

Anke-Bettina Röseler  
Dr. med.

## **Der nonvirale Gentransfer des tetrazyklinabhängigen Transaktivators (tTA) in das humane Nierenzellkarzinom**

Geboren am 29.05.1965 in Waldbröl / Rhld  
Reifeprüfung am 06.06.1986  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 91 bis WS 97/98  
Physikum am 24.08.1993 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 19.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Urologie  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. S. Pomer

Die Immuntherapie mit autologen *Virus-* oder *Bacillus Calmette Guerin* modifizierten Tumorzellen mit Zytokinen, die adoptive zelluläre Immuntherapie und die systemische Zytokintherapie haben unter teils massiven Nebenwirkungen die Prognose des Nieren-zellkarzinoms nicht verbessert. Zytokine sezernierende Tumorzellklone erzeugen im Gegensatz zu Zytokinen hohe Zytokinspiegel in Tumornähe ohne toxische Nebenwirkungen. Die retrovirale Transduktion zeichnet sich zwar durch eine hohe Transduktionseffizienz und Genexpression aus, führt jedoch auch zu allergischen Reaktionen gegen Virusproteine und zur malignen Transformation von unbeteiligten Zellen. In dieser Arbeit sollten IFN $\alpha$ <sub>2b</sub>-IL-2-tTA-Dreifachtransfektanten der humanen Nieren-zellkarzinomlinie KTCTL-1M entstehen. Die antiproliferative Wirkung von IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und die effektive Genexpression sollte durch Klonierung der cDNAs für IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und IL-2 in tetO-Vektor pUHD 10-3 reguliert werden. Die erfolgreiche Klonierung von IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und IL-2 in pUHD 10-3 bestätigte sich durch Sequenzierung. Die transkriptionelle Aktivierung von IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und IL-2 in tet-IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und tet-IL-2 durch tTA wurde nach Kotransfektion der Zelllinie HeLa-tTA mit tet-IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und tet-IL-2 an den gebildeten RNAs deutlich. Die Vektoren pUHD 15-1-neo-tTA, tet-IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und tet-IL-2 wurden in KTCTL-1M koelektroporiert. Die Zellen wurden nach drei Tagen für einige Wochen mit G418 selektioniert und 3 Klone expandiert, welche auf tTA-cDNA, IFN $\alpha$ <sub>2b</sub>- und IL-2-RNA durch Hybridisierungsreaktionen untersucht wurden. Die transkriptionelle Aktivität von tTA zeigte sich nach Kotransfektion der Klone mit CMV-lacZ und tet-Luci an den aus den  $\beta$ -Gal-Werten und Luciferaseaktivitäten und gebildeten Aktivierungsfaktoren. Zur Überprüfung der Regulierbarkeit der Plasmide über tTA in Klon 5 wurde dieser mit tet-Luci und tet-IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> oder tet-IL-2 kotransfiziert und nach 20 h die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Nach 48 h wurden die RNAs nachgewiesen. Zwei KTCTL-1M-Klone enthielten tTA. Keiner der Klone exprimierte IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> oder IL-2. In Klon 5 regulierte tTA die Expression der Luciferase um den Aktivierungsfaktor  $31,2 \pm 5,3$ . Nach transienter Transfektion wurden die RNAs für IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und IL-2 nachgewiesen. Klon 1 erwies sich mit  $\beta$ -Gal-Werten um 1 nach 15 min als sehr gut transfizierbar. Die Klone 1 und 5 stellen somit gute Kandidaten für die Gewinnung zytokinsezernierender Dreifachtransfektanten dar. Klon 1 ist wegen seiner sehr guten Transfizierbarkeit geeignet, die die Hauptvoraussetzung für die Herstellung vieler Klone darstellt. Klon 5 ist wegen seiner Fähigkeit, die Genexpression von tet-IFN $\alpha$ <sub>2b</sub> und tet-IL-2 über tTA zu regulieren ebenfalls geeignet. Für die Transfektion von

Klon 1 müsste neoR aus pUHD 15-1 neo-tTA durch einen anderen Selektionsmarker ersetzt und mit den Zytokinkonstrukten koelektroporiert werden. Klon 5 müsste mit den Zytokinkonstrukten koelektroporiert werden. Die Transfektionen wurden in dieser Arbeit etabliert.