation des p53-Suppressorgens kommt in 50 % der fortgeschrittenen Ovarial-CAs vor und ist ein Indikator für eine schlechte Heilungsaussicht. Kontrovers wird dagegen noch der Einfluss des HER-2/neu Status auf die Prognose diskutiert.

### 1.1.7 Probleme konventioneller Ovarialkarzinom-Therapie

Aus verschiedensten Gründen ist die Behandlung des Ovarialkarzinoms derzeit noch unbefriedigend.

Das erste Problem stellt der mangelnde Einsatz bewährter Therapie dar. Die radikale tumorreduktive Therapie wird oftmals nur unzureichend durchgeführt. Gründe hierfür sind primär sehr ausgedehnte Karzinome, ein unerfahrener Operateur, mangelnde interdisziplinäre Kooperation oder eingeschränkte Operabilität durch Co-Morbidität des Patienten. Auch wirksame Chemotherapeutika werden oft nicht ausreichend eingesetzt, ebenso wie die „Supportiv-Therapie“ bei toxischen Nebenwirkungen. Andererseits wird auch beim großzügigen Einsatz supportiver Maßnahmen das Erzielen einer wirksamen Chemotherapiedosis durch die Toxizität begrenzt. Als wesentliche limitierende Nebenwirkungen sind bei den Platinverbindungen die Hämato-, Nephro- und Neurotoxizität und bei den Taxanen die periphere Neuropathie zu erwähnen.

Eine grundsätzlich andere Ursache für das Versagen konventioneller Therapien ist die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz. Diese wird, mit unterschiedlichen Mechanismen, für alle eingesetzten Substanzklassen beschrieben (von Hugo et al. 1989; Howell et al. 1992). Die Behandlungsergebnisse bei Patientinnen, die als platinrefraktär eingestuft werden, sind deutlich schlechter (Markman et al. 1992; Du Bois et al. 1997).

Deshalb wird zunehmend über einen Wechsel der therapeutischen Ansätze für diese Patientengruppe nachgedacht, trotz steigender primärer Remissionsraten über die letzten Jahre: Unter Anthracyclintherapie knapp 40 %, nach Einführung der Platinanaloga bis zu 60 % und bis zu 70 % unter Chemotherapie mit Taxanen (Du Bois et al. 2003; Wagner 2004).

### 1.1.8 Moderne Therapieansätze

Im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie, die letztlich alle Körperzellen unselektiv trifft, verfolgen die neuen Therapievorstellungen das Ziel selektiver Eingriffe in die in Tumorzellen gestörten Signalwege. Die meisten neueren Ansätze konzentrieren sich entweder auf Oberflächenantigene oder auf die Hemmung der an intrazellulären Signaltransduktionswegen beteiligten Moleküle,

z. B. Tyrosinkinase oder Mitglieder der ras-Proteinfamilie, die innerhalb maligner Populationen oft verändert vorliegen.

In der Folge werden einige Beispiele dafür aufgezählt; verschiedene Übersichtsarbeiten (Kurzeder et al. 2006) bieten eine umfassende Darstellung neuer Therapieansätze:

- „Targeted therapy“: Inhibition der EGFR Rezeptortyrosinkinase (ZD1839 „Iressa“) (Baselga et al. 2002)
- Monoklonale Antikörper gegen CA12-5 (Wagner et al. 2001)
- bi-spezifische Antikörper gegen das T-Zellantigen CD3 sowie das Oberflächenantigen epCAM (Mack et al. 1997)
- Hemmung der Farnesyl-Transferase und Normalisierung aberranter Ras-Signalübermittlung in Kombination mit Chemotherapie (Adjei et al. 2001)

## 1.2 Prinzipien der Gentherapie

Kaum ein anderes Forschungsgebiet genießt im Moment solch breites öffentliches Interesse wie die Gentherapie und weckt dabei in großem Maße Hoffnungen und Ängste.

Als Gentherapie bezeichnet man das Einbringen von kodierenden und regulatorischen Nukleinsäuren in Zellen oder Zellverbände, durch deren Expression ein therapeutisch wirksames Protein entsteht. Im Gegensatz zur herkömmlichen Arzneimitteltherapie, bei der das Therapeutikum meist im ganzen System zur Wirkung kommt, können bei der Gentherapie oft bestimmte Zellen selektiv angesprochen werden. Zudem besteht die Möglichkeit durch Auswahl geeigneter Promotoren in den Expressions-Prozess regulierend einzugreifen.

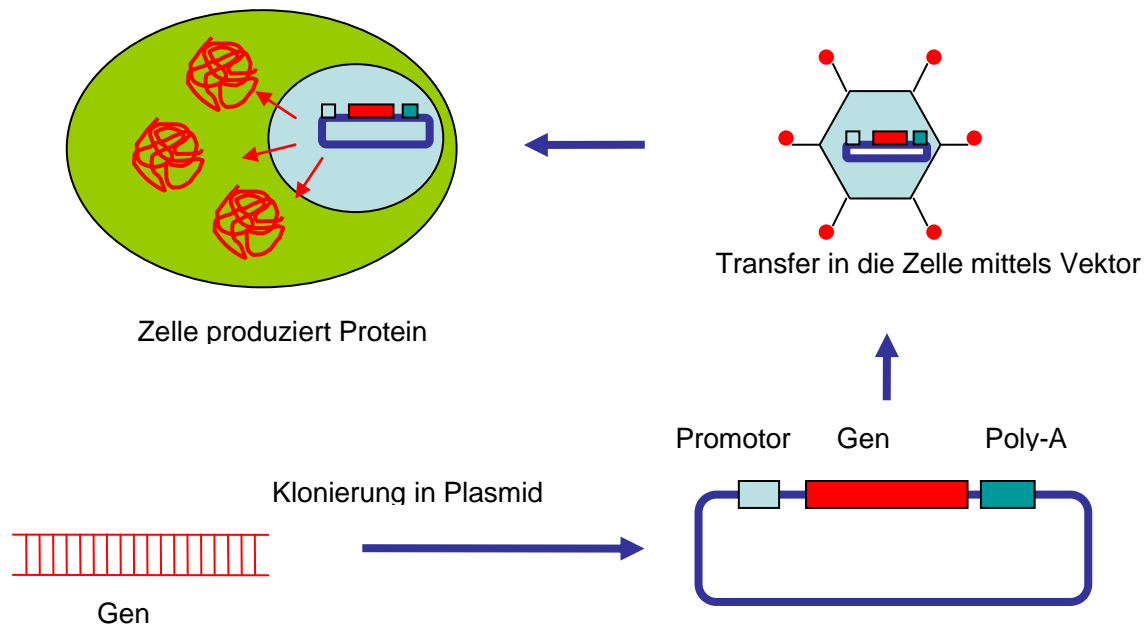


Abb. 1: Gentherapieprinzip (modifiziert nach Hallek et al. 2001)

Bisher wurden Gentherapiestudien bei malignen Erkrankungen, monogenen Erberkrankungen, Infektionen und kardiovaskulären Erkrankungen durchgeführt. Dabei stellen die Neoplasien den weitaus größten Anteil. Ein mögliches Ziel genterapeutischen Vorgehens ist es, die Tumorzelle so zu verändern, dass sie für das Immunsystem erkennbar wird. Das Ersetzen von defekten tumorsuppressiven Genen oder gar das Einbringen von für zytotoxische Proteine kodierenden Genen scheitert momentan noch an der zu geringen Selektivität der Vektoren.

Bei den monogenen Erberkrankungen gelingt es nur bei rezessiven Erkrankungen, zum Beispiel der Mukoviszidose, eine intakte Kopie neben dem defekten Gen zu platzieren. Bei dominanten Erkrankungen, bei denen die Krankheit allein durch Anwesenheit eines defekten Gens ausgelöst wird, ist eine effektive Therapie bislang noch in keinem Fall etabliert.

Für den Gentransfer stehen verschiedene als Vektoren bezeichnete Vehikel zur Wahl. Ein idealer Vektor verfügt neben der Fähigkeit, sicher und zielgenau das gewünschte Gewebe zu treffen, über eine hohe Selektivität, Übertragungseffizienz und eine große Beladungskapazität. Zudem sollte er keine Immunantwort auslösen und auch langfristig nicht toxisch wirken.

Man unterscheidet virale und nicht-virale Vektoren. Bei den viralen Vektoren nutzt man deren Fähigkeit, Gene dauerhaft in das menschliche Genom zu integrieren. Gleichzeitig beraubt man die Viren pathogener oder schädigender Sequenzen, sowie der Fähigkeit, sich zu vermehren. Durch Einbringen des Therapiegens entsteht ein sogenanntes rekombinantes Virus.

Adenovirus, AAV (Adeno-assoziiertes Virus) und verschiedene Retroviren sind die am häufigsten genutzten viralen Vektoren, die sich fast alle durch eine stabile genomische Integration und eine hohe Effizienz des Gentransfers auszeichnen, gleichzeitig aber nur eine geringe Selektivität und eine begrenzte Beladungskapazität haben. Die geringe Selektivität stellt eines der Hauptprobleme dar, welchem man u. a. durch Modifikation der Virushülle („retargeting“) und damit Erhöhung der Selektivität für bestimmte Gewebe beizukommen versucht.

Für die nicht-viralen Vektoren benutzt man beispielsweise Liposomen, d. h. man verpackt das Gen in einen lipophilen und damit zellmembranpermeablen Komplex, oder man injiziert die DNS direkt in die Zelle. Beide Methoden zeichnen sich zwar durch eine kaum begrenzte Beladungskapazität und einfachere Handhabung aus, allerdings wird das Gen ohne Selektionsdruck nicht dauerhaft in die Zielzelle integriert und auch Selektivität und Effizienz sind meist gering.

### 1.3 Das adenovirale E1A Protein

#### 1.3.1 Adenoviren

Das menschliche Adenovirus gehört zu den unbehüllten Doppelstrang-DNS-Viren und hat einen Durchmesser zwischen 70 und 80 nm. Man unterscheidet 51 verschiedene Serotypen, die sich durch unterschiedliche Capsid-Oberflächenantigene auszeichnen. Obwohl eine onkogene Transformation von Zellen für einige Serotypen in vitro nachgewiesen wurde, konnten Adenoviren trotz intensiver Suche nicht mit Malignomen beim Menschen assoziiert werden (Branton et al. 1985). Als hochonkogen gilt der Serotyp 12, die Serotypen 2 und 5 zeichnen sich dagegen durch ein eher schwaches bis nicht vorhandenes onkogenes Potential aus.



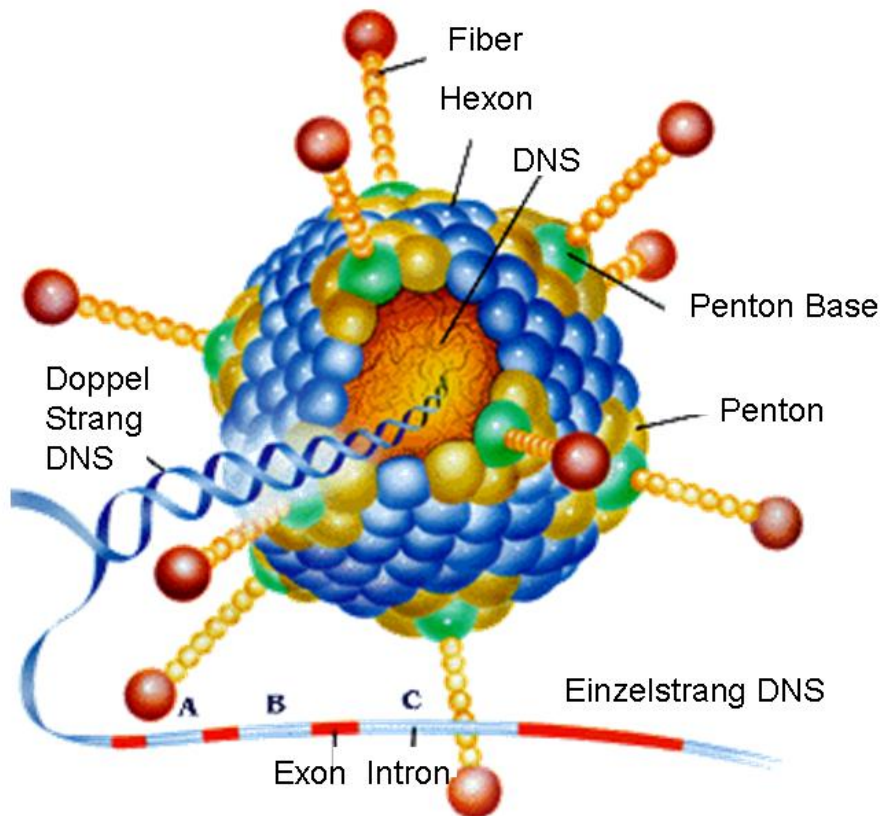


Abb. 2: Modell eines Adenovirus (modifiziert nach Medicine Nobel Poster 1993)

Adenoviren werden durch Tröpfcheninfektion sowie fäkal-oral auf den Menschen übertragen und für etwa 10 % der akuten Atemwegserkrankungen bei Kindern verantwortlich gemacht. Fast 100 % aller Erwachsenen haben Antikörper gegen die Serotypen 1, 2, 3 und 5.

Als klinische Erscheinung einer erfolgten Infektion treten Rhinitiden, Bronchiolitiden, febrile Pharyngitiden und Pneumonien auf. Speziell die Serotypen 8, 19 und 37 werden für epidemisch auftretende, hochinfektiöse bilaterale Keratokonjunktivitiden verantwortlich gemacht, die mit Fieber und einer zervikalen Adenopathie einhergehen und spontan nach 1-2 Wochen ausheilen (Kasper et al. 2005).

Seltener werden Adenoviren mit Krankheiten außerhalb des Respirationstraktes, besonders bei immunsupprimierten Patienten, in Verbindung gebracht.

### 1.3.2. Das E1A Gen

E1A (Early Region 1A) ist ein DNS-Abschnitt des humanen Adenovirus Serotyp 5, der für zwei Proteine mit 289 bzw. 243 Aminosäuren kodiert. Diese beiden Proteine, die die ersten beiden viralen Produkte sind, die nach einer Infektion in der Wirtszelle synthetisiert werden, sind bis auf eine 46 Aminosäuren lange Sequenz („unique region“, kodiert für einen „Zink Finger“, Abb. 3) identisch (Mymryk 1996; Deissler und Oppalka 2006).

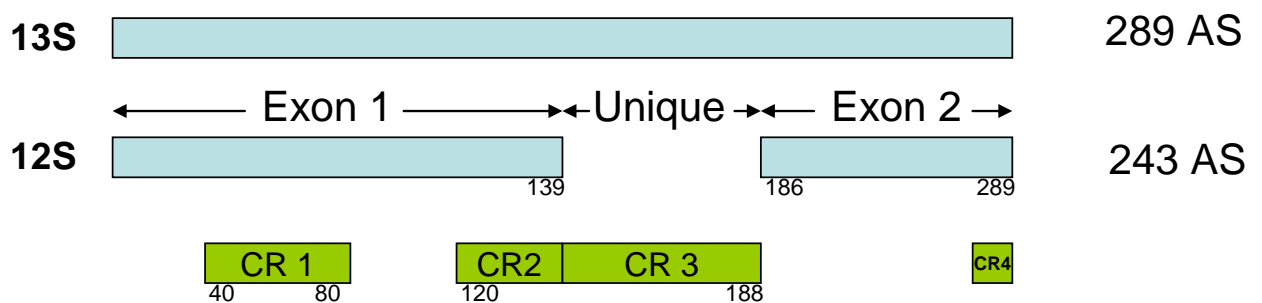


Abb. 3: Aufbau des E1A (Early region 1A)Gens: Vergleicht man die E1A Sequenzen verschiedener Serotypen des Adenovirus, so findet man immer vier Regionen („Conserved region“ CR 1, 2, 3 und 4), in denen die Sequenz zu einem hohen Maße konserviert vorliegt (modifiziert nach Oppalka 2006) AS = Aminosäuren.

E1A ist ein seit langem untersuchtes Protein, für das multiple Wirkungen und Interaktionen in menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnten, weswegen sich diese Einleitung auf die wichtigsten und für die Arbeit relevantesten Funktionen beschränken muss.

Die Hauptfunktion von E1A in infizierten Zellen ist die Aktivierung der viralen Gentranskription und die Reprogrammierung der zellulären Genexpression, um eine optimale Umgebung für die Virusreplikation zu schaffen. E1A kann sowohl Transkription aktivieren als auch unterdrücken, Zellzyklusveränderungen vornehmen und die Differenzierung blockieren.

Es ist E1A in Kombination mit einem weiteren Onkogen möglich (zum Beispiel Adenovirus E1B und/oder aktiviertem ras) adhärente Primärkulturen von Nagerzellen zu immortalisieren und zu transformieren.

Überraschenderweise kann E1A aber in verschiedenen Tumorzelltypen auch als Anti-Onkogen wirken und dem malignen Phänotyp entgegenwirken sowie die

Wirtszelle gegenüber der Wirkung von TNF (Tumor Nekrose Faktor) und der zellulären Immunabwehr sensibilisieren. Als Beispiele seien hier die beiden Onkogene ras und c-erbB2/neu (oder auch bekannter als HER-2/neu) genannt (Yu et al. 1994), deren Transkription durch E1A vermindert werden kann. Für eine tumorsupprimierende Wirkung ist die Fähigkeit von E1A, Apoptose zu induzieren oder proapoptotische Einflüsse zu verstärken von besonderer Bedeutung.

### 1.3.3 Mechanismen der E1A Wirkungen

E1A entfaltet seine Wirkung nicht über eine direkte DNS-Bindung, sondern interagiert mit einer großen Anzahl von zellulären Proteinen, die bei der Genexpression Kontrollfunktion ausüben und deren normale Funktion durch die Bindung von E1A verändert oder inhibiert wird. Als Beispiele sollen hier nur das „CREB binding proteine“ CBP (Arany et al.1995), p300 (Eckner et al. 1994) und pRB (Whyte et al. 1988) genannt werden.

Einzelne Funktionen und Wirkungen konnten den konservierten Regionen des E1A zugeordnet werden. So zeigte Haley (1984), dass CR3 wohl einen suppressiven Effekt auf juvenile Ratten-Nieren-Zellen hat, da es ohne diese Region 150-mal häufiger zu einer malignen Transformation kommt. Außerdem induziert E1A eine Akkumulation des p53 Tumorsuppressorgen-Produkts (Chiou et al.1994), in dem es einerseits die p53 Transkription induziert und andererseits die Stabilität des Proteins erhöht.

