Aus dem Zentrum für Innere Medizin Medizinische Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Direktor Prof. Dr. H. Greten

# Gentherapie von hepatischen Kolonkarzinommetastasen mit Hilfe tumorspezifischer adenoviraler Vektoren

Dissertation

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

. . . .

Philipp Breuch aus Hamburg Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin	
Der Universität Hamburg am:	3. August 2005
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbere	eichs
Medizin der Universität Hamburg	
Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende:	PD. Dr. de Weerth
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:	Prof. Dr. Amling
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:	Prof. Dr. Thaiss

#### Eigenständigkeitserklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Hamburg, den 01.04. 2004

Für die Erkenntnis gibt es keine endgültigen Ziele, sondern der Fortschritt der Erkenntnis ist nichts als eine Differenzierung der Fragestellungen.

> Hermann Hesse, Gesammelte Briefe 1936-1948

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis Abbildungsverzeichnis Tabellenverzeichnis	I VII IX
1 Zielsetzung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das kolorektale Karzinom	2
2.1.1 Die Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	3
2.1.2 Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms	4
2.1.3 Therapieverfahren von kolorektalen Lebermetastasen	5
2.1.3.1 Chirurgische Resektion	5
2.1.3.2 Lokale Therapieverfahren	5
2.1.3.3 Neue, experimentelle Therapiekonzepte	5
2.2 Gentherapie als neue, alternative Therapieoption	6
2.2.1 Physikalische Gentransfermethoden	7
2.2.2 Virale Gentransfermethoden	8
2.3 Adenoviren als Therapiewerkzeuge für das metastasierte kolorekt	ale
Karzinom	10
2.3.1 Aufbau und Lebenszyklus	10
2.3.2 Adenoviren als Vektoren für die Gentherapie	12
2.3.3 Adenovirale Gentherapie metastasierter kolorektaler Karzinome	15
2.3.3.1 Enzym/Prodrug Systeme	16
2.3.3.2 Korrektur von molekulargenetischen Defekten und Beeinflussu	ing
der Tumorangiogenese	16
2.3.3.3 Immunmodulatorische Ansätze durch Zytokine	17
2.4 Tumorspezifische, adenovirale Gentherapie des kolorektalen	
Karzinoms	19
2.4.1 Tumorspezifische Promotoren für die Therapie des kolorektalen	
Karzinoms	20
2.4.1.1 CEA Promotor	21
2.4.1.2 β-Catenin/Tcf4 regulierter Promotor	21

2.4.1.3 DF3/MUC1 Promotor	22
2.4.2 Probleme der tumorspezifischen Gentherapie	24
2.4.2.1 Gal4-VP16 Fusionsprotein als Amplifikator tumorspezifischer	
Promotoren	24
2.5 Interleukin-12 als Transgen für die Konstruktion therapeutischer,	
adenoviraler Vektoren	27
2.5.1 Struktur und Biologie des Interleukin-12	27
2.5.2 Das p40/p35 Fusionsprotein des Interleukin-12	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Materialien	30
3.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	30
3.1.2 Enzyme	31
3.1.3 Molekulargewichtsstandards, dNTP, Proteine und Antikörper	32
3.1.4 Labormaterial	32
3.1.5 Geräte	33
3.1.6 Medien und Zusätze für das Arbeiten mit Bakterien	33
3.1.7 Verwendete Plasmide	34
3.1.8 Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur	34
3.1.9 Verwendete Zelllinien	35
3.1.10 Hergestellte Pufferlösungen	35
3.1.11 Hergestellte Lösungen	36
3.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken	37
3.2.1 Sterilisation	37
3.2.2 Wasseraufbereitung	37
3.2.3 Absorbtionsmessung	37
3.2.4 Restriktionsverdau	37
3.2.5 Auffüllen überhängender Enden (Blunten)	38
3.2.6 Dephosphorilierung des 5' Ende eines DNS-Fragments	38
3.2.7 Ligation von DNS-Fragmenten mit überhängenden Enden	38
3.2.8 Ligation von DNS-Fragmenten mit aufgefüllten Enden	39
3.2.9 Transformation in kompetente E. coli	39
3.2.10 Kryokonservation von Bakterien	39

3.2.11 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	. 40
3.2.12 Gelelektrophorese	. 40
3.2.13 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	. 41
3.2.14 Aufreinigung von DNS nach enzymatischen Reaktionen	. 41
3.2.15 Endotoxinaufreinigung von Plasmid DNS	. 41
3.3 Allgemeine Arbeitstechniken für die Zellkultur	. 42
3.3.1 Aussähen von tiefgefrorenen Zellen	. 42
3.3.2 Kultivierung und Passagierung	. 42
3.3.3 Zellzählung und Vitalitätsprüfung durch den Trypanblau-	
Ausschlusstest	. 42
3.3.4 Einfrieren	. 43
3.3.5 Calcium-Phosphat-Transfektion von Plasmid-DNS in Zelllinien	. 43
3.3.6 Transfektionskontrolle mit Hilfe der $\beta$ -Galaktosidasefärbung	. 43
3.4 Spezielle molekularbiologische Arbeitstechniken	. 44
3.4.1 Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide	. 44
3.4.1.1 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSystmsclL-12	. 44
3.4.1.2 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-Red2	. 45
3.4.1.3 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSystRed2	. 45
3.4.2 Funktionale Charakterisierung der klonierten adenoviralen	
Expressionsplasmide	. 46
3.4.2.1 Single-chain Interleukin-12 Expressionsvergleich nach Transfekti	on
von adenoviralen Expressionsplasmiden in verschiedene	
eukaryotische Zelllinien	. 46
3.4.2.2 Funktionelle Prüfung des adenoviralen Expressionsplasmids	
pAd.DF3/MUC1-binSystRed2	. 47
3.4.3 Sequenzierung des binären Systems	. 47
3.5 Arbeiten mit adenoviralen Vektoren	. 49
3.5.1 Allgemeines zur Durchführung	. 49
3.5.2 Konstruktion des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-mscIL-12	
(Calcium-Phosphat-Kopräzipitation)	. 49
3.5.2.1 Verifizierung der Virusplaques (CPE-Assay) und funktionale	
Prüfung	. 50
3.5.2.2 Vermehrung und Aufreinigung	. 51
3.5.2.3 Titration (Plaque-Assay)	. 52

3.5.2.4 Funktionale Charakterisierung des Virus (Interleukin-12 ELISA)	54
3.5.3 Konstruktionsversuch der adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-	
binSyst-mscIL-12 und Ad.DF3/MUC1-binSystRed2	54
3.5.4 Charakterisierung der tumorspezifischen adenoviralen Vektoren in der	r
Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mittels Luciferase	55
3.5.4.1 Viraler Luciferaseexpressionstest in verschiedenen Zelllinien	55
3.5.4.2 Promotorkinetik durch Luciferaseexpressionstests	56
3.6 Adenovirale Experimente <i>in vivo</i>	56
3.6.1 Präparation der adenoviralen Vektoren für die Experimente in vivo	56
3.6.1.1 Vermehrung und Aufreinigung des adenoviralen Vektors	
Ad.DF3/MUC1-binSystLuc	56
3.6.1.2 Funktionale Prüfung, Vermehrung und Aufreinigung des	
adenoviralen Vektors Ad.CMV-GFP	57
3.6.2 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Fixierung der murinen	
Gewebe für die Fluoreszenzmikroskopie	57
3.6.3 Versuchstiere	58
3.6.4 Intrahepatisches Multimetastasenmodell	59
3.6.5 Applikation der viralen Vektoren	60
3.6.6 Terminierung der Tiere und Fixation der Lebern	60
3.6.7 Immunhistologische Darstellung der Luciferase	60
3.6.8 Fluoreszenzmikroskopie am paraffin-eingebetteten Lebergewebe	61
4 Ergebnisse	62
4.1 Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide	62
4.1.1 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSystmscIL-12	62
4.1.2 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-Red2	64
4.1.3 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSvstRed2	65
4.2 Funktionale Charakterisierung der klonierten, adenoviralen	
Expressionsplasmide	66
4.2.1 Single-chain Interleukin-12 Expressionsvergleich nach Transfektion vo	on
adenoviralen Expressionsplasmiden in verschiedene eukarvotische	
Zelllinien	66

4.2.2 Funktionale Prüfung der adenoviralen Expressionsplasmide	
pAd.DF3/MUC1-binSystRed268	8
4.3 Sequenzierung des binären Systems69	9
4.4 Konstruktion adenoviraler Vektoren	1
4.4.1 Konstruktion des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-mscIL-127	1
4.4.1.1 Funktionale Charakterisierung des Virus (Interleukin-12 ELISA) 7	1
4.4.2 Konstruktionsversuch der adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-	
binSystmscIL-12 und Ad.DF3/MUC1-binSystRed2	3
4.5 Charakterisierung der tumorspezifischen adenoviralen Vektoren in der	,
Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mittels Luciferase	3
4.5.1 Viraler Luciferaseexpressionstest in verschiedenen Zelllinien	3
4.5.2 Promotorkinetik durch Luciferaseexpressionstests	6
4.6 Adenovirale Experimente <i>in vivo</i>	9
4.6.1 Präparation der adenoviralen Vektoren für die Experimente in vivo 79	9
4.6.1.1 Vermehrung und Aufreinigung des adenoviralen Vektors	
Ad.DF3/MUC1-binSystLuc	9
4.6.1.2 Funktionelle Prüfung, Vermehrung und Aufreinigung des	
adenoviralen Vektors Ad.CMV-GFP80	0
4.6.2 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Fixierung der murinen	
Gewebe für die Fluoreszenzmikroskopie	D
4.6.3 Tumorspezifische, adenovirale Genexpression im murinen Tiermodell 82	2
5 Diskussion	6
5.1 Konstruktion von tumorspezischen, adenoviralen Vektoren zur	
antitumoralen Therapie mit dem Interleukin-12 Fusionsprotein	6
5.1.1 Single-chain Interleukin-12 Expressionsvergleich nach Transfektion von	
adenoviralen Expressionsplasmiden in verschiedene eukaryotische	
Zelllinien	6
5.1.2 Charakterisierung des Vektors Ad.DF3/MUC1-mscIL-12	8
5.1.2.1 Effektivere Ausschleusung des Interleukin-12 Fusionsproteins	
(sclL-12)	8
5.1.3 Konstruktionsversuch der adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-	
binSystmscIL-12 und Ad.DF3/MUC1-binSystRed2	0

5.2 Vektorcharakterisierung in MCA-26-Zellen mittels Luciferase und
hepatisches Multimetastasenmodell92
5.2.1 Charakterisierung der tumorspezifischen adenoviralen Vektoren in der
Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mittels Luciferase
5.2.1.1 Abhängigkeit des Amplifikationsfaktors des Fusionsproteins von der
Transduktionseffizienz
5.2.1.2 Verstärkender Effekt der Muzinexpression in Kombination mit der
intrazellulären Konzentration der spezifischen Vektoren
5.2.1.3 Akkumulation von Gal4-VP16 in der Kolonkarzinomzelllinie im
Verlauf von 7 Tagen und ein zunehmender, amplifizierender
Effekt
5.2.1.4 Reduktion der Tumorspezifität des DF3/MUC1 Promotors durch
Gal4-VP16 in muzin-negativen Karzinomzellen
5.2.2 In vivo Experimente am murinen, hepatischen Multimetastasenmodell 98
5.2.2.1 Deutliche Spezifität des DF3/MUC1 Promotors in Hepatozyten 99
5.2.2.2 Selektive Luciferaseexpression durch den DF3/MUC1 Promotor in
Kolonkarzinommetastasen bei geringer Transduktion
5.3 Ausblick zur adenoviralen Gentherapie kolorektaler
Lebermetastasen 102
5.3.1 Systemische Vektorapplikation für die Therapie von Metastasen 102
5.3.2 Neue adenovirale Vektoren für die Therapie kolorektaler Metastasen 105
6 Zusammenfassung107
7 Literatur consistencia
108 / Literaturverzeichnis
8 Anhang130
8.1 Abkürzungsverzeichnis 130
8.2 Bezugsquellenverzeichnis
9 Danksagung136
40 Laboralouf
10 Levensiau

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1:	Aufbau eines Adenovirus mit seinen wichtigsten Struktur-	
		merkmalen	10
Abbildung	2:	Genomorganisation der adenoviralen Wildtypform	11
Abbildung	3:	Zusammenfassung der wichtigsten Ereignisse der frühen Phase	
		des adenoviralen Lebenszykluses	12
Abbildung 4	4:	Prinzip der Herstellung adenoviraler Vektoren durch homologe	
		Rekombination	15
Abbildung	5:	Prinzip der Amplifikation durch das Fusionsprotein Gal4-VP16	26
Abbildung	6:	Makroskopisches Bild von 2 Virusplaques im 293-Zell-Monolayer	50
Abbildung <sup>·</sup>	7:	Virusbanden nach der Ultrazentrifugation	52
Abbildung	8:	Plaque-Assay	53
Abbildung	9:	Plasmidkarte für das adenovirale Expressionsplasmid	
		pAd.DF3/MUC1-binSystmscII-12	62
Abbildung	10:	Kontrollverdau der Klonierung für pAd.DF3/MUC1-	
		binSystmscIL-12	63
Abbildung	11:	Plasmidkarte für das adenovirale Expressionsplasmid	
		pAd.DF3/MUC1-Red2	64
Abbildung	12:	Kontrollverdau der Klonierung für pAd.DF3/MUC1-Red2	64
Abbildung	13:	Plasmidkarte für das adenovirale Expressionsplasmid	
		pAd.DF3/MUC1-binSystRed2	65
Abbildung	14:	Kontrollverdau der Klonierung für pAd.DF3/MUC1-binSystRed2.	65
Abbildung	15:	Amplifikation der Interleukin-12 Expression durch das binäre	
		System	67
Abbildung	16:	Vergleich der amplifizierten, spezifischen Interleukin-12 Expressio	n
		mit der CMV-vermittelten Genexpression	67
Abbildung	17:	Vergleich der nicht-amplifizierten spezifischen Interleukin-12	
		Expression mit der CMV-vermittelten Genexpression	68
Abbildung	18:	Fluoreszenzmikroskopie von pAd.DF3/MUC1-binSystRed2	
		transfizierten 293-Zellen	68
Abbildung	19:	Sequenz des binären Systems	70
Abbildung	20:	Vergleich der nicht-amplifizierten spezifischen Genexpression mit	
		der CMV-vermittelten auf adenoviraler Vektorenebene	72

Abbildung 21:	Amplifikation der Luciferaseexpression durch das binäre System.	75
Abbildung 22:	Vergleich der amplifizierten, spezifischen Genexpression mit der	
	CMV-vermittelten Genexpression durch Luciferasevektoren	75
Abbildung 23:	Vergleich der nicht-amplifizierten, spezifischen Genexpression mit	
	der CMV-vermittelten Genexpression durch Luciferasevektoren	76
Abbildung 24:	Amplifikation der Genexpression durch das binäre System über die	е
	Zeit	78
Abbildung 25:	Vergleich der amplifizierten, spezifischen Genexpression mit der	
	CMV-vermittelten Genexpression über die Zeit	78
Abbildung 26:	Vergleich der nicht-amplifizierten, spezifischen Genexpression mit	
	der CMV-vermittelten über die Zeit	79
Abbildung 27:	GFP Expression in HepG-2-Zellen nach Infektion mit	
	Ad.CMV-GFP	80
Abbildung 28:	Adenoviral infizierte MCA-26 Kolonkarzinomzellen	81
Abbildung 29:	Intrahepatische und intratumoraleTransgendetektion durch	
	Immunfluoreszenz	85

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadiengruppierungen des Kolonkarzinoms, Stadienverteilung zum	
Zeitpunkt der Primärdiagnose sowie Erkrankungsprognose	2
Tabelle 2: Hauptgruppen der viralen Vektoren	9
Tabelle 3: Verwendete Plasmide	34
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	35
Tabelle 5: Charakteristika der Fluoreszenzproteine für die Experimente in vivo	61
Tabelle 6: Stärke der Fluoreszenz bei unterschiedlichen Fixierungen	81

### 1 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll ein neuer, adenoviraler Therapieansatz des metastasierten kolorektalen Karzinoms untersucht werden. Tumorspezifische Vektoren, die einen amplifizierten Muzinpromotor beinhalten, sollen hergestellt und *in vitro* sowie in einem murinen Tiermodell charakterisiert werden.

**Charakterisierung der Vektoren:** Zunächst gilt es, die durch ein Gal4-VP16 Fusionsprotein amplifizierte Genexpression des tumorspezifischen Muzinpromotors (DF3/MUC1) in der murinen Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck werden tumorspezifische Vektoren, die das Markergen Luciferase kodieren mit einem unspezifischen Luciferasevektor, der einen CMV Promotor beinhaltet, in MCA-26-Zellen sowie in weiteren murinen und humanen Zelllinien verglichen.

Intrahepatisches Tumormodell: Um die selektive und amplifizierte Genexpression des tumorspezifischen Adenovirus im Vergleich zu dem CMV-Vektor in einem Organismus qualitativ zu untersuchen, soll *in vivo* mit der syngenen kolorektalen Karzinomzelllinie MCA-26 eine diffuse Metastasierung in der Leber von Balb/c Mäusen erzeugt werden. Über eine systemische Gabe wird ein Gemisch aus dem zu konstruierenden spezifischen Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 und dem konstitutiv exprimierenden Vektor Ad.CMV-GFP appliziert. Der spezifische Vektor kodiert für ein rot fluoreszierendes und der unspezifische für ein grün fluoreszierendes Protein. Histopathologische Untersuchungen der murinen Lebern sollen die Selektivität des tumorspezifischen Ansatzes visuell eruieren.

**Therapeutische Vektoren:** Darüber hinaus sollen adenovirale Expressionsplasmide sowie adenovirale Vektoren zur tumorspezifischen Expression des antitumoral wirksamen, jedoch potentiell toxischen Zytokins Interleukin-12 konstruiert und *in vitro* charakterisiert werden.

### 2 Einleitung

#### 2.1 Das kolorektale Karzinom

In den U.S.A. wurden für das Jahr 2002 von der American Cancer Society 148.300 neue Fälle von kolorektalen Karzinomen und 56.600 spezifische Todesfälle registriert. Diese Zahlen machen das kolorektale Karzinom zu der zweithäufigsten diagnostizierten Krebsart und krebsbedingten Todesursache in den Vereinigten Staaten (Jemal *et al.*, 2002). Das Risiko, in seinem Leben die Diagnose kolorektales Karzinom gestellt zu bekommen, beträgt für die U.S. Bevölkerung ca. 6 % und 2,3 % der Bevölkerung verstirbt an dieser Krebsart (SEER, 1973-1998), die zu 41,5 % im Rektum oder Sigmoid, und zu 37 % im Colon descendens lokalisiert ist (Cheng *et al.*, 2001). Das bevorzugte Organ für eine Metastasierung ist aufgrund der portal-venösen Blutversorgung die Leber.

Ein kurativer Ansatz durch alleinige chirurgische Therapie ist mit großer Wahrscheinlichkeit nur bei frühen Tumorstadien möglich. Liegt eine Ausbreitung in regionäre Lymphknoten vor (Stadium III, Dukes C) oder bestehen bereits Fernmetastasen (Stadium IV, Dukes D), so verschlechtert sich die Überlebensprognose deutlich (Tabelle 1). Zum Zeitpunkt der Primäroperation liegt bei 30 % der Patienten ein Stadium III vor und 25 % befinden sich bereits im Stadium IV. Insgesamt entwickeln 60 % aller Patienten mit kolorektalem Karzinom im Verlauf ihrer Erkrankung Fernmetastasen, was in der Regel eine palliative Zielsetzung der onkologischen Therapieführung zur Folge hat (Grothey *et al.*, 2002).

UICC		Dukes	Astler- Coller	т	N	М	Häufigkeit	5-Jahres-Überleben
0	Α		Α	Tis	N0	M0		
I	Α		Α	T1			12 %	90 %
			B1	T2				
П	В	B1	B2	Т3			30 %	60-80 %
		B2	B3	T4				
Ш	С		C1	T1, T2	N1, N2		25 %	30-60 %
			C2	Т3				
			C3	T4				
IV	D		D	jedes T	jedes N	M1	33 %	5 %

Tabelle 1: Stadiengruppierungen des Kolonkarzinoms, Stadienverteilung zum Zeitpunkt der Primärdiagnose sowie Erkrankungsprognose (nach Grothey *et al.*, 2002)

#### 2.1.1 Die Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Das genetische Modell von Fearson und Vogelstein für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms beschreibt eine sukzessive Anhäufung von genetischen Veränderungen. Dies führt als morphologisches Korrelat zu einer Reihe von histopathologischen Umgestaltungen des kolorektalen Epithels. Kolorektale Tumore entstehen nach diesem Modell als eine Konsequenz aus der mutationsbedingten Aktivierung von Onkogenen und der ebenfalls durch Mutation bedingten Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Diese Veränderungen entstehen durch eine sich entwickelnde chromosomale Instabilität. Mehrere solcher Mutationen sind für die Ausbildung eines malignen Tumors notwendig, wohingegen wenige für die Entwicklung eines Adenoms als prämaligne Läsion ausreichen. Es wird vermutet, dass die absolute Akkumulation dieser genetischen Veränderungen für die Entstehung eines Karzinoms entscheidender ist als die Reihenfolge in der sie auftreten (Fearson und Vogelstein, 1990).

In dem Prozess der sporadischen Kolonkarzinomgenese muss das Adenomatosis polyposis coli Gen (APC) inaktiviert werden. Mutationen in diesem Gen sind in ca. zwei Drittel der Adenome und sporadischen Kolonkarzinome zu finden (Powell *et al.*, 1992) und spielen auch bei der Entstehung einer familiären Adenomatosis polyposis eine wichtige Rolle (Groden *et al.*, 1991). In den verbleibenden sporadischen Kolonkarzinomen ist das APC-Gen durch Methylierung der Promotorsequenz inaktiviert (Hiltunen *et al.*, 1997). Das APC-Gen phosphoryliert normalerweise zelluläres  $\beta$ -Catenin und ermöglicht dadurch dessen Abbau. Ohne diese Reaktion akkumuliert  $\beta$ -Catenin in der Zelle und aktiviert zelluläre Wachstumsgene (Morin *et al.*, 1997).

Ein weiteres Merkmal der malignen Transformation sind Mutationen im Ras-Onkogen. Derartige Veränderungen sind bei vielen Kolonkarzinompatienten in frühen und mittleren Adenomstadien dokumentiert (Fearson und Vogelstein, 1990). In späteren Stadien der Adenomentstehung sind häufig Chromosomendeletionen zu finden. Hier ist besonders der Verlust von 18q21 zu erwähnen, der zwei vermeintliche Tumorsuppressorgene beinhaltet. Chromosomale Deletionen auf dem Chromosom 18 sind in über 60 % der Kolonkarzinome zu finden (Thiagalingam *et al.*, 1996).

3

Ebenfalls ein späteres molekulares Ereignis sind Veränderungen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17, die u.a. mit einem Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53 assoziiert sind. Zusammen mit anderen genetischen Abnormitäten verstärken sie die genomische Instabilität (Fearson und Vogelstein, 1990).

Neben dieser Form existiert als weitere Art der genomischen Instabilität die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (lonov *et al.*, 1993). Sie ist ein Charakteristikum des Hereditären nichtpolypösen Kolorektalen Karzinom Syndroms (Lynch Syndrom). Dabei verliert das kolorektale Epithel durch Mutationen in *Missmatch Repair* Genen die Fähigkeit DNS-Fehler zu reparieren. Somatische Mutationen des hMLH1- und hMSH2-Gens sind in sporadisch entstehenden Tumoren beschrieben und entwickeln sich in der späten Phase der Tumorgenese (Thibodeau *et al.*, 1998).

Für sporadische, herediäre nichtpolypöse und Colitis ulcerosa-assoziierte kolorektale Karzinome wurden zusätzlich Mutationen im TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II beschrieben (Markowitz *et al.,* 1995 und Souza *et al.,* 1997). TGF- $\beta$  hat in nichttransformiertem menschlichen Kolonepithel einen starken antiproliferativen und proapoptotischen Effekt (Alexandrow und Moses, 1995). Menschliche Kolonkarzinome, die eine fehlerhafte *Missmatch Repair* Funktion aufweisen, zeigen gewöhnlich eine genetisch bedingte Suppression der TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II Funktion (Markowitz *et al.,* 1995). Insgesamt zeigen 12 % der sporadischen, humanen Kolonkarzinome eine Mikrosatelliteninstabilität als Folge des Verlustes der Missmatch Repair Funktion (Ionov *et al.,* 1993).

#### 2.1.2 Chemotherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Durch die Chemotherapie soll versucht werden, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern oder zu erhalten und die Zeit bis zur Tumorprogression hinauszuzögern. Auch wenn moderne Kombinationschemotherapien die medianen Überlebenszeiten einer rein supportiven Behandlung von 5 bis 7,5 Monaten mehr als verdoppelt haben (Scheithauer *et al.* 1993), beträgt diese jedoch nur ungefähr 18 Monate (Douillard *et al.*, 2000; Giacchetti *et al.*, 2000). Als Chemotherapeutika wird bei diesem Palliativansatz, wie auch bei der adjuvanten Therapie im Tumorstadium III, eine Kombination von 5-Fluoruracil und Folinsäure (5-FU/FS) verwendet. Vergleichbar hierzu sind orale Fluorpyrimidine wie Capecitabine (van Cutsem *et al.* 2001). Neben den Fluorpyrimidinen sind Irinotecan als DNS-Topoisomeraseinhibitor und das Platinanalog Oxaliplatin die wirksamsten Einzelsubstanzen. Die Ansprechrate dieser drei Substanzgruppen bei metastasierter Erkrankung beträgt jedoch nur ca. 15 % (Köhne *et al.*, 1998).

#### 2.1.3 Therapieverfahren von kolorektalen Lebermetastasen

#### 2.1.3.1 Chirurgische Resektion

Bei 15 bis 25 % der Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen werden die Lebermetastasen chirurgisch reseziert, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate nur ca. 30 % beträgt. Durch neue Strategien wie eine neoadjuvante Chemotherapie, eine portal-venöse Embolisation sowie eine zweistufige Hepatektomie kann der Prozentsatz der resektablen Patienten erhöht werden (Fusai und Davidson, 2003). Bei etwa 50 % der Patienten kommt es im Anschluss an einen potenziell kurativen Eingriff nach 12 bis 14 Monaten zu einem Tumorrezediv in der Leber und/oder in der Lunge (Fong *et al.,* 1999).

#### 2.1.3.2 Lokale Therapieverfahren

Lebermetastasen bis zu einer Größe von 4 bis 5 cm können durch Kryotherapie, Laserbehandlung oder Hochfrequenzthermoablation behandelt werden. Derzeit fehlen jedoch noch Studien, um den Stellenwert dieser lokalen Verfahren gegenüber der chirurgischen Therapie oder einer systemischen Chemotherapie beurteilen zu können. Es gilt noch festzustellen, ob die teilweise günstigen Ergebnisse nur auf einer Patientenselektion beruhen.

#### 2.1.3.3 Neue, experimentelle Therapiekonzepte

In Anbetracht der limitierten therapeutischen Optionen des hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms ist eine Vielzahl von molekularen Therapieformen in der Erprobung. Es werden Techniken für die Herstellung von Makromolekülen wie DNS und Antikörper oder sogar Immunzellen oder Viren für die Anwendung *in vivo* entwickelt. Die Grundlagenforschung der letzten 20 Jahre auf den Gebieten der Biochemie, Molekular- und Zellbiologie hat zudem wesentliche Mechanismen der intrazellulären Regulation von Wachstum, Differenzierung, Transformation und programmiertem Zelltod aufgedeckt und entscheidend dazu beigetragen, die molekularbiologischen Grundlagen des kolorektalen Karzinoms zu verstehen. Dies hat zur Identifizierung neuer Tumorantigene geführt, die wiederum Ziele für einen therapeutischen Ansatz darstellen.

Auf eine spezifische Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten zielt der Ansatz unter Verwendung dentritischer Zellen ab, die mit kolorektalen Karzinomantigenen bzw. deren RNS transfiziert sind. Eine derartige Vakzinierung mit CEA-Antigen beladenen dentritischen Zellen in Kombination mit einem hämatopoetischen Wachstumsfaktor zeigte bei einigen Patienten eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs (Fong *et al.,* 2001).

Antikörper, die gegen überexprimierte Antigene der malignen Zellen gerichtet sind, stellen einen weiteren immunologischen Therapieansatz dar. Radioaktiv markierte Anti-CEA-Antikörper wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt (Ychou *et al.,* 1998). Ein allgemeines Problem bei der Anwendung von Antikörpern, das zum Therapieversagen beitragen kann, ist jedoch die Entwicklung von humanen Anti-Maus-Antikörpern im Laufe der Therapie (Sears *et al.,* 1982).

#### 2.2 Gentherapie als neue, alternative Therapieoption

Die Gentherapie stellt ein weiteres experimentelles Therapiekonzept zur Behandlung dieser malignen Erkrankung dar. Ursprünglich diente die Übertragung fremder genetischer Information in eukaryotische Zellen dazu, Genfunktionen zu untersuchen. Bald darauf rückte der biotechnologische Einsatz zur Herstellung rekombinanter Genprodukte stärker in den Vordergrund. Der Transfer neuer genetischer Information in ein Individuum markiert schließlich einen Höhepunkt dieser Entwicklung. Er stellt die Grundlage der Gentherapie als neuen Wissenschaftszweig dar und könnte in naher Zukunft die Behandlung von vererbten und erworbenen Gendefekten ermöglichen. In Anbetracht der schlechten Prognose von Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Stadium IV mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5 % wurde versucht, neue, sichere und effektive Therapieverfahren zu entwickeln. Vor dem Hintergrund der genetischen Veränderungen als Grundlage für die Enstehung maligner Erkrankungen stellt die Gentherapie eine neue, viel versprechende Option dar.

#### 2.2.1 Physikalische Gentransfermethoden

Um Fremd-DNS in Zellen einzubringen, stehen einige direkte, physikalische Transfertechniken zur Verfügung, die allerdings keine große Effizienz aufweisen. Dies hängt zum Teil mit der Tatsache zusammen, dass Makromoleküle, wie zum Beispiel DNS, in der Zelle in spezielle endosomale und lysosomale Vesikel aufgenommen und dort abgebaut werden.

Die **Elektroporation** ist in diesem Zusammenhang ein Verfahren, bei dem die Zellen in einem elektrischen Feld einer hohen Spannung ausgesetzt und dadurch permeabel für die DNS-Moleküle werden (Andreason und Evans, 1988). In einem subkutanen Tumormodell konnte durch Elektroporation eines Plasmids, das für das Interleukin-12 Fusionsprotein kodiert, eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums sowie eine partielle, systemische Immunität erreicht werden (Tamura *et al.*, 2001). Lee und Kollegen (2003) konnten zudem eine Wachstumsverlangsamung von kolorektalen Lungenmetastasen durch intramuskuläre Elektroporation eines IL-12-Plasmids im murinen Tiermodell erzielen.

Eine intratumorale **Injektion von nackter Plasmid-DNS**, die das Enzym Cytosindesaminase kodiert, führte bei kolorektalen Lebermetastasen in Kombination mit einer systemischen Gabe des Prodrugs 5-FC zu einer signifikanten Tumorregression und Überlebensverlängerung in einem Rattenmodell (Baque *et al.*, 2002).

Ein weiteres Verfahren benutzt Membranvesikel aus einer Lipiddoppelschicht (Liposomen), die durch Fusion mit der Zellmembran in die Zielzellen eingeschleust werden (Mannino und Gould-Fogerite, 1988). Der aus den Lipiden DMRIE-DOPE bestehende liposomale Vektor Allovectin-7 wurde erfolgreich in die Leberläsionen von Kolonkarzinompatienten eingeschleust. Dieser Vektor kodiert für die Genprodukte HLA-B7 und  $\beta$ -2-Mikroglobulin und soll die in 60 % der Tumore vorkommenden MHC I Antigenveränderungen kompensieren (Rubin *et al.*, 1997). In dieser Studie konnte allerdings kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden.

Der Anteil von physikalischen Gentransfermethoden an Gentherapiestudien beträgt ca. 25 %, wobei circa die Hälfte auf Lipofektion und ein Drittel auf der Injektion von nackter Plasmid-DNS beruht (http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

#### 2.2.2 Virale Gentransfermethoden

Dieser Forschungszweig nutzt den evolutionär alten, aber sehr effektiven viralen Infektionsmechanismus aus, um genetische Information in Zielzellen einzuschleusen. Ein derartiger viraler Vektor für die Therapie von Krebserkrankungen sollte idealerweise folgende Eigenschaften besitzen:

- Hohe Konzentration (> 10<sup>8</sup> Partikel/ml)
- Einfache und reproduzierbare Herstellung
- Hohe Effizienz beim Einbringen des Therapiegens in die Zielzellen
- Ausschließliche Infektion von Tumorzellen bzw. Beschränkung der Genexpression auf die malignen Gewebe
- Regulierbare Genexpression (regulierbare Promotoren)
- Keine Immunantwort gegen den Vektor

Derzeit erfüllt noch kein viraler Vektor alle diese Eigenschaften. Eine persistierende Genexpression durch die Fähigkeit zur gezielten Integration in das menschliche Genom bzw. die stabile episomale Persistenz ist bei der Therapie von metabolischen Erkrankungen, nicht jedoch bei Tumorkrankheiten, notwendig und birgt zudem die Gefahr durch eine Insertionsmutagenese selber eine maligne Erkrankung zu induzieren (Check, 2002).

In der vorliegenden Arbeit soll ausschließlich näher auf die adenoviralen Gentransfermethoden als Grundlage der adenoviralen Gentherapie von malignen Erkrankungen eingegangen werden. Adenoviren besitzen für diesen Zweck eine Reihe der geforderten Eigenschaften und haben mit ca. 25 % einen großen Anteil an den derzeitigen Gentransferstudien. Einen Überblick zu den Hauptgruppen der viralen Vektoren bietet Tabelle 2.

viraler Vektor	Charakteristika	Vorteile	Nachteile
Retrovirus	<ul> <li>RNS-Virus</li> <li>bis 8 kb Fremd-DNS</li> <li>integriert sich in das Wirtsgenom</li> </ul>	<ul> <li>persistierender Gen- transfer</li> <li>niedriges Entzün- dungspotenzial</li> </ul>	<ul> <li>nur Infektion von sich tei- lenden Zellen</li> <li>Induktion einer malignen Transformation ist möglich</li> <li>relativ niedrige Titer (10<sup>6</sup>- 10<sup>7</sup>)</li> </ul>
Lentivirus	<ul> <li>RNS-Virus</li> <li>bis 8 kb Fremd-DNS</li> <li>breiter Zelltropismus</li> <li>integriert sich in das Wirtsgenom</li> </ul>	<ul> <li>persistierender Gen- transfer in den meis- ten Geweben</li> <li>niedriges Entzün- dungspotenzial</li> </ul>	<ul> <li>Induktion einer malignen Transformation ist möglich</li> </ul>
HSV-1	<ul> <li>dsDNS-Virus</li> <li>bis zu 40 kb Fremd- DNS (bei Amplicon bis zu 150 kb)</li> <li>starker neuronaler Zelltropismus</li> <li>Genom liegt in der Wirtszelle episomal vor</li> </ul>	<ul> <li>große Verpackungs- kapazität</li> <li>starker neuronaler Tropismus</li> </ul>	<ul> <li>in nicht-neuronalen Zellen nur transiente Transgen- expression</li> <li>hohes Entzündungspoten- zial</li> </ul>
Adeno- assoziierte Viren (AAV)	<ul> <li>ssDNS-Virus</li> <li>&lt; 5 kb Fremd-DNS</li> <li>breiter Zelltropismus</li> <li>90 % liegen in der Wirtszelle als episo- male Form vor</li> <li>10 % integrieren sich ins Genom</li> </ul>	<ul> <li>nicht pathogen</li> <li>nicht entzündungs- auslösend</li> </ul>	<ul> <li>kleine Verpackungskapa- zität</li> </ul>
Adenovirus	<ul> <li>dsDNS-Virus</li> <li>bis 8 kb Fremd-DNS (bei helferabhängigen Viren bis 30 kb)</li> <li>breiter Zelltropismus</li> <li>liegen in der Wirtszelle episomal vor</li> </ul>	<ul> <li>extrem effiziente Transduktion der meisten Gewebe</li> <li>Herstellung in hohen Titern (10<sup>12</sup>)</li> </ul>	<ul> <li>kapsid-vermittelte ent- zündliche Immunantwort</li> <li>hohes Entzündungspoten- zial</li> <li>nur transiente Genexpres- sion</li> </ul>

## 2.3 Adenoviren als Therapiewerkzeuge für das metastasierte kolorektale Karzinom

#### 2.3.1 Aufbau und Lebenszyklus

Adenoviren werden in zwei Gattungen unterteilt, die Mastadenoviren, die Säugetiere infizieren können und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind. Es werden mehr als 100 serologische Formen unterschieden. Adenoviren haben ein sehr breites Wirtsspektrum. Sie können sich teilende, ruhende wie auch bereits ausdifferenzierte Zellen infizieren. Im Allgemeinen befallen Adenoviren vor allem das Epithel der oberen Atemwege. Sie verursachen 5 - 15 % aller Erkältungskrankheiten. Das Virus kann jedoch auch Krankheiten wie Keratokonjunktivitis, Gastroenteritis, Pneumonie, Bronchitis und Hepatitis auslösen.

Morphologische Charakteristika des 80 nm durchmessenden Adenovirus sind ein ikosaedrisches Kapsid mit 252 Untereinheiten, bestehend aus drei Hauptproteinen: Hexonproteine (240), Pentobasisproteine (12) und Fiberproteine (Stewart *et al.,* 1993). Das Virusgenom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNS von ungefähr 36 kb Länge, die in 100 *map units* (mu) unterteilt wird. An jedem Genomende liegen so genannte *inverted terminal repeats* (ITR's), die für die Verpackung und Replikation des Virusgenoms in Virionen wichtig sind. Am 5'-Ende ist zudem kovalent ein terminales Protein gebunden (Rekosh *et al.,* 1977).



Abb. 1: Aufbau eines Adenovirus mit seinen wichtigsten Strukturmerkmalen





Dargestellt sind nur die wichtigsten Charakteristika des adenoviralen Genoms. Es ist in 100 Einheiten mit einer Länge von je 0,36 kb unterteilt. Für die Verpackung und Replikation des Genoms in Virione sind die *inverted terminal repeats* (ITR's) an beiden Enden wichtig. Die E1-Region kodiert für zwei Transkriptionsfaktoren, die E2-Genprodukte werden bei der Virusreplikation benötigt. Eine Suppression des wirtseigenen Immunsystems wird von der E3-Region bewirkt. Die E4-Gene sind zum einen an frühen transkriptionellen Prozessen beteiligt, fördern aber auch den Übergang zur späten Phase der Replikation. L1-L5 sind die späten viralen Gene und kodieren für Strukturproteine. Das VA-Gen beeinflusst die Translation viraler Proteine und pIX ist für die physikalische Stabilität des Adenovirus verantwortlich. (Abbildung modifiziert nach Günzburg und Salmons, 1997)

Der adenovirale Replikationszyklus dauert 32 - 36 Stunden und lässt sich in zwei Phasen unterteilen. In der ersten Phase bindet sich der Adenovirus mit Hilfe seiner Fiberproteine an den Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor, der zur Immunglobulin-Superfamilie gehört (Tomko *et al.*, 2000). Es folgt eine, durch die Bindung des Pentobasisproteins an  $\alpha\nu\beta\beta/\alpha\nu\beta5$ -Integrine induzierte, clathrin-vermittelte Endocytose (Mathias *et al.*, 1998). Durch die virale Protease L3/p23 wird das Viruskapsid angedaut und so durch die Kernporen in den Nucleus transportiert (Greber *et al.*, 1996). Hier bleibt die virale DNS als Episom bestehen und die Transkription und Translation der adenoviralen Gene beginnt.

Die virale Expression und die Virusreifung stellen die zweite Phase dar. Sie können in drei Abschnitte unterteilt werden: sehr frühe, verzögert frühe und späte Genexpression. Zunächst wird, durch zelluläre Transkriptionsfaktoren vermittelt, das E1A-Gen prozessiert. Das Produkt ist an der Transkription der verzögert frühen Gene E1B, E2A, E2B, E3 und E4 beteiligt (Abb. 3) (Nevins, 1981). Ein Komplex aus E1B und E4 aktiviert wiederum die späte Genexpression (Sarnow *et al.*, 1984), deren Gene L1 - L5 hauptsächlich für virale Strukturproteine kodieren, die bei dem Zusammenbau des Cores und des Kapsids benötigt werden. Bei der Kapsidverpackung spielt ein Verpackungssignal am linken Ende des adenoviralen Genoms eine wichtige Rolle (Hearing *et al.,* 1987). Diese Ereignisse führen zur Permeabilitätsänderung der Kernmembran und ermöglichen dem Virus den Übertritt in das Zytoplasma und schließlich durch Lyse der Zellmembran die Freisetzung (Rao *et al.,* 1996 und Tollefson *et al.,* 1996).



Abb. 3: Zusammenfassung der wichtigsten Ereignisse der frühen Phase des adenoviralen Lebenszykluses (Abbildung modifiziert nach Günzburg und Salmons, 1997)

#### 2.3.2 Adenoviren als Vektoren für die Gentherapie

Adenoviren sind in der Lage, ihr Genom in eine Vielzahl von Zelltypen einzuschleusen. Durch den Einbau von Fremdgenen in die adenovirale DNS ist es möglich, in ähnlich effektiver Weise heterologe genetische Informationen in Zellen einzubringen. Dies stellt die Grundlage für die Verwendung von Adenoviren in der Gentherapie dar. Die Tatsache, dass die virale DNS im Kern der Wirtszelle als Episom vorliegt und nicht in das Genom integriert wird, führt nur zu einer transienten Genexpression. Varda-Bloom *et al.* (2001) konnten zeigen, dass in Balb/c Mäusen die konstitutive, adenoviral-vermittelte Genexpression bei systemischer Applikation nach 5 Tagen ihren Maximalwert in der Leber hat und nach 14 Tagen signifikant abfällt. Diese Eigenschaft stellt bei der Tumortherapie einen Vorteil dar, da hier eine hohe, aber temporär beschränkte Genexpression erwünscht ist. Eine mögliche Insertionsmutagenese wie bei Retroviren stellt keine Gefahr dar. Dieses Charakteristikum und die Tatsache, dass Adenoviren leicht und in hohen Titern herzustellen sind, macht sie zu einem geeigneten Werkzeug in der Tumor-Gentherapie.

Da das Adenovirus die infizierten Zellen im Verlauf des Replikationszyklus zerstört, mussten Wege gefunden werden, den viralen Zyklus derart zu beeinflussen, dass nach Infektion der Zelle keine Lyse mehr stattfindet. Zu diesem Zweck hat man die für die Virusreplikation essenzielle E1-Region aus dem Genom entfernt, ohne dabei die Transduktionseigenschaften des Virus zu verändern. Bei dieser Deletion müssen jedoch die ITR's (1 - 103 bp) sowie das Verpackungssignal (194 - 358 bp) erhalten bleiben, da sie essenziell für die virale Lebensfähigkeit sind (Hearing und Shenk, 1983; Hearing *et al.*, 1987; Gräble und Hearing, 1992). Zusätzlich muss für die Verpackung des Genoms in die Virione das Protein IX vorhanden sein, das sich mit dem Leserahmen für E1B überschneidet (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987). Mit solchen Vektoren lassen sich nun effizient Fremdgene in Zellen einbringen und unter der Kontrolle von viralen oder heterologen Promotoren exprimieren.