Ein weiterer bekannter Effekt ist, dass durch E1A immortalisierte Primärkulturen nicht über die Fähigkeit zur Metastasierung verfügen. E1A erhöht hierbei einerseits die Zell-Zell Adhäsion durch Expressionssteigerung der für die Adhäsion wichtigen Cadherine (Frisch 1994), andererseits wird die Expression von Metalloproteasen, die Tumorzellen zur Überwindung der Basalmembran dienen, vermindert (Linder et al. 1992).

Zusätzlich entfaltet E1A einen Teil seiner tumorsuppressiven Wirkung über eine Anregung der zellulären Immunabwehr. So macht es wahrscheinlicher, dass Tumorzellen von natürlichen Killerzellen lysiert werden. Zusätzlich wirken auf der Zelloberfläche an MHC I (Major histocompatibility complex) gebundene virale Bestandteile als Liganden für den T-Zell-Rezeptor von zytotoxischen CD8 T-Lymphozyten (Urbanelli et al. 1989).

#### 1.3.4 E1A und Apoptose

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein aktiver Prozess, bei dem die Zelle ihre eigene Zerstörung einleitet. Dies dient zur Regulierung der Zellzahl und verhindert durch Elimination die Vermehrung geschädigter Zellen.

Beide großen E1A-Proteine können, vor allem in Anwesenheit von intaktem p53 in einer großen Anzahl verschiedener Zelltypen Apoptose induzieren (Mymryk und Bayley 1994). Vermutlich wird dieser Effekt bei dem Protein mit 289 Aminosäuren durch Spaltung und Inaktivierung einer Poly-ADP-Ribose-Polymerase (Boulakia et al. 1995) erreicht, bei dem kleineren E1A-Protein (243 AS) wird dies wahrscheinlich durch eine Proliferationsblock erreicht, der unweigerlich zur Apoptose führt.

In vivo wird die Apoptose durch Anwesenheit des adenoviralen E1B-Proteins verhindert, was eine Erklärung für die notwendige Anwesenheit beider Proteine für eine maligne Transformation bietet. Ebenso ist es E1A möglich, die anti-apoptotische Wirkung des Philadelphiachromosomenproduktes BCR-ABL aufzuheben, welches für die chronisch-myeloische Leukämie verantwortlich ist (Stiewe et al. 2000). Zusätzlich sensibilisiert E1A Zellen gegenüber der Wirkung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (Chen et al. 1987), ein Interleukin, welches die apoptotische und die nekrotische Form der Zellyse induzieren kann.

Yu und darauf folgend Yan gelang der Beweis, dass durch E1A die Expression von HER-2/neu in SKOV3 Zellen und damit deren Fähigkeit zur Proliferation und Koloniebildung vermindert werden kann (Yu et al. 1990, Yan et al. 1991).

In vivo wurden zusätzlich zu den durch E1A vermittelten anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekten eine Hemmung der Neoangiogenese (Shao et al. 2000) sowie eine Sensibilisierung von T-Killer Zellen (Cook et al. 2003) beobachtet.

Außerdem erhöht E1A die zytotoxischen Effekte konventioneller Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil, Adriamycin, Cisplatin und Doxorubicin sowie von Bestrahlung (Lowe et al. 1993). Durch die Überexpression von HER-2/neu wird dieser Effekt noch verstärkt. Ebenso konnten Mammakarzinomzelllinien gegenüber der Wirkung von Taxan-induzierter Apoptose sensibilisiert werden, vermutlich über eine Inaktivierung von den anti-apoptotisch wirksamen Modulatoren AKT und p38 (Liao et al. 2003).

### 1.3.5 E1A in klinischen Studien

Die apoptotische und immunsensibilisierende Wirkung von E1A auf Tumorzellen wurde schon im Tierversuch sowie in einigen klinischen Studien untersucht.

Routes et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass E1A exprimierende Sarkomzellen von immunkompetenten Mäusen eliminiert werden konnten, nicht aber von immuninkompetenten (Routes et al. 2000). Allerdings wurden die meisten Studien von E1A-Wirkungen auf menschliche Tumoren an T-Zell defizienten Nacktmäusen gemacht, weswegen die tumorabstoßende Wirkung von E1A exprimierenden Zellen eher unterschätzt wurde und es im Menschen möglicherweise zu einem Synergieeffekt von ungerichteter und spezifischer Immunabwehr kommt (Cook und Routes 2005).

Ebenso zeigten Mäuse mit artifiziell erzeugtem Ovarialkarzinom eine deutlich längere Überlebenszeit nach E1A Behandlung (Yu et al. 1995), zusätzlich wurde der wie bereits in den *in vitro* Experimenten gesehene Synergieeffekt bei der Behandlung mit Paclitaxel beobachtet (Liao et al. 2004). Bis zu der Dosis von 120 µg DNS bei wiederholter Gabe wurden keine Toxizität oder „adverse effects“ beobachtet.

Hung et al. gelang es in einer Phase 1 Studie, E1A mit Hilfe eines intraperitoneal gegebenen kationischen Liposomenkomplexes bei Patienten mit fortgeschrittenem HER-2/neu positiven Ovarial- oder Mammakarzinomen einzubringen. Beobachtet wurde, dass bei allen sechs Patienten sich die immunhistochemisch gemessene Expression von HER-2/neu auf der Zelloberfläche und die im Serum gemessenen Tumormarker verringerten bei im allgemeinen guter Verträglichkeit und ohne, dass es zu schwerwiegenden Therapiezwischenfällen kam (Hung et al. 2000).

Einen ähnlichen Studienaufbau wählte Madhusudan, allerdings gelang es in diesem Fall nur bei 18 % der Patienten, die HER-2/neu Expression zu vermindern (Madhusudan et al. 2004). Bei der Einzigen bisher mit E1A durchgeführten Phase II Studie an Patienten mit einem nicht resektablen Plattenepithelkarzinomrezidiv im Kopf/Hals Bereich konnte allerdings nur ein moderates Ansprechen auf die intratumoral gegebene Therapie beobachtet werden (Villaret et al. 2002). Hierbei konnten in 10 % der Patienten durch E1A

eine komplette Remission erreicht werden, bei weiteren 20 % wurde eine partielle Remission erzielt.

Gegenwärtig werden Patienten mit platinresistenten Ovarialkarzinomen am MD Anderson Cancer Center in eine Phase I Studie rekrutiert, gezeigt werden soll der zuvor erwähnte Synergieeffekt von liposomalem E1A und Paclitaxel.

#### 1.4 Tet-off und In-Fusion System

Bei der Einschleusung von tumorsuppressiven Faktoren in Zellen mit dem Ziel einer stabilen langfristigen Expression, ergibt sich folgendes grundsätzliches Problem: die tumorsuppressive Sequenz fördert die Apoptose, behindert oder verhindert damit die Zellvermehrung. Für Versuche der funktionellen Charakterisierung und Analyse grundlegender molekularer Mechanismen sind jedoch größere Zellzahlen, die sich nur durch stabile exprimierende transfektante Linien gewinnen lassen, nötig.

Um dieses Problem zu lösen setzt man Systeme ein, die die eingeschleusten Gensequenzen nach Vermehrung der Zellen erst ab einem gewissen Zeitpunkt zur Wirkung bringen, sozusagen „einschalten“. Ein solches Schaltersystem, das Tet-off System, wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Das Tet-off System, erstbeschrieben von Gossen (Gossen und Bujard 1992), besteht aus einer prokaryotischen, ursprünglich aus E-Coli stammenden Geneexpression bewirkenden Promotersequenz. Im Gegensatz zum Tet-on System, bei dem durch Zugabe des Antibiotikums Tetrazyklin (oder von Tetrazyklinderivaten) eine gewünschte Sequenz angeschaltet wird, bedeutet beim Tet-off System die Zugabe von Tetrazyklin eine Hemmung und erst durch Entfernung des Antibiotikums aus dem Kulturmedium kommt die Aktivierung des zu exprimierenden Gens zustande. In dieser Arbeit wurde wegen dessen höherer Stabilität ausschließlich das Tetrazyklinderivat Doxycyclin (Abb. 4) eingesetzt.

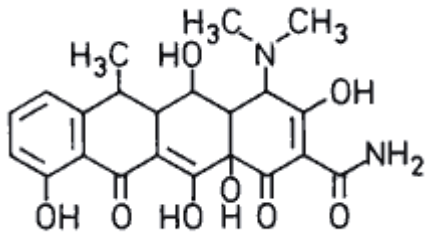


Abb. 4: Strukturformel von Doxycyclin

Die Entscheidung für die Verwendung des Tet-off Systems zur Untersuchung von E1A-Effekten beruhte darauf, dass eine mögliche Apoptoseinduktion durch E1A zunächst durch Zugabe von Doxycyclin in der Wachstumsphase vermieden werden kann.

Das Tet-off System besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: die erste ist das Regulatorprotein, ein Fusionsprodukt aus den ersten 207 Aminosäuren des prokaryotischen Tet-Repressors und den C-terminalen 127 Aminosäuren der Herpes Simplex-Virus VP16 Aktivierungsdomäne (Hillen und Berens 1994), das die Funktion eines tetrazyklinabhängigen Transkriptionsaktivators besitzt. Dieses Hybridprotein **tTA** (tetracycline controlled **trans**activator) wird auf dem **pTet-off**-Regulatorplasmid kodiert, das außerdem noch eine Neomycin-Resistenz vermittelt, welche die Selektion der transfizierten Zellen ermöglicht.

Die zweite wichtige Komponente ist das "response plasmid" (**pTRE**), das die Expression des gewünschten Genes (in diesem Fall E1A) durch das „tetracycline response element“ (**TRE**) kontrolliert.

Das TRE befindet sich direkt vor einem minimalen CMV Promotor (P<sub>min</sub>CMV), der also erst aktiviert wird, wenn der Komplex aus dem Regulator Protein tTA und Doxycyclin an TRE bindet (Abbildung siehe Material und Methoden).

Das Tet-off System hat mehrere Vorteile gegenüber anderen eukariotischen Expressionssystemen:

- Eine niedrige Hintergrunds-Expression ohne Regulator
- Eine hohe absolute Expressions-Menge
- Mit Doxycyclin ein billiges, gut verträgliches und bekanntes Induktions-Agenz
- Kaum Interferenz mit anderen Regulatoren und Induktoren durch die Benutzung einer prokariotischen Sequenz

Das ebenfalls von der Firma Clontech vertriebene In-Fusion-System vereinfacht die Klonierung von PCR (Polymerasekettenreaktion)-Produkten und die Einbringung dieser in Vektoren, da es ohne spezifische Restriktionsenzyme und Ligasen auskommt. Dabei wird zuerst die gewünschte cDNS in einen pDNR-Dual Vektor (siehe Kap. 2: Materialien und Methoden) eingebracht und kann davon ausgehend direkt über eine Cre-loxP-Rekombinasereaktion in einen beliebigen Acceptor-Vektor (in diesem Fall der das TRE enthaltende pLP-TRE2) übertragen werden.

### 1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zur induzierbaren Expression des adenoviralen E1A-Proteins in menschlichen Ovarialkarzinomzelllinien zu etablieren, das Folgeuntersuchungen zum Mechanismus der Induktion von Apoptose in diesen Zellen erlaubt. Wesentlicher Teil der Arbeiten bestand in der Herstellung von bisher nicht verfügbaren modifizierten Zelllinien, die den tetrazyklinabhängigen Transkriptionsaktivator exprimieren und in der Optimierung der Induktionsbedingungen. Abschließend sollte das System zur Expression von wtE1A in einer ersten funktionellen Untersuchung eingesetzt werden, um eine E1A-Wirkung auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzellen zu analysieren



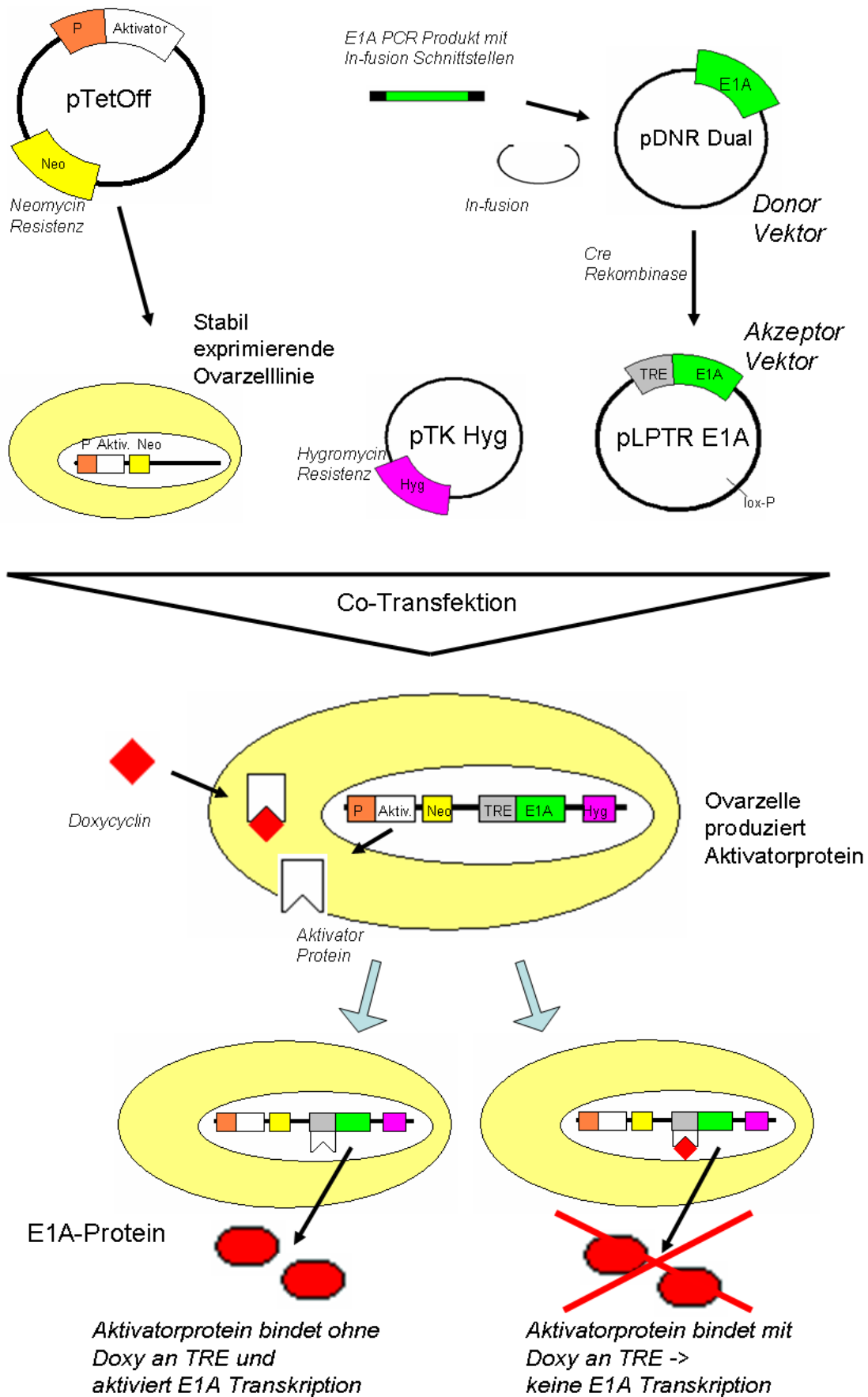


Abb. 5: Flussdiagramm Klonierungsschritte dieser Arbeit, TRE: tetracycline response element; E1A early region 1A, PCR: Polymerase Ketten Reaktion)

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

XL1-Blue Kanamycinresistenter E-coli-Stamm, besonders geeignet für Vektoren, bei denen das Einfügen eines „Inserts“ eine Galaktosidasesequenz unterbricht. Dies verhindert die Umsetzung eines Galaktosesubstrats zu einem Farbstoff und lässt daher eine Unterscheidung potentiell richtiger Kolonien von Bakterien, die nur leere Vektoren enthalten, zu. Superkompetente XL1-Blue-Bakterien wurden von Stratagene (Heidelberg) bezogen.

HEK 293 Humane embryonale Nierenepithelzelllinie, die durch Einführung der E1a und E1b Gene von Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurde diente als E1A exprimierende Positivkontrolle.

Ovcar 3 Epitheliale Zelllinie eines menschlichen ovariellen Adenokarzinoms (aus Ascites gewonnen (Hamilton et al. 1983)); die von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville; USA) bezogen wurde.

SKOV 3 Epitheliale Zelllinie, aus Aszites eines menschlichen ovariellen Adenokarzinoms, die ursprünglich von ATCC bezogen worden war.

Die folgenden Zelllinien (Tab. 4) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Moebus im EOL der Universitätsfrauenklinik Ulm aus Ascites von Ovarialkarzinompatientinnen generiert und sind dort der Zell- und Gewebebank entnommen worden.

Tab.4: In dieser Arbeit verwendete hauseigene Ovarialkarzinomzelllinien

Zelllinie	Histologische Klassifikation des Ursprungstumors	Grading	FIGO-Stage
OV MZ 4	serös-papillär	nicht bekannt	III
OV MZ 8	entdifferenziert	III	III
OV MZ 27	serös-papillär	II	III

## 2.2 Plasmide

Die der 12S-mRNA des Adenovirus 5 E1A entsprechende cDNA wurde im Vektor pRc/CMV von Prof. B. Oppalka (Essen) zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Plasmide (Abb. 6-10) wurden alle von der Fa. Clontech/BD Biosciences, Heidelberg bezogen und in Bakterien in ampicillinhaltigen Medien vermehrt.