In einem Wildtyp-Virus ist ein maximaler Einbau von ca. 2 kb Fremd-DNS möglich (Bett *et al.*, 1993). Unter Berücksichtigung der essenziellen Bestandteile, ist eine Deletion der E1-Region von 3,2 kb durchführbar, sodass heterologe DNS mit einer Länge von 5,2 kb eingebaut werden kann (Bett *et al.*, 1994). Um eine größere Kapazität im Virusgenom zu erreichen, kann zusätzlich die nicht-essenzielle E3-Region partiell entfernt werden. Diese Region ist für eine Immunmodulation des Wirtsorganismus bei Infektion eines Wildtyp-Virus verantwortlich (Wold und Gooding, 1991). Durch eine Deletion von 2,69 kb ist der zusätzliche Einbau von genetischem Material möglich. In E1<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup>-Vektoren läßt sich auf diese Weise insgesamt Fremd-DNS mit einer Größe von 7,5 bis 7,9 kb verpacken (Bett *et al.*, 1994).

Für die Produktion derartiger Adenoviren sind spezielle Verpackungszelllinien nötig, die die fehlenden Genprodukte für die Virusreplikation zur Verfügung stellen. Eine solche Zelllinie ist bereits 1977 etabliert worden. Es handelt sich um die menschliche, embryonale Nierenzelllinie 293, die stabil mit den linken 11 % des adenoviralen Genoms transfiziert ist und u.a. die, in den Vektoren deletierte, E1-Region *in trans* zur Verfügung stellt (Graham *et al.,* 1977). Auf diese Weise ist eine Virusreplikation nur in dieser Verpackungszelllinie möglich und nicht in anderen Zellen, die nicht über die E1-Region in ihrem Genom verfügen.

Das Prinzip, das in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von adenoviralen Vektoren verwendet wurde, basiert auf der Arbeit von Bett *et al.* (1994). Das Plasmid pBHG-10, das fast alle essenziellen adenoviralen Sequenzen enthält, die für die Herstellung von infektiösen Viren nötig sind, wird über eine Calciumphosphatpräzipitation in die Verpackungszelllinie 293 transfiziert. Dem Plasmid fehlt jedoch das essenzielle Verpackungssignal für die Herstellung kompletter Viruskapside. Infektiöse Vektoren können nur entstehen, wenn ein Shuttle-Plasmid kopräzipitiert wird, das das linke Ende des adenoviralen Genoms inklusive des Verpackungssignals enthält. Dieses Plasmid weist homologe, adenovirale Bereiche mit pBHG-10 auf, die die deletierte E1-Region flankieren, in der die heterologe DNS kloniert wurde. Durch homologe Rekombination arrangieren sich die beiden Plasmide derart, dass ein komplettes Genom eines infektiösen, adenoviralen Vektors entsteht, das die Fremd-DNS in seiner deletierten E1-Region trägt (Abb. 4).

Die eingebauten Fremd-Gene können zum einem unter der Kontrolle eines adenoviralen Promotors stehen, andererseits können heterologe Promotoren vor dem Transgen mit integriert werden. Beispiele für solche heterologen Promotoren sind der Rous-Sarkom-Virus (RSV) sowie der Cytomegalie-Virus (CMV) Promotor, der in einer Vielzahl von Zelllinien eine starke Expression bewirkt (Schmidt *et al.*, 1990 und Boshart *et al.*, 1985). Neben dem verwendeten Promotor spielt für die Stärke der Transgenexpression ein Polyadenylierungssignal, das dem Gen nachgeschaltet ist, eine entscheidende Rolle. Die Verwendung eines SV40-pA<sup>+</sup>-Signals liefert in diesem Zusammenhang zufrieden stellende Expressionsraten und eine homogene mRNA-Population in adenoviralen Vektoren (Berkner *et al.*, 1987).



#### Abb. 4: Prinzip der Herstellung adenoviraler Vektoren durch homologe Rekombination

Über eine Chalcium-Phosphat-Transfektion gelangen zwei Plasmide in die Verpackungszelle 293. Das Plasmid pBHG10 enthält das gesamte adenovirale Genom bis auf die Verpackungssequenz ψ und eine deletierte E3-Region. Das Shuttle-Plasmid beinhaltet das linke Ende der viralen DNS inklusiv der Verpackungssequenz. In der deletierten E1-Region kann heterologe DNS von maximal 7,8 kb eingebaut werden. In den 293-Zellen, die das deletierte E1-Genprodukt *in trans* zur Verfügung stellt, können nach homologer Rekombination der adenoviralen Sequenzen virale Vektoren erzeugt werden (Abbildung modifiziert nach Bett *et al.*, 1994).

Ap<sup>r</sup>: Ampicillinresistenz, ori: bakterieller Replikationsursprung, Ad5: Adenovirus Serotyp 5, mu: map units, ITR: inverted terminal repeats, Pac I: Restriktionsschnittstelle

#### 2.3.3 Adenovirale Gentherapie metastasierter kolorektaler Karzinome

Die adenoviralen Gentherapieansätze beim kolorektalen Karzinom lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- Enzym/Prodrug Systeme,
- Korrektur der molekulargenetischen Defekte und Beeinflussung der Tumorangiogenese sowie
- immunmodulatorische Ansätze

#### 2.3.3.1 Enzym/Prodrug Systeme

Durch adenovirale Vektoren werden die Gene für Enzyme in die Zielzellen eingeschleust. Diese Enzyme konvertieren eine zugeführte Substanz (Prodrug) von einer unwirksamen Vorstufe in den aktiven Metaboliten, dessen Wirkungen vorwiegend lokal beschränkt bleiben.

Ein Beispiel für ein solches System ist die Thymidinkinase des Herpes simplex Virus 1 (HSV1-tk), die, mit Hilfe zellulärer Kinasen, das Zytostatikum Ganciclovir in seine aktive Triphosphatform überführt, welche hemmend auf die DNS-Synthese wirkt (Moolten, 1986). Es ist bereits eine intratumorale Virusapplikation bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen als klinische Phase I Studie durchgeführt worden (Sung *et al.*, 2001), obwohl in syngenen Tiermodellen zwar eine Tumorregression, jedoch kein tumorfreies Langzeitüberleben bei alleiniger Vektorgabe erreicht werden konnte (Hayashi *et al.*, 1997 und Chen *et al.*, 1995 und 1996).

Andere Arbeitsgruppen verwenden dagegen das Enzym Cytosindeaminase (CD) aus dem Bakterium *E. coli*, das 5-Fluorocytosin (5-FC) in das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil umwandelt (Huber *et al.*, 1993). Block *et al.* (2000) konnte in Tierexperimenten in einem syngenen Multimetastasenmodell bei systemischer Virusgabe eine signifikante Reduktion der Lebermetastasen erreichen, ohne jedoch eine signifikante Verlängerung des Überlebens zu erzielen.

### 2.3.3.2 Korrektur von molekulargenetischen Defekten und Beeinflussung der Tumorangiogenese

Durch die Arbeiten von Fearson und Vogelstein (1990) sind eine Reihe von Mutationen in den den Zellzyklus regulierenden Genen identifiziert worden, die als Ziele für die adenovirale Gentherapie genutzt werden können.

Defekte Tumorsuppressorgene wie p16 oder p53 können mittels Adenoviren in die Tumorzellen eingeschleust werden und bewirken nach Expression die Apoptose der infizierten Zellen (Maron *et al.*, 2001 und Tamm *et al.*, 2002). Maron *et al.* (2001) konnten in einem singulären Metastasenmodell nur durch die intratumorale Injektion eines p53-Vektors unter der Kontrolle eines CMV-Promotors einen thera-

peutischen Effekt nachweisen. Bei Injektion in die Leberarterie sowie bei systemischer Applikation konnte jedoch mit Hilfe eines Vektors mit dem Markergen LacZ keine Transduktion der Tumorzellen erreicht werden. Tamm und Kollegen (2002) reduzierten in einem orthotopen, murinen Lebermetastasenmodell mit dem Vektor Ad.CMV-p16 zwar das lokale Tumorwachstum sowie die Anzahl der Lebermetastasen, erreichten jedoch kein verlängertes Überleben.

Auch Mutationen im Ras-Gen sind neben p53 häufig und in 40 - 50 % der kolorektalen Tumore beschrieben. Van Etten *et al.* publizierten 2002 eine Arbeit, in der ein intrazellulärer, neutralisierender Antikörper gegen das Ras-Genprodukt durch einen adenoviralen Vektor in kolorektale Karzinomzellen eingeschleust wurde und signifikant das Zellwachstum *in vitro* hemmte. In einem Lebermetastasenmodell in der Ratte konnte weder durch die sytemische oder die direkte Applikation in die *A. hapatica* noch durch isolierte Leberperfusion oder durch intratumorale Gabe ein Effekt auf das Tumorwachstum erzielt werden. Erst durch die fünfmalige Wiederholung der arteriellen Vektorinjektion konnte ein therapeutischer Effekt erreicht werden.

Ebenfalls über einen Hemmmechanismus wirkt der Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor TIMP-2. Metalloproteinasen bauen extrazelluläre Matrixproteine ab und spielen eine wichtige Rolle in der Progression und Angiogenese von malignen Erkrankungen. Die systemische Gabe eines TIMP-2 Vektors führt zu einer Transgenexpression in der Leber, die signifikant das Wachstum von Kolonkarzinomzellen reduziert, allerdings nur, wenn das Virus vor oder kurz nach der Tumorzellgabe appliziert wird (Brand *et al.*, 2000).

#### 2.3.3.3 Immunmodulatorische Ansätze durch Zytokine

Der zytokintherapeutische Ansatz zielt auf eine Verstärkung der antitumoralen, immunologischen Reaktion des körpereigenen Immunsystems gegen die malignen Zellen ab. Ein entscheidender Vorteil dieses Ansatzes ist die Tatsache, dass nur wenige maligne Zellen infiziert werden müssen, um eine immunmodulatorische Stimulation zu erzielen. Bei der Korrektur von Gendefekten müssen alle entarteten Zellen transduziert werden und bei der Enzym/Prodrug Therapie ist die antitumorale Wirkung zudem nur lokal begrenzt. Für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7, IL-12 IFN $\gamma$ , GM-CSF und TNF $\alpha$  ist bereits in vielen Tumor-Tiermodellen eine effektive Metastasenreduktion nachgewiesen worden (Mackensen *et al.,* 1997).

In einem murinen Lebermetastasenmodell konnte gezeigt werden, dass eine intratumorale Applikation des Vektors Ad.RSV-mIL-2 zu einer signifikanten Tumorreduktion und teilweise Vollremission führte, allerdings nur in Kombination mit dem Vektor Ad.RSV-HSV1-tk und einer intraperitonealen Ganciclovirgabe. In einem *Chalange*-Experiment mit erneuter Tumorzellapplikation hatten nur die Tiere mit der adenoviralen Kombinationstherapie im Vergleich zu Tieren mit der Einzeltherapie eine systemische Immunität entwickelt, die das Wachstum von Tumoren verhinderte (Chen *et al.*, 1995).

Caruso *et al.* (1996) verglichen diesen Therapieansatz mit einer adenoviralvermittelten Interleukin-12-Therapie. Sie konnten zeigen, dass die systemische Immunität der Kombinationstherapie nach 38 Tagen nicht mehr vorhanden war. Im Vergleich zeigte die intratumorale Behandlung mit dem Adenovirus Ad.RSV-mIL-12 ein verlängertes Überleben. Auch die Reduktion der Tumormasse war durch mIL-12 gegenüber einem Kontrollvektor signifikant verringert und massiv mit Entzündungszellen infiltriert.

Verbesserte Therapieresultate wurden im Zusammenhang mit Interleukin-12 durch die Kombination mit einem 4-1BB-kodierenden, adenoviralen Vektor erzielt (Martinet *et al.*, 2000). 4-1BB ist Stimmulator für antigenpräsentierende Zellen und führt so zu einer Expansion von antigen-spezifischen, zytotoxischen T-Lymphozyten. Dies verlängerte im Tiermodell das Langzeitüberleben von 20 - 30 % auf 62 %. Auch die intratumorale adenovirale Therapie mit einer Kombination aus einem IL-12 Vektor und einem, der für das INF-γ-induzierte Protein-10 kodiert, zeigte einen synergetischen Effekt (Narvaiza *et al.*, 2000).

## 2.4 Tumorspezifische, adenovirale Gentherapie des kolorektalen Karzinoms

Bei den beschriebenen Ansätzen zur adenoviralen Gentherapie des metastasierten Kolonkarzinoms wurde stets ein unspezifischer Promotor für die Regulation des viral eingeschleusten Transgens verwendet. Solche Promotoren sind der Rous Sarkom Virus Promotor sowie der Cytomegalovirus immediate early gene Promotor (CMV), der eine starke, konstitutive Genexpression in einer Vielzahl von Zellen bewirkt (Schmidt *et al.*, 1990 und Boshart *et al.*, 1985), die für die Gentherapie maligner Erkrankungen sehr effizient sein kann.

Im speziellen Fall der Therapie von hepatischen Metastasen ist die Anwendung derartiger Promotoren allerdings durch die Organtoxizität limitiert, die aus der unspezifischen Expression in Hepatozyten resultiert (Brand *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 1997 und van der Eb *et al.*, 1998). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei systemischer Adenovirusgabe bis zu 90 % Hepatozyten infiziert werden (Herz und Gerart, 1993; Huard *et al.*, 1995; Worgall *et al.*, 1997). Diese Tatsache ist besonders bei der adenoviral vermittelten Expression von potenziell toxischen Genen zu beachten. Es wurden daher verschiedenen Versuche unternommen die Genexpression auf die malignen Zellen zu beschränken. Dieser tumorspezifische Ansatz lässt sich in 3 Bereiche unterteilen:

- Replikationskompetente Adenoviren
- Modifikation der adenoviralen Fibermoleküle
- Tumorspezifische Promotoren

**Replikationskompetente Adenoviren** replizieren sich selektiv in den malignen Zellen und zerstören diese durch die nachfolgende Lyse. Der bekannteste replikationsfähige Vektor ist ONYX-015 (dl1520). Er besitzt eine 827 bp große Deletion im E1B-55K-Gen. Dieses Protein ist essenziell für die Hemmung von p53, mit der Konsequenz, dass ONYX-015 sich nur in Zellen replizieren kann, die einen mutationsbedingten Ausfall in diesem Apoptosegen besitzen (Bischoff *et al.,* 1996). Da bei bis zu 70 % der menschlichen Tumore dieses Gen inaktiviert ist, kommt es hier zu einer selektiven Virusreplikation und konsekutiv zu einer Lyse der Tumorzellen. In einer Pilotstudie, die auch Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen einschloss, konnte keine dosisabhängige Toxizität bei i.v. Injektion beobachtet werden (Nemunaitis *et al.*, 2001). Phase I und II Studien mit Stadium IV Patienten zeigten bei Applikation in die Leberarterie nur in Kombination mit i.v. Chemotherapie eine antitumorale Aktivität (Reid *et al.*, 2001). Die p53-abhängige Spezifität wird allerdings von einigen Forschern angezweifelt (McCormick, 2000; Dix *et al.*, 2001) und daher eine nicht-spezifische Replikation als potenzielles Risiko angesehen.

Durch **Modifikation der adenoviralen Fibermoleküle** versucht man den Vektor derart zu verändern, dass dieser nicht mehr von dem breit vorkommenden Coxackie-Adenovirus-Rezeptor abhängig ist, der zudem bei Tumoren herunterreguliert sein kann (Li *et al.*, 1999). Stattdessen soll das Virus mit zell- und gewebsspezifischen Rezeptoren interagieren und so eine ausschließliche Transduktion von Tumorzellen erreicht werden (Wickham, 2000). Zur Zeit haben jedoch derart modifizierte Adenoviren noch keinen Einzug in klinische Studien gehalten.

**Tumorspezifische Promotoren** ermöglichen ebenfalls eine Beschränkung der Genexpression auf maligne Zellen. Ein solcher Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit für die adenovirale Gentherapie des kolorektalen Karzinoms verwendet und soll im Folgenden näher betrachtet werden.

### 2.4.1 Tumorspezifische Promotoren für die Therapie des kolorektalen Karzinoms

Eine viel versprechende Möglichkeit der tumorspezifischen Gentherapie ist der Ansatz, die Transgenexpression in einem adenoviralen Vektor unter die Kontrolle eines tumor- bzw. gewebsspezifischen Promotors zu stellen. Bei vielen Tumorentitäten sind spezifische zelluläre Antigene identifiziert worden, deren regulatorische Elemente für die Steuerung der Expression bei gentherapeutischen Ansätzen verwendet wurden (Bui *et al.*, 1997; Shirakawa *et al.*, 1998; Latham *et al.*, 2000). Dies ermöglicht die spezifische Genexpression in den malignen Zellen und reduziert die Expression in dem umliegenden Gewebe, auch wenn diese nichttransformierten Zellen adenoviral infiziert sind.

#### 2.4.1.1 CEA Promotor

Für das kolorektale Karzinom ist das bekannteste Tumorantigen das Carcinoembryonale Antigen (CEA), das allerdings auch in anderen epithelialen Tumoren wie dem Magen-, dem Mamma- und dem Bronchialkarzinom exprimiert wird (Shively und Beatty, 1985). Der Plasmaspiegel von CEA korreliert bei Kolonkarzinompatienten mit der Anzahl und der Größe von Lebermetastasen (Ishizuka *et al.,* 2001) sowie mit dem Grad der Tumordifferenzierung (Lorenzi *et al.,* 1997). Zur tumorspezifischen, adenoviralen Gentherapie von hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen wird am häufigsten der Promotor dieses Tumorantigens verwendet (Brand *et al.,* 1998; Qiao *et al.,* 2002).

Die Verwendung des CEA-Promotors birgt trotz des hohen Prozentsatzes von 70 % CEA-positiver Kolonkarzinome (Teh und McKenzie, 1990) auch Nachteile. So konnten Kim *et al.* (1999) zeigen, dass das CEA-Gen nicht nur in den Lebermetastasen exprimiert wird, sondern auch in den umliegenden Hepatozyten. In einem Kontrollkollektiv von Kolonkarzinompatienten ohne Lebermetastasen wurde zudem in 75 % der Lebern eine CEA-Expression nachgewiesen, auch bei CEAnegativen Primärtumoren. Der genaue Mechanismus der CEA-Genregulation in Hepatozyten ist jedoch noch nicht geklärt, aber gerade vor dem Hintergrund der hauptsächlichen Transduktion von Hepatozyten bei der systemischen Virusgabe ist dieser Verlust der Tumorspezifität für die Vermeidung von toxischen Nebenwirkungen zu berücksichtigen.

#### 2.4.1.2 β-Catenin/Tcf4 regulierter Promotor

Ein weiterer tumorspezifischer Promotor für das kolorektale Karzinom ist ein synthetischer β-Catenin/Tcf4 regulierter Promotor, der in Tiermodellen viel versprechende Ergebnisse bezüglich Tumorspezifität und Toxizität lieferte (Lipinski *et al.*, 2001; Kwong *et al.*, 2002). β-Catenin akkumuliert in den Zellen, wenn es durch ein mutiertes APC-Genprodukt nicht mehr phosphoriliert wird. Diese Anhäufung führt wiederum zu einer Aktivierung von zellulären Wachstumsfaktoren und stellt einen Schritt in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms dar (Morin *et al.*, 1997).

#### 2.4.1.3 DF3/MUC1 Promotor

Ein neuer Ansatz für die tumorspezifische, adenovirale Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, stellt die Verwendung eines Muzinpromotors (MUC1-Promotor) dar. Ein solcher Promotor wurde bereits in der adenoviralen Gentherapie des Mammakarzinoms in Tiermodellen erprobt (Chen *et al.*, 1995).

Es sind inzwischen 11 verschiedene humane Muzingene identifiziert worden, deren Genprodukte sich in gelförmige, lösliche und membrangebundene unterteilen lassen und hauptsächlich in epithelialen Geweben vorkommen. Sie zeigen alle als charakteristische Merkmale eine Nukleotid-Tandem-Repeat-Domäne, eine serinund threoninreiche Peptiddomäne, die stark O-glykosyliert ist, und eine komplexe RNA-Transkription. Ihre Funktionen gehen weit über die alleinige Protektion und Lumbrikation des Epithels hinaus und beinhalten zudem Beteiligungen an Wachstum, fetaler Entwicklung, Zellerneuerung, Differenzierung und Epithelintegrität. Auch an Prozessen der Karzinogenese und Metastasierung sind Muzine beteiligt (Moniaux *et al.*, 2001).

**Muzin 1 (MUC1)**, eines dieser 11 Muzinmoleküle, ist ein hoch glykosyliertes Transmembran-Glykoprotein mit einer großen extrazellulären Domäne, die hauptsächlich aus Tandemwiederholungen von je 20 Aminosäuren besteht, sowie einem 69 aminosäure-großen, zytoplasmatischen Abschnitt (Gendler *et al.*, 1991). Es wird in einer Vielzahl von sekretorischen, epithelialen Geweben, wie z.B. den Milchdrüsen, dem Pankreas, der Lunge, den Speicheldrüsen, den Hauptzellen des Magens und in einer Reihe von Karzinomen exprimiert. So wurde in den meisten Adenokarzinomen der Lunge, des Magens, Pankreas, Ovar, sowie der Brustdrüse und Prostata eine erhöhte MUC1-Expression nachgewiesen (Ho *et al.*, 1993). In Karzinomen wird jedoch, im Vergleich zu normalem Gewebe, das identische MUC1 Core-Protein unterschiedlich glykosiliert, sodass es die Eigenschaften eines Tumorantigens erhält (Gendler *et al.*, 1991). Es konnte zudem gezeigt werden, dass im Leberparenchym keine MUC1 Expression stattfindet (Vandenhaute *et al.*, 1997). In kolorektalen Adenokarzinomen konnten Andrews und Kollegen (1993) durch immunhistologische Untersuchungen in 84 %, jedoch nur in 15 % der Adenome, eine Expression des Muzin1 Glykoproteins nachweisen, das mit dem monoklonalen Antikörper DF3 detektiert wurde. Dieses tumor-assoziierte Antigen wird als DF3 (MUC1), bzw. Ca15-3, bezeichnet. Normales Kolongewebe zeigte keine, entzündliche Darmschleimhaut nur teilweise eine fokale Reaktion mit dem DF3 Antikörper (Andrews *et al.,* 1993).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten eine positive Korrelation der MUC1-Expression mit dem Entdifferenzierungsgrad, der Anzahl der Metastasen sowie einer schlechten Prognose des Tumors nachweisen, wohingegen MUC2, das signifikant stärker in muzinösen Karzinomen vorkommt, eine negative Korrelation mit diesen Größen zeigt (Matsuda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001 und Baldus *et al.*, 2002).

Mögliche Ursachen für diese Assoziation mit einem schlechten klinischen Verlauf ist die Beobachtung, dass Zellen, die mit der cDNS von MUC1 transfiziert sind, resistenter gegenüber der Lyse durch natürliche Killerzellen (Zhang *et al.*, 1997) sowie durch zytotoxische T-Lymphozyten sind (van de Weil van Kemenade *et al.*, 1993). Bohm *et al.* (1997) untersuchten dieses Phänomen näher und gaben Hinweise, dass die O-Glykosilierung der extrazellulären Domäne des MUC1 für diese Inhibierung verantwortlich zu sein scheint.

Ein weiterer Faktor für die schlechte Prognose und die Korrelation mit der Anzahl der Metastasen scheint die Interaktion von MUC1 mit der Zelladhäsion zu der extrazellulären Matrix zu sein. Die integrin-vermittelte Adhäsion mit der extrazellulären Matrix war bei MUC1-transfizierten Zellen im Vergleich zu nicht-tranfizierten Zellen reduziert (Wesseling *et al.*, 1995). Hanski und Kollegen (1992) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Muzinexpression mit dem Verlust der Kontaktinhibierung und einem aggregativen Zellwachstum *in vitro* korreliert. *In vivo* zeigten die muzin-positiven Zellen ein schnelleres Tumorwachstum.

Für die Konstruktion eines tumorspezifischen DF3/MUC1-Promotors wurden nun 2,9 kb der regulierenden 5'-flankierenden Sequenz des humanen MUC1 Gens kloniert und in Deletionsversuchen analysiert. Dabei zeigte ein 743 bp langes Fragment aus der proximalen Region dieser Sequenz die maximale Marker-
genexpression in muzin-positiven Zelllinien bei erhaltener Tumorspezifität. Die Sequenz zwischen – 60 und – 150 bp vom Transkriptionsstartpunkt beinhaltet eine Sp1 Bindungsstelle sowie eine E-Box (E-MUC1) und zeigte sich in Deletionsversuchen als essenziell für die Tumorspezifität (Kovarik *et al.*, 1993). Dieser 743 bp lange Promotor wurde zuerst von Block *et al.* (2002) für die adenovirale Gentherapie des Kolonkarzinoms verwendet und in Kolonkarzinomzelllinien getestet.

#### 2.4.2 Probleme der tumorspezifischen Gentherapie

Mehrere Arbeitsgruppen, die tumorspezifische Promotoren für die adenovirale Therapie kolorektaler Karzinome verwendeten, stellten sogar in den antigenpositiven Tumorzellen schwächere Genexpressionsraten der spezifischen Promotoren im Vergleich zu einem konstitutiven CMV-Promotor fest (Brand *et al.,* 1998, Block *et al.,* 2002). Brand und Mitarbeiter (1998) erreichten mit einem CEA-Promotor in CEA-positiven Karzinomzelllinien nur 2 - 10 % der CMV-vermittelten Genexpression und Block *et al* (2002) wiesen für den DF3/MUC1-Promotor in den meisten muzin-positiven Zellen ebenfalls eine Unterlegenheit gegenüber dem CMV-Promotor nach.

Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht, diese schwache Genexpression zu kompensieren ohne an Gewebsspezifität zu verlieren. Zwei Arbeitsgruppen, die sich beide mit der adenoviralen Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms beschäftigen, benutzten für diesen Zweck das amplifizierende Fusionsprotein Gal4-VP16, um die promotor-vermittelte Genexpression zu verstärken (Qiao *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2002).

### 2.4.2.1 Gal4-VP16 Fusionsprotein als Amplifikator tumorspezifischer Promotoren

Das Gal4 Genexpressionssystem aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist eines der am besten untersuchten eukaryontischen Genregulationssysteme. Das Hefeprotein Gal4 bindet physiologisch als Transkriptionsregulator an vier gleiche, aus 17 Basenpaaren bestehende, Motive der Aktivierungssequenz UAS<sub>G</sub> (*galactose upstream activating sequence*) an und initiiert damit die Transkription der Gene Gal1 und Gal10, die für den Galaktosestoffwechsel von Bedeutung sind (Gini-

ger *et al.*, 1985). Gal4 ist zudem in der Lage die Genexpression in Säugetierzellen (Kakidani und Ptashne, 1988), Pflanzenzellen (Ma *et al.*, 1988) und in *Drosophila* (Brand und Perrimon, 1993) zu aktivieren.

Ma und Kollegen (1988) fanden zudem heraus, dass nur zwei kurze Regionen des Gal4 als aktivierende Sequenz fungieren und durch eine Reihe von Peptiden aus *Escherichia coli* oder durch synthetische Peptide ersetzt werden können, wenn diese eine negativ-geladene, amphiphile Alpha-Helixstruktur aufweisen. Zudem zeigte eine synthetische Gal4 Bindungsstelle aus 17 Aminosäuren, wie auch eine komplette UAS<sub>G</sub>-Sequenz, in transient transfizierten Säugetierzellen eine funktionelle Bindungsfähigkeit zu Gal4 (Webster *et al.,* 1988). Durch die Verwendung von fünf synthetischen Gal4-Bindungsstellen kann die TATA-Box-vermittelte Genexpression zudem um den Faktor 80, im Vergleich zu einer Bindungsstelle, gesteigert werden (Chang und Gralla, 1993).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten nun zeigen, dass in einem System aus synthetischen Gal4-Bindungsstellen, einer TATA-Box als Minimalpromotor sowie einem Fusionsprotein aus der DNS-Bindungsdomäne des Gal4 und dem aktivierenden Abschnitt eines anderen Transkriptionsaktivators die Genexpression in eukaryotischen Zellen reguliert werden kann (Sadowski *et al.*, 1992; Chang und Gralla, 1993; Wang *et al.*, 1994).

Eine derartige Fusion der DNS-Bindungsdomäne des Gal4-Proteins mit der stark sauren Transaktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus 1 Proteins VP16 zeigte eine sehr potente Verstärkung der Genexpression unter Beibehaltung der DNS-Bindungsspezifität (Sadowski *et al.*, 1988). VP-16 induziert physiologisch die Transkription der fünf *immediate early* Gene des HSV-1 Virus (Triezenberg *et al.*, 1988). Dieses System wurde erfolgreich zur Genexpression in Säugetierzellen eingesetzt (Wang *et al.*, 1994; Qiao *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2002).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete binäre System zur amplifizierten, spezifischen Genexpression besteht aus dem tumorspezifischen Promotor DF3/ MUC1, der die Expression des Fusionsproteins Gal4-VP16 reguliert. Dieses Fusionsprotein bindet an fünf stromabwärts gelegene Gal4-Bindungsstellen an, die mittels eines TATA-Minimalpromotors die Transgentranskription initiieren (Abb. 5).



#### Abb. 5: Prinzip der Amplifikation durch das Fusionsprotein Gal4-VP16

A: Ohne amplifizierendes System wird die Transgenexpression nur durch den DF3/MUC1-Promotor in MUC1-positiven Zellen reguliert.

B: In dem verstärkten System reguliert der tumorspezifische Promotor in muzin-positiven die Expression des Fusionsproteins Gal4-VP16, das stromabwärts mit fünf Gal4-Bindungsstellen (Gal4 BS) interagiert. Durch den Transaktivator VP16 des Fusionsproteins wird über einen TATA-Minimalpromotor die Transkription des eingebauten Transgens initiiert.

Mit diesem binären System konnte durch adenovirale Vektoren *in vitro* eine bis zu 250fache Amplifikation der tumorspezifischen Luciferaseexpression gegenüber dem alleinigen DF3/MUC1-Promotor erzielt werden. Im Vergleich zu dem konstitutiv-exprimierenden CMV-Promotor war die Genexpression durch das Fusionsprotein in muzin-positiven Zellen bis zu 590fach verstärkt. In muzin-negativen Zellen betrug dieser Amplifikationsfaktor nur 1,3 bis 7 (Block *et al.*, 2002).

# 2.5 Interleukin-12 als Transgen für die Konstruktion therapeutischer, adenoviraler Vektoren

Bei der Verwendung von Enzym/Prodrug Systemen oder der Korrektur eines genetischen Defektes ist man bei der adenoviralen Gentherapie darauf angewiesen, dass sämtliche Tumorzellen viral infiziert werden. Zwar existiert bei den Enzym/Prodrug Systemen ein so genannter "Bystander-Effekt" (Brand *et al.*, 1998), bei dem nicht-infizierte Zellen den toxischen Antimetaboliten über Gap junctions von infizierten Zellen erhalten, doch übt dieser Effekt keinen Einfluss auf entferntere Metastasen aus.

Immunmodulatorische Ansätze bieten in diesem Zusammenhang den großen Vorteil, neben einer lokalen, antitumoralen Immunreaktion, auch eine systemische Immunität zu induzieren. Im Falle des hepatisch-metastasierten kolorektalen Karzinoms mit multiplen Metastasen bietet ein solcher Therapieansatz die Möglichkeit, alle Metastasen therapeutisch anzugehen. Beim Vorhandensein einer singulären Metastase stellt auch eine intratumorale Injektion von Adenoviren der anderen beide Ansätze eine Option dar, doch ist in diesem Fall die unter 2.1.3.1 beschriebene chirurgische Resektion weitaus etablierter.

Interleukin-12 hat sich aus diesen Gründen sowie durch die beschriebenen Studien zu einem viel versprechenden Molekül in der Therapie von malignen Erkrankungen entwickelt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich adenovirale Expressionsplasmide mit dem murinen Interleukin-12-Fusionsprotein kloniert und für die Generierung von adenoviralen Vektoren verwendet.

### 2.5.1 Struktur und Biologie des Interleukin-12

Zytokine, wie Interleukin-12, sind eine heterogene Klasse von kurzlebigen Polypeptiden mit einer relativen Molekülmasse unter 80.000. Sie beeinflussen die Dauer und Stärke einer Immunantwort, indem sie die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von Immunzellen regulieren. Zytokine kontrollieren zudem die Produktion und Freisetzung biologisch aktiver Moleküle wie anderer Zytokine und deren Rezeptoren. Interleukin-12 ist ein heterodimeres Protein (70 kDa), bestehend aus einer 35 kDa (p35) und einer 40 kDa (p40) Untereinheit, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Kobayashi *et al.*, 1989). Die Gene für die beiden Untereinheiten sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und werden in unterschiedlicher Weise transkriptionell reguliert (Trinchieri, 2003).

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-12 wird physiologisch hauptsächlich von Phagozyten (Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) sowie von dentritischen Zellen als Reaktion auf eine Infektion mit pathogenen Keimen produziert. Es stimuliert die Differenzierung von T-Zellen und aktiviert natürliche Killerzellen und Phagozyten (Trinchieri, 2003). Der wichtigste Mediator in der Wirkung von Interleukin-12 ist Interferon-gamma (INF-γ), dessen Ausschüttung synergistisch mit anderen Zytokinen wie Interleukin-18 (Nakahira *et al.*, 2002), Interleukin-2 (Hodge *et al.*, 2002) sowie co-stimulatorischen Molekülen wie B7.1 (Kubin *et al.*, 1994) geregelt wird.

Interferon-gamma wird hauptsächlich durch T- und NK-Zellen produziert und ist hauptverantwortlich für die antitumorale Wirkung von Interleukin-12 (Brunda *et al.,* 1995). Es steigert die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen, CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, T1-Helferzellen und Makrophagen und wirkt autokrin auf diese Zellen mit der Folge einer positiven Feedback-Ausschüttung von INF-γ. Zusätzlich verstärkt es die humorale Immunantwort durch Induktion der IgG2a-Produktion (Trinchieri, 2003) und übt eine anti-angiogenetische Wirkung durch eine Induktion des Proteins 10 aus (Sgadari *et al.,* 1996).

Die Fähigkeit von IL-12, eine antitumorale Immunität zu induzieren, beruht auf der Aktivierung von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (Pham-Nguyen *et al.*, 1999), wobei Martinet *et al.* (2000) die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hauptverantwortlich für die Immunität ansehen und die Funktion der NK-Zellen der akuten Immunantwort zuschreiben. Eine Blockade der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das Langzeitüberleben in einem murinen Lebermetastasenmodell gezeigt.

#### 2.5.2 Das p40/p35 Fusionsprotein des Interleukin-12

Bei der gentherapeutischen Anwendung des Interleukin-12 ergeben sich Probleme, sollten die beiden Untereinheiten nicht in einem äquimolaren Verhältnis exprimiert werden, da es in diesem Fall zur Bildung von p40-Homodimeren kommen kann (Gillessen *et al.*, 1995), die die biologische Funktion des Heterodimers am Rezeptor antagonisieren (Mattner *et al.*, 1993). Dieses Problem wurde auf unterschiedliche Weise zu lösen versucht:

Ein Ansatz verbindet die cDNS beider Untereinheiten mit einer *Internal Ribosome Entery Side* (IRES), so dass eine bicistronische mRNS transkripiert und translatiert wird (Qiao *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wird ein adenoviraler Vektor, der dieses p40-IRES-p35-Konstrukt unter der Kontrolle eines CMV Promotors beinhaltet, verwendet. Ein derartiges System hat jedoch den Nachteil, dass es zu einer ca. dreifach schwächere Expression des zweiten Cistrons kommt (Dirks *et al.*, 1993). Dies führt wiederum zu einer nicht-äquimolaren Expression der beiden Untereinheiten, bei der die p40 Ketten überwiegen.

Um dieses Phänomen zu verhindern, wurden beide DNS-Abschnitte der Untereinheiten mit einer Linker-Sequenz, die für 6 - 15 Aminosäuren kodiert, verbunden. Dieses IL-12.p40-linker-p35 Fusionsprotein weist im Vergleich mit dem nativen oder rekombinanten Interleukin-12 eine vergleichbare spezifische Bioaktivität und einen ebenfalls vergleichbaren antitumoralen Effekt auf (Lieschke *et al.*, 1997). Für die Konstruktion tumorspezifischer, adenoviraler Vektoren in der vorliegenden Arbeit wurde dieses IL-12-Fusionsprotein aufgrund seiner besseren biologischen Eigenschaften im Vergleich zum IRES-Konstrukt verwendet.

# 3. Material und Methoden

### 3.1 Materialien

### 3.1.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Agarose (Gelelektrophorese)	(Merck)
Agarose, Sea Plaque	(Biozym)
Ammoniumchlorid	(Merck)
Bromphenolblau	(Merck)
Calciumchlorid-Dihydrat	(Merck)
Cäsiumchlorid	(Gibco)
Cell Culture Lysis Reagents (CCLR) 5x	(Promega)
N,N-Dimethylformamid	(Merck)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck)
Dithiothreitol (DTT)	(Gerbu)
DOTAP	(Roche)
EDTA	(Merck)
Ethanol absolut p.A.	(Merck)
Ethidiumbromid	(Merck)
Ethylendiamintetraessigsäure	(Merck)
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galacto-Pyranosid (X-Gal)	(Merck)
Ficoll 400	(Merck)
Gel Extraction Kit	(Qiagen)
Glucose	(Merck)
Glutaraldehyd	(Merck)
Glycerin, wasserfrei	(Merck)
Hefeextrakt	(Merck)
HOPE-Fixierlösungen	(DCS)
Isopropanol	(Merck)
Kaliumacetat	(Fluka)
Kaliumchlorid	(Merck)
Kaliumhydroxid	(Merck)

Kaliumferricyanid (K <sub>3</sub> Fe[CN] <sub>6</sub> )	(Merck)
Kaliumferrocyanid (K <sub>4</sub> Fe[CN] <sub>6</sub> )	(Merck)
Luciferase Assay Kit	(Promega)
Magnesiumsulfathexahydrat	(Merck)
Magnesiumsulfatheptahydrat	(Merck)
MOPS	(Fluka)
Natriumchlorid	(Baker)
Di-Natriumcarbonat	(Merck)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck)
Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat	(Merck)
Natriumhydroxid	(Merck)
Natriumacetat	(Merck)
OptEIA <sup>™</sup> Mouse IL-12 (p70) ELISA	(Pharmingen)
PCR Purification Kit	(Qiagen)
Phenol Rot (Histo)	(Merck)
Plasmid Preparation Maxi Kit	(Qiagen)
DC-Protein Assay	(BioRad)
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	(Gibco)
Triton-X-100	(Fluka)
Tryptonwasser	(Merck)
Trypanblau	(Merck)
Tween 20	(Fluka)
Xylenecyanol	(Merck)

# 3.1.2 Enzyme

Schrimps Alka	alische Phophatase		(Roche)	
T4 DNS-Ligase			(Roche)	
T4 DNS-Polymerase			(Invitrogen)	
BamH I	(Biolabs)	Kpn I	(Biolabs)	
Cla I	(Roche)	Not I	(Roche)	
EcoRV	(Biolabs)	Sac I	(Biolabs)	
Hind III	(Roche)	Xba I	(Roche)	

DNS-Marker II	(Roche)
DNS-Marker VII	(Roche)
dATP	(Roche)
dGTP	(Roche)
dCTP	(Roche)
dTTP	(Roche)
Oligonukleotide für Squenzierungsreaktionen	(MWG-Biotech)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix	(Applied Biosystems)
2,5x Sequencing Buffer	(Applied Biosystems)
Proteinmolekulargewichtsstandard Rainbow Markers	(Amersham)
rekombinante Luciferase	(Promega)
rekombinantes murines Interleukin-12	(R&D Systems)
polyklonaler Ziegen Anti-Luciferase-IgG (ab 498)	(Abcam)
polyklonaler Kaninchen Anti-Ziegen-IgG (ab 6739)	(Abcam)

### 3.1.3 Molekulargewichtsstandards, dNTP, Proteine und Antikörper

### 3.1.4 Labormaterial

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

Dialysemembranen Slide-A-Lyzer	(Pierce)
Einwegspritzen 1 ml, 10 ml, 50 ml	(Braun, Melsungen)
Lab-Tek Champer Slides <sup>®</sup>	(Nunc)
Sterilfilter, Porenweite 0,22 µm	(Schleicher & Schuell)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	(Eppendorf)
Pipetten (2 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	(Gilson)
Pipetten 8- und 12fach Multichannel	(Eppendorf)
Ultrazentrifugenröhrchen ultra clear, 14 x 95 mm	(Beckman)

### 3.1.5 Geräte

Auflichtmikroskop	(Hund)
Autoklav Sandoclav	(Wolf)
Brutschränke Bakterienkulturen	(Köttermann)
Brutschränke Zellkultur Hera Cell	(Heraeus)
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT und Power Pack 300	(BioRad)
ELISA-Spektralphotometer Titertek Multiskan Plus	(Thermo Labsystems)
Feinwaage HR-120	(A&D)
Luminometer Lumat LB 9507	(EG&G Berthold)
Magnetrührer	(Cenco)
Neubauer-Zählkammer	(Labor Optik)
PCR-Thermozykler PCR Sprint	(ThermoHybaid)
pH-Meter pH 358	(WTW)
Schüttler 3005	(GFL)
Spektrophotometer SmartSpec 3000	(BioRad)
Sterilwerkbank HeraSafe	(Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge pico	(Heraeus)
Ultrazentrifuge Typ L7-35	(Beckman)
UV-Kammer für Gelanalyse und Software Gel Doc 2000	(BioRad)
Vortexer	(Braun)
Wasserbad	(Braun)
Zentrifuge Type 5804R	(Eppendorf)

### 3.1.6 Medien und Zusätze für das Arbeiten mit Bakterien

Luria-Bertani (LB):	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl; (pł	H 7,0)
SOC:	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % Na	CI, 0,4 %
	Glukose, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5 mM KCl; pH 7,0	
Agar (für Platten):	32 g Agar in 1 l Aqua dest.	(Gibco)
Ampicillin:	5 g auf 50 ml 10 mM Tris pH 8,0	(Roche)

### 3.1.7 Verwendete Plasmide

Plasmid	Resistenz	Vertrieb/Klonierung
pBHG-10	Ampicillin	F. Graham, McMaster University, Hamilton, ON, Canada
pRC.CMV-ß-Gal	Ampicillin	Perricaudet, Institut Gustave Rous- sy, Villejuif, France
pUC19	Ampicillin	Invitrogen
pBluescript II KS (+)	Ampicillin	Stratagene
pBluescript II KS (+)-binSyst.	Ampicillin	Labor
pAd.CMV-mscIL-12	Ampicillin	Labor
pBK.CMV	Kanamycin	Stratagene
pBK.CMV-binSyst.	Kanamycin	Labor
pAd.DF3/MUC1-pA	Ampicillin	Labor
pAd.DF3/MUC1-mscIL-12	Ampicillin	Labor
pAd.DF3/MUC1-binSystmscIL-12	Ampicillin	Klonierung
pDSRed2	Ampicillin	Clontech
pAd.DF3/MUC1-Red2	Ampicillin	Klonierung
pAd.DF3/MUC1-binSystRed2	Ampicillin	Klonierung

#### Tabelle 3: Verwendete Plasmide

### 3.1.8 Medien, Puffer und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium with high Glucose (HGDMEM)	(Gibco)
McCoy's 5A Medium	(Gibco)
Nutrient Mixture Ham's F-12 1x	(Gibco)
RPMI 1640	(Gibco)
Modified Eagle Medium 2x	(Gibco)
Waymouth's	(Gibco)
Fetal Bovine Serum	(Gibco)
Horseserum	(Gibco)
Penicillin/Streptomycin (100x)	(Gibco)
L-Glutamin 200 mM (100x)	(Gibco)
Vitamine	(Gibco)
Dulbecco's Phosphate-buffered salin w/o Ca Mg, (PBS)	(Gibco)
HEPES (Konz.)	(Gibco)
Trypsin-EDTA	(Gibco)