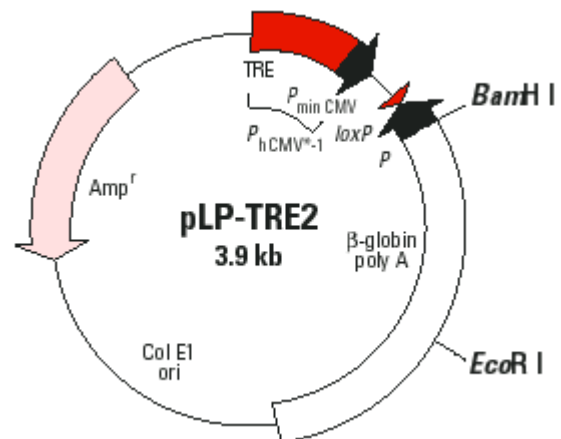


Abb. 6: pTet-Off: Trägt die kodierende Sequenz für den tetrazyklinabhängigen Aktivator, der ohne Tetrazyklin an „tetrazyclin-response element“ (TRE) und loxP den Promoter bindet. Neo: Neomycin Resistenz, Amp: Ampicillin Resistenz ( Alle Fa. Clontech, user manual)

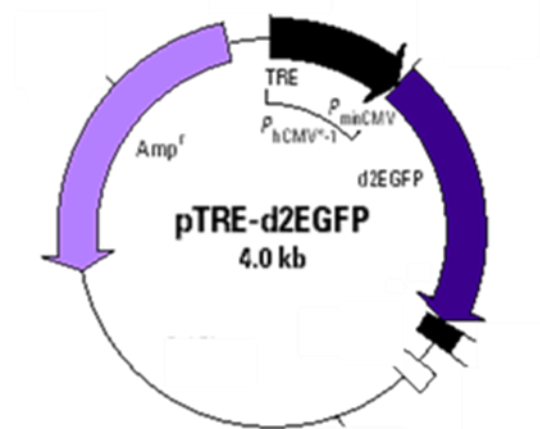
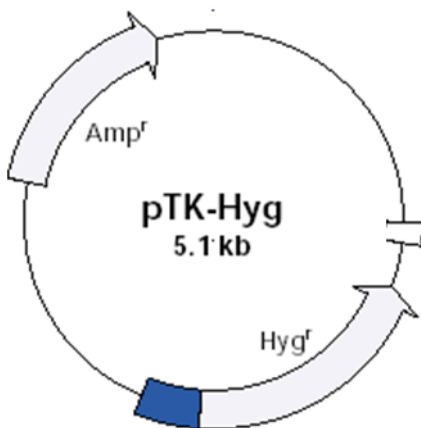


Abb. 8: pTK-Hyg: Hygromylinresistenz-vermittelndes Plasmid zur Co-Transfektion, Amp: Ampicillin Resistenz

Abb. 9: pTRE-d2EGFP: Enthält EGFP (enhanced green fluorescent protein), Amp: Ampicillin Resistenz

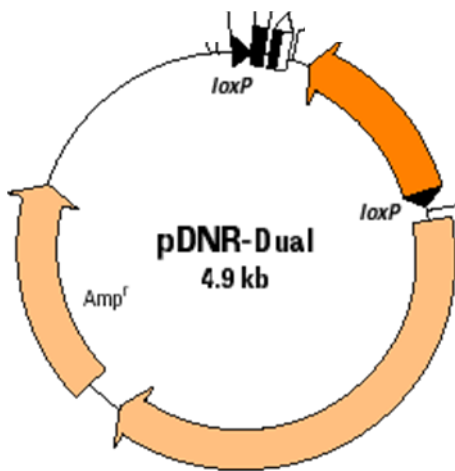


Abb. 10: pDNR-Dual: Donorvektor im Creator-System zur initialen Klonierung. Dieser Vektor enthält zwischen den *loxP* Schnittstellen eine Chloramphenicolresistenz vermittelnde Sequenz, die dann zusammen mit der einklonierten Sequenz auf das Akzeptorplasmid übertragen und dabei aktiviert wird. Dies erlaubt eine Selection geeigneter Klone. Amp = Ampicillin Resistenz

## 2.3 Oligonukleotide

Alle als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Sequenzierungen verwendeten synthetischen Oligonukleotide stammen von Biomers oder Thermo (beide Ulm).

Sequenzierprimer zur Analyse:

Dual-SR1: 5'-ACC AGG ATC TCC TAG GCT AGT TG-3'

Dual-SF1: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA TC-3'

PLPTRE-314F: 5'-TCG AGT AGG CGT GTA CGG TG-3'

Primer für die In-Fusion-Klonierung:

E1A-ATG-IF: 5'-GAA GTT ATC AGT CGA CCT CCG AGC CGC TCC GAC AC-3'

E1A-Stop-IF1: 5'-ATG GTC TAG AAA GCT TTT TAC ACC TTA TGG CTT GGG GC-3'

E1A-spezifische Primer für die konventionelle PCR:

E1A-ATG1: 5'-CTC CGA GCC GCT CCG ACA C-3'

E1A-STOP1: 5'-TTT ACA CCT TAT GGC CTG GGG C-3'

E1A-spezifische Primer für die quantitative Echtzeit-PCR (TaqMan-Verfahren)

E1AGT-Probe: 5'-(FAM)ACA AGA CCT GCA ACC GTG CCC(TAMRA)-3'

E1AGT-F1: 5'-CCA GTG ACG ACG AGG ATG AA-3'

E1AGT-R1: 5'-CCG TAT TCC TCC GGT GAT AAT G-3'

## 2.4 Antikörper

Verwendet wurden gereinigte monoklonale anti-Adenovirus Typ 5 E1A-Antikörper der Firmen BD Biosciences (Klon M58) und Upstate (Lake Placid; USA; Klon M 73), sowie ein HRP-konjugierter Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper von Pierce, Rockford; USA.

## 2.5 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien und Säugerzellen

### LB Medium (Luria-Bertani Medium)

10 g	Tryptan
5 g	Fleischextrakt
10 g	NaCl

Die Mediumkomponenten wurden in 950 ml entionisiertem Wasser gelöst und mit Natronlauge ein pH von 7,0 eingestellt. Nach Auffüllen auf 1 Liter wurde 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die Zugabe eines Antibiotikums (z. B. 75 µg/ml Ampicillin) erfolgte unmittelbar vor Verwendung.

### LB Agar (Zum Gießen von Bakterienkulturplatten)

LB Medium wurde 20 g/l Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe eines Antibiotikums (z. B. 75 µg/ml Ampicillin) erst nach Abkühlen auf ca. 55 °C, bevor Petrischalen ausgegossen wurden.

### SOC Medium

20 g	Tryptan
5 g	Fleischextrakt
0,5 g	NaCl
20 ml	Glucoselösung (1 M)
10 ml	KCl Lösung 250 mM

Die Mediumkomponenten wurden in 950 ml entionisiertem Wasser gelöst und mit Natronlauge ein pH von 7,0 eingestellt. Nach Auffüllen auf 1 Liter wurde 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und anschließend noch 5 ml einer 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung dazugegeben.

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle's Medium) wurde von PAA Laboratories (Pasching; Österreich) bezogen und pro 500 ml ergänzt mit:

5 ml	Penicillin/Streptomycin (10 000 IE/ml, PAA)
50 ml	“Tet system-approved” fötales Kälberserum (FCS, Clontech/BD Biosciences)

5 ml Arginin- (11,6 g/l)/Asparagin-(3,6 g/l) Lösung  
und gegebenenfalls  
5 ml Hygromycin B in PBS (50 mg/ml, Invitrogen)  
5 ml G418, ein Neomycinsulfatderivat (10 mg/ml, Invitrogen)  
500 µl Doxycyclin (10 mg/ml, Apotheke des Universitätsklinikums Ulm)

Trypsin/EDTA (1:250) und PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) für die Zellkultur wurden als Fertiglösungen von PAA bezogen, DMSO-haltiges Einfriermedium von MP Biomedicals, Eschwege.

## 2.6 Enzyme, Chemikalien, Lösungen, Kits, Verbrauchsmaterialien

### Für Western Blot-Analysen

8-16 % „Precise Protein Western Blot Gel (Pierce Chemical Company, Rockford; USA)

Solubilisierungsgrundpuffer: 40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl

Proteaseinhibitor-Mischung „Complete Mini EDTAfree“ (Roche Diagnostics, Mannheim; 1 Tablette auf 10 ml Puffer).

Triton X-100 (Sigma, Steinheim)

Protein-Größenstandard „PAGERuler“ (Fermentas, St. Leon-Roth)

Blotting-Puffer I: 300 mM TrisCl, 20 % Methanol (pH 10,4)

Blotting-Puffer II: 25 mM TrisCl, 20 % Methanol (pH 10,4)

Blotting-Puffer III: 25 mM TrisCl, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure (pH 9,4)

PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran „Fluorotrans“ (0,2 µm, Pall, Portsmouth; England)

„SuperSignal West Dura“ Detektionsreagenz und

„SuperSignal West Dura“ stabiler Peroxidpuffer (beide von Pierce)

### Für die PCR

TaqMan Universal PCR Master Mix, Multiscribe Reverse Transkriptase, Taq-Polymerase, Nukleotidmix Stratagene La Jolla; USA/Invitrogen

## Für Klonierungen in Plasmidvektoren

In-Fusion PCR Cloning Kit, BD Biosciences

BD-Creator pDNR-Dual Kloning Kit, BD Biosciences

X-GAL Lösung (40 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosidase in Dimethylformamid)

IPTG Lösung (XX mg/ml Isopropyl- $\beta$ -D-galaktosidase in Wasser)

## Geräte

UV-Spektrometer UV-DU 640 von Beckmann Coulter, Krefeld

Biofuge Primo R und Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

Hera Freeze - 80 °C-Gefrierschrank, Heraeus

NSF 49 Sterilwerkbank, Nunc, Wiesbaden

Mikroskop IX 50, Olympus, Hamburg

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 25 mit Mikroskopleuchte HBO 50 und Filtersatz 15 488015-0000, Zeiss, Jena

GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Waltham; USA

Steri-Cult-Brutschränke, Labotect, Göttingen

ABI PRISM 7700 Sequenzdetektor, Applied Biosystems, Foster City; USA

FACSCalibur Flusszytometer mit Software CellQuest Pro, BD Bioscience

MRX ELISA-Reader; Dynatech Laboratories, Chantilly; USA

Gelkammern, Invitrogen

## 2.7 Klonierungen mit dem Creator- und In-Fusion-System

### 2.7.1 Vermehrung und Analyse von Plasmiden

Die für die 12S-mRNA des E1A und davon abgeleitete Deletionsmutanten enthaltenden Plasmide (B. Opalka, Essen) wurden in E-coli-Bakterien vermehrt.

In einem ersten Schritt wurden die Plasmide in superkompetente E-coli XL1-Blue eingebracht. Dazu wurden die Bakterien mit 10 ng des Plasmids gemäß Herstellerprotokoll (Stratagene) transformiert und eine Stunde in SOC-Medium bei



225 upm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten ausplattiert, die je nach Vektorresistenz 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin oder eine Kombination aus 30 µg/ml Chloramphenicol und 7 % Saccarose enthielten. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden einzelne Kolonien anschließend in eine 5ml-Vorkultur in LB Medium (mit Antibiotikum) überführt, aus welcher nach 8-10 Stunden Inkubation bei 37 °C/225 upm 500 µl zum Animpfen der Hauptkultur (125 ml, gleiches Medium) entnommen wurden. Diese wurde weitere 12-16 Stunden bei 37°C/225 upm inkubiert, bevor die Plasmide mit Hilfe eines Plasmid-Mini-Kits (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben aus den Bakterien isoliert wurden. Durch Messen der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm wurden die Plasmidmenge bestimmt (1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 µg/ml dsDNA) und die Qualität (gut bei E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub>=1,8-2,9) beurteilt.

Durch eine Sequenzierung mit den Sequenzierprimern Dual-SF1 und Dual-SR1 wurden in Creator-Donorvektoren inklonierte Inserts grundsätzlich verifiziert.

### 2.7.2 Anfügen der In-Fusion-Rekombinationsstellen

Mit Hilfe von entsprechend verlängerten PCR-Primern wurden PCR-Produkte gewonnen, die unter Einwirkung der In-Fusion-Rekombinase mit linearisiertem pDNADual rekombinieren und so das Einfügen der E1A-Sequenzen in diesen Vektor ermöglichen.

Mit 1 ng des Ausgangsplasmids und den Primern E1A-ATG-IF und E1A-STOP-IF wurde eine 2-phasige PCR mit fehlerkorrigierenden Pfx-Polymerase durchgeführt. Hierfür wurde das Standardprotokoll für Pfx-Polymerase (Invitrogen) mit folgender Spezifikation für einen 50 µl-Ansatz verwendet:

5,0 µl	10-fach Pfx-Amplifikationspuffer
1,5 µl	10 mM dNTP-Mischung
1,0 µl	50 mM MgSO <sub>4</sub>
0,8 µl	Platinium Pfx-Polymerase
1,5 µl	Primer E1A-ATG-IF, 10 pmol/µl
1,5 µl	Primer EV1A-STOP-IF1, 10 pmol/µl
1,0 µl	wtE1A-enthaltendes Plasmid, 1 ng/µl
39,7 µl	Wasser

Die PCR-Bedingungen waren:

94 °C, 3 Minuten;

10x (94 °C, 30 s/55 °C, 30 s/72 °C, 60 s);

15x (94 °C, 30 s/65 °C, 30 s/72 °C, 60 s);

72 °C, 15 Minuten; 4 °C bis zur Analyse der Produkte.

### 2.7.3 Einbringen von E1A in das Creator-System

Die um die Rekombinationstellen erweiterte E1A-Sequenz wurde in den linearisierten Donorvektor des Creator-Systems (pDNR-Dual) mit Hilfe der In-Fusion-Rekombinase gemäß Herstellerprotokoll (BD Clontech) eingefügt. Mit den Rekombinationsmischungen wurden E-coli XL-1 Blue transformiert, die auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen wurden. Einzelne Kolonien wurden in LB Medium mit Ampicillin vermehrt und die enthaltenden Plasmide zur Analyse durch Präparation mit einem Plasmid Mini-Kit (Qiagen) gewonnen. Die Integration in die Plasmide wurde mit Hilfe einer Standard PCR (20 Zyklen, 94 °C, 30 s/58 °C, 30 s/72 °C, 30 s) mit den Primern E1A-ATG1 und E1A-STOP1 Primer nachgewiesen.

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese in einem einprozentigen Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung und UV-Detektion in einer Geldokumentationskammer (Fa. Alpha Inotech, San Leonardo, CA; USA) analysiert.

Durch eine Rekombinationsreaktion mit Cre-Rekombinase wurde die in den Donorvektor pDNRDual eingefügte, für E1A kodierende Sequenz dann in den Akzeptorvektor des Creator-Systems pLP-TRE2, der ein „tetracyclin responsive element“ enthält, umkloniert. Hierzu wurden jeweils 100 ng beider Plasmide zusammen mit Cre-Rekombinase gemäß Handbuch zum Creator-System (BD Clontech) inkubiert und hinterher auf Agarplatten ausplattiert, die Saccharose und Chloramphenicol enthielten. Bei der Cre-Rekombinationsreaktion wird neben dem Insert auch die Chloramphenicolresistenz in den Akzeptorvektor hinter einen aktiven Promoter übertragen. Klone, die nur den Donorvektor enthalten, können durch das SacB-Element in diesem Vektor Saccharose zu einem toxischen

Produkt umsetzen, das ihr Heranwachsen verhindert, sodass unter den Selektionsbedingungen nur Bakterien mit dem in angestrebter Weise rekombinierten Plasmid überleben können. Anschließend erfolgte die Vermehrung dieser Bakterien in kanamycinhaltigem Medium und die Isolierung der Plasmide durch eine Präparation mit einem Plasmid-Maxi-Kit (Qiagen)

## 2.8 Zellkultur und Analyse von Zellen

### 2.8.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C in DME-Medium (DMEM) in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde wie in 2.5 beschrieben ergänzt, für die Selektion transfektanter Klone und zum Aufrechterhalten eines Selektionsdrucks auch mit dem Neomycinderivat G418 oder Hygromycin. Zur Regulation im Expressionssystem mit tetrazyklinabhängigem Aktivator, wurde zusätzlich das Tetrazyklinderivat Doxycyclin zugegeben. In Vorversuchen mit einer ansteigenden Konzentrationsreihe war vor den Experimenten getestet worden, bei welchen Neomycin-, Doxycyclin- und Hygromycinkonzentrationen für die jeweiligen Zellsorten toxische Effekte auftraten.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurde statt Tetracyclin das strukturverwandte Doxycyclin verwendet.

Der Hauptgrund hierfür war, dass bereits eine niedrige Konzentration (von 100 ng/ml) Doxycyclin im Kulturmedium ausreicht, um die Transkription vollständig zu unterdrücken, während die dafür erforderliche Menge Tetracyclin vielfach höher zu erwarten gewesen wäre, was die Wahrscheinlichkeit des Auftretens ungewollter oder gar toxischer Effekte erhöht hätte. Diesem Vorteil steht allerdings eine geringere Stabilität (Halbwertszeit etwa 24 Stunden) von Doxycyclin gegenüber, wodurch häufiges Wechseln des Kulturmediums erforderlich ist.

Eine Alternative zu beiden Substanzen, vor allem bei Anwendung in vivo, könnte zukünftig 4-Epidoxycyclin sein: So konnten Eger et al. für diese Substanz im Mausmodell eine gute Regulierbarkeit im Tet-off System bei geringerem Nebenwirkungsspektrum nachweisen (Eger et al. 2004).

### 2.8.2 Aufbewahrung von Zellen

In Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) können Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden etwa  $10^7$  Zellen abzentrifugiert (3 min, 200 xg, RT), zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml „Opti-Freeze“-Medium resuspendiert und in ein 2 ml-Einfriergefäß (Nunc-Cryotube) überführt. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im 37 °C-Wasserbad aufgetaut und nach Verdünnen in Kulturmedium abzentrifugiert. Die in frischem Medium resuspendierten Zellen wurden dann unter Standardbedingungen kultiviert.

### 2.8.3 Herstellung von Tet-off-Zelllinien durch stabile Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit pTet-off

Vor einer Transfektion der Standardzelllinien Ovarcar-3 und SKOV 3 sowie der in der UFK Ulm etablierten Zelllinien OV MZ 4, OV MZ 8 und OV MZ 27 wurden diese nach Auftauen zweimal passagiert und in 10 cm-Schalen zu einer Konfluenz von 80-90 % heranwachsen gelassen. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin 2000 gemäß Herstellerprotokoll (Invitrogen) verwendet, welches mit Plasmiden nach zehn Minuten Inkubation bei RT lipophile Komplexe bildet und damit die Passage der Zellmembran ermöglicht.

Es wurden je 24 µg des Plasmids pTet-off mit 60 µl Transfektionsreagenz für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in das Medium über den Zellen gegeben.

Nach viereinhalb Stunden wurde das Medium durch frisches DMEM ersetzt und nach weiteren zwölf Stunden eine sterilfiltrierte G418-Stammlösung (Endkonzentration 800 µg/ml) zugesetzt. Dieses Selektionsmedium, dessen G418-Konzentration nach der initialen Zugabe auf 600 µg/ml gesenkt wurde, wurde alle 48 Stunden gewechselt. Nach drei bis vier Wochen waren die überlebenden Einzelzellen zu makroskopisch sichtbaren Kolonien herangewachsen, von denen 24 pro Platte für weitere Vermehrung in 12-well Platten überführt wurden. Dazu wurden mit einem Bürolocher ausgestanzte 5 mm große Scheibchen aus Filterpapier benutzt, die zunächst einige Stunden in 70 % Isopropanol gebadet

wurden. Die getrockneten Scheibchen wurden vor der Verwendung in Trypsin-EDTA-Lösung getränkt. Das Medium wurde von den Zellkulturplatten gesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Positionen der einzelnen Kolonien mit einem schwarzen Stift auf der Rückseite der Platten markiert und die trypsinfeuchten, einmal abgetupften Scheibchen unter Zuhilfenahme zweier Kanülen auf die Kolonien aufgebracht. Nach zwei Minuten erfolgte die Überführung der Scheibchen mit den anhaftenden Zellen in 12-Loch-Platten mit Kulturmedium. Dort wurden die Klone bis zum Erreichen einer 80 %igen Konfluenz belassen, um dann in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt zu werden. Die Transferschritte überlebten ca. 50 % der ursprünglich isolierten Klone. Von den Zellen jedes etablierten Klons wurden mehrere Portionen eingefroren und die laufende Passage unter schwachem Selektionsdruck (200 µg/ml G148) bis zu den durchzuführenden Versuchen kultiviert.

#### 2.8.4 Auswahl der Klone

Der Nachweis, dass ein Klon das Plasmid Tet-off funktionsfähig integriert hatte, erfolgte durch eine transiente Transfektion mit pTRE-d2EGFP. Diese Kombination aus dem Tetracyclin-sensiblen Element (TRE) und dem verstärkt grünfluoreszierenden Protein (EGFP) ermöglicht eine Überprüfung der Regulierbarkeit der stabilen Tet-off Klone, da Zellen funktionierender Klone nach Weglassen des Doxycyclins aus dem Medium grün fluoreszieren und durch Fluoreszenzmikroskopie bewertet werden können. Ausgewählt wurden 48 Stunden nach Transfektion die Klone, bei denen ohne Doxycyclin mindestens 20 % der Zellen leuchteten und die sich gleichzeitig durch ein möglichst geringes (<0,5 %) Hintergrundleuchten auszeichneten. Die Transfektion mit Lipofectamin erfolgte analog zu der vorangegangenen, jedoch wurden die einzelnen Klone in je zwei Kulturvertiefungen von 12-Loch-Platten ausgesät und transfiziert. Jeweils einer der beiden Portionen eines Klons wurde sechs Stunden nach der Transfektion 10 µl/ml Doxycyclin zugesetzt.

### 2.8.5 Ermittlung des HER-2-Status

Zur Ermittlung des HER-2-Status wurden die Zellen „4-Chamber CultureSlides“ (Becton Dickinson Labware, Le Point de Claix; Frankreich) gebracht, deren Boden einem Objektträger entspricht. Die Zellen wurden bei Erreichen einer 90 %igen Konfluenz zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zehn Minuten in eisgekühltem Methanol fixiert. Danach erfolgte die HER-2-spezifische Anfärbung mittels einer semiquantitativen immunhistochemischen Methode (HercepTest rabbit, DakoCytomation GmbH, Hamburg; Deutschland). Abweichend vom Protokoll wurde auf den Epitopdemaskierungsschritt verzichtet, da die Ovarialkarzinomzelllinien nicht paraffin eingebettet waren. Als Positivkontrolle dienten die mitgelieferten formalinfixierten Mammakarzinomzellen. Die Auswertung erfolgte danach unter dem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung.

### 2.8.6 Flusszytometrische Analyse der tetracyclinabhängigen EGFP-Expression

Für die Messung der konzentrationsabhängigen EGFP-Expression wurden die Zellen in 12-Loch Platten ausgesät und mit pTRE-d2EGFP transfiziert (siehe 2.8.3). Getestet wurden Doxycyclinkonzentrationen im Medium zwischen 10 µg/ml und  $8 \times 10^{-6}$  µg/ml sowie Medium ohne Doxycyclin. Als Kontrollansätze wurden stets untransfizierte Zellen und mit dem leeren Vektor transfizierte Zellen mitgeführt.

Das Ausmaß der Transgenexpression in den Zellen wurde mit Hilfe eines Flusszytometers 48 Stunden nach Einstellen der jeweiligen Doxycyclinkonzentrationen gemessen. Dazu wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Medium aufgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und in 600 µl PBS in einem Polypropylenröhrchen resuspendiert. Durch Wahl geeigneter zelllinienspezifischer Größenparameter wurden bei den Messungen nur vitale Zellen einer Population erfasst. Die Hintergrundfluoreszenz als Grundeinstellung der FACS-Parameter wurde durch untransfizierte und mit dem leeren Vektor transfizierte Zellen definiert. Als Maß für die EGFP-Expression wurde für die einzelnen Doxycyclinkonzentrationen die grünen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt. Diese Werte wurden um die

Autofluoreszenz korrigiert durch Differenz- oder Quotientenbildung zum Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIR). Vor der flussytometrischen Quantifizierung wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Anregungswellenlänge 546 nm) betrachtet, um einen ersten Überblick über die Induzierbarkeit zu erhalten.

#### 2.8.7 Transfektion von Zellen mit Plasmiden, die die für E1A kodierende DNS enthalten und Gewinnung stabiler Zellklone

Auf Basis der Bestimmung der konzentrationsabhängigen EGFP-Expression nach transienter Transfektion (siehe 2.8.6) wurden gut regulierbare Klone ausgewählt, um E1A entsprechend regulierbar zu exprimieren. Eine durch das eingesetzte Plasmid vermittelte Hygromycinresistenz erlaubt dabei die Selektion der dieses enthaltenden Zellkolonien. Die sechs geeigneten Zellklone wurden in 10 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen ausgesät und bei 80 % Konfluenz gleichzeitig mit zwei Plasmiden (pTK-Hyg und pLP-TRE2-E1Awt, jeweils 12 µg/Platte) unter Einwirkung von Lipofectamin (s. 2.8.3) transfiziert. Dem Medium wurden 500 µg/ml Hygromycin sowie 100 µg/ml Doxycyclin zugegeben, um die Expression des E1A zu unterbinden. Klone überlebender Zellen wurden in zwei Portionen eingefroren; für Screening-Versuche wurden spätere Passagen der weiter kultivierten Klone benutzt. Unter den Selektionsbedingungen erreichten etwa die Hälfte der zunächst isolierten Klone eine Zellzahl, die die Überführung in eine Zellkulturflasche erlaubte.

Die Klone wurden OV X-Y-Z genannt, wobei OV der Name der Ausgangszelllinie ist, X für die ursprüngliche Platte steht, von der die Tet-off Klone stammten, Y eine laufende Nummer ist und Z eine laufende Nummer der Klone nach der Co-Transfektion mit pTK-Hyg und pLP-TRE2-E1A ist. Damit ergibt sich beispielsweise OV MZ8 2-11-2 für einen der Klone.

Zum Nachweis der Integration von E1A wurde aus den Zellen die genomische DNS mit Hilfe eines DNeasy Kit (Qiagen) gemäß Herstellerprotokolls und in einer Standard-PCR (siehe 2.7.2) mit den Primern eingesetzt, die zu einem E1A-spezifischen Produkt führt.

### 2.8.8 Nachweis E1A-spezifischer RNS in den modifizierten Ovarialkarzinomzelllinien

Klone, bei denen die Integration des Plasmids in das Genom nachgewiesen worden war, wurden in sechs Loch-Platten ausgesät und nach vier Tagen verschiedene Mengen Doxycyclin (16,7/8,3/1,7/0,8/0 ng/ml) ausgesetzt. Nach 48 Stunden geerntet wurden die Zellen mit einem QIAshredder (Qiagen) homogenisiert und die RNA mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die photometrisch bestimmten Konzentrationen wurden bei allen Proben auf 200 ng/µl mit RNase-freiem Wasser eingestellt. Um die Integrität empfindlichen RNA auszuschließen wurden 1 mg RNS durch Agarose-Gelelektrophorese (E-Gel, 2 % Agarose, Invitrogen) analysiert.

Zur Synthese von cDNS (komplementäre DNS) durch reverse Transkription wurde folgende Reaktionmischung zehn Minuten bei 25 °C, 30 Minuten bei 48 °C und fünf Minuten bei 95 °C in „MicroAmp Optical Tubes“ (Applied Biosystems) inkubiert:

1 µl	RNA-Lösung (200 ng/µl)
1 µl	10-fach TaqMan RT-Puffer
2,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
2 µl	dNTP-Mix
0,5 µl	Lösung zufälliger Hexamere
0,2 µl	RNase Inhibitor
0,25 µl	Multiscribe Reverse Transkriptase
2,85 µl	RNase-freies Wasser

Nicht genauer beschriebene Lösungen entstammen dem Multiscribe RT-Kit (Invitrogen).

Für den Nachweis der E1A-spezifischen cDNS wurde eine TaqMan Echtzeit-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein „Mastermix“ hergestellt, der pro Probe enthielt:



12,5 µl 2-fach Mastermix-Puffer (Applied Biosystems)  
 1,5 µl Forward Primer E1AGT-F1 (10 pmol/µl)  
 1,5 µl Reverse Primer E1AGT-R1 (10 pmol/µl)  
 0,5 µl E1AGT-Probe (10 pmol/µl)  
 1,5 µl E1AGT Forward Primer Microglobulin (10 pmol/µl)  
 1,5 µl E1AGT Reverse Primer Microglobulin (10 pmol/µl)  
 0,5 µl Probe Micorglobulin (10 pmol/µl)  
 4,5 µl Rnase freies Wasser  
 1 µl cDNS aus dem RT-Ansatz

Die PCR-Bedingungen waren: (2 Minuten 50 °C, 10 Minuten 95 °C, 15 Sekunden 95 °C; 1 Minute 60 °C)x40 Zyklen in MicroAmp Optical 96-Loch Reaktionsplatten (Applied Biosystems) in einem ABI 7700 DNS Detector (Applied Biosystems).

#### 2.8.9 Nachweis des E1A-Proteins durch Western Blotting

Zum Nachweis des E1A Proteins mit einem spezifischen Antikörper wurde zunächst eine gelelektrophoretische Analyse der zellulären Proteine mit anschließendem Übertragen der Proteinbanden auf eine PVDF Membran durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten HEK 293-Zellen, als Negativkontrolle nichttransfizierte Ovarcar-3-Zellen.

Die Lyse der Zellen erfolgte durch einstündige Inkubation der in Solubilisierungspuffer (40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, „Complete“-Proteaseinhibitoren, 1 % Triton X 100, 0,1 % Na-Dodecylsulfat-Lösung) resuspendierten Zellen auf Eis. Das durch Abzentrifugieren (>10000 xg, 15 Minuten, 4 °C) gewonnene Solubilisat wurde mit 1/5 Volumen reduzierendem 5-fach Auftragspuffer versetzt. Der 5x-Auftragspuffer war eine Lösung aus 3 ml Glycerin; 7,5 ml 0,5 M TrisCl (pH 6,8), 1,5 g SDS und 0,5 ml 1 % Bromphenolblau, die mit 1/9 Volumen Mercaptoethanol jeweils vor Verwendung ergänzt wurde. Die so vorbereiteten Proben wurden in die Probentasche eines 12 % SDS-PAGE-Fertiggels (Pierce) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 100 V/60 mA pro Gel in einer Gelelektrophoresekammer (Pierce), bis die kleinste Bande einer aus gefärbten Proteinen Markermischung gerade das Ende des Gels

erreicht hatte. Aus dem in Puffer II gebadeteten Gel, einer mit Methanol und Wasser vorbehandelten PVDF-Membran und puffergetränkten Filterpapierstreifen wurde wie in Abb. 11 dargestellt zwischen den Elektroden einer Elektroblopparatur ein Stapel gebildet. Der Transfer der Proteinbanden auf die Membran erfolgte bei  $1,5 \text{ mA/cm}^2$  in 60 Minuten.

Die Membran wurde anschließend mit 1 %iger Casein-Lösung (Blockierreagenz, Roche) zwei Stunden bei RT blockiert. Nach kurzem Schwenken in TBS wurde die Membran mit 30  $\mu\text{l}$  des E1A erkennenden Antikörpers M 58 in 15 ml TBS mit 0,1 % Blockierreagenz bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran einmal mit TBS, 0,1 % Tween-20 und zweimal in TBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörpers (1:10000 in TBS, 0,1 % Blockierreagenz) für 1,5 Stunden bei RT.

Anschließend erfolgten weitere Waschschrirte (2xTBS; 2xTBS, 0,1 % Tween-20, 1xTBS) und fünf Minuten Inkubation mit einem Gemisch aus jeweils 7 ml der beiden Komponenten des Detektionssystems (SuperSignal, Pierce).

Für die fotografische Detektion wurde die gerade noch feuchte Membran zwischen zwei Kunststofffolien fixiert und unter Rotlichtbedingungen Röntgenfilme (Hyperfilm, GE Healthcare) aufgelegt. Nach 15 Sekunden, 2 Minuten und 10 Minuten wurden die Filme in einer Kodak M 1000 Entwicklermaschine entwickelt.

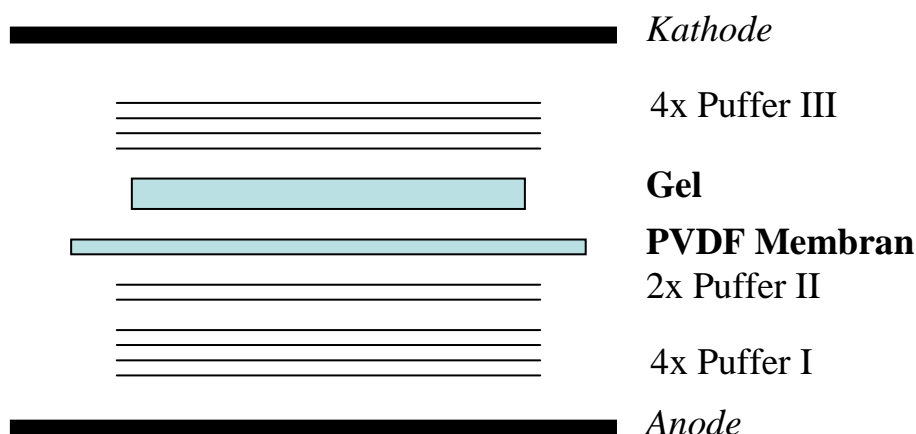


Abb. 11: Aufbau der Elektroblopparatur (PVDF: Polyvinylidene Fluorid)

### 2.8.10 Proliferationsassay

Für die Untersuchung einer möglicherweise proliferationshemmenden Wirkung des E1A Proteins wurde ein WST-1 enthaltendes Kit (Roche) eingesetzt. Das Tretrazoliumsalz WST-1 wird zu den Zellen gegeben und durch eine mitochondriale Dehydrogenase gespalten, was einen Farbumschlag bewirkt. Die Intensität dieses Farbumschlages ist dabei direkt proportional zu der Menge der lebenden Zellen.

Für den Assay wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 96-Lochplatten ausgesät. Zu diesen wurde nach einer Stunde 10  $\mu\text{l}$  des im Wasserbades aufgetauten WST-1 Reagenz gegeben und nach 60 Minuten das erste Mal die Menge des umgesetzten WST-1 photometrisch in einem „MRX ELISA Reader“ bestimmt. Es wurden jeweils drei Parallelansätze bestimmt für Doxycyclinkonzentrationen von 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,0001  $\mu\text{g/ml}$  und ohne Doxycyclin. Weitere Messungen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Die einzelnen Messwerte wurden jeweils um die Hintergrundabsorption korrigiert.

Zum Vergleich der Messwerte zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde der Mann-Whitney-Test unter Verwendung des Softwarepakets „Statistica“ der Firma StatSoft (Hamburg) durchgeführt. Unterschiede wurden bei p-Werten kleiner als 0,05 als statistisch signifikant bewertet. Graphisch dargestellt wurden die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung von Tet-off-Ovarialkarzinomzelllinien

In einem ersten Schritt wurde in verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien die für den tetrazyklinabhängigen Transaktivator kodierende Sequenz durch Transfektion mit dem Plasmid pTet-off und nachfolgender Selektion stabil integriert. Während der Wachstumsphase nach Transfektion wurden die Zellen unter ständigem Selektionsdruck durch Kultivierung in Medium mit einem Neomycinderivat gehalten. Von den insgesamt bei Ansätzen mit verschiedenen Ausgangszelllinien so entstandenen und überimpften ca. 600 Klonen, erreichten bei der weiteren Kultivierung etwas die Hälfte eine Zellzahl, die eine Überführung in eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche erlaubte. Während des Klonierungsprozesses wurden regelmäßig Zellproben als Reserve für eine spätere Rekultivierung eingefroren.

Um die prinzipielle Funktionsfähigkeit im Tet-off-System und die Qualität der Klone, bestimmt durch den Bereich ihrer Regulierbarkeit, zu testen, wurden im nächsten Schritt alle Klone transient mit dem Plasmid pTRE-d2EGFP transfiziert, das die für EGFP kodierende Sequenz unter Kontrolle eines TRE-abhängigen Promoters enthielt. Kultivierung der transfektanten Zellen ohne Doxycyclin und bei einer relativ hohen Konzentration dieses Tetrazyklinderivats erlaubte dann nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung eine erste Klassifizierung der erhaltenen Klone.