# 3.1.9 Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Beschreibung	Nährmedium	Bezug
293	humane embryonale Nierenkar- zinomzelllinie, die stabil mit den Basenpaaren 1 bis 4344 des adenoviralen Genoms transfi- ziert ist (Graham <i>et al.</i> , 1977)	HGDMEM, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 10 mM HEPES	ATCC (CRL-1573)
MCA-26 (CT-26.WT)	murine Kolonkarzinomzelllinie (Wang <i>et al</i> ., 1995)	1:1 Verhältnis HGDMEM und HAM-F 12, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Pen/Strep, 10 mM HEPES	ATCC (CRL-2638)
SK-CO-1	humane Kolonkarzinomzelllinie (Fogh und Trempe, 1975)	RPMI 1640, 2 mM L-Glut- amin, 1 % Pen/Strep, 10 % FBS, 10 mM HEPES	ATCC (HTB-39)
Hepa1-6	murine Hepatomzelllinie (Darlington <i>et al</i> ,. 1980)	HGDMEM, 4 mM L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 1,5 g/L Na- trium Bicarbonat, 10 % FCS	ATCC (CRL-1830)
HepG-2	humane Hepatoblastomzelllinie (Aden <i>et al.</i> , 1979)	5:1 Verhältnis MEM und Way- mouth's, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Pen/Strep	ATCC (HB-8065)
SW-620	humane Kolonkarzinomzelllinie (Leibovitz, 1976)	HGDMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Pen/Strep, 1 % Vitamine, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 10 mM HEPES	ATCC (CCL-227)
Cos-7	Nierenzelllinie des afrika- nischen Grünaffen, mit SV40 Mutante transformiert (Gluzman, 1981)	HGDMEM, 4 mM L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 1,5 g/L Natri- um Bicarbonat, 10 % FCS	ATCC (CRL-1651)

### 3.1.10 Hergestellte Pufferlösungen

### <u>pH Puffer:</u>

10x TE-Puffer pH 7,6	100 mM Tris-Cl (pH 7,6); 10 mM EDTA (pH 8,0)
10x TE-Puffer pH 8,0	100 mM Tris-Cl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0)
Tris-Cl (1 M) pH 7,6/8,0	121,1 g Tris Base in 1 I H <sub>2</sub> O pH Einstellung mit HCI
HEPES buffered saline	5 g HEPES, 8 g NaCl, 0,37 g KCl, 0,125 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	*2H <sub>2</sub> O, 1 g Glucose, H <sub>2</sub> O ad 1 I Aqua dest.
Elektrophoresepuffer:	
0,5x TBE	45 mM Tris-Borsäure; 1 mM EDTA
6x Gel Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencya-
	nol; 15 % (w/v) Ficoll 400

Virus-Dialysepuffer:

Dialysepuffer

10 mM TRIS-HCI, pH 7,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerol

### 3.1.11 Hergestellte Lösungen

X-Gal-Färbelösung (2 % w/v)	1,3 mM MgCl2, 3 mM NaCl, 3 mM Kali-
	umhexacyanotarrat(II)-trihydrat, 3 mM Ka-
	liumhexacyanotarrat(III), 2,5 % X-gal-Lö-
	sung (bestehend aus 20 mg 5-Brom-4-
	Chlor-3-Indolyl-β-D-Galacto-Pyranosid in 1
	ml N,N-Dimethylformamid) und 44 mM
	HEPES pH 7,3
Trypanblaulösung	0,5 % (w/v) Trypanblau und 0,9 % NaCl in
	PBS lösen
Glutaraldehyd (0,5%)	in PBS angesetzt
1,5 g/ml CsCl Lösung	30 g CsCl in 42,5 ml PBS; Einstellung mit
	PBS auf 1,5 g/ml (maximale Toleranz:
	0,005 g/ml)
1,35 g/ml CsCl Lösung	35 ml der 1,5 g/ml CsCl Lösung und 14 ml
	PBS; Einstellung mit PBS auf 1,35 g/ml;
	(maximale Toleranz: 0,005 g/ml)
1,25 g/ml CsCl Lösung	11 ml der 1,35 g/ml CsCl Lösung und 9 ml
	PBS; Einstellung mit PBS auf 1,25 g/ml;
	(maximale Toleranz: 0,005 g/ml)
1 % Agaroselösung	1 g Agarose pro 100 ml Aqua dest., auto-
	klavieren
2x Modified Eagle's Medium (MEM)	2x MEM, 200 mM Glutamin, 2 %
+ Zusätz	Pen/Strep., 5 % Hefeextrakt, 10 % Horse-
	serum, 1 M HEPES
Agarose-Nährmediumgemisch für	1:1 Gemisch aus 1 % Agaroselösung und
Kopräzipitation und Plaque Assay	2x Modified Eagle's Medium + Zusätze

### 3.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken

### 3.2.1 Sterilisation

Alle hitzestabilen Nährlösungen und Gerätschaften wurden in heißem Wasserdampf in dem Autoklaven Sanoclav der Firma Wolf bei 121°C und 2,05 bar für ca. 20 Minuten sterilisiert. Lösungen mit hitzesensitiven Stoffen wurden mit einem Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schuell), bzw. mit dem Stericup Vakuumfilter (Millipore), steril filtriert.

### 3.2.2 Wasseraufbereitung

Wasser wurde mit dem Destillator Bi-Dest 2304 von der Firma GFL Burgwedel doppelt destilliert und autoklaviert oder sterilfiltriert verwendet. Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) wurde für die Zellkultur verwendet.

### 3.2.3 Absorbtionsmessung

Die Konzentration der DNS Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Der Nullwert wurde mit 0,1x TE-Puffer (pH 7,6) bestimmt, und anschließend die verdünnte DNS Lösung bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm in einer Glasküvette gemessen. Eine hohe Absorbtion bei 280 nm spricht für eine Proteinverunreinigung, da aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge absorbieren (Glasel *et al.,* 1995). Es wurde daher nur DNS verwendet, die eine 260/280 nm Ratio von größer 1,8 aufwies.

### 3.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen hydrolysieren doppelsträngige DNS sehr spezifisch an meist palindromen Sequenzen. Sie erzeugen entweder überhängende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Pro 1 µg DNS wurden 10 units des jeweiligen Restriktionsenzyms in einem Gesamtvolumen von 50 µl verwendet. Die Wahl des Reaktionspuffers und gegebenenfalls der Zusatz von BSA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C.

### 3.2.5 Auffüllen überhängender Enden (Blunten)

Hierzu wurde die T4 DNS-Polymerase verwendet. Diese weist eine  $3' \rightarrow 5'$  Exonukleaseaktivität sowie, in Gegenwart hoher Konzentrationen von ATP, TTP, GTP, CTP und Mg<sup>2+</sup>-Ionen, zusätzlich eine  $5' \rightarrow 3'$  Polymerase Aktivität auf (Richardson *et al.*, 1964). Dies führt an beiden Enden des DNS-Fragments zum Auffüllen der überhängenden Enden. Die Reaktionsbedingungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.6 Dephosphorilierung des 5' Ende eines DNS-Fragments

Um die Rezirkulation und Selbstligation restriktionsverdauter Plasmid DNS in einer *blunt end*-Ligation zu reduzieren, kann mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase der 5' Phosphatrest des linearisierten Plasmids entfernt werden (Ullrich *et al.* 1977).

Zu diesem Zweck wurde bei allen *blunt end*-Ligationen der linearisierte Vektor für eine Stunde bei 37°C mit der Schrimps Alkalischen Phosphatase gemäß den Angaben des Herstellers inkubiert und die Phosphatase anschließend hitzeinaktiviert.

### 3.2.7 Ligation von DNS-Fragmenten mit überhängenden Enden

Um ein DNS-Fragment in ein mit Restriktionsenzymen geöffnetes Plasmid einzufügen, müssen die beiden aufeinander passenden Enden durch Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und den 5'-Phosphatenden an beiden Strängen verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch die T4 DNS-Ligase katalysiert (Weiss, 1968).

Es wurden molare Verhältnisse zwischen Plasmidvektor und DNS-Fragment von 1:0; 1:1; 1:3; 1:5 und 1:10 verwendet. Die DNS-Konzentration betrug in einem 10 µl Reaktionsvolumen < 10 ng/ul. Die T4 DNS-Ligase sowie der Ligasepuffer wurden nach Angaben des Herstellers hinzugefügt und die Ansätze für vier Stunden bei 20°C inkubiert.

### 3.2.8 Ligation von DNS-Fragmenten mit aufgefüllten Enden

Für diese Ligationsreaktion wurde das Protokoll für DNS mit überhängenden Enden modifiziert. Es wurden die gleichen molaren Verhältnisse zwischen Plasmid und DNS-Fragment verwendet. Die DNS-Konzentration betrug jedoch in einem Reaktionsvolumen von 5 - 10 µl nur 1 - 5 ng/ul. Die T4 DNS-Ligase wurde in einer Konzentration 100 U/ml hinzugefügt und die Reaktionsansätze mit 10 % 10x Ligasepuffer fünf Stunden bei 33°C inkubiert (nach Bercovich *et al.*, 1992).

### 3.2.9 Transformation in kompetente E. coli

Für die Transformation und spätere Amplifikation der klonierten Plasmide wurden kompetente *E. coli* Bakterien (*E. coli* DH5  $\alpha$ , supercompetent cells, Gibco) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer Anlagerung der DNS an die Zellwand und einer hitzevermittelten Permeabilitätsänderung, die zur DNS-Aufnahme führt (Hanahan, 1983).

Zu 50 µl kompetenter Bakterien wurden 25 ng zu tranformierende Plasmid-DNS hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden in einem 42°C Wasserbad. Anschließend wurden die Ansätze für 1 - 2 Minuten auf Eis gelagert und dann für 45 Minuten in 800 µl SOC-Medium bei 37°C kultiviert. Zur Selektionierung wurden 200 µl des SOC-Mediums auf eine 90 mm Agarmediumplatte überführt, die Ampicillin der Konzentration 100 µg/ml enthielt. Nach 18 - 20 Stunden konnten die Kolonien der transformierten Klone durch Inokulation von ampicillinhaltigem LB-Medium (100 µg/ml) weiter vermehrt und die Plasmide nach Präparation durch einen Restriktionsverdau getestet werden.

### 3.2.10 Kryokonservation von Bakterien

Zur Lagerung plasmid-tragender Bakterien wurden diese in LB-Medium mit 7 % DMSO bei – 80°C gelagert.

### 3.2.11 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Die Isolierung von Plasmid-DNS gliedert sich in Anzucht und Lyse der Bakterien und anschließende Reinigung der freigesetzten DNS (Birnboim und Doly, 1979). Die Anzucht erfolgte je nach erforderlicher DNS-Menge in 3 - 5 ml (Minipräparation) bzw. in 1 l (Maxipräparation) LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin für ca. 16 Stunden bei 37°C (OD<sub>600</sub> = ~ 1,6) im Brutschrank. Die alkalische Lyse wurde gemäß den Angaben der Firma Qiagen mit Hilfe der Pufferlösungen P1, P2 und P3 durchgeführt.

Die Aufreinigung erfolgte bei der Minipräparation durch eine Alkoholfällung, indem zunächst die, bei der Lyse ausgefallenen, Proteine, Zellwandreste und chromosomale DNS bei 8000 - 12000 rpm abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde nun mit der doppelten Menge Ethanol ausgefällt, erneut zentrifugiert (10000 - 12000 rpm; 10 - 13 Minuten; 4°C), mit 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in 0,1x TE-Puffer (pH 7,6) aufgenommen.

Bei der Maxipräparation wurde, um den Reinheitsgrad der DNS für eine Transfektion eukaryotischer Zellen zu erhöhen, die Aufreinigung über eine Qiagen-tip 500-Säule nach Protokoll des Herstellers durchgeführt und anschließend mit Alkohol ausgefällt.

### 3.2.12 Gelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung unterschiedlich großer DNS-Fragmente aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch ein Agarosegel in einem elektrischen Feld. Es wurde in 0,5x TBE-Puffer eine 1 %ige Agaroselösung angesetzt, die mit 500 ng/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNS und emitiert nach Anregung im UV-Bereich Licht im sichtbaren Bereich (Waring, 1965). Bei dem Laufpuffer handelte es sich ebenfalls um 0,5x TBE-Puffer. Die DNS-Lösungen wurden mit 10 % Gel-Ladepuffer gemischt und bei 80 - 120 V aufgetrennt, anschließend fotografiert und elektronisch weiterverarbeitet.

### 3.2.13 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNS wurde mit einem Skalpell unter Durchleuchtung mit 366 nm UV-Licht ausgeschnitten. Die Extraktion des DNS-Fragmentes aus der Agarose erfolgte durch eine Silica-Gelmembran des Gel Extraction Kits nach dem Protokoll des Herstellers.

### 3.2.14 Aufreinigung von DNS nach enzymatischen Reaktionen

Um DNS für weitere Reaktionen oder Transfektionen von Enzymen zu trennen, wurde ein PCR Purification Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.2.15 Endotoxinaufreinigung von Plasmid DNS

Lipopolysaccharide (Endotoxine), die bei der Präparation von Plasmid-DNS anfallen, können einen toxischen Effekt auf menschliche Zellen haben und mit Hilfe von Triton X 114 Extraktion entfernt werden (Cotten *et al.*, 1994). Das Prinzip dieser Extraktion beruht auf einer Phasentrennung von hydrophilen und amphiphilen Molekülen (Bordier, 1981).

Die DNS-Lösung wurde mit 3 M Natriumacetatlösung (pH 7,5) auf eine 0,3 M Natriumacetatlösung eingestellt. Diese Lösung wurde mit 3 % Triton X 114 versetzt, das vorher einem dreimaligen Temperaturwechsel von 0°C auf 30°C ausgesetzt wurde. Die wässrige Phase wurde nach Zentrifugation (2 min.; 30°C; 200 rpm) vorsichtig abpipettiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt und die DNS anschließend aus der wässrigen Phase durch Alkoholfällung weiter aufgereinigt.

### 3.3 Allgemeine Arbeitstechniken für die Zellkultur

### 3.3.1 Aussähen von tiefgefrorenen Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und der Inhalt mit 20 ml des jeweils für die Zelllinie empfohlenen Nährmediums gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend in eine 144 mm Petrischale gegeben und bei 37°C und 5 %  $CO_2$  im Brutschrank inkubiert. Innerhalb von 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um das DMSO zu entfernen.

### 3.3.2 Kultivierung und Passagierung

Alle Zelllinien wurden in Monolayerkulturen gehalten, bei denen das Medium alle drei Tage gewechselt wurde. Eine Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von 80 %. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden einmal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend folgte eine 3 - 5minütige Inkubation mit 3 - 4 ml 37°C warmem Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop betrachtet und bei einem Adhärenzverlust der Zellen von größer 50 % mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube mit der doppelten Menge Komplettmedium überführt. Nach Zentrifugation bei 1300 U/min und 4°C wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:8 auf neue Petrischalen verteilt.

## 3.3.3 Zellzählung und Vitalitätsprüfung durch den Trypanblau-Ausschlusstest

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Differenzierung lebender und toter Zellen wurden diese nach Trypsinierung und Resuspension in einem Verhältnis von 1:5 mit Trypanblaulösung für fünf Minuten inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Vitale Zellen sind in der Lage den Farbstoff auszuschleusen und erscheinen unter dem Mikroskop hell. Tote Zellen sind dagegen tiefblau gefärbt.

### 3.3.4 Einfrieren

Für eine kurzfristige Lagerung der Zellen wurde eine Kryokonservierung mit DMSO bei – 80°C durchgeführt. DMSO verhindert die Kristallisation innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydration des Zytoplasmas. Die Zellen wurden wie bei der Passagierung mit Trypsin-EDTA in Suspension gebracht, nach Zentrifugation in dem jeweils von ATCC empfohlenen Einfriermedium resuspendiert und in 2 ml Kryotubes bei – 80°C gelagert.

### 3.3.5 Calcium-Phosphat-Transfektion von Plasmid-DNS in Zelllinien

Die verwendete Methode der Calcium-Phosphat-vermittelten Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNS basiert auf Jordan *et al.* (1996).

Einen Tag vor der Transfektion wurden die jeweiligen Zellen mit einer Dichte ausgesät, sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 70 % vorlag. Ein Mediumwechsel erfolgte eine Stunde vor der Transfektion. Es wurden nun in einem Polystyrolröhrchen 25 µg Plasmid-DNS in 100 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> pipettiert. Das Gesamtvolumen wurde mit 0,1x TE Puffer (pH 7,6) auf 1 ml gebracht und mit 1 ml 2x *HEPES-buffered salin* gemischt. Nach einer einminütigen Inkubation wurden 0,1 ml dieser Calcium-Phosphat-DNS-Suspension pro Milliliter Nährmedium zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es schloss sich ein kompletter Mediumwechsel an.

### 3.3.6 Transfektionskontrolle mit Hilfe der β-Galaktosidasefärbung

In Transfektionsstudien wird oft das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* als Referenzmaß verwendet. Das Prinzip beruht auf der Umwandlung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galacto-Pyranosid zu 5-Bromo-4-Chloro-Indigo, das eine blaue Färbung aufweist (Pearson *et al.*, 1963).

Einen Tag nach der Transfektion mit dem Plasmid pRC.CMV-ß-Gal wurde das Medium der Kontrollwells einer 6-Well-Platte entfernt und die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Es folgte eine fünfminütige Inkubation mit 1 ml einer 0,5 %igen Glutaraldehydlösung. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Nun folgte die Zugabe von 1 ml X-Gal Färbelösung und eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach 24 Stunden konnte der prozentuale Anteil der blaugefärbten Zellen, ein Maß für die Transfektionseffizienz, bestimmt werden.

Für die Transfektionskontrolle zur Virusgeneration mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Kopräzipitation wurden für eine 94 mm Petrischale jeweils 5 ml der angegebenen Lösungen verwendet.

### 3.4 Spezielle molekularbiologische Arbeitstechniken

#### 3.4.1 Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide

Bei den verwendeten adenoviralen Expressionsplasmiden handelt es sich um Vektoren, bei denen eine *Multiple Cloning Site* (MCS) von Sequenzen des adenoviralen Genoms flankiert ist. Stromaufwärts der MCS liegen die Basenpaare 1 bis 456, stromabwärts die Basenpaare 3345 bis 5865. Diese Sequenzen sind Voraussetzung für die Generierung adenoviraler Vektoren durch homologe Rekombination in 293-Zellen.

#### 3.4.1.1 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12

Der Vektor pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 wurde mit der Restriktionsendonuclease EcoR V geschnitten. Es entstand ein linearisiertes Plasmid mit aufgefüllten Enden (*blunt ends*), dessen 5'-Enden mit der Schrimps Alkalischen Phosphatase dephosphoriliert wurden. pBK.CMV-binSyst. wurde mit Cla I geschnitten und anschließend für 10 Minuten mit Sac I partial verdaut. Dadurch wurden drei verschiedene Fragmente aus pBK.CMV-bin herausgeschnitten, und zwar durch Hydrolysierung beider Sac I Schnittstellen ein 557 und ein 1421 basenpaarlanges Fragment sowie durch den Sac I Partialverdau ein 1978 langes Fragment. Letzteres codiert für das binäre System und wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahiert. Die überhängenden Enden wurden mit der T4 Polymerase aufgefüllt, *blunt end* mit dem geschnittenen Plasmid pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 ligiert und in *E. coli* transformiert. Nach Selektionierung auf Ampicillinplatten und Minipräparation wurde die Klonierung sowie die Orientierung des Fragments durch einen Not I Verdau kontrolliert.

#### 3.4.1.2 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-Red2

Das cDNS-Fragment des Red2 wurde durch Verdau des Vektors pDSRed2 mit Kpn I und Not I und anschließende Gelextraktion gewonnen (Fragmentlänge: 703 Basenpaare). Aus dem Plasmid pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 wurde mit Hilfe von Kpn I und Not I das Gen für das Interleukin-12 Fusionsprotein als 1772 basenpaargroßes Fragment herausgeschnitten. Der gelextrahierte, linearisierte Vektor wurde mit der gelextrahierten cDNS für Red2 *sticky end* ligiert. Nach Transformation, Selektionierung auf Ampicillinplatten und Minipräparation wurde die Klonierung durch einen Verdau mit Kpn I und Not I kontrolliert.

#### 3.4.1.3 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Der Vektor pAd.DF3/MUC1-Red2 wurde durch Hydrolyse mit Kpn I linearisiert. Die überhängenden Enden wurden mit Hilfe der T4 DNS-Polymerase aufgefüllt und die 5' Enden durch die Schrimps Alkalische Phosphatase dephosphoriliert. Der Vektor pBK.CMV-bin.Syst. wurde mit Cla I geschnitten und anschließend für zehn Minuten mit Sac I partial verdaut. Das Fragment, welches das binäre System kodiert, wurde gelextrahiert und mit der T4 DNS-Polymerase gebluntet. Es folgte eine *blunt end*-Ligation zwischen diesem Fragment und dem linearisierten Vektor pAd.DF3/MUC1-Red2. Die selektionierten Klone wurden nach Minipräparation mit Not I kontrollverdaut.

### 3.4.2 Funktionale Charakterisierung der klonierten adenoviralen Expressionsplasmide

### 3.4.2.1 Single-chain Interleukin-12 Expressionsvergleich nach Transfektion von adenoviralen Expressionsplasmiden in verschiedene eukaryotische Zelllinien

Die verwendeten adenoviralen Expressionsplasmide waren pAd.CMV-mscIL-12, pAd-DF3/MUC1-mscIL-12 und pAd.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12. Die Transfektion wurden an folgenden Zelllinien durchgeführt:

- 293 (humane embryonale Nierenzelllinie)
- Cos-7 (SV40 transfizierte Affen-Nierenzelllinie)
- SW 620 (humane Kolonkarzinomzelllinie)
- MCA-26 (murine Kolonkarzinomzelllinie)
- Hepa1-6 (murine Hepatomzelllinie)

Einen Tag vor der Transfektion wurden jeweils 5\*10<sup>5</sup> Zellen von jeder Zelllinie in einer 6-Well-Platte ausgesät und gemäß 3.3.5 mit dem jeweiligen adenoviralen Expressionsplasmid transfiziert. Es wurden pro Zelllinie und Plasmid jeweils Triplets angesetzt. 24 und 48 Stunden später wurde jeweils 0,5 ml Zellkulturüberstand abgenommen und bei – 20°C gelagert. Nach der ersten Abnahme erfolgte ein kompletter Austausch des Mediums. Die Interleukin-12 Konzentrationen in den Überständen wurde gemäß der Anleitung des Herstellers mit einer murinen p70-ELISA gemessen.