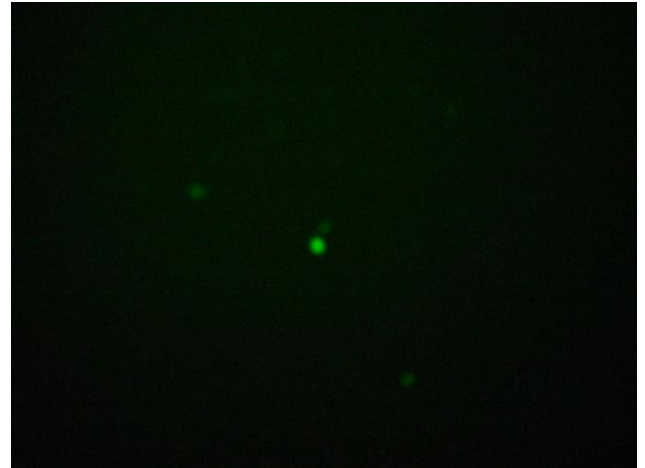
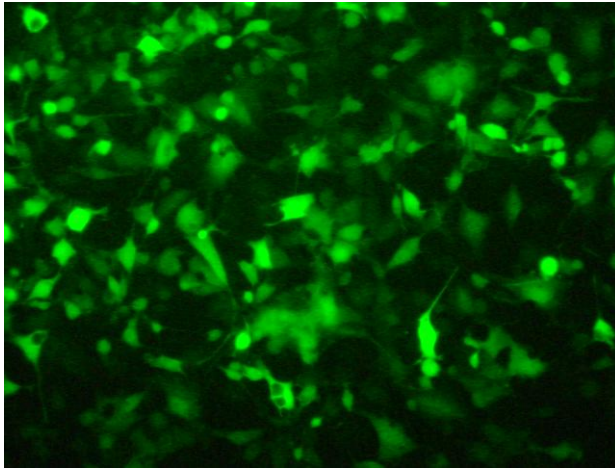


Abb. 12 zeigt exemplarisch die Regulierbarkeit des von der Zelllinie OVMZ 8 abgeleiteten Klons K2-11. Die Regulierbarkeit erkennt man am Unterschied der durch EGFP (enhance green fluroscent protein) hervorgerufenen Fluoreszenz zwischen Zellen die ohne (links) und mit Doxycyclin (rechts) kultiviert wurden. 200 fache fluoreszenzmikroskopische Vergrößerung

Es wurden 90 von der Zelllinie OVCAR 3 abgeleiteten Zellklone transfiziert und auf Grund der fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung in drei Kategorien eingeteilt. Dabei galten eine deutliche Fluoreszenz ohne Doxycyclin von über 15 % der Zellen bei gleichzeitig einer Fluoreszenz mit Doxycyclin von höchstens 1 % als Voraussetzungen für die Zuordnung zur Kategorie I, eine Fluoreszenz von über 10 % der Zellen mit und unter 3 % ohne Doxycyclin als Voraussetzung für die Kategorie II; während alle Klone, die schlechtere Regulierbarkeit zeigten der Kategorie III zugeteilt wurden. Mit der Bedingung geringe Fluoreszenz bei Kultivierung mit Doxycyclin konnten die Klone aussortiert werden, die „leaky“ waren, d. h. die eine zu hohe, durch Doxycyclin nicht unterdrückbare Hintergrundexpression hatten. Tabelle 5 zeigt die Verteilung der untersuchten Klone auf diese Kategorien für die vier Ausgangszelllinien.

Tab 5: Anzahl der Klone in den Kategorien I (sehr gute Regulierbarkeit), Kat. II (gute Regulierbarkeit) und Kat. III (keine oder schlechte Regulierbarkeit)

Ursprungszelllinie	Zahl der Klone in		
	Kat. I	Kat. II	Kat. III
OVCAR 3	19	31	40
OVMZ27	10	12	30
SKOV3	2	1	12

Ausgehend von der Zelllinie OVMZ19 entstanden nur neun Klone, die aber alle nach Transfektion nur eine geringe, Doxycyclin-unabhängige Hintergrundexpression von EGFP zeigten und deswegen nicht weiter charakterisiert wurden.

Die Klone, die durch diese Vorversuche der Kategorie I zugeordnet werden konnten, wurden durch Transfektion und Messung der EGFP-Fluoreszenz durch Flusszytometrie noch einmal hinsichtlich ihrer Regulierbarkeit durch Doxycyclin überprüft. Tabelle 6 zeigt die Klone, die auf Grund dieser Messungen schließlich für die nähere Charakterisierung ausgewählt wurden. Mit Blick auf die geplante regulierbare Expression des adenoviralen Proteins E1A, das eine tumorsuppressive Wirkung durch Beeinflussung der HER2-Expression haben kann, wurde von den gut regulierbaren Klonen diese immunhistochemisch bestimmt. Erstaunlicherweise ergaben sich aus den Ursprungszelllinien Klone mit stark unterschiedlicher HER2-Expression.

*Tab 6: Unterschiede in der Expression des TRE-(Tet-responsive element)regulierbaren EGFP (Enhanced green fluorescent protein) nach transienter Transfektion der erzeugten Tet-off-Klone mit deutlichster Regulierbarkeit. Dargestellt sind die Anteile der Zellen mit einer grünen Fluoreszenz über der Hintergrundfluoreszenz nach Kultivierung mit oder ohne Doxycyclin. Die HER2-Expression ist durch den in der Routinediagnostik üblichen IHC-Score (immunohistochemistry) dargestellt.*

Name des Zellklons	ohne Doxycyclin	mit Doxycyclin	HER2-Expression
OVCAR3 K1-1	55 %	2%	++
OVCAR3 K2-5	20%	0,5%	++
OVCAR3 K1-12	40 %	3%	-
OVCAR3 K2-12	22 %	0,5%	-
OVMZ27 K1-12	35 %	3 %	+
OVMZ8 K1-25	20%	2%	-
OVMZ8 K2-11	20%	3%	++
SKOV 3 K2-16	25%	1,5%	+++
OVMZ 4 K1-15	20%	3%	+
OVMZ 4 K3-42	15%	2%	+/-

Waren bis dahin alle Klone nur unter dem Gesichtspunkt „alles oder nichts“ getestet worden, wurden die Klone in einem nächsten Schritt auf abgestufte Regulierbarkeit durch Kultivierung in Medium mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen für 48 Stunden und nachfolgender flusszytometrischer Analyse getestet.

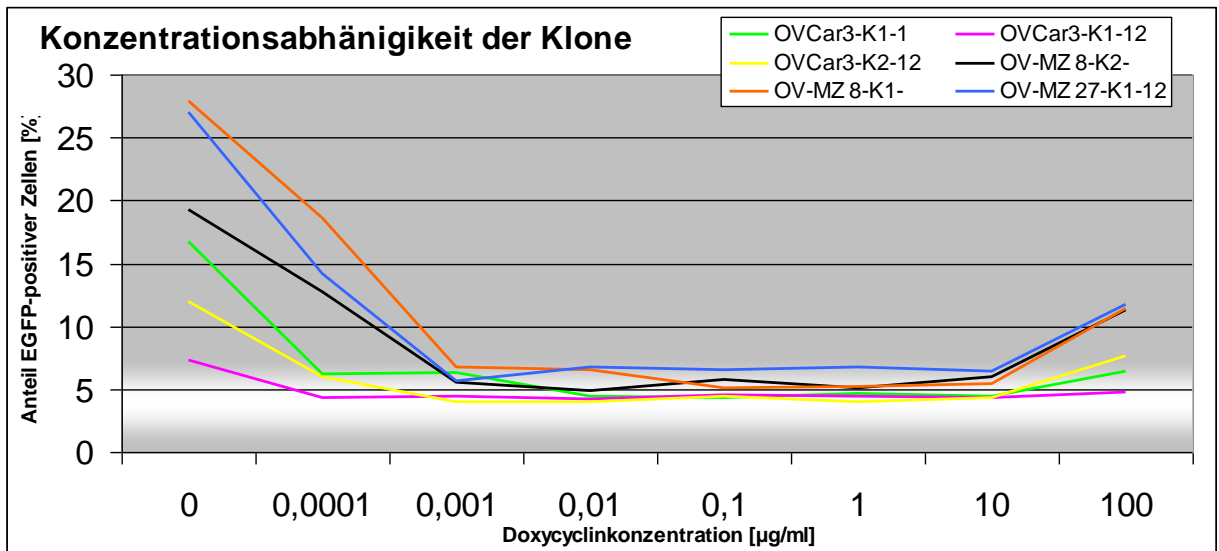


Abb. 13: Expression des EGFP-(Enhanced green fluorescent protein)Reporters in Abhängigkeit von der Doxycyclinkonzentration im Medium. Bis zu einer Doxycyclinkonzentration von 0,01 µg/ml lässt sich die EGFP Expression wirkungsvoll unterdrücken. Ab 0,001 µg/ml steigt die Expression kontinuierlich an, um (ohne Doxycyclin) ihren maximalen Wert zu erreichen. Bei dem Anstieg im Bereich von 100 µg/ml handelt es sich vermutlich um einen noch ungeklärten, toxischen Effekt.

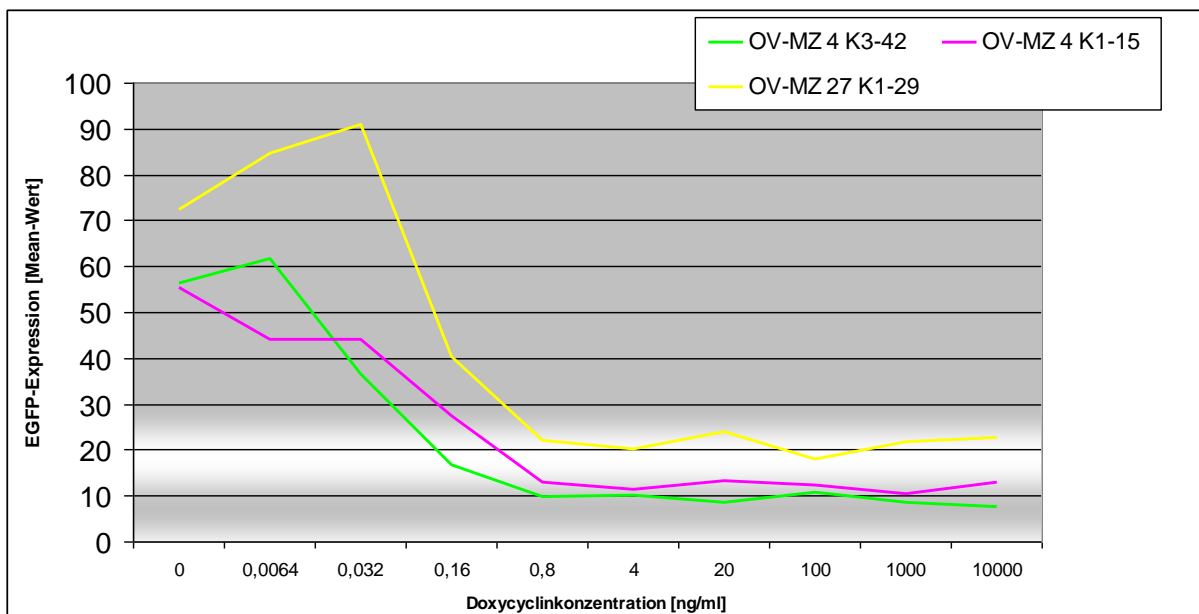


Abb. 14: Expression des EGFP-(Enhanced green fluorescent protein) Reporters in Abhängigkeit von der Doxycyclinkonzentration im Medium. Bei diesem Versuch wurde die Verdünnungsreihe im Bereich des erwarteten Kurvenanstiegs noch feiner unterteilt. Es zeigte sich, dass sich nicht alle Zellklone durch

Doxycyclin vollständig supprimiert werden können; zum Beispiel bleibt auch bei hohen Doxycyclinkonzentrationen beim Klon OVMZ27 K1-29 eine starke, Doxycyclin-unabhängige Hintergrundexpression.

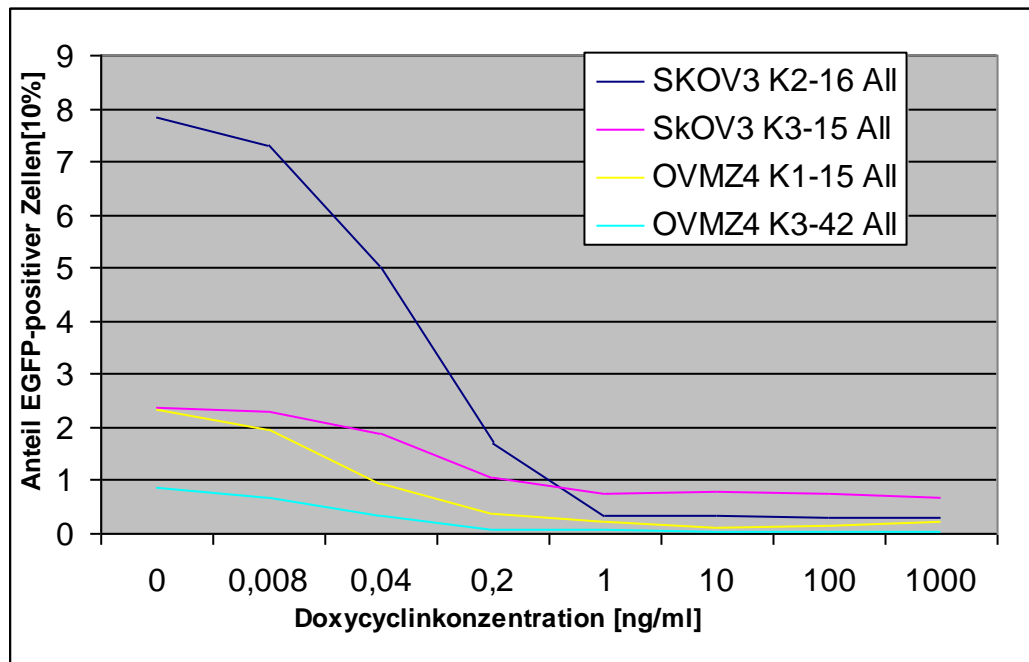


Abb. 15: Expression des EGFP(Enhanced green fluorescent protein)-Reporters in Abhängigkeit von der Doxycyclinkonzentration im Medium. Auch die maximal erreichbare Expression ist in einem weiten Bereich unterschiedlich. Für den Klon SKOV3 K2-16 ist das Verhältnis der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten der ohne und mit Doxycyclin kultivierten Zellen etwa 20.

Die Konzentrationsabhängigkeit der EGFP-Expression ist auch bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung deutlich erkennbar (Abb. 16).



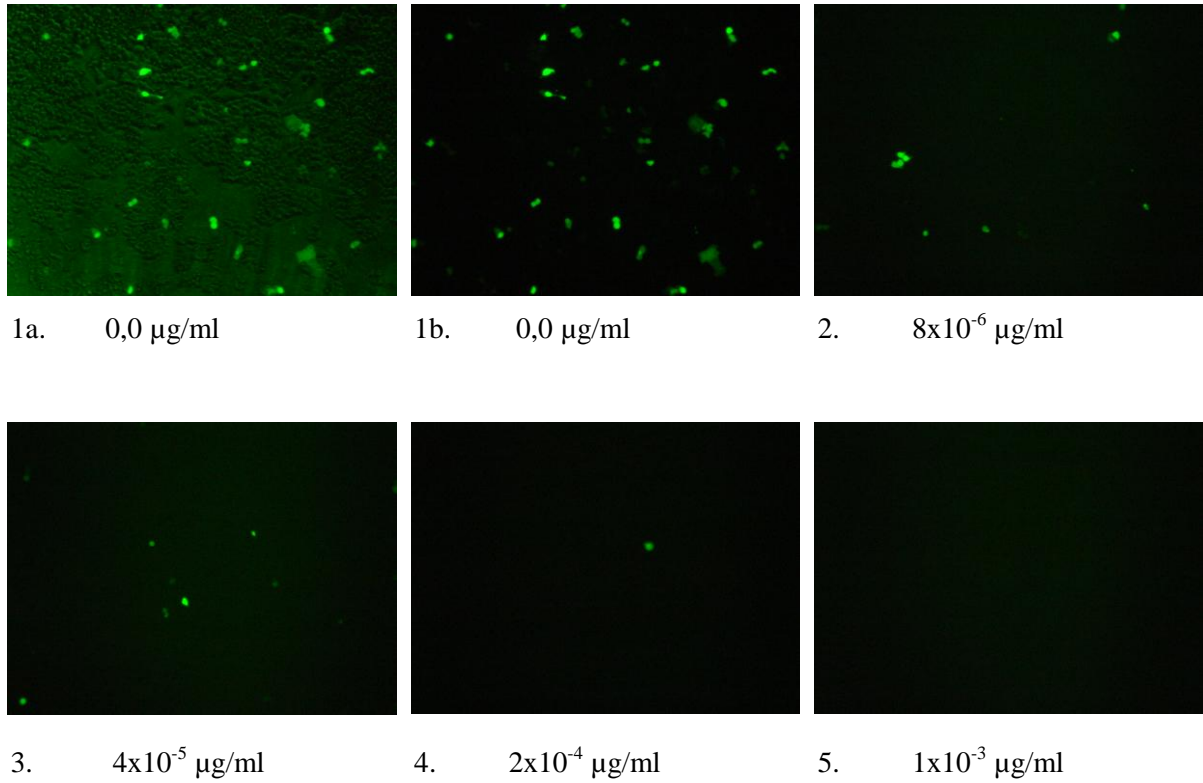
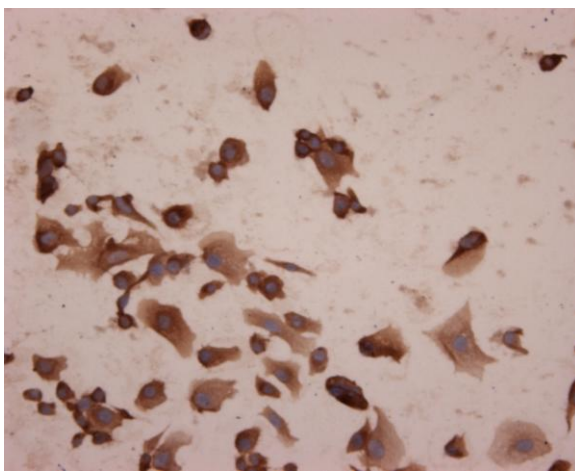


Abb. 16: Expression des EGFP ( Enhanced green fluorescent protein) Reporters durch Zellen des Klons OVMZ 8 K2-11 in Abhängigkeit von der Doxycyclinkonzentration im Medium im Bereich zwischen 0 und  $1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ . Mit steigender Doxycyclinkonzentration die Zahl der fluoreszierenden Zellen ab, bis (Bild 5) bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  alle Fluoreszenz unterdrückt ist. Bild 1 und 2 zeigen jeweils denselben Bildausschnitt, einmal bei konventioneller, einmal bei Dunkelfeldmikroskopie bei 100-facher Vergrößerung

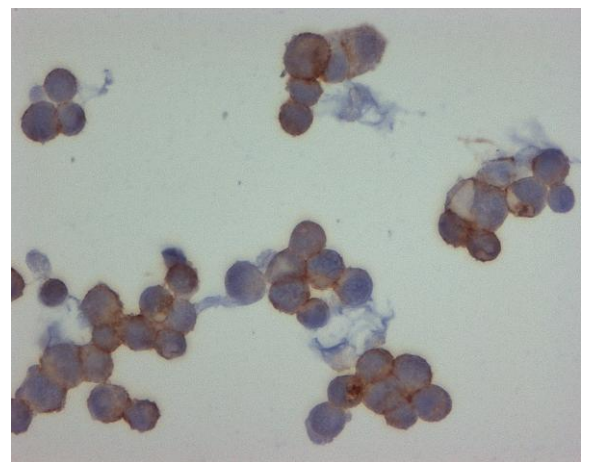
### 3.2 Immunhistochemische Bestimmung der HER2-Expression der Doxycyclin-regulierbaren Ovarialkarzinomzelllinien-Subklone

Da E1A bekanntermaßen einen Einfluss auf die HER2-Expression von Ovarialkarzinomzellen ausübt (Yu et al. 1990, Yan et al. 1991), wurden alle Klone der Kategorie I nach der im klinisch-pathologischen Bereich üblichen Methode gefärbt und in vier Gruppen (HER2 negativ; einfach positiv; zweifach positiv und dreifach positiv) eingeteilt (Tabelle 6, Kap. 3.1.).

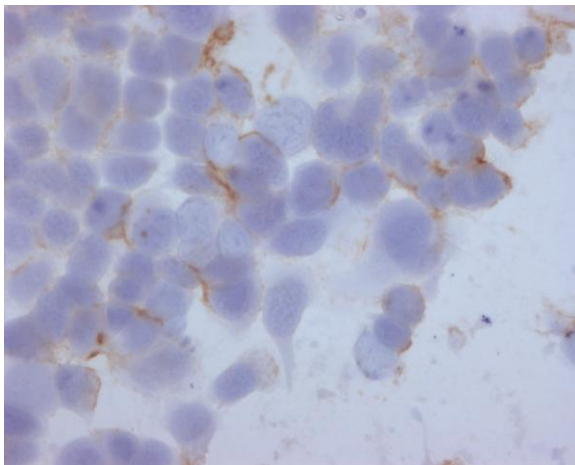
Abb. 17 zeigt je ein Beispiel für Klone die einer dieser vier Gruppen zugeordnet wurden.



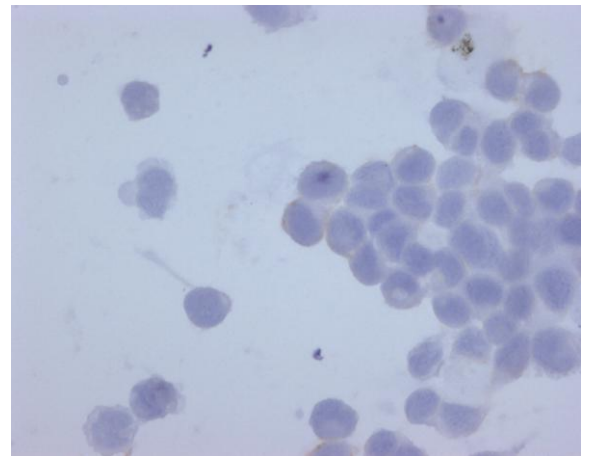
a



b



c



d

Abb. 17 a-d Dargestellt sind die Zellen in 400-facher Vergrößerung. HER2 Expression wird durch braune Färbung angezeigt

- a) SKOV3 K2-16 als Beispiel für einen dreifach HER2-positiven Klon
- b) OVCAR3 K1-1 als Beispiel für einen zweifach HER2-positiven Klon
- c) OVMZ8 K2-11 als Beispiel für einen einfach HER2-positiven Klon
- d) OVMZ27 K1-12 als Beispiel für einen HER2-negativen Klon

### 3.3 Klonierung des adenoviralen E1A und Doxycyclin-abhängige Expression in den etablierten Ovarialkarzinom-Tet-off-Zelllinien

Die die für das adenovirale E1A kodierende Sequenz wurde hinter den TRE-abhängigen und dadurch Tetrazyklin-regulierbaren Promoter in den Vektor pLP-TRE2 eingefügt (siehe Methoden und Materialien). Bevor der Versuch der Etablierung stabiler Klone, die E1A doxycyclinabhängig exprimieren, versucht wurde, wurde durch transiente Transfektion dieses Plasmids in die hergestellten Tet-off-Zellen die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Expressionssystems untersucht. Dazu wurden Zellextrakte 36 Stunden nach Transfektion hergestellt und durch Western Blot hinsichtlich der Expression des E1A-Proteins untersucht. Als Positivkontrolle wurden Extrakte aus den stabil E1A exprimierenden HEK 293-Zellen verwendet. Eine von der Doxycyclinkonzentration abhängige Expression von E1A nach transients Transfektion konnte klar gezeigt werden.

Zur Herstellung von Sublinien, die E1A stabil regulierbar exprimieren, wurden Co-Transfektionen zusätzlich mit dem Plasmid pTK-Hyg durchgeführt, auf die eine Selektion der gegen Hygromycin resistenten transfektanten Zellen erfolgte. Die so erhaltenen Klone wurden zunächst hinsichtlich der stabilen Integration der für E1A kodierenden DNS mit Hilfe einer PCR mit isolierter genomischer DNS untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 11 (68 %) der Klone, die mit Hygromycin selektiert worden waren, die komplette DNS-Sequenz enthielten, 6 % enthielten nur Bruchstücke und in 26 % konnte keine E1A-DNS nachgewiesen werden. In allen die intakte Sequenz enthaltenden Klonen, konnte bei Kultivierung ohne Doxycyclin, mittels RT-PCR E1A-mRNS nachgewiesen werden. Allerdings gelang der Nachweis des E1A-Proteins durch Western Blot nur im Fall des Klons OVMZ-8 K2-11-19. Auch bei diesem Klon war die induzierbare Proteinmenge relativ klein im Vergleich zur E1A-Expression der Kontrollzelllinie HEK und er wurde daher, obwohl ein vollständiges Unterdrücken der Expression durch Doxycyclin möglich war, nicht für Folgeexperimente herangezogen.

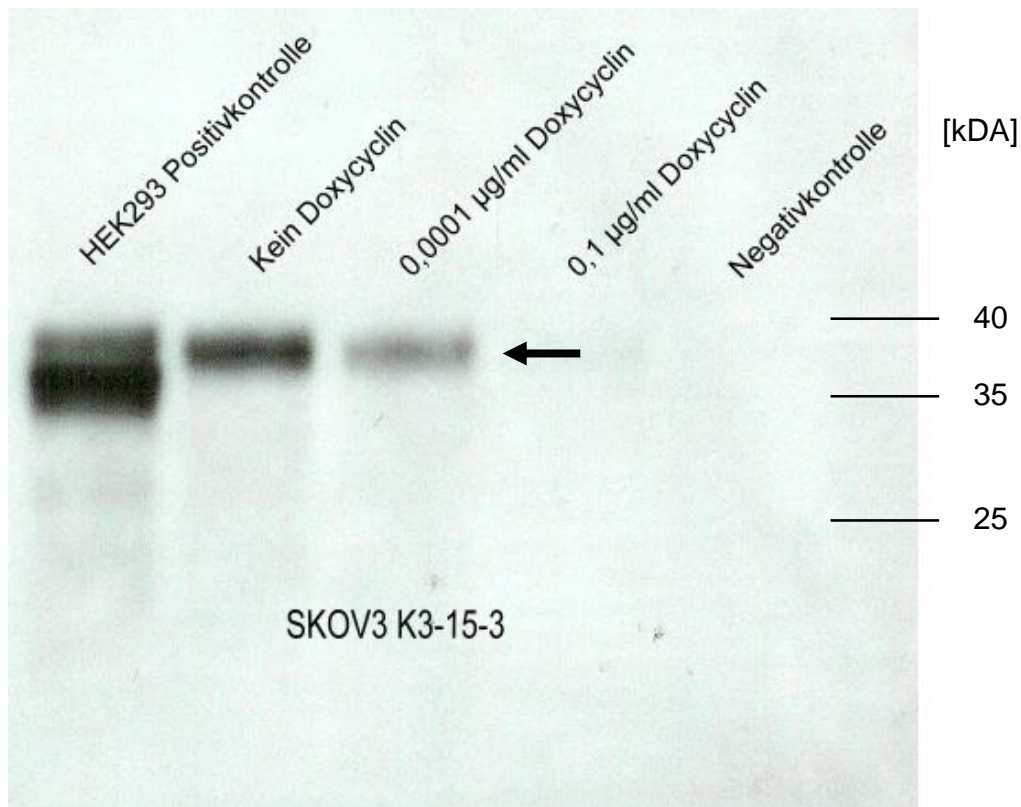


Abb. 18: Western Blot-Analyse nach transienter Transfektion mit einem die E1A-Sequenz (Early region 1A) hinter einem tetrazyklinabhängigen Promoter enthaltenden Plasmid und zwei Tagen Kultivierung in Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen des Tetrazyklinderivats Doxycyclin. Doxycyclinabhängig exprimiert wird die größte E1A Form, die im Gel bei etwa 37 kilo-Dalton migriert (Pfeil).

### 3.4 Einfluss Doxycyclin-reguliert exprimierten E1A auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen

Um die Funktion des im Tet-off System exprimierten E1A zu verifizieren, wurde nach transienter Transfektion und Kultivierung in Medien mit unterschiedlichen Mengen des die Expression unterdrückenden Doxycyclin die Proliferation der Zellen mit Hilfe des WST-Assays gemessen.

Es zeigte sich, dass zwar die Zellproliferation nicht vollständig durch E1A (kein Doxycyclin) unterdrückt werden konnte, jedoch die Zellvermehrung deutlich verlangsamt war (Abb. 19). Die Messung des der Zellzahl proportionalen WST-1-Reaktionsprodukts wurde bis 72 Stunden nach Transfektion durchgeführt, wonach die Transgenexpression nachgelassen hätte und die Proliferation durch Kontaktinhibierung in den dann fast konfluenten Kulturen beeinflusst worden wäre.

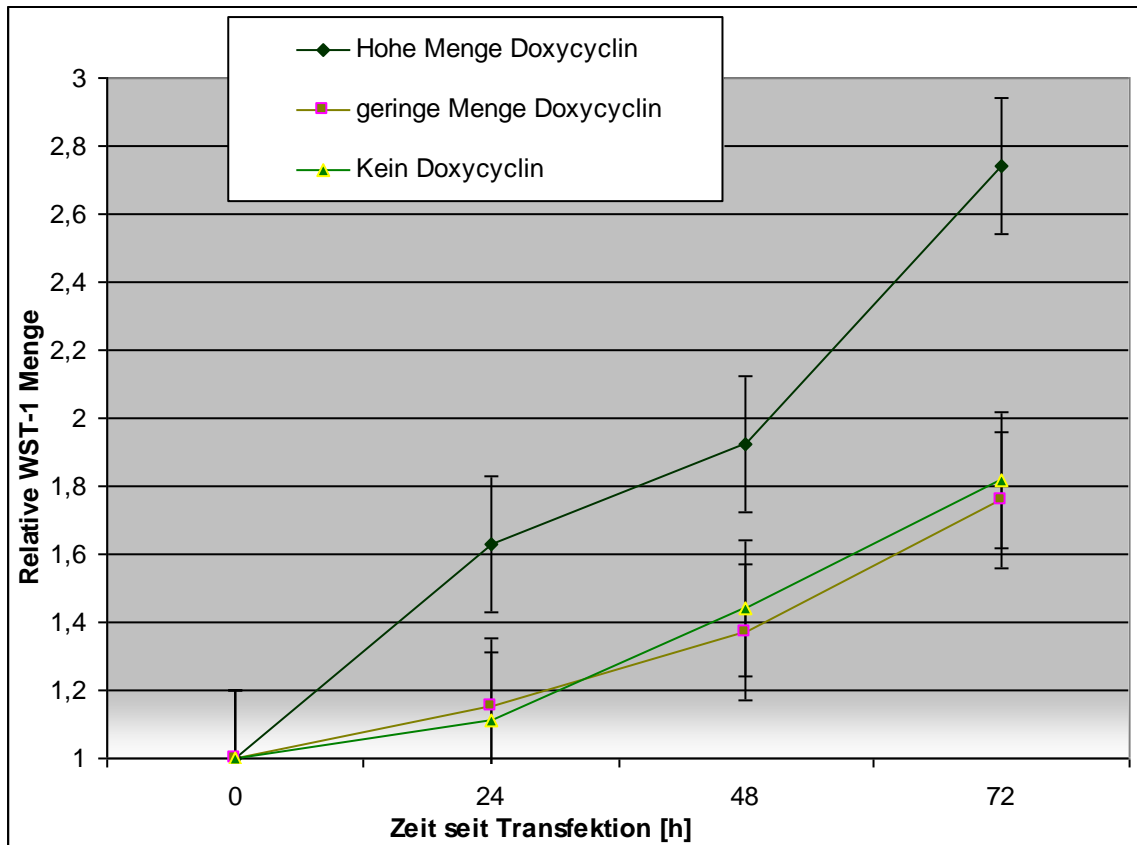


Abb. 19: Proliferation von SKOV3 (eine epitheliale Zelllinie) K3-15-3-Zellen nach transienter Transfektion mit der für E1A (Early region 1A) kodierenden DNS (Desoxyribonukleinsäure) unter Kontrolle eines doxycyclinabhängigen Promoters. Dargestellt ist die relative Menge des der Zellzahl entsprechenden photometrisch bestimmten Reaktionsprodukts des WST-1 (water-soluble tetrazolium salt). Ohne Doxycyclin ist die Proliferation der Zellen deutlich geringer als bei hoher Doxycyclinkonzentration, d. h. bei „ausgeschaltetem“ E1A. Dargestellt wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen, statistisch wurde Signifikanz (Mann-Witney Test) mit einem p Wert < 0,05 erreicht.

## 4. Diskussion

### 4.1. Tet-off: Ein geeignetes System zum Nachweis E1A-spezifischer Effekte

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zur induzierbaren Expression des adenoviralen E1A-Proteins in menschlichen Ovarialkarzinomzelllinien zu etablieren, das Folgeuntersuchungen zum Mechanismus der Induktion von Apoptose in diesen Zellen erlaubt. Ein wesentlicher Teil der Arbeiten bestand in der Herstellung von bisher nicht verfügbaren modifizierten Zelllinien, die den tetrazyklinabhängigen Transkriptionsaktivator exprimieren und in deren Charakterisierung hinsichtlich der Regulierbarkeit der Transgenexpression. Abschließend sollte das System zur Expression von E1A in einer ersten funktionellen Untersuchung eingesetzt werden, um dessen Wirkung auf die Proliferation der Ovarialkarzinomzellen zu analysieren. Beim stabilen Einbringen von potentiell Apoptose auslösenden Gensequenzen in dafür suszeptible Zellen ergibt sich folgendes Problem: Werden die kodierten Proteine in aktiver Form synthetisiert, sterben die Wirtszellen bzw. sind nicht mehr vermehrungsfähig, sodass sich für mechanistische Untersuchungen kaum ausreichend große Zellmengen gewinnen lassen.

Durch das in dieser Arbeit verwendete Tet-off Schaltersystem ließ sich die für das proapoptotische E1A kodierende Sequenz durch Zugabe von Doxycyclin so lange stilllegen, bis eine für einen Versuch genügend große Anzahl an Zellen vorhanden war, bzw. der Nachweis der Integration in das Zellgenom erbracht war. Die Entscheidung für das Tet-off-System beruhte weitgehend auf der geringen basalen, nicht unterdrückbaren Expression („leakiness“) im Vergleich zu dem analogen Tet-on System, bei dem der tetrazyklinabhängige Transaktivator in Gegenwart von Tetrazyklin (oder-derivaten) aktiv ist (Meyer-Fica et al. 2004).

Zur raschen Überprüfung der Regulierbarkeit der Transgenexpression in den erzeugten Tet-off-Sublinien wurde in dieser Arbeit das Verfahren von Callus und Mathey-Prevot (Callus und Mathey-Prevot 1999) verwendet. Hierbei nutzt man ein grünfluoreszierendes Protein, welches erst durch Bindung des tTA und einen ein TRE enthaltenden Promoter transkribiert wird und in der Folge durch Leuchten des Proteins die Anwesenheit und Wirksamkeit des Aktivators anzeigt. So konnte eine große Anzahl der erhaltenen Klone in kurzer Zeit relativ einfach durch

fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der mit einem entsprechenden Plasmid transfizierten Zellen gescreent werden. Dabei wurde ein großer Anteil an leuchtenden Zellen nach Kultivierung ohne Doxycyclin als Hinweis auf einen möglicherweise gut regulierbaren Klon betrachtet. Um die konzentrationsabhängige Expression zu quantifizieren, wurden die vorselektionierten Klone nach Transfektion in Medien mit ansteigenden Doxycyclinkonzentrationen kultiviert und die doxycyclinabhängige EGFP-Fluoreszenz durch Flusszytometrie gemessen (Klucher et al. 1997). Bei den meisten Tet-off-Subklonen war ab einer Doxycyclinkonzentration kleiner als 0,001 µg/ml eine Zunahme der grünen Fluoreszenz zu beobachten. Über zwei Zehnerpotenzen bis zu einer Konzentration von etwa  $10^{-5}$  µg/ml ergab sich eine lineare Zunahme der EGFP-Fluoreszenz, die dann ein Plateau erreichte. Im Bereich von 100 µg/ml (also weit über den üblicherweise eingesetzten Mengen) wurde bei einzelnen Klonen ebenfalls eine Steigerung der basalen Expression bis zum doppelten Wert beobachtet, die nicht erwartet worden war. Der Mechanismus einer Aktivierung der Transkription durch große Mengen Doxycyclin ist unklar; der tTA sollte auf jeden Fall gesättigt und damit inaktiv sein. Da dieser Effekt nur bei extrem hoher Doxycyclinkonzentration und nur in einzelnen Versuchsreihen auftrat, konnte er außer Acht gelassen werden.