Die statistische Auswertung erfolgte, wie auch bei den anderen Expressionsexperimenten, mit einem ungepaarten Student-t-Test auf ein Signifikanzniveau von p < 0,05 hin. Hierzu wurde die Software GraphPad InStat der Firma GraphPad, San Diego, CA, USA verwendet.

### 3.4.2.2 Funktionelle Prüfung des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Es wurden 3\*10<sup>5</sup> 293-Zellen pro Feld einer 6-Well-Platte ausgesät und 24 Stunden später wie unter 3.3.5 beschrieben mit dem Plasmid pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 transfiziert. Mit Unterstützung von Dr. med. P. Nollau aus dem Institut für Klinische Chemie des UKE wurde die Expression des *Red Fluorescent Proteins 2* fluoreszenzmikroskopisch dargestellt und photographiert. Das verwendete Fluoreszenzprotein Red2 weist eine Anregungswellenlänge von 558 nm sowie eine Emissionswellenlänge von 583 nm auf.

### 3.4.3 Sequenzierung des binären Systems

Die verwendete Methode basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchs- bzw. Didesoxynucleotidverfahrens (Sanger *et al.*, 1977).

Der Sequenzierungsansatz bestand aus ca. 500 ng des Plasmids pBlueskript II (+)-bin.Syst., 15 pMol des jeweiligen Primers, 2 µl BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix und 6 µl 2,5x Sequencing Buffer. Die verwendete DNS aus einer Maxipräparation wurde vorher durch eine Ethanolfällung aufgereinigt und in Aqua dest. aufgenommen. Die photometrisch überprüfte 260/280 nm Ratio betrug mindestens 1,8.

Es wurde folgendes Sequenzierungsprogramm im Thermozykler durchgeführt:

25 Zyklen:	
96°C	10 Sekunden
50°C	5 Sekunden
60°C	4 Minuten

Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem Standard 1,5 ml Eppendorftube mit 80 µl 0,3 M Natriumacetat aufgefüllt, mit 300 µl Ethanol versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die DNS pelletiert und anschließend luftgetrocknet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI-Sequenator 377 durch das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des UKE. Es wurde sowohl die Senseals auch die Antisenseorientierung sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen für beide Orientierungen wurden mit der Software MacMolly Tetra (Soft Gene) auf Kongruenz untereinander hin untersucht. Mit einer *Blast Search* (NCBI) erfolgte ein Vergleich mit den Sequenzen in der NCBI Datenbank für die einzelnen Bestandteile des binären Systems. Weiter wurde das Sequenzierungsresultat mit der Klonierungstrategie des binären Systems verglichen (Block *et al.,* 2002). Verwendete Primer (MWG-Biotech):

<u>Orientierung: sense:</u>	Primer 1: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
	Primer 2: 5'-AGA CAG TTG ACT GTA TCG CCG-3'
	Primer 3: 5'-TAA CTG AAA CAC GGA AGG AG-3'
	Primer 4: 5'-TCA GGT CCA CGA CCC AAG C-3'

Orientierung: anti-sense: Primer 1: 5'-TTA ATG CGC CGC TAC AGG-3' Primer 2: 5'-ATA CCC TCT AGA GTC TCC G-3' Primer 3: 5'-CCT GGG CAT GCA AGC TTT GG-3' Primer 4: 5'-TTC CGT GTT TCA GTT AGC C-3' Primer 5: 5'-TTG TTA CTA CTC TCT TCC G-3'

### 3.5 Arbeiten mit adenoviralen Vektoren

### 3.5.1 Allgemeines zur Durchführung

Alle Arbeiten mit adenoviralen Vektoren wurden an der sterilen Werkbank nach S2 Sicherheitsbestimmungen durchgeführt. Konstruktion, Titration und Aufreinigung der Vektoren basieren auf den Arbeiten von Graham und Prevec (1991 und 1995) und Bett *et al.* (1994).

### 3.5.2 Konstruktion des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 (Calcium-Phosphat-Kopräzipitation)

Einen Tag vor dem Assay wurden fünf 144 mm Petrischalen mit 293-Zellen einer Konfluenz von ca. 90 bis 95 % auf zwanzig 94 mm Petrischalen gesplittet, die am nächsten Tag wieder eine Konfluenz von 90 bis 95 % zeigten. Die beiden adenoviralen Expressionsplasmide pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 und pBHG-10 lagen steril im 0,1x TE-Puffer (pH 7,6) mit einer Konzentration von 500-1000 ng/ml vor. Jeweils 15 - 20  $\mu$ g beider Plasmide wurden in 19 12\*75 mm Polystyrenröhrchen steril pipettiert, welche 1,5 ml HEPES enthielten. Ein Röhrchen erhielt 15  $\mu$ g des Plasmids pRC.CMV-ß-Gal in 1,5 ml HEPES.

Tröpfchenweise wurden nun 75  $\mu$ l einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub> Lösung zu jedem Röhrchen zugeführt und nach jedem Tropfen die Lösung gewirlt. Nach einem erneuten Mixen inkubierten die Lösungen 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur und bildeten einen feinen Niederschlag aus. Diese Lösung wurde direkt in die 20 Petrischalen pipettiert ohne das Nährmedium vorher zu entfernen. Die Zellkulturschalen wurden 4,5 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde zunächst das Nährmedium der Petrischale entfernt, die das ß-Gal-Plasmid erhalten hat und durch 10 ml frisches Nährmedium ersetzt. Am nächsten Tag wurde eine ß-Galaktosidasefärbung durchgeführt (siehe 3.3.6). Bei den anderen 19 Platten wurde das Nährmedium durch 20 ml eines Agarose-Nährmediumgemisches ersetzt, das sehr vorsichtig über den Rand der Petrischale auf den Zellrasen pipettiert wurde. Nach Erhärtung des Gemisches wurden die

Petrischalen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für ca. 3 Wochen inkubiert. Alle 4 bis 5 Tage wurden 8 bis 10 ml des Agarosegemisches zum Nachfüttern der Zellen hinzu pipettiert. Virusplaques wurden nach 10 bis 14 Tagen als hellere, weniger dichte Areale im Zellrasen sichtbar. Mit stärkerer Vergrößerung erkennt man unter dem Mikroskop ein kreisförmiges Areal von abgerundeten Zellen, das sich im Verlauf radiär ausbreitet (Beispiel: Abb. 6).





Zum Isolieren der Plaque wurde mit einer 1ml Pipette, deren Spitze ca. 10 mm abgeschnitten wurde, die Plaque mit dem darüber liegenden Agarosegemisch aspiriert und in 1 ml Nährmedium bei – 80°C gelagert.

### 3.5.2.1 Verifizierung der Virusplaques (CPE-Assay) und funktionale Prüfung

Die von den 94 mm Petrischalen isolierten Plaques müssen vor der Amplifikation dahingehend untersucht werden, ob es sich wirklich um ein neu entstandenes Virus handelt und ob das Virus das gewünschte Transgen enthält und nicht nur eine leere Expressionskassette.

Dazu wurden zunächst die gepickten Plaques dreimal einem Auftau-Einfrier-Zyklus unterzogen, indem die Eppendorftubes mit den Plaques erst in ein 37°C Wasserbad und dann in ein Trockeneis-Ethanol-Gemisch überführt wurden. Durch diese Prozedur brechen die Zellmembranen auf und das in der Zelle enthaltene Virus steht für eine Infektion bereit. In einer 24-Well-Platte wurden nun 2\*10<sup>5</sup> 293-Zellen ausgesät, die 24 Stunden später mit 300 µl der aufgebrochenen Plaquesuspension infiziert wurden. Dazu wurde das Nährmedium von den 293Zellen entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen wurden die 300  $\mu$ l hinzupipettiert und die Zellen für 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde mit 700  $\mu$ l Nährmedium auf 1 ml aufgefüllt und die Zellen für 2 bis 5 Tagen wieder im Brutschrank inkubiert.

Das Vorhandensein eines Virus wird durch einen zytopathischen Effekt der 293-Zellen innerhalb von 2 bis 5 Tagen bewiesen. Die Zellen beginnen sich abzurunden, verlieren schließlich die Adhärenz und schwimmen frei im Medium. Ein kleiner Teil des Nährmediums (ca. 100 µl) wurde verwendet, um die Funktionalität des viralen Vektors zu überprüfen. In diesem Fall wurde bei der Herstellung des Adenovirus Ad.DF3/MUC1-rmscIL-12 ein p70-ELISA zum Nachweis von Interleukin-12 im Überstand gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der restliche Teil der lytischen Zellsuspension verblieb für die weitere Vermehrung.

#### 3.5.2.2 Vermehrung und Aufreinigung

Mit den restlichen 900 µl aus dem vorangegangenen Test auf einen zytopathischen Effekt wurde nach dreimaligem Auftau-Einfrier-Zyklus eine 94 mm Petrischale mit 293-Zellen einer Konfluenz von ca. 70 bis 80 % infiziert. Hierbei wurden die 900 µl zu 10 ml frischem Nährmedium für die 293-Zellen beigefügt. Nach 36 bis 48 Stunden stellte sich ein zytopathischer Effekt ein, bei dem 95 bis 100 % der Zellen abgerundet waren und 10 bis 20 % keine Adhärenz zeigten. Das virushaltige Nährmedium wurde durch Zentrifugation von den lytischen Zellen getrennt und mit frischem Medium für sieben 144 mm Petrischalen vereinigt, das zur Infektion von weiteren 293-Zellen verwendet wurde. Auf die gleiche Weise diente das Nährmedium dieser sieben Petrischalen zur Infektion von 50 weiteren Schalen.

Nun wurden die Zellen nach 36 bis 48 Stunden abzentrifugiert und, nach einmaligem Waschen, in 5 ml PBS resuspendiert und das Medium verworfen. Die Zellen wurden einem dreimaligen Einfrier-Auftau-Zyklus unterzogen und durch fünfminütige Zentrifugation bei 2500 rpm von dem jetzt virushaltigen PBS abgetrennt. Nach Auffüllen auf 36 ml PBS wurde die Viruslösung auf sechs Ultrazentrifugenröhrchen verteilt, die einen dreiteiligen CsCl Stufengradienten enthielten. Dieser setzte sich aus 0,5 ml 1,5g/ml CsCl Lösung, 3 ml 1,35 g/ml CsCl Lösung und 3 ml 1,25 g/ml CsCl Lösung zusammen, die vorsichtig übereinander geschichtet waren. Alle drei Lösungen wurden in PBS angesetzt. Es folgte ein einstündiger Zentrifugationslauf bei 10°C und 34000 rpm in dem SW 40Ti Rotor der Ultrazentrifuge.



Abb. 7: Virusbanden nach der Ultrazentrifugation (Beispiel)

Zwischen der 1,25 und der 1,35 g/ml CsCl Schicht zeichnete sich das Virus als bläuliche Bande ab (Abb. 7), die vorsichtig mit einer 20 G-Kanüle in einer 20 ml Spritze gesammelt und mit der 1,35 g/ml CsCl Lösung auf ein Volumen von 24 ml gebracht wurde. Es schloss sich ein 18 stündiger Zentrifugationslauf bei ebenfalls 10°C und 34000 rpm an, wobei zwei Zentrifugationsröhrchen mit je 12 ml beschickt wurden. Bei diesem Zentrifugationsschritt bildet sich ein kontinuierlicher CsCl Gradient aus. Die Virusbande wurde erneut mit einer 20 G-Kanüle abgezogen und mit Dialyse Puffer auf ein Gesamtvolumen von ca. 5 ml gebracht.

Anschließend wurde die Lösung in eine Dialysemembran überführt und 24 Stunden im Dialysepuffer bei 4°C und Dunkelheit dialysiert. Alle acht Stunden erfolgte ein Wechsel des Puffers. Das Virus wurde dann in 1,5 ml Eppendorftubes zu je 100  $\mu$ l pipettiert, in einem Trockeneis-Ethanolgemisch schockgefroren und anschließend bei – 80°C gelagert.

### 3.5.2.3 Titration (Plaque-Assay)

Einen Tag vor der Titration wurden zwei 144 mm Petrischalen 293-Zellen, die eine Konfluenz von ca. 90 % hatten, auf 16 bis 20 60 mm Schalen gesplittet. Am nächsten Tag erfolgte eine serielle, exponentielle Verdünnungsreihe von 200 µl Virusaufreinigung. Die Verdünnung erfolgte im 293-Zellmedium ohne Zusätze. Die

verwendeten Verdünnungsstufen für die Titerung waren 1:10<sup>6</sup> bis 1:10<sup>15</sup>. Das Medium wurde von den 293-Zellen entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS durch 0,5 ml der jeweiligen Virusverdünnung ersetzt. Jede Verdünnung wurde als Duplikat infiziert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde die Viruslösung entfernt und in gleicher Weise wie schon bei der Virusgenerierung eine Überschichtung der Zellen mit jeweils 8 ml eines Agarose-Nährmediumgemisches durchgeführt. Nach Erhärtung der Überschichtung erfolgte eine 12 bis 14-tägige Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Am 7. Tag erfolgte eine weitere Überschichtung der Zellen mit 5 ml des Agarose-Nährmediumgemisches. Am 13. Tag wurden die entstandenen Plaques auf den Platten ausgezählt, deren Morphologie denen bei der Virusgeneration entsprach.

Der Virustiter wurde nach folgender Formel berechnet:

Durchschnitt der Plaques pro Platte x Verdünnung		plaque forming units
0,5 (= Menge der Viruslösung pro Platte)		ml

Es wurden nur die Platten zur Titerberechnung verwendet, die zwischen 30 und 300 Plaques zeigten.



#### Abb. 8: Plaque-Assay

Zellkultur mit diversen Plaques am 10. Tag nach Infektion. Der Monolayer wurde mit einer Virusverdünnung von 1:10<sup>7</sup> beimpft. (Beispiel eines Plaque Assay)

### 3.5.2.4 Funktionale Charakterisierung des Virus (Interleukin-12 ELISA)

Der konstruierte adenovirale Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 wurde durch Interleukin-12 Expressionstests in den murinen Tumorzelllinien Hepa1-6 (Hepatomzelle) MCA-26 (Kolonkarzinomzelle) auf seine Funktionalität hin untersucht. Als Maß für die Stärke der Genexpression diente der im Labor konstruierte Vektor Ad.CMVp40IRESp35 (Ad.CMV-IL-12).

Sechs Stunden vor der Infektion wurden jeweils  $1*10^6$  Zellen pro Feld einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Virusverdünnungen von 1, 10 und 100 m.o.i. wurden in zusatzfreiem 293-Zellmedium angesetzt. Nach Entfernung des Vollmediums und einmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Virusverdünnung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das virushaltige Medium durch 2 ml Vollmedium ersetzt und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. 1 ml Zellkulturüberstand wurde durch Zentrifugation von den Zellen entfernt und bei – 20°C gelagert. Mit einem murinen p70 ELISA wurden die Interleukin-12 Konzentrationen in den Überständen gemäß der Anleitung des Herstellers gemessen.

## 3.5.3 Konstruktionsversuch der adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1binSyst-msclL-12 und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

In gleicher Weise, wie bei dem Vektor Ad.DF3/MUC1-msclL-12 beschrieben, wurden insgesamt neun Calcium-Phosphat-Kopräzipitationen zur Konstruktion des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-binSyst.msclL-12 und weitere acht Versuche zur Herstellung des Vektors Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 ohne positive Resultate durchgeführt.

Zusätzlich wurde zur Konstruktion beider adenoviraler Vektoren ein alternatives Verfahren angewendet (Zhang *et al.*, 1993), das zur Virusherstellung eine Liposomen-vermittelte (DOTAP) Plasmidaufnahme sowie eine Inkubation ohne Agaroseüberschichtung propagiert. Die Durchführung wurde gemäß der publizierten Arbeit durchgeführt, jedoch wurde das Plasmid pBHG-10 an Stelle von pJM-17 verwendet.

## 3.5.4 Charakterisierung der tumorspezifischen adenoviralen Vektoren in der Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mittels Luciferase

#### 3.5.4.1 Viraler Luciferaseexpressionstest in verschiedenen Zelllinien

Für diese Experimente wurden die im Labor konstruierten adenoviralen Vektoren Ad.CMV-Luc, Ad.DF3/MUC1-Luc und Ad.DF3/MUC1.binSyst.-Luc (D. Milasinovic) verwendet. Der Luciferaseexpressionstest wurde in folgenden Zelllinien durchgeführt:

- MCA-26 (murine Kolonkarzinomzelllinie)
- HepG-2 (humane Hepatoblastomzelllinie)
- SK-CO-1 (humane Kolonkarzinomzelllinie)

Sechs Stunden vor der Infektion wurden jeweils 1\*10<sup>6</sup> Zellen pro Feld einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Virusverdünnungen von 1, 10 und 100 m.o.i. wurden in zusatzfreiem 293-Zellmedium angesetzt. Nach Entfernung des Vollmediums und einmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Virusverdünnung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das virushaltige Medium durch 2 ml Vollmedium ersetzt und die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nun wurden mit Hilfe des Luciferase Cell Culture Lysis Reagents gemäß den Angaben des Herstellers die Zellen lysiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei – 80°C gelagert.

Im Luminometer wurden die relativen light units (rlu) als ein Maß für die Luciferasekonzentration in den Überständen bestimmt. Mit Hilfe rekombinanter Luciferase wurde eine Standardkurve für die Luciferasekonzentrationen aus den rlu-Werten berechnet. Die gewonnenen Konzentrationswerte wurden mit der Gesamtzellproteinkonzentration der Überstände korreliert, die mit Hilfe eines Protein-Assays gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt wurde.

#### 3.5.4.2 Promotorkinetik durch Luciferaseexpressionstests

Für diese Experimente wurden die im Labor konstruierten adenoviralen Vektoren Ad.CMV-Luc, Ad.DF3/MUC1-Luc und Ad.DF3/MUC1.binSyst.-Luc (D. Milasinovic) verwendet.

Die beiden verwendeten Zelllinien waren:

- MCA-26 (murine Kolonkarzinomzelllinie)
- Hepa1-6 (murine Hepatomzelllinie)

Sechs Stunden vor der Infektion wurden jeweils 1\*10<sup>6</sup> Zellen pro Feld einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Virusverdünnungen von 100 m.o.i. wurden in einem zusatzfreien Zellmedium angesetzt. Nach Entfernung des Vollmediums und einmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine einstündige Inkubation der Zellen mit der jeweiligen Virusverdünnung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das virushaltige Medium durch 3 ml Vollmedium ersetzt und die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Nach 1, 2, 4 und 7 Tagen wurden die Zellen mit Hilfe des Luciferase Cell Culture Lysis Reagents lysiert und der Überstand aliquotiert. Alle 2 Tage wurde das Nährmedium erneuert. Die Luciferasekonzentration wurde wiederum mittels der Standardkurve aus den rlu-Werten bestimmt und mit den Gesamtzellproteinwerten korreliert.

### 3.6 Adenovirale Experimente in vivo

### 3.6.1 Präparation der adenoviralen Vektoren für die Experimente in vivo

### 3.6.1.1 Vermehrung und Aufreinigung des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc

Da es nicht gelang den viralen Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.Red2 zu konstruieren, wurde für die qualitative Untersuchung der Tumorspezifität *in vivo* der im Labor konstruierte adenovirale Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc (D. Milasinovic) verwendet und auf die gleiche Weise vermehrt und aufgereinigt wie es bei dem Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 unter 3.5.2.2 beschrieben wurde.

### 3.6.1.2 Funktionale Prüfung, Vermehrung und Aufreinigung des adenoviralen Vektors Ad.CMV-GFP

Der adenovirale Vektor Ad.CMV-GFP wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. F. Schnieders aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II - Molekulare Zellbiologie des UKE zur Verfügung gestellt.

Zur funktionalen Prüfung wurden 1\*10<sup>6</sup> HepG-2-Zellen pro Feld einer 6-Well-Platte ausgesät und 6 Stunden später, nach einmaligem Waschen mit PBS, mit 10 µl der erhaltenen Viruslösung in 500 µl zusatzfreiem Medium infiziert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium durch 2 ml Vollmedium ersetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung im Institut für Klinische Chemie des UKE mit Hilfe von Dr. med. P. Nollau.

Der Rest der erhaltenen Viruslösung wurde für die Amplifikation verwendet. Die Vermehrung und Aufreinigung erfolgte in gleicher Weise, wie bei dem Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 unter 3.5.2.2 beschrieben.

# 3.6.2 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Fixierung der murinen Gewebe für die Fluoreszenzmikroskopie

Zu diesem Zweck wurden 2\*10<sup>5</sup> MCA-26-Zellen auf Lab-Tek Champer Slides<sup>®</sup> ausgesät und 6 Stunden in 2 ml Vollmedium bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Waschen mit PBS und anschließend eine einstündige Inkubation bei 37°C mit FCS-freien 200 µl einer 1000 m.o.i. konzentrierten Viruslösung. Die verwendeten adenoviralen Vektoren waren Ad.CMV-GFP bzw. Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc. Nach einer Stunde erfolgte ein Austausch der Viruslösung mit 2 ml Vollmedium und eine weitere Inkubation für 48 Stunden bei 37°C.