In der Erstbeschreibung des Tet-off-Systems von Gossen und Bujard (Gossen M, Bujard H. 1992) gelang eine 10 bis 10000fache Expressionssteigerung des Modellproteins in HeLa Zellen durch Entfernen von Doxycyclin aus dem Nährmedium. Bei den im ersten Teil der Arbeit hergestellten Tet-off-Ovarialkarzinomzelllinien wurde eine Steigerung, gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität des EGFP, bis auf das 50fache des basalen Wertes erzielt.

Damit lagen die maximalen Werte nicht im Bereich der Spitzenwerte der Erstbeschreibung, was allein auf die grundsätzlichen Unterschiede der verwendeten Zellsorten zurückzuführen sein könnte, zum Beispiel haben die Ovarialkarzinomzelllinien im Vergleich zu HeLa-Zellen eine deutlich längere Generationszeit und daher wahrscheinlich unterschiedliche Anteile der Gesamtpopulation in den verschiedenen Zellzyklusphasen, von denen auch die Transgenexpression abhängt.

Yin erreichte mit dem Tet-off-System sogar eine stärkere Transgenexpression als mit konstitutiv überexprimierenden Zellen, bei denen ein CMV-Promoter verwendet worden war. Allerdings gelang dies nur nach sehr aufwändigem Selektieren optimierter Klone bestimmter Zelllinien (Yin et al. 1996).

Bei analogen Versuchen mit verschiedenen Tet-off-Zelllinien wurde eine bis zu 20fache Steigerung der basalen Expression bei guter Induzierbarkeit erreicht (Ach 2005). Zudem belegen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, dass die tetracyclinabhängige Expression stark vom verwendeten Zelltyp abhängig sein kann (Ackland-Berglund u. Leib 1995; Howe et al. 1995) und sogar in Subpopulationen des gleichen Zellklons stark differieren kann (Meyer-Fica et al. 2004) verglichen verschiedene induzierbare Expressionssysteme durch transiente Transfektion eines Reporterkonstruktes. Hier wurde das Tet-off-System im Vergleich zu verschiedenen anderen Induktionssystemen als eher „leaky“ mit relativ geringer Induzierbarkeit beschrieben, allerdings bei recht hoher maximaler Expression, was bei diesen Untersuchungen, trotz eines anderen Zelltyps und im Detail verschiedenen experimentellen Bedingungen, ähnlich beobachtet wurde. Durch einen Wechsel zum Tet-on-System wäre nach den Ergebnissen von Meyer-Fica et al. keine bessere Induzierbarkeit zu erwarten gewesen, da eine möglicherweise stärkere Maximalexpression durch eine höhere „leakiness“ mehr als ausgeglichen würde.

Inzwischen wurden ein hinsichtlich nicht unterdrückbarer Basalexpression und erreichbarer Expressionsstärke verbessertes TRE beschrieben (Agha-Mohammadi et al. 2004), allerdings stand dieses System zum Zeitpunkt der Planung und Durchführung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

#### 4.2 Stabile regulierbare Expression des E1A

Eine der größten Herausforderungen dieser Arbeit bestand im Nachweis des E1A Proteins in den stabil mit dem TRE-Promoter-E1A-Konstrukt transfizierten Tet-off-Zellklonen. So ergaben anfänglich sowohl der als Screeningmethode vorgesehene Immun-Dotblot, als auch der wesentlich sensitivere Western Blot mit kommerziellen E1A-spezifischen Antikörpern selbst mit Extrakten aus HEK293-Zellen, die als Positivkontrolle dienten, höchstens schwache. Daher wurden



Anstrengungen in zwei Richtungen unternommen: Einerseits wurden die Protokolle des Western Blots optimiert, was letztlich den sicheren Nachweis des Proteins ermöglichte, andererseits wurden die erhaltenen transfektanten Subklone der Tet-off-Ovarialkarzinomzelllinien vor weiteren Untersuchungen auf das Vorhandensein von E1A-DNS im Genom überprüft. In der dafür eingesetzten PCR zeigten sich 68 % der stabil transfizierten Klone als E1A-dann-haltig. Bei den übrigen Linien konnten vermutlich unabhängige Resistenzmechanismen so schnell aktiviert werden, dass der Selektionsdruck nach der Transfektion nicht ausgereicht hat, um die Vermehrung dieser Zellen zu verhindern. Obwohl es als wahrscheinlich gilt, dass bei einer Co-Transfektion beide verwendeten Plasmide zusammen in das zelluläre Genom integriert werden, ist es nicht völlig auszuschließen, dass bei den E1A-DNS-freien Zelllinien nur das die Hygromycinresistenz vermittelnde Plasmid in die Zellen gelangte ohne, dass auch das die für E1A kodierende Plasmid erfolgreich transfiziert wurde. Als weitere Ursache ist denkbar, dass bei einzelnen Zellklonen durch spontane Mutation(en) Resistenz gegenüber den nach der Transfektion eingestellten Selektionsbedingungen entstanden war.

Zudem wiesen alle ausgewählten Zellklone eine „leakiness“ zwischen 0,5-2 % auf, weshalb möglich erscheint, dass eine Zelle die nach Transfektion hinsichtlich der E1A-Expression „leaky“ war, Apoptose einleitete und nicht überleben konnte. Das könnte die Ursache für die geringe Ausbeute an Klonen mit regulierbarer E1A-Expression sein.

Die E1A-DNS enthaltenden stabilen Zelllinien wurden dann auf das Vorhandensein von E1A-spezifischer mRNA mittels reverser Transkription und PCR überprüft, um die erfolgreiche Transkription der integrierten Gene zu bestätigen. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden wurde grundsätzlich alle gewonnene RNA auf Degradation überprüft.

Damit eine Expression über längere Zeit stattfinden kann, muss eine dauerhafte Integration des Gens in das Genom stattfinden.

Letzten Endes gelang es, in einem stabilen Zellklon induzierbare E1A Expression nachzuweisen. Für parallel zur Untersuchung der stabilen Transfektanten durchgeführte Untersuchungen (z. B. zum Einfluss von E1A auf die Proliferation) wurden transient mit der für E1A kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines ein TRE enthaltenden Promoters transfizierte Tet-off-Klone eingesetzt. Bei diesem

Vorgehen lies sich das E1A-Protein nach Optimierung des Westernblots problemlos nachweisen.

Ein möglicher Grund dafür, dass es trotz erfolgreicher Transfektion und Integration der für E1A kodierenden DNS (bewiesen durch den Nachweis im zellulären Genom) bei fast allen untersuchten Klonen nicht zu einer Transkription kommt, ist eine Inaktivierung des in den Konstrukten verwendeten modifizierten CMV-Promotors durch Methylierung.

Die von Brooks et al. (Brooks et al. 2004) analog zu den vorliegenden Ergebnissen beobachtete Verstummung der Transkription nach zunächst erfolgreichem Gentransfer in Muskelzellen mit einem adenoviralen Vektor konnte klar auf eine hochgradige Methylierung des benutzten CMV-Promotors zurückgeführt werden.

Möglicherweise ist, wie von Everett postuliert wurde, die E1A-Sequenz eine Initiationsstelle für Methylierung, allerdings werden ähnliche Effekte auch bei E1- und E2b-deletierten Adenoviren beim Gentransfer in Leberzellen beobachtet (Everett et al. 2004), sodass eher von einem allgemeinen Mechanismus zur Stilllegung fremder DNS im Genom auszugehen ist, der bei einem Apoptose auslösenden Transgen durch einen starken Selektionsdruck getrieben wird. Vermutlich sind aber auch Fehler auf der Ebene Translation anzunehmen, da das zwar bei 18 Klonen mittels RT-PCR E1A-mRNA nachgewiesen werden konnte, nicht aber das Protein, kann auch durch eine solche Selektion für defekte oder eingeschränkt funktionierende (E1A-Menge unterhalb der Nachweisgrenze) bedingt sein. Möglicherweise ist zur stabilen Expression von E1A ein System nötig, das die Expression ohne Induktion noch wesentlich besser unterdrückt, als das im Tet-off-System möglich ist.

#### 4.3 Optimierung der Bedingungen zur Induktion der E1A-Expression und des Nachweises durch Western Blot

Da die in den zunächst durchgeführten Versuchen Nachweisgrenze des E1A-Proteins im abschließenden Western Blots unbefriedigend hoch war, wurden die Bedingungen zur Induktion der Expression und des Nachweisverfahrens optimiert, was letzten Endes eine regulierbare Expression und einen hinreichend empfindlichen Proteinnachweis ermöglichte. Wesentliche Verbesserungen der

Bedingungen zur Zellkultivierung und Induktion bestanden in täglichem Mediumwechsel, Verwendung von speziellem, für das Tet-System getestetem Serum und in zusätzlichen Waschschrinen, um auch geringste Mengen Doxycyclin sicher zu entfernen.

Auch die Empfindlichkeit des E1A-spezifischen Western Blots konnte durch verschiedene Optimierungen verbessert werden, darunter der Wechsel des zum Blockieren eingesetzten Proteins und der Übergang von Nitrocellulose- zu hydrophoben PVDF-Membranen, die trotz der insgesamt eher hydrophilen Natur des E1A-Proteins ein wesentlich besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis ergaben. Die vorliegende Arbeit ist ein weiteres Beispiel dafür, dass Proteinexpressionssysteme für jedes Protein sorgfältig optimiert werden müssen.

#### 4.4 Wirkung von E1A auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen

Die Messung der Proliferation der mit und ohne Doxyzyklin kultivierten Transfektante zeigte, dass sich E1A nicht nur im Tet-off-System regulieren lässt, sondern dabei auch eine biologische Funktion, hier die Hemmung der Proliferation, ausübt. Allerdings gelang es mit dem hier verwendeten Ansatz nicht, einen kompletten Wachstumsstillstand zu erreichen. Das kann prinzipielle Ursachen haben oder in der Transfektionseffizienz begründet sein, durch die nicht in alle Zellen E1A eingebracht werden konnte.

Zudem wurde in dieser Arbeit Wildtyp-E1A transfiziert, das neben seiner antiproliferativen Wirkung auch über ein Transformationspotential verfügt und in manchen Zelltypen möglicherweise auch eine pro-proliferativen Komponente besitzt.

Bei den Vorversuchen mit EGFP als Reporterprotein ließ sich mit den etablierten Tet-off-Zelllinien mit der Abnahme der Doxycyclinkonzentration über vier Zehnerpotenzen auch proportional die Expression steigern. Diese Breite der Regulierbarkeit war bei den Proliferationsmessungen nicht zu beobachten, allerdings waren auch nur drei unterschiedliche Doxycyclinkonzentrationen verwendet worden. Retrospektiv betrachtet, war die Konzentration von 0,0001 µg/ml immer noch zu hoch, um einen Einfluss auf die Proliferation erkennen zu können; bei noch niedrigeren Konzentrationen hätte man den Effekt

in mittelstarker Ausprägung vermutlich gesehen. Daraus lässt sich schließen, dass eine relativ starke E1A-Expression nahe am Maximum des Systems nötig ist, um die Proliferation messbar zu hemmen.

Der proliferationshemmende Effekt von E1A trat im Rahmen dieser Arbeit bei einer stark HER2-positiven Zelllinie auf. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu sehen, ob diese Wirkung auch bei HER2-negativen Linien ähnlich ausgeprägt ist.

Es gibt Hinweise darauf, dass die tumorsuppressive Eigenschaft von E1A nicht bei allen Zelltypen an das Vorhandensein von HER2 gebunden ist (Frisch und Dolter 1995). Allerdings scheint die Überexpression von HER2 in vielen Fällen für eine durch E1A vermittelte Sensibilisierung für verschiedene Chemotherapeutika und Bestrahlung wichtig zu sein (Ueno et al. 1997; Cook et al. 2003). Weitere Untersuchungen sind nötig, um den tatsächlichen Einfluss des HER2neu auf den proliferationshemmenden oder allgemein tumorsuppressiven Effekt von E1A auf Ovarialkarzinomzellen zu bestimmen.

#### 4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit verfolgte Klonierungsstrategie auf Basis des Rekombinase-vermittelten Übertragens einer kodierenden DNS von einem Ausgangsplasmid in einen von vielen möglichen Zielvektoren stellt ein robustes und universell einsetzbares modulares System dar. Konkret war es durch die Kombination des einfach zu handhabenden In-Fusion Systems mit dem Creator-System zum Übertragen in einen Vektor mit TRE-abhängigem Promoter problemlos möglich, die für E1A kodierende Sequenz in einen Vektor zur regulierbaren Expression zu bringen, der zur Generierung stabiler Transfektanten der Tet-off-Linien eingesetzt werden konnte. Gelingt die Herstellung stabiler regulierbarer Sublinien nicht, so kann für die geplanten Untersuchungen auf die transiente Transfektion zurückgegriffen werden. Neben Zielvektoren, die eine regulierbare Expression erlauben, die besonders für Apoptose-vermittelnde Gene Vorteile bieten, stehen zum Beispiel auch Zielvektoren zur Expression von Fusionsproteinen mit fluoreszierenden Komponenten wie EGFP zur Verfügung, die für Studien zur Proteinlokalisierung in lebenden Zellen verwendet werden können.

Es ist bekannt, dass die unterschiedlichen „Conserved regions“ (CRs) des E1A Gens für verschiedene Effekte in Zellen verantwortlich sind und teilweise synergistische, aber auch gegensätzliche Wirkungen auf verschiedene zelluläre Signalkaskaden haben können. Dickopp et al. gelang es, E1A Deletionsmutanten herzustellen, die nur noch CR3 und CR4 in ihrer Sequenz aufwiesen und dabei ihre antiproliferative und *in vivo* tumorsuppressive Wirkung behielten, ohne jedoch weiter ein Transformationspotential zu zeigen (Dickopp et al. 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Xing et al. (Xing et al. 1998) mit „Mini-E1A“, das im Mausmodell keine Transformationsaktivität zeigte, aber tumorsuppressiv wirkte. Es bietet sich nun an, mit Hilfe des modularen Klonierungssystems, verschiedene E1A Deletionsmutanten in geeignete Vektoren zur regulierbaren Expression Tet-off-Ovarialkarzinomzelllinien zu überführen, um dann die Bedeutung der einzelnen CRs untersuchen zu können. Möglicherweise lassen sich antiproliferative und transformierende Eigenschaften von E1A noch weiter trennen und einzelnen Sequenzen zuordnen. Im Hintergrund solcher Untersuchungen steht die mögliche klinische Anwendung: Die bisher mit wtE1A als therapeutischem Transgen im Menschen durchgeführten Studien waren zwar vielversprechend (Zhang et al. 1995), doch wird in Zukunft eher die Kombination nicht transformierender Deletionsmutanten, möglicherweise in Kombination mit konventioneller Therapie, eine größere Bedeutung haben. Je kleiner dabei die therapeutisch wirksame E1A-Sequenz ist, desto geringer ausgeprägt werden wahrscheinlich unerwünschte Nebeneffekte sein. Auch wenn im therapeutischen Einsatz momentan noch die geringe Selektivität und Effektivität der Vektoren den limitierenden Faktor darstellt, so könnte gerade beim Ovarialkarzinom die intraperitoneale Anwendung eine gute Ergänzung einer systemischen Chemotherapie sein. Allerdings wurde von Xing et al. (Xing et al. 1998) berichtet, dass im Mausmodell nach intraperitonealer Gabe von liposomalem E1A die Sequenz auch in extraperitonealem Lungen und Nierengewebe der Mäuse nachgewiesen werden konnte. Daher muss selbst bei intraperitonealer Applikation ein möglichst Tumorzell-spezifisches Expressionssystem bzw. tumorselektiv wirksame Transgene wie E1A in gentherapeutischen Ansätzen zur Tumorthherapie eingesetzt werden.

In dieser Arbeit konnten mit Standard-Transfektionsverfahren maximal 50 % der Zellen transfiziert werden. Überlebt *in vivo* aber auch nur eine Tumorzelle die Therapie, ist ein Rezidiv sehr wahrscheinlich und eine Heilung damit *per se*

ausgeschlossen. Die bisherigen Gentransfermethoden sind allerdings weit davon entfernt, auch nur annähernd 100 % der Tumorzellen *in vivo* zu erreichen (Hallek et al. 2001). Trotzdem erscheint der Gentransfer von E1A vielversprechend: So konnte von Shao et al. gezeigt werden, dass E1A über einen so genannten „Bystander“ Effekt auf mehr als die initial erreichten Zellen wirkt. Obwohl nicht alle Zellen *in vivo* transfiziert werden konnten, kommt es allein durch die erfolgreiche Transfektion einiger Zellen und die dadurch erfolgte Beschädigung zur Freisetzung von Antigenen aus diesen, welche dann eine starke systemische Immunantwort gegen alle Tumorzellen triggern (Shao et al. 2000).

Grundsätzlich bietet auch eine induzierbare Expression in therapeutischen Konzepten mit kombinierter Anwendung verschiedener Agenzien Vorteile.

Über die systemische Konzentration von Doxycyclin, einer Substanz, die als verträgliche Medikation ohne nennenswerte Toxizität gilt und mit der schon jahrelange Erfahrungen im klinischen Alltag besteht, könnte sich bei Tet-off-Systemen auch die Wirkung einer therapeutischen Komponente im Patienten so steuern lassen, dass zum optimalen Zeitpunkt ein synergistischer Effekt entsteht. Abschließend lässt sich sagen, dass der vielversprechenste Ansatz zur Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms wahrscheinlich weiterhin in der Kombination von Operation und herkömmlicher Chemotherapie liegt, die aber durch intraperitoneale Gentherapie mit therapeutischen Transgenen wie E1A in Zukunft ergänzt werden kann.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Die transiente Expression des adenoviralen E1A im Tet-off-System stellte eine funktionierende Alternative dar, um die Effekte von E1A auf Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen. Die durchgeführte Proliferationsmessung zeigt, dass das System funktioniert und E1A einen seiner typischen Effekte zur Wirkung bringen kann. Darüber hinaus bilden die etablierten Tet-off-Ovarialkarzinomzelllinien einen Grundstock für Untersuchungen verschiedener weiterer Gene *in vitro*. Um E1A im Hinblick auf seine therapeutische Nutzung beim Ovarialkarzinom beurteilen zu können, sind weitere Studien zu seiner Wirkung und zum Einsatz transformationssensitiver E1A-Mutanten nötig.