Es wurden anschließend die Zellen auf verschiedene Arten fixiert (Tabelle 5). Jeweils zwei Ansätze der beiden Viren wurden für jede Fixierart durchgeführt. Die Darstellung der *Green Fluorescent Protein* Expression erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Prof. Dr. med. H.-J. Schäfer des Instituts für Pathologie des UKE. Die Luciferase wurde immunhistologisch detektiert und ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch dargestellt (siehe 3.6.7).

Fixierungsarten				
Formalin (10 Minuten)	Azeton (10 Minuten)			
Formalin (6 Stunden)	Azeton (6 Stunden)			
Alkohol (10 Minuten)	Luft			
Alkohol (6 Stunden)				

#### Tabelle 5: Verschiedene Fixierungen der murinen Zellen

Zusätzlich wurden jeweils 2\*10<sup>6</sup> MCA-26-Zellen auf einer 100 mm Petrischale ausgesät und 6 Stunden später mit jeweils 1,4 ml einer 1000 m.o.i. konzentrierten Viruslösung eines der beiden genannten Viren infiziert und wiederum eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte eine Trypsinierung der Zellen und das durch Abzentrifugieren gewonnene Pellet wurde in HOPE I Lösung resuspendiert und bei 4°C für 24 bis 48 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte die weitere Fixierung, sowie die Paraffineinbettung der Zellpellets im Institut für Pathologie des UKE gemäß den Angaben zur HOPE-Fixierungstechnik des Herstellers. Ebenfalls hier wurde bei den Paraffinschnitten für die Luciferase-exprimierenden Zellen die Immunhistologie (siehe 3.6.7) sowie für beide Viren die Photodokumentation durchgeführt.

#### 3.6.3 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 12-15 Wochen alte, weibliche Inzuchtmäuse des Stammes Balb/c, die von einem kommerziellen, amtlich zugelassenen Versuchstierzüchter (Charles River, Wilmington, MA, USA) bezogen wurden. Die Mäuse wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen in dafür ausgewiesenen Räumen des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf unter S2-Sicherheitsbedingungen nach dem Gentechnikgesetz gehalten. Sie hatten unlimitierten Zugang zu Futter und Wasser und es wurden maximal fünf Tiere pro Käfig gehalten. Insgesamt wurden 20 Tiere für die Experimente verwendet. Die Tierversuchsvorhaben Nr. 33/02, Gz. G 21132/591-00.33, vom 28.03.2002 wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lagerstraße 36, 20357 Hamburg, genehmigt. Tierversuchsleiter war Dr. med. A. Block, wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

### 3.6.4 Intrahepatisches Multimetastasenmodell

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Erzeugung eines Multimetastasenmodells in der Leber basiert auf der, von Gnant *et al.* (1999) modifizierten, Methode von Lafreniere und Rosenberg (1986).

Exponentiell wachsende MCA-26 Adenokarzinomzellen wurden von 144 mm Petrischalen durch Trypsinierung geerntet und nach dreimaligem Waschen mit PBS mit FCS-freiem Nährmedium auf eine Konzentration von 1,25\*10<sup>6</sup> Zellen/ml gebracht. Diese Zellpräparation wurde bis zur Injektion auf Eis gelagert.

Alle Manipulationen an den Tieren wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Mäuse wurden mit 0,1 ml/10 g KG eines Gemisches aus Ketamin und Rompun (12 mg Ketamin + 1,6 mg Rompun pro ml 0,9 %iger NaCl-Lösung) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Anschließend erfolgte mit einer Schermaschine subcostal im linken oberen Quadranten eine Rasur, die mit 70 % Ethanol desinfiziert wurde. Auf einer Korkplatte wurden die Tiere in einer rechts-lateralen Position gelagert und eine 10 mm lange subcutane Inzision auf Höhe der linken vorderen Axilarlinie unterhalb des linken Rippenbogens durchgeführt. Das Peritoneum wurde eröffnet und die Milz dargestellt. Nach Identifikation des gastrosplenischen Ligaments und der kurzen Magengefäße wurden diese Strukturen mit einem Elektrokauter durchtrennt, was zur vollständigen Mobilisierbarkeit der Milz führte. Das Organ wurde nun außerhalb der Bauchhöhle auf einer 3\*3 cm großen, sterilen Kompresse gelagert und 200 µl der präparierten Zellsuspension (2,5\*10<sup>5</sup> MCA-26-Zellen) langsam mit einer 26 G-Kanüle über den oberen Milzpol injiziert. Nach der Applikation wurde die Nadel langsam entfernt und die Einstichstelle zur Hämostase vorsichtig komprimiert.

Nach einem Intervall von fünf Minuten, in dem die Tumorzellen über die Milzvene portal-venös in die Leber metastasierten, wurden die Milzgefäße am Hilus mit einem nicht resorbierbaren 2-0 Nahtmaterial (Ethibond<sup>®</sup> Excel, Ethicon) ligiert und die Milz entfernt. Nach der Splenektomie wurde die Bauchhöhle in einer Schicht mit Hilfe einer Klammermaschine mit 9 mm Wund-Autoclips (Autoclip<sup>®</sup>, Becton Dickinson) verschlossen.

59
### 3.6.5 Applikation der viralen Vektoren

Vier Tage nach der Tumorzellapplikation erfolgte für alle Tiere die Virusinjektion. Die Mäuse befanden sich hierzu in einer Zwangsröhre und die Schwanzvenen wurden mit 42 bis 45°C warmem Wasser für ca. eine Minute dilatiert. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl eines äquimolaren Gemisches aus den Viren Ad.CMV-GFP und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc, was einer Virusmenge von 8,5\*10<sup>8</sup> pfu pro Virus entspricht. Die Virusapplikation wurde über einen Zeitraum von 90 Sekunden mit einer 1 ml Spritze und einer 26 G-Kanüle durchgeführt.

#### 3.6.6 Terminierung der Tiere und Fixation der Lebern

Die Versuchstiere waren in Bezug auf den Zeitpunkt der Terminierung in drei Gruppen zu je sechs Tieren unterteilt. Jeweils 2 Tage, 4 Tage und 7 Tage nach der Virusinjektion erfolgte die Terminierung der Tiere durch cervikale Dislokation. Die Bauchhöhle wurde großzügig eröffnet und die Leber entnommen.

Die Lebern wurden zu gleichen Teilen auf zwei verschiedene Arten fixiert. Zum einen wurde gemäß den Angaben des Herstellers in der HOPE I-Lösung für 24 bis 48 Stunden bei 4°C fixiert sowie in phosphatgepuffertem Formalin für ebenfalls 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die HOPE I und die formalinfixierten Proben im Institut für Pathologie der Universität Hamburg gemäß dem Protokoll des Herstellers mit der HOPE II-Fixierlösung sowie mit Azetonlösungen weiterbehandelt bzw. nach Standardverfahren verarbeitet und nachfolgend in Paraffin eingebettet.

#### 3.6.7 Immunhistologische Darstellung der Luciferase

Die Ad.DF3/MUC1-binSyst.-luc vermittelte Luciferaseexpression wurde vom Institut für Pathologie der Universität Hamburg durch eine immunhistologische Färbemethode an den HOPE-fixierten Leberschnitten durchgeführt. Hierzu wurden ein polyklonaler Luciferaseantikörper aus der Ziege sowie sekundär ein polyklonaler Ziegen-IgG Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Der zweite Antikörper war mit dem Fluorochrom *Texas Red<sup>TM</sup>* markiert. Die immunhistologischen Arbeiten wurden gemäß den Angaben der Firma Abcam durchgeführt.

#### 3.6.8 Fluoreszenzmikroskopie am paraffin-eingebetteten Lebergewebe

Die Darstellung der adenoviral-vermittelten *Green Fluorescent Protein* (GFP) Expression sowie der immunhistologischen Färbung der ebenfalls viral-vermittelten Luciferaseexpression wurde mit dem Mikroskop Axioskop der Firma Zeiss des Instituts für Pathologie der Universität Hamburg durch Prof. Dr. med. H.-J. Schäfer durchgeführt und mittels digitaler Photographie dokumentiert.

Die verwendeten Fluoreszenzproteine weisen folgende Anregungs- und Emissionswellenlängen auf:

Tabelle 5: Charakteristika der Fluoreszenzproteine für die Experimente in vivo

	Green Fluorescent Protein (GFP)	Texas Red <sup>™</sup>	
Anregungswellenlänge	488 nm	596 nm	
Emissionswellenlänge	507 nm	620 nm	

Für die Darstellung des GFP wurde ein FITC Filter und für das *Texas*  $Red^{TM}$  ein Rhodamine Filter verwendet, die beide von der Firma Zeiss stammen.

## 4 Ergebnisse

Für die Konstruktion von rekombinanten adenoviralen Vektoren wurden zunächst adenovirale Expressionsplasmide kloniert und *in vitro* charakterisiert. Das Amplifikationssystem für den tumorspezifischen Promotor DF3/MUC1, bestehend aus dem Gal4-VP16 Fusionsprotein und korrespondierenden Bindungsstellen wurde zudem komplett sequenziert. Der konstruierte tumorspezifische Vektor, der das Interleukin-12 Fusionsprotein kodiert, wurde in verschiedenen murinen Zelllinien untersucht. Im Hinblick auf ein murines, hepatisches Multimetastasenmodell wurden der amplifizierte, tumorspezifische Vektor mit Hilfe des Luciferasemarkergens in der Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 näher charakterisiert und abschließend die Tumorspezifität in einem hepatischen Multimetastasenmodell qualitativ untersucht.

## 4.1 Klonierung der adenoviralen Expressionsplasmide

#### 4.1.1 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12

Der Klonierungsvektor pBK-binSyst. wurde mit den Restriktionsendonucleasen Cla I und partial mit Sac I geschnitten und so die cDNS für das binäre System gewonnen. Die überhängenden Enden wurden mit Hilfe der T4 DNS-Polymerase aufgefüllt und das Fragment *blunt end* in die dephosphorilierte EcoR V Schnittstelle des adenoviralen Expressionsplasmids pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 kloniert (Abb. 9).



Abb. 9: Plasmidkarte für das adenovirale Expressionsplasmid pAd.DF3/MUC1-binSyst.mscll-12

Die selektionierten Klone wurden nach Minipräparation mit Not I bzw. Hind III kontrollverdaut. Ist die cDNS des binären Systems in der richtigen Orientierung in den Vektor kloniert worden, liegt die zweite Not I Schnittstelle stromaufwärts zum binären System und bei einem Not I Verdau wird dieses zusammen mit dem murinen single-chain Interleukin-12 Gen herausgeschnitten. Der Hind III Verdau bestätigt nur, dass das binäre System in das Plasmid kloniert wurde (Abb. 10).



#### Abb. 10: Kontrollverdau der Klonierung für pAd.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12

Spur 1 und 2 zeigen den Molekulargewichtsstandard II bzw. VII. In Spur 3 ist mit einem Not I Verdau ein 3681 basenpaargroßes Fragment herausgeschnitten (cDNS für binäres System und murines single chain Interleukin-12). Auf Spur 4 ist aus dem Vektor mit Hind III die cDNS für Gal4-VP16 aus dem binären System herausgeschnitten (1232 Basenpaare).

#### 4.1.2 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-Red2

Die cDNS für Red2 wurde durch Hydrolyse des Plasmids pDSRed2 mit Kpn I und Not I gewonnen. Aus dem adenoviralen Expressionsplasmid pAd.DF3/MUC1mscIL-12 wurde das Gen für das murine Interleukin-12 Fusionsprotein mit Kpn I und Not I herausgeschnitten und mit Hilfe einer sticky end-Ligation durch die cDNS für das Gen Red2 ersetzt (Abb. 11).



Abb. 11: Plasmidkarte für das adenovirale Expressionsplasmid pAd.DF3/MUC1-Red2

Die selektionierten Klone wurden nach Minipräparation mit Kpn I und Not I kontrollverdaut, die das Gen für das *Red Fluorescent Protein 2* wieder aus dem Vektor herausschneiden (Abb. 12).



#### Abb. 12: Kontrollverdau der Klonierung für pAd.DF3/MUC1-Red2

Spur 1 zeigt den Molekulargewichtsstandard VII. Auf der Spur 2 ist das unverdaute Plasmid aufgetragen. Die Spur 3 zeigt einen zusätzlichen Sicherheitsverdau mit Xba I und Not I. Das 1452 basenpaargroße Fragment kodiert für den DF3/MUC1 Promotor sowie für das *Red Fluorescent Protein 2*. Auf der Spur 4 ist die mit Kpn I und Not I herausgeschnittene cDNS für Red2 zu sehen (703 Basenpaare)

### 4.1.3 Klonierung von pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Das adenovirale Expressionsplasmid pAd.DF3/MUC1-Red2 wurde mit Kpn I geschnitten, die überhängenden Enden mit der T4 DNS Polymerase aufgefüllt und mit der Schrimps Alkalischen Phosphatase dephosphoriliert. Die cDNS für das binäre System wurde mit einem Cla I und einem partialen Sac I Verdau aus pBKbinSyst. isoliert und es wurden ebenfalls die überhängenden Enden aufgefüllt. Es folgte eine *blunt end*-Ligation in die Kpn I Schnittstelle des adenoviralen Expressionsplasmids (Abb. 13)



Abb. 13: Plasmidkarte für das adenovirale Expressionsplasmid pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Die selektionierten Klone wurden nach Minipräparation mit Not I bzw. Hind III kontrollverdaut (Abb. 14).



#### Abb. 14: Kontrollverdau der Klonierung für pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2.

Spur 1 und 2 zeigen den Molekulargewichtsstandard II bzw. VII. In Spur 3 ist mit einem Not I Verdau ein 2652 basenpaargroßes Fragment herausgeschnitten (cDNS für binäres System und murines single chain Interleukin-12). Auf Spur 4 ist aus dem Vektor mit Hind III die cDNS für Gal4-VP16 aus dem binären System herausgeschnitten (1232 Basenpaare). Das unverdaute Plasmid ist auf Spur 5 aufgetragen.

# 4.2 Funktionale Charakterisierung der klonierten, adenoviralen Expressionsplasmide

## 4.2.1 Single-chain Interleukin-12 Expressionsvergleich nach Transfektion von adenoviralen Expressionsplasmiden in verschiedene eukaryotische Zelllinien

Mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation wurden die adenoviralen Expressionsplasmide pAd.CMV-mscIL-12, pAd-DF3/MUC1-mscIL-12 und pAd.DF3/MUC1binSyst.-mscIL-12 in verschiedene humane und murine Zellen transfiziert und nach 24 und 48 Stunden die Konzentration des Interleukin-12-Fusionsproteins im Zellkulturüberstand mit einem murinen p70 ELISA bestimmt.

Nach 24 Stunden zeigen die muzin-positiven, murinen Kolonkarzinomzellen MCA-26 sowie die Affenzelllinie COS-7 den größten Amplifikationsfaktor (57 bzw. 50) (Abb. 15). In den anderen drei Zelllinien schwankte dieser zwischen 8 und 15. Nach zwei Tagen erhöhte sich die amplifizierende Wirkung in den 293-, COS-7und MCA-26-Zellen um das 3- bis 5fache, wohingegen Hepa1-6- und SW-620-Zellen keine Veränderung zeigten.

Vergleicht man die amplifizierte, spezifische Genexpression mit der CMVvermittelten, so zeigen nur die beiden muzin-positiven Zelllinien MCA-26 und SW-620 eine signifikante (p < 0,05) 2- bis 5fache Überlegenheit der tumorspezifischen Konstrukte (Abb. 16). In den muzin-negativen Zelllinien ist an beiden Messtagen der CMV Promotor bis zu einem Faktor von 15 signifikant dem DF3/MUC1binSyst.-Konstrukt überlegen (p < 0,02), schwächt sich jedoch nach 48 Stunden leicht ab. (In den COS-7-Zellen liegt nach 48 Stunden keine Signifikanz mehr vor: p = 0,0621.)

Der nicht-amplifizierte Muzinpromotor zeigt in allen getesteten Zelllinien eine signifikante Unterlegenheit (p < 0,006 bis p < 0,0001) gegenüber dem konstitutiven Promotor (Abb. 17). In muzin-negativen Zellen variiert dieser Unterschied zwischen 22- und 345fach. Die stärkste Interleukin-12 Expression zeigt der DF3/ MUC1 Promotor in der muzin-positiven, humanen Kolonkarzinomzelllinie SW-620. Hier ist der CMV Promotor nach 48 Stunden nur um den Faktor 2,5 stärker.



**Abb. 15: Amplifikation der Interleukin-12 Expression durch das binäre System** Die Amplifikation wurde durch Transfektion von muzin-negativen (293, COS-7, Hepa1-6) und muzin-positiven Zelllinien (MCA-26, SW-620) mit den adenoviralen Expressionsplasmiden pAd.DF3/MUC1-binSyst.-msclL-12 bzw. pAd.DF3/MUC1-msclL-12 quantifiziert. Die Interleukin-12 Expression wurde mit einem p70 ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt.



#### Abb. 16: Vergleich der amplifizierten, spezifischen Interleukin-12 Expression mit der CMVvermittelten Genexpression

Die Genexpression wurde durch Transfektion von muzin-negativen (293, COS-7, Hepa1-6) und muzin-positiven Zelllinien (MCA-26, SW-620) mit den adenoviralen Expressionsplasmiden pAd.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12 bzw. pAd.CMV-mscIL-12 quantifiziert. Die Interleukin-12 Expression wurde mit einem p70 ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt.



# Abb. 17: Vergleich der nicht-amplifizierten spezifischen Interleukin-12 Expression mit der CMV-vermittelten Genexpression

Die Genexpression wurde durch Transfektion von muzin-negativen (293, COS-7, Hepa1-6) und muzin-positiven Zelllinien (MCA-26, SW-620) mit den adenoviralen Expressionsplasmiden pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 bzw. pAd.CMV-mscIL-12 quantifiziert. Die Interleukin-12 Expression wurde mit einem p70 ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt.

## 4.2.2 Funktionale Prüfung der adenoviralen Expressionsplasmide pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Nach Calcium-Phosphat-Transfektion des Plasmids pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 in 293-Zellen wurde mit Hilfe von Dr. med. P. Nollau vom Institut für Klinische Chemie durch Fluoreszenzmikroskopie die Funktionalität des konstruierten adenoviralen Expressionsplasmids überprüft und photodokumentiert (Abb. 18).



Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie von pAd.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 transfizierten 293-Zellen

### 4.3 Sequenzierung des binären Systems

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde der im Labor klonierte Vektor pBluescript II (+)-binSyst. verwendet. Es wurden mit vier Primern die Sense-Orientierung, und mit fünf Primern die Antisense-Orientierung sequenziert. Die Analyse der entstandenen Amplifikate erfolgte im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des UKEs mit Hilfe des ABI Sequenator 377. Die erhaltenen Sequenzen für beide Orientierungen wurden mit der Software MacMolly Tetra (Soft Gene) auf Kongruenz hin untersucht. Mit einer *Blast Search* (NCBI) erfolgte ein Vergleich mit den Sequenzen in der NCBI Datenbank für die einzelnen Bestandteile des binären Systems. Des Weiteren wurde das Sequenzierungsresultat mit der Klonierungsstrategie des binären Systems verglichen (Block *et al.*, 2002).

In *Sense*-Orientierung folgt zuerst ein Fragment mit 44 Basenpaaren. Es kodiert für die Restriktionsschnittstellen Cla I, Apa I, Not I, Xba I, Sca I, Xho I und Hind III aus der *Mutiple Cloning Site* des Vektors pBK.CMV. Das sich anschließende Fusionsprotein Gal4-VP16 weist eine Länge von 1226 Basenpaaren auf. Hiervon nimmt Gal4 eine Größe von 463 und VP16 eine Größe von 752 Basenpaaren ein.

Beide Sequenzen sind von einer EcoR I und einer Sma I Restriktionsschnittstelle (11 Basenpaare) getrennt. An das Fusionsprotein schließt sich die Sequenz der Schnittstellen Hind III und Sph I aus dem Plasmid pGal4-5BS-CAT an. Es folgt ein 554 basenpaarlanges Fragment, das für einen Ausschnitt aus dem aminoterminalen Ende des LacZ Gens kodiert (220 Basenpaare) und zusammen mit dem Abschnitt für das SV40 polyA (334 Basenpaare) aus dem pBK.CMV Vektor in das binäre System kloniert wurde (2 Basenpaare stammen aus einer geblunteten Pst I Schnittstelle).

Stromabwärts folgen fünf Gal4 Bindungsstellen mit jeweils 17 Basenpaaren und nach einem 18 basenpaarlangen Zwischenstück eine TATA-Box als Minimalpromotor (8 Basenpaare). Es schließt sich ein Stück von 21 Basenpaaren aus *der Muliple Cloning Site* des Vektors pGal4-5BS-CAT an, das für die Restriktionsschnittstellen Sma I, Kpn I und Sac I kodiert. Insgesamt besitzt das für die eigenen Klonierungen verwendete binäre System eine Basenpaarlänge von 1978 (Abb. 19). Es konnte keine Abweichung in der Basenpaarabfolge im Vergleich zu den publizierten Sequenzen der einzelnen Bestandteile festgestellt werden.