## 5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom stellt trotz aller Fortschritte auf dem Gebiet der klassischen Chemotherapie und der Entwicklung spezifischer Wirksubstanzen immer noch die gynäkologische Tumorentität mit der schlechtesten Prognose da. E1A (Early Region 1A) ist ein multifunktionelles Protein des Adenovirus, das schon frühzeitig nach erfolgter Infektion exprimiert wird und vielfältigen Einfluss auf Signalkaskaden der Wirtszelle ausübt. Dies geschieht durch Interaktion mit zellulären Proteinen oder durch direkten Einfluss auf die Translation. Neben seiner Fähigkeit zur malignen Transformation bestimmter Zelltypen verfügt es über tumorsuppressive und Apoptose induzierende Eigenschaften. Auf dieser Basis wurden schon erste präklinische und klinische Studien mit E1A als therapeutisches Gen im Tiermodell und bei Ovarialkarzinompatienten mit viel versprechendem Ergebnis durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden mehrere Ovarialkarzinomzelllinien etabliert, die einen tetrazyklinabhängigen Transaktivator (tTA) stabil exprimieren und zur regulierbaren Expression kodierender Sequenzen in diesem Zelltyp eingesetzt werden können. Die Funktionsfähigkeit des Systems wurde durch Transfektion mit einer für ein fluoreszierendes Protein (EGFP= enhances green fluorescent protein) kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines tTA-abhängigen Promoters überprüft und die Regulierbarkeit einzelner Sublinien bestimmt. Für die Klonierung des adenoviralen E1A in einen geeigneten Vektor wurde auf das Creator Rekombinase-Klonierungssystem zurückgegriffen. Dieses modulare System erlaubt die schnelle Klonierung verschiedener Sequenzen in einen Akzeptorvektor mit tTA-regulierbarem Promoter.

Bei Versuchen, stabile E1A regulierbar exprimierenden Sublinien herzustellen, wurde die erfolgreiche Integration in das zelluläre Genom durch PCR (polymerase chain reaction) und die tatsächliche Transkription durch RT-PCR (Reverse Transkriptions-PCR) überprüft. Das E1A-Protein wurde durch Western Blot-Analysen quantifiziert. Als erster funktioneller Test, der die Funktionsfähigkeit des Systems belegt, wurde die Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der gesteuerten E1A-Expression gemessen. Hierbei zeigte sich die für verschiedene Zelltypen beschriebene proliferationshemmende Wirkung von E1A.

Mit der Etablierung von Tet-off-Sublinien aus Ovarialkarzinomzelllinien und eines Systems zur regulierbaren Expression von E1A wurde das Ziel dieser Arbeit erreicht. Eine erste funktionelle Analyse bestätigte eine proliferationshemmende Wirkung von E1A auf Ovarialkarzinomzellen.



## 6. Literatur

Ach TH: Regulierbare Expression des Tetraspanins CD63 in Mammakarzinomzellen und Bestimmung seiner intrazellulären Lokalisation. Med Dissertation , Universität Ulm (2005)

Adjei AA, Davis JN, Bruzek LM, Erlichman C, Kaufmann SH: Synergy of the protein-Fanestyltransferase inhibitor SCH66336 and Cisplatin in human cancer cell lines. Clin Can Res 7: 1438-1445 (2001)

Agha-Mohammadi S, O'Malley M, Etemad A, Wang Z, Xiao X; Lotze MT: Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. J Gene Med 6: 817-828 (2004)

Arany Z, Newsome D, Oldread E, Livingston DM, Eckner R: A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. Nature 374: 81-84 (1995)

Baselga J, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback DG, Kaye SB, Gianni L, Harris A, Bjork T, Averbuch SD, Feyereislova A, Swaisland H, Rojo F, Albanell J: Phase I Safety pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of ZD 1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosin kinase inhibitor, in patients with 5 selected tumor types. J Clin Oncol 20: 4292-4302 (2002)

Benedetti-Panici P, Landoni F, Scarabelli C, Winter R, Maggioni A, Ackermann S, Favalli G, Monaghan M, Grassi R, Greggi S, Amoroso , Giannarelli D, Torri V, Mangioni C, Hacker N: Systematic aortic and pelvic lymphadenectomy (SAPL) vs resection of any bulky nodes (RBN) only for optimally debulked advanced ovarian cancer (AOC): preliminary report from an international randomized trial. Int J Gynecol Cancer 9: 132 (1999)

Beral V, Hermon C, Kay C, Hannaford P, Darby S, Reeves G: Mortality associated with oral contraceptive use: 25 years follow up of kohort of 46 000 women from

Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *Brit Med J* 318: 96-100 (1999)

Berchuck A, Schildkraut JM, Marks JR, Futreal PA: Managing hereditary ovarian cancer risk. *Cancer* 86: 2517-2524 (1999)

Bosetti C, Negri E, Trichopoulos D, Franceschi S, Beral V, Tzonou A, Parazzini F, Greggi S, La Vecchia C: Long Term effects of oral contraceptives on ovarian cancer risk. *Int J Cancer* 102: 262-265 (2002)

Boulakia CA, Chen G, Nq FW, Teodoro JG Branton PE, Nicholson DW, Poirier GG, Shore GC: Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDA protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene* 12: 529-535 (1995)

Branton PE, Bayley ST, Graham FL: Transformation by human adenoviruses. *Biochim Biophys Acta* 780: 67-94 (1985)

Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ: Survival impact of maximum cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum-era: *J Clin Oncol* 20: 1248-1259 (2002)

Brun JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocke C: Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 78: 21-27 (2000)

Chang-Claude J, Becher H, Hamann U, Schroeder-Kurth T: Risk assessment for familial occurrence of breast cancer. *Zentralbl Gynakol* 117: 423-34 (1995)

Chen MJ, Holskin B, Strickler J, Gorniak J, Clark MA, Johnson PJ, Mitcho M, Shalloway D: Induction by E1A oncogene expression of cellular susceptibility to lysis by TNF. *Nature* 330: 581-583 (1987)

Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E: Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol* 68: 6553-6556 (1994)

Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ: The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 77: 2318-2324 (1996)

Cook J, Routes JM: Adenovirus E1A gene-induced tumor rejection through cellular sensitization to immune and nonimmune apoptotic injuries. *Frontiers in Bioscience* 10: 1396-1414 (2005)

Cook JL, Miura TA, Ikle DN, Lewis AM, Jr., Routes JM: E1A oncogene-induced sensitization of human tumor cells to innate immune defenses and chemotherapy-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 63: 3435-3443 (2003)

Deissler H, Opalka B: Therapeutic transfer of DNA encoding adenoviral E1A. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 1:1-10 (2007)

Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K: Prognostic factors in patients with stage I epithelial cancer. *Obstet Gynecol* 75: 263-273 (1990)

Dickopp A, Esche H, Swart G, Seeber S, Kirch HC, Opalka B: Transformation-defective adenovirus 5 E1A mutants exhibit antioncogenic properties in human BLM melanoma cells. *Cancer Gene Therapy* 7: 1043-1050 (2000)

Du Bois A, Lück HJ, Meerpohl HG: Rezidiv- und 2nd-Therapie beim Ovarialkarzinom: Eine Übersicht der konventionellen systemischen Therapiemodalitäten. *Zentralb Gynäkol* 119: 299-323 (1997)

Du Bois A., Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W, Pfisterer J: A randomized clinical trial of cisplatin/Paclitaxel

versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Institut* 95: 1320-1330 (2003)

Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingstone DM: Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8: 869-884 (1994)

Eger K, Hermes M, Uhlemann K, Rodewald S, Ortwein J, Brulport M, Bauer AW, Schormann W, Lupatsch F, Schiffer IB, Heimerdinger CK, Gebhard S, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Zabel B, Sauer C, Tanner B, Kolbl H, Krugel U, Franke H; Illes P, Madaj-Sterba P, Bockamp EO, Beckers T, Hengstler JG: 4-Epidoxycycline: an alternative to doxycycline to control gene expression in conditional mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 979-986 (2004)

Everett RS, Evans HK, Hodges BL, Ding EY Serra DM, Amalfitano A: Strain-specific rate of shutdown of CMV enhancer activity in murine liver confirmed by use of persistent [E1(-), E2b(-)] adenoviral vectors. *Virology* 325: 96-105 (2004)

Frisch SM, Dolter KE: Adenovirus E1a-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Res* 155: 5551-5555 (1995)

Frisch SM: E1A induces the expression of epithelial characteristics. *J Cell Biol* 127: 1085-1096 (1994)

Gossen M, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc Nat. Acad Sci USA* 89: 5547-5551 (1992)

Haley KP, Overhauser J, Babiss LE, Ginsberg HS Jones NC: Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5734-738 (1984)

Hallek M, Buening H, Ried M, Hacker U, Kurzeder C, Wendtner CM: Grundlagen der Genterapie. *Gynäkologe* 34: 1182-11889 (2001)

Hillen W, Berens C: Mechanisms underlying expression of Tn10-encoded tetracycline resistance. *Annual Rev Microbiol* 48: 345-369 (1994)

Howell SB, Christen RD, Andrews PA: Signal transducing pathway regulation of cisplatin sensitivity. In: Sharp F, Mason WP, Creasman W (eds.): *Ovarian Cancer, Biology, Diagnosis and Management*. Chapman & Medical, London 2: 149-152 (1992)

Hung MC, Hortobaghy GN, Ueno NT: Development of clinical trial of E1A Gene therapy targeting HER/neu overexpressing breast and ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol* 465: 171-180 (2000)

Kasper D, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser S, Jameson L: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill New York Chicago 16: 1064-1065 (2005)

Kurzeder C, Sauer G, Deissler H: Molecular targets of ovarian carcinomas with acquired resistance to platinum/taxane chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 207-227 (2006)

Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C: Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *Int J Cancer* 110: 155-169 (2004)

Liao Y, Hung MC: Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol Cell Biol* 23: 6836-6848 (2003)

Liao Y, Zou YY, Xia WY, Hung MC. Enhanced paclitaxel cytotoxicity and prolonged animal survival rate by a nonviral-mediated systemic delivery of E1A gene in orthotopic xenograft human breast cancer. *Cancer Gene Ther* 11:594-602 (2004)

Linder S, Popowicz , Svensson C, Marshall H, Bondesson M, Akusjarvi G: Enhanced invasive properties of rat embryo fibroblasts transformed by adenovirus E1A mutants with deletions in the carboxy-terminal exon. *Oncogene* 7: 439-443 (1992)

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967 (1993)

Mack M, Gruber R, Schmidt S, Riethmuller G, Kufer P: Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (epCAM) and CD 3. *J Immunol* 158: 3965-3970 (1997)

Madhusudan S, Tamir A, Bates N, Flanagan E, Gore ME, Barton DP, Harper P, Seckl M, Thomas H, Lemoine NR, Charnock M, Habib NA, Lechler R, Nicholls J, Pignatelli M, Ganesan TS: A Multicenter Phase I Gene Therapy Clinical Trial Involving Intraperitoneal Administration of E1A-Lipid Complex in Patients with Recurrent Epithelial Ovarian Cancer Overexpressing HER-2/neu Oncogene. *Clin Cancer Res* 10: 2986-2996 (2004)

Makar AP, Baekelandt M, Trope CG, Kristensen GB: The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 56: 175-180 (1995)

Markman M, Hoskins W: Response to salvage chemotherapy in ovarian cancer: a critical need for precise definitions of treated population. *J Clin Oncol* 10: 513-514 (1992)

Meyer-Fica M, Meyer RG, Kaiser H, Brack A, Kandolf R, Küpper JH: Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Analytical Biochemistry* 334: 9-19 (2004)

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

Mymryk JS, Bayley ST: Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5. *Virus Res* 33: 89-97 (1994)

Routes JM, Ryan S, Li H, Steinke J, Cook JL: Dissimilar immunogenicities of human papillomavirus E7 and adenovirus E1A proteins influence primary tumor development. *Virology* 27: 48-57 (2000)

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener D: Gynäkologische Onkologie, 6. Auflage, 338-339 Schattauer, Stuttgart New York (2000)

Schmutzler RK, Kempe A, Kiechle M, Beckmann MW: Clinical counseling and care of women with genetic predisposition to breast and ovarian carcinoma. *Dtsch Med Wochenschr.* 124: 563-566 (1999)

Shao R, Xia W, Hung MC: Inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis are involved in E1A-mediated bystander effect and tumor suppression. *Cancer Res* 60: 3123-3126 (2000)

Stiewe T, Keiarasch P, Esche H, Opalka B, Pützer B: E1A overcomes the apoptosis block in BCR-ABL+ leukemia cells and renders cells susceptible to induction of apoptosis by chemotherapeutic agents. *Cancer Research* 60: 3957-3964 (2000)

Ueno NT, Yu D, Hung MC: Chemosensitization of HER-2/neu-overexpressing human breast cancer cells to paclitaxel (Taxol) by adenovirus type 5 E1A. *Oncogene* 15: 953-960 (1997)

Urbanelli D, Sawada Y, Raskova J, Jones NC, Shenk T, Raska K Jr: C-terminal domain of the adenovirus E1A oncogene product is required for induction of cytotoxic T lymphocytes and tumorspecific transplantation immunity. *Virology* 173: 607-614 (1989)

van Nagell JR Jr, Higgins RV, Donaldson ES, Gallion HH, Powell DE, Pavlik EJ, Woods CH, Thompson EA: Transvaginal sonography as a screening method for ovarian cancer. A report of the first 1000 cases screened. *Cancer* 65: 573-577 (1990)

Vessey MP, Painter R: Endometrial and ovarian cancer and oral contraceptives findings in a large cohort study. *Br J Cancer* 71: 1340-1342 (1995)

Villaret D, Glisson B, Kenady D, Hanna E, Carey M, Gleich L, Yoo GH, Futran N, Hung MC, Anklesaria P, Heald AE: A multicenter phase II study of tgDCC-E1A for the intratumoral treatment of patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 24: 661-669 (2002)

von Hugo R, Holscher M, Janicke F: Morbidity, mortality and quality of life following radical surgical interventions in advanced ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet* 245: 625-627 (1989)

Wagner U, Kohler S, Reinartz S, Giffels P, Huober J, Renke K, Schlebusch H, Biersack HJ, Mobus V, Kreienberg R, Bauknecht T, Krebs D, Wallwiener D: Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA 125: Immune responses and survival in palliative treatment. *Clin Can Res* 7: 1154-1162 (2001)

Wagner U: Neue Hoffnungsträger in der Therapie des Ovarialkarzinoms. *Geburtsh. Frauenheilk* 64: 777-780 (2004)

Whittemore AS, Harris R, Itnyre J: Characteristics relating to ovarian cancer risks: collaborative analysis of 12 US case-control studies, II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 136: 1184-1203 (1992)

Whyte P, Ruley HE, Harlow E: Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J Virol* 62: 257-265 (1988)



Xing X, Zhang S, Chang JY, Tucker SD, Chen H, Huang L, Hung MC: Safety study and characterization of E1A-liposome complex gene-delivery protocol in an ovarian cancer model. *Gene Ther* 5: 1538-1544 (1998)

Yan DH, Chang LS, Hung MC: Repressed expression of the HER-2/c-erbB-2 proto-oncogene by the adenovirus E1a gene products. *Oncogene* 6: 343-5 (1991)

Yu D, Matin A, Xia W, Sorgi F, Huang L, Hung MC. Liposome-mediated in vivo E1A gene transfer suppressed dissemination of ovarian cancer cells that overexpress HER-2/neu. *Oncogene* 11: 1383-1388 (1995)

Yu D, Suen TC, Yan DH, Chang LS, Hung MC: Transcriptional repression of the neu protooncogene by the adenovirus 5 E1A gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4499-4503 (1990)

Yu D, Wolf JK, Scanlon M, Price JE, Hung MC: Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Res* 53: 891-898 (1994)

Zhang Y, Yu D, Xia W, Hung MC. HER-2/neu-targeting cancer therapy via adenovirus-mediated E1A delivery in an animal model. *Oncogene* 10: 1947-1954 (1995)

Brooks Ar, Harkins RN, Wang P, Quian HS, Liu P, Rubanyi GM: Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 4: 295-404 (2004)

Everett RS, Evans HK, Hodges BL, Ding EY Serra DM, Amalfitano A: Strain-specific rate of shutdown of CMV enhancer activity in murine liver confirmed by use of persistent [E1(-), E2b(-)] adenoviral vectors. *Virology* 325: 96-105 (2004)

Callus BA, Mathey-Prevot B: Rapid selection of tetracycline-controlled inducible cell lines using a green fluorescent-transactivator fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 874-878 (1999)

Klucher KM, Gerlach MJ, Daley GQ: A novel method to isolate cells with conditional gene expression using fluorescence activated cell sorting (FACS) *Nucleic Acid Res* 25: 4858-4860

Ackland-Berglund CE, Leib DA: Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18: 196-200 (1995)

Howe JR, Skryabin BV, Belcher SM, Zerillo CA, Schmauss C: The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J Biol Chem* 270: 14168-14174 (1995)

Yin DX, Zhu L, Schimke RT: Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem* 235: 195-201 (1996)

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 43: 5379-5389 (1983)

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Rolf Kreienberg dafür, dass er die Pflichten des offiziellen Betreuers übernommen hat.

Herrn Prof. Dr. Helmut Deissler für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für seine Unterstützung und seinen Beistand bei allen Problemen dieser Arbeit sowie für die guten Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Bernd Koppold für die superbe allzeit verfügbare Betreuung im Alltag, für seine Anregungen, Hilfestellungen und Freundschaft.

Herrn Dr. Christian Kurzeder für die Vergabe des interessanten Themas, seine Unterstützung, Hilfe und wissenschaftlichen Rat sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Sonja Wohlfahrt, Jasmin Windisch für die praktische Unterstützung und Hilfestellung, die anregenden Diskussionen sowie für die Freude und die jederzeit lockere Atmosphäre.

Frau Christine Hanselmann für das weitreichende praktische Know-How und die zahlreichen Synergieeffekte.

Meinen Eltern sowie meiner Partnerin Corina für Verbesserungs- und Korrekturvorschläge sowie für den motivativen Input.

Den Mitgliedern (sowie mittlerweile Ex-Mitgliedern) der Arbeitsgruppe Deissler für die gute Zusammenarbeit, praktische Unterstützung und wissenschaftlichen

Diskussionen und allen Kolleginnen und Kollegen des Endokrinologischen onkologischen Labors der Frauenklinik, die zum guten Arbeitsklima beigetragen haben.