1	ATCGATGGGC	CCGCGGCCGC	TCTAGAAGTA	CTCTCGAGAA	GCTTGAAGCA	
51	AGCCTCCTGA	AAGATGAAGC	TACTGGCTTC	TATCGAACAA	GCATGCGATA	
101	TTTGCCGACT	TAAAAAGCTC	AAGTGCTCCA	AAGAAAAACC	GAAGTGCGCC	
151	AAGTGTCTGA	AGAACAACTG	GGAGTGTCGC	TACTCTCCCA	AAACCAAAAG	
201	GTCTCCGCTG	ACTAGGGCAC	ATCTGACAGA	AGTGGAATCA	AGGCTAGAAA	
251	GACTGGAACA	GCTATTTCTA	CTGATTTTTC	CTCGAGAAGA	CCTTGACATG	Gal4
301	ATTTTGAAAA	TGGATTCTTT	ACAGGATATA	AAAGCATTGT	TAACAGGATT	
351	ATTTGTACAA	GATAATGTGA	ATAAAGATGC	CGTCACAGAT	AGATTGGCTT	
401	CAGTGGAGAC	TGATATGCCT	CTAACATTGA	GACAGCATAG	AATAAGTGCG	
451	ACATCATCAT	CGGAAGAGAG	TAGTAACAAA	GGTCAAAGAC	AGTTGACTGT	
501	ATCGCCGGAA	TTCCCGGGGA	TCTGGGCCCC	CCCGACCGAT	GTCAGCCTGG	
551	GGGACGAGCT	CCACTTAGAC	GGCGAGGACG	TGGCGATGGC	GCATGCCGAC	
601	GCGCTAGACG	ATTTCGATCT	GGACATGTTG	GGGGACGGGG	ATTCCCCGGG	
651	TCCGGGATTT	ACCCCCACG	ACTCCGCCCC	CTACGGCGCT	CTGGATATGG	
701	CCGACTTCGA	GTTTGAGCAG	ATGTTTACCG	ATGCCCTTGG	AATTGACGAG	
751	TACGGTGGGT	AGGGGGCGCG	ACCGGACCCG	CATCCCCCGT	CTGGGTTTTC	
801	CCCTCCCGTC	CCCGGTTCGT	ATCCACAATA	AACACGAGCA	CATACATTAC	
851	AAAAACCTGC	GGTTGTCGTC	TGATTATTTG	GTGGATCCGG	GGGAGATGGG	VP-16
901	GGAGGCTAAC	TGAAACACGG	AAGGAGACAA	TACCGGAAGG	AACCCGCGCT	
951	ATGACGGCAA	TAAAAAGACA	GAATAAAACG	CACGGGTGTT	GGGTCGTTTG	
1001	TTCATAAACG	CGGGGTTCGG	TCCCAGGGCT	GGCACTCTGT	CGATACCCCA	
1051	CCGAGACCCC	ATTGGGGCCA	ATACGCCCGC	GTTTCTTCCT	TTTCCCCACC	
1101	CCACCCCCA	AGTTCGGGTG	AAGGCCCAGG	GCTCGCAGCC	AACGTCGGGG	
1151	CGGCAGGCCC	TGCCATAGCC	ACTGGCCCCG	TGGGTTAGGG	ACGGGGTCCC	
1201	CCATGGGGAA	TGGTTTATGG	TTCGTGGGGG	TTATTATTTT	GGGCGTTGCG	
1251	TGGGGTCAGG	TCCACGACCC	AAGCTTGCAT	GCCCAGGTAA	GTGTACCCAA	
1301	TTCGCCCTAT	AGTGAGTCGT	ATTACAATTC	ACTGGCCGTC	GTTTTACAAC	LacZ-
1351	GTCGTGACTG	GGAAAACCCT	GGCGTTACCC	AACTTAATCG	CCTTGCAGCA	Fragm.
1401	CATCCCCCTT	TCGCCAGCTG	GCGTAATAGC	GAAGAGGCCC	GCACCGATCG	
1451	CCCTTCCCAA	CAGTTGCGCA	GCCTGAATGG	CGAATGGAGA	TCCAATTTTT	
1501	AAGTGTATAA	TGTGTTAAAC	TACTGATTCT	AATTGTTTGT	GTATTTTAGA	
1551	TTCACAGTCC	CAAGGCTCAT	TTCAGGCCCC	TCAGTCCTCA	CAGTCTGTTC	
1601	ATGATCATAA	TCAGCCATAC	CACATTTGTA	GAGGTTTTAC	TTGCTTTAAA	SV-
1651	AAACCTCCCA	CACCTCCCCC	TGAACCTGAA	ACATAAAATG	AATGCAATTG	polyA
1701	TTGTTGTTAA	CTTGTTTATT	GCAGCTTATA	ATGGTTACAA	ATAAAGCAAT	
1751	AGCATCACAA	ATTTCACAAA	TAAAGCATTT	TTTTCACTGC	ATTCTAGTTG	
1801	TGGTTTGTCC	AAACTCATCA	ATGTATCTTA	ACGCGGGGTCG	GAGTACTGTC	5BS
1851	CTCCGAGCGG	AGTACTGTCC	TCCGAGCGGA	GTACTGTCCT	CCGAGCGGAG	
1901	TACTGTCCTC	CGAGCGGAGT	ACTGTCCTCC	GAGCGGAGAC	TCTAGAGGG <b>T</b>	TATA-
1951	ATATAATGGA	TCCCCGGGTA	C CGAGCTC			Box

#### Abb. 19: Sequenz des binären Systems (Sense-Orientierung)

Zunächst ist die Sequenz des Fusionsproteins Gal4-VP16, bestehend aus 463 Basenpaaren für Gal4 und 752 Basenpaaren für VP16 zu sehen. Nach einem kurzen Abschnitt aus dem LacZ Gen (218 Basenpaare) folgt eine, für das SV40 polyA kodierende, Basenabfolge (330 Basenpaare). Es schließen sich fünf Gal4 Bindungsstellen mit jeweils 17 Basenpaaren sowie eine acht basenpaarlange TATA-Box an. Teiweise sind diese funktionellen Sequenzen durch Restriktionsschnittstellen voneinander getrennt.

## 4.4 Konstruktion adenoviraler Vektoren

#### 4.4.1 Konstruktion des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-mscIL-12

Durch Calcium-Phosphat-Kopräzipitation der beiden Plasmide pAd.DF3/MUC1mscIL-12 und pBHG-10 in 293-Zellen wurde der adenovirale Vektor Ad. DF3/MUC1-mscIL-12 generiert. Es entstanden auf 19 94 mm Petrischalen, die mit Agarose überschichtet waren insgesamt drei Virusplaques. Diese wurden isoliert und zeigten alle einen zytopathischen Effekt im CPE-Assay. Mit einem Aliquot des Überstandes wurde ein muriner p70 Interleukin-12 ELISA durchgeführt (Daten nicht abgebildet). Alle Überstände wiesen deutliche Konzentrationen von Interleukin-12 auf. Der CPE-Assay Überstand mit der größten Konzentration wurde für die Virusvermehrung benutzt.

Das durch einen dreimaligen Einfrier-Auftau-Zyklus aufgebrochene Zellpellet von insgesamt 50 144 mm Petrischalen wurde zur Aufreinigung einer zweimaligen CsCI Dichtezentrifugation unterzogen und die abgezogene Virusbande anschließend dialysiert.

Die Titerung des adenoviralen Vektors erfolgte im Plaque-Assay durch eine 293-Zellinfektion mit einer seriellen exponentiellen Virusverdünnung und Auszählung der nach 14 Tagen entstandenen Plaques. Der erhaltene Titer betrug 2,6\*10<sup>9</sup> pfu/ml bei einem Gesamtvolumen der Viruspräparation von 5,6 ml. Das entspricht 1,46\*10<sup>10</sup> infektiösen Partikeln.

#### 4.4.1.1 Funktionale Charakterisierung des Virus (Interleukin-12 ELISA)

Der konstruierte Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL12 wurde in der muzin-negativen murinen Hepatoblastomzelllinie Hepa1-6 sowie in der muzin-positiven murinen Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 auf seine single-chain Interleukin-12 Expression hin untersucht und mit dem im Labor konstruierten Vektor Ad.CMV-p40IRESp35 (Ad.CMV-IL-12) verglichen. Es wurden Viruskonzentrationen von 1, 10 und 100 m.o.i. verwendet und jeweils 1\*10<sup>6</sup> Zellen pro Feld einer 6-Well-Platte infiziert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und mit einem murinen p70 ELISA die Interleukin-12 Konzentration bestimmt.

Ab einer m.o.i. von 10 ist in den Hepa1-6-Zellen eine signifikante Überlegenheit (p < 0,02) von Ad.CMV-p40IRESp35 gegenüber dem Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 zu sehen (Abb. 20) und bei 100 m.o.i. zeigt hier der konstitutive CMV Promotor mit 1.098.986 pg/ml eine 10,5fach stärkere Genexpression als der muzinabhängige DF3/MUC1 Promotor (105.135 pg/ml). In der murinen Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 lässt sich bei keiner Vektorkonzentration ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Promotoren in der Genexpression erkennen (p > 0,2).

Der Quotient aus der Genexpression in den beiden Zelllinien, bezogen auf einen Promotor, ergibt eine 48- bis 166fach stärkere Expression für den CMV in Hepa1-6-Zellen als in MCA-26-Zellen bei einer m.o.i. von 10 bzw. 100. Betrachtet man den DF3/MUC1 Promotor, so zeigt sich eine stärkere mscIL-12 Expression in Hepa1-6-Zellen, die je nach m.o.i. zwischen 18- und 48fach schwankt.



#### Abb. 20: Vergleich der nicht-amplifizierten spezifischen Genexpression mit der CMVvermittelten auf adenoviraler Vektorenebene

Die Genexpression wurde durch Infektion der muzin-negativen Zelllinie Hepa1-6 und der muzinpositiven Zelllinie MCA-26 mit den adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 bzw. Ad.CMVp40IRESp35 quantifiziert. Die Interleukin-12 Expression wurde mit einem p70 ELISA im Zellkulturüberstand bestimmt.

## 4.4.2 Konstruktionsversuch der adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1binSyst.-mscIL-12 und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Insgesamt führten neun Calcium-Phosphat-Kopräzipitationen zur Konstruktion des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-binSyst.mscIL-12 und jeweils acht Versuche zur Herstellung des Vektors Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 zu keiner positiven Plaque. Auch ein alternatives Herstellungsverfahren nach Zhang *et al.* (1993) brachte bei wiederholter Durchführung keinen Erfolg.

# 4.5 Charakterisierung der tumorspezifischen adenoviralen Vektoren in der Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mittels Luciferase

### 4.5.1 Viraler Luciferaseexpressionstest in verschiedenen Zelllinien

Im Hinblick auf eine Verwendung in einem murinen Tumormodell wurde die muzinpositive, murine Kolonkarzinomzelllinie MCA-26, nach Infektion mit den Vektoren Ad.CMV-Luc, Ad.DF3/MUC1-Luc und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc, auf ihre Luciferaseexpression hin untersucht. Als Vergleichszelllinie wurden HepG-2 (humanes Hepatoblastom, muzin-negativ) sowie SK-CO-1 (humanes Kolonkarzinom, stark muzin-positiv) verwendet. Jeweils 1\*10<sup>6</sup> Zellen wurden mit verschiedenen Viruskonzentrationen infiziert (1, 10 und 100 m.o.i.) und nach 24 Stunden lysiert. In diesem Lysat wurde die Luciferasekonzentration bezogen auf die Gesamtzellproteine bestimmt.

Das binäre System zeigt in der muzin-negativen humanen Hepatoblastomzellline bei den niedrigen Viruskonzentrationen den größten Amplifikationsfaktor von allen getesteten Zelllinien (Abb. 21). Dieser Faktor schwankt zwischen 99 und 247. In den beiden muzin-positiven Zelllinien hingegen weist diese Amplifikation, im Gegensatz zu den HepG-2-Zellen, eine Abhängigkeit von der Viruskonzentration auf. Mit steigender intrazellulärer Vektormenge nimmt die muzin-abhängige Amplifikation zu und unterscheidet sich bei 100 m.o.i. für die humane Kolonkarzinomzelllinie nicht mehr signifikant (p > 0,1) von der muzin-negativen Zelllinie. Die murine Kolonkarzinomzelle bleibt jedoch in der m.o.i.-abhängigen Zunahme der Amplifikation gegenüber den SK-CO-1-Zellen zurück und ist bei Viruskonzentrationen von 10 und 100 m.o.i. gegenüber beiden humanen Zelllinien signifikant schwächer (p < 0,05). Der Maximalwert liegt hier mit dem 39fachen bei der höchsten Viruskonzentration.

Bei einem Vergleich des Quotienten aus der amplifizierten, spezifischen Genexpression und der CMV-vermittelten (Abb. 22) ergibt sich eine deutliche Überlegenheit für das spezifische Konstrukt in den stark muzin-positiven SK-CO-1-Zellen. Der Faktor, um den die Luciferaseexpression stärker ist, reicht von 111 bis 276 und erstreckt sich über alle Viruskonzentrationen. Für die murinen MCA-26-Zellen ist bei den beiden niedrigen Vektorkonzentrationen noch kein Vorteil gegenüber dem konstitutiven Ansatz zu verzeichnen. Erst bei 100 m.o.i. ist auch hier mit dem Faktor 2,1 eine signifikante Überlegenheit erkennbar (p < 0,04).

In der Hepatoblastomzelllinie zeigt die amplifizierte Expression bei 1 m.o.i. eine ca. siebenfache Überlegenheit (p < 0,02) im Vergleich zum CMV Promotor. Bei den höheren Konzentrationen ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr (p > 0,4).

Für den alleinigen DF3/MUC1 Promotor zeigt sich nur in den SK-CO-1-Zellen für die beiden niedrigeren Vektorkonzentrationen eine 8 bis 45fache Überlegenheit gegenüber der CMV-vermittelten Genexpression (p < 0,002). Für die MCA-26-Zellen erkennt man hier eine bis zu 10fach stärkere Genexpression durch den CMV Promotor. Dieser Wert steigert sich in HepG-2-Zellen bis auf den Faktor 228. In dieser muzin-negativen Zelllinie ist dieser Quotient bei allen Viruskonzentrationen signifikant kleiner als in den MCA-26-Zellen (p < 0,002) (Abb. 23).

Vergleicht man die beiden Zelllinien SK-CO-1 und MCA-26 in Bezug auf die promotorvermittelte Genexpression, so zeigt sich eine ca. 2000fach stärkere Genexpression bei höheren Viruskonzentrationen unter Verwendung des amplifizierten DF3/MUC1 Promotors in der humanen Zelllinie. Der CMV Promotor ist in dieser Zelllinie maximal 28fach stärker als in den murinen Zellen. Die Genexpression in HepG-2-Zellen zeigt gegenüber den MCA-26-Zellen für den amplifizierten Muzinpromotor bei den hohen Viruskonzentrationen eine 3169- bis 11922fach stärkere Luciferaseexpression in der humanen Zelllinie. Hier ist, mit einem Faktor von ca 8000 bis 8500, auch der CMV Promotor stärker.





noviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-Luc bzw. Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc bei unterschiedlichen viralen Dosen durchgeführt. Als Referenz fungierten die humanen Zelllinien HepG-2 (muzinnegativ) und SK-CO-1 (muzin-positiv). Die Luciferasekonzentration wurde nach 24 Stunden im Zelllysat bestimmt und auf die Gesamt-Zellproteinmenge bezogen.





Die Genexpression wurde durch Infektion der murinen Kolonkarzinomzelle MCA-26 mit den adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc bzw. Ad.CMV-Luc bei unterschiedlichen viralen Dosen durchgeführt. Als Referenz fungierten die humanen Zelllinien HepG-2 (muzin-negativ) und SK-CO-1 (muzin-positiv). Die Luciferasekonzentration wurde nach 24 Stunden im Zelllysat bestimmt und auf die Gesamt-Zellproteinmenge bezogen.





Die Genexpression wurde durch Infektion der murinen Kolonkarzinomzelle MCA-26 mit den adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-Luc bzw. Ad.CMV-Luc bei unterschiedlichen viralen Dosen durchgeführt. Als Referenz fungierten die humanen Zelllinien HepG-2 (muzin-negativ) und SK-CO-1 (muzin-positiv). Die Luciferasekonzentration wurde nach 24 Stunden im Zelllysat bestimmt und auf die Gesamt-Zellproteinmenge bezogen.

#### 4.5.2 Promotorkinetik durch Luciferaseexpressionstests

Für die Planung der Tierversuche wurde die Genexpression des amplifizierten DF3/MUC1 Promotors in ihrem zeitlichen Verlauf mit dem CMV Promotor verglichen. Als Referenz wurde zusätzlich der alleinige Muzinpromotor verwendet. Es wurden jeweils 1\*10<sup>6</sup> murine muzinnegative Hepa1-6-Zellen bzw. murine muzinpositive MCA-26-Zellen mit einer Konzentration von 100 m.o.i. der im Labor hergestellten Luciferasevektoren Ad.CMV-Luc, Ad.DF3/MUC1-Luc und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc infiziert. Am 1., 2., 4. und 7. Tag wurden die Zellen lysiert und die Luciferasekonzentration, bezogen auf die Gesamtzellproteine, bestimmt.

In den MCA-26-Zellen nimmt die Luciferasemenge pro Zellprotein im Verlauf von einer Woche um mehr als zwei Dekaden zu (124fach). Für den CMV Promotor ist nur ein 36facher Zuwachs zu verzeichnen. Der nicht amplifizierte DF3/MUC1 Promotor stagniert nach dem zweiten Tag in seiner vermittelten Expression und bleibt im gesamten Verlauf schwächer als die beiden anderen Konstrukte.

Für die murine Hepatoblastomzelllinie Hepa1-6 ist ein anderer Verlauf der Genexpression über die Zeit zu erkennen. Alle drei Vektoren zeigen eine maximal vermittelte Genexpression am zweiten Tag und anschließend einen kontinuierlichen Abfall. Die Schwankungen der Luciferaseexpression erstrecken sich bei allen Vektoren über 1 bis 1,5 Dekaden.

Bei der Betrachtung der amplifizierenden Wirkung des Gal4-Vp16 Fusionsproteins im zeitlichen Verlauf (Abb. 24) erkennt man in beiden Zelllinien eine kontinuierliche Zunahme über die Beobachtungszeit. In den muzin-positiven MCA-26-Zellen wächst dieser Amplifikationsfaktor von 25 auf 1134 am 7. Tag an. Für die murine Hepatoblastomzelllinie steigt der Quotient aus DF3/MUC1-binSyst. und DF3/MUC1 nur von 124 auf 569. Ab dem 4. Tag ist dieser Verstärkungseffekt in der Kolonkarzinomzellinie signifikant höher (p < 0,004).

Ein Vergleich der amplifizierten Genexpression mit der CMV-vermittelten (Abb. 25) zeigt nach 24 Stunden nur eine knappe Überlegenheit in der Kolonkarzinomzelle gegenüber der hepatischen Tumorzelle (p < 0,02). Am zweiten Tag steigt der Quotient in den MCA-26-Zellen auf ca. 15 an und bleibt für die nächsten beiden Messzeitpunkte auf diesem Niveau. In der muzin-negativen Zelllinie schwankt diese Überlegenheit der amplifizierten Expression geringfügig um den Faktor vier und bleibt damit im gesamten Verlauf signifikant unter den Werten für die muzin-positive Zelle (p < 0,02 bis p < 0,002).

Der nicht-amplifizierte DF3/MUC1 Promotor zeigt im Vergleich zu dem konstitutiven Promotor (Abb. 26) eine ca. 100fach schwächere Genexpression über die gesamte Woche in den Hepa1-6-Zellen. In der Kolonkarzinomzelllinie ist die CMVvermittelte Expression zunächst nur ca. 10fach stärker. Diese Überlegenheit steigert sich jedoch ebenfalls auf ca. 100fach am 7. Tag.

Vergleicht man auch hier die beiden untersuchten Zelllinien in Bezug auf die promotorvermittelte Luciferaseexpression, so zeigt sich in Hepa1-6-Zellen an den ersten beiden Tagen eine 55- bis 65fach höhere Luciferasemenge unter Verwendung des CMV Promotors. Der amplifizierte Muzinpromotor zeigt hier nur eine 11- bis 34fach, der alleinige DF3/MUC1 Promotor nur eine 7- bis 17fach stärkere Expression. Nach dem zweiten Tag sinkt dieser Zelllinienquotient bei allen drei Promotorkonstrukten kontinuierlich ab und am 7. Tag ist die Genexpression in der Kolonkarzinomzelllinie stärker als in der Hepatoblastomzelllinie.



**Abb. 24: Amplifikation der Genexpression durch das binäre System über die Zeit** Die Genexpression wurde durch Infektion der muzin-negativen Zelllinie Hepa1-6 und der muzinpositiven Zelllinie MCA-26 mit den adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc bzw. Ad.DF3/MUC1-Luc quantifiziert. Die Luciferasekonzentration im Zelllysat wurde 1, 2, 4 und 7 Tage nach Infektion bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge bezogen.



# Abb. 25: Vergleich der amplifizierten, spezifischen Genexpression mit der CMV-vermittelten Genexpression über die Zeit

Die Genexpression wurde durch Infektion der muzin-negativen Zelllinie Hepa1-6 und der muzinpositiven Zelllinie MCA-26 mit den adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc bzw. Ad.CMV-Luc quantifiziert. Die Luciferasekonzentration im Zelllysat wurde 1, 2, 4 und 7 Tage nach Infektion bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge bezogen.



#### Abb. 26: Vergleich der nicht-amplifizierten, spezifischen Genexpression mit der CMVvermittelten über die Zeit

Die Genexpression wurde durch Infektion der muzin-negativen Zelllinie Hepa1-6 und der muzinpositiven Zelllinie MCA-26 mit den adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-Luc bzw. Ad.CMV-Luc quantifiziert. Die Luciferasekonzentration im Zelllysat wurde 1, 2, 4 und 7 Tage nach Infektion bestimmt und auf die Gesamtproteinmenge bezogen.

## 4.6 Adenovirale Experimente in vivo

#### 4.6.1 Präparation der adenoviralen Vektoren für die Experimente

in vivo

## 4.6.1.1 Vermehrung und Aufreinigung des adenoviralen Vektors Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc

Da der Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 in mehreren Versuchen nicht herzustellen war, wurde der im Labor konstruierte adenovirale Vektor Ad.DF3/MUC1binSyst.-Luc für die Untersuchung der tumorspezifischen Expression *in vivo* verwendet. Dieser wurde wie unter 3.5.2.2 beschrieben auf 50 144 mm Petrischalen vermehrt, aufgereinigt und durch einen Plaque-Assay getitert. Der erhaltene Titer betrug 1\*10<sup>10</sup> pfu/ml bei einem Gesamtvolumen der Viruspräparation von 5,4 ml. Das entspricht 5,4 \*10<sup>10</sup> infektiösen Partikeln.

## 4.6.1.2 Funktionelle Prüfung, Vermehrung und Aufreinigung des adenoviralen Vektors Ad.CMV-GFP

Zur funktionellen Prüfung wurden HepG-2-Zellen (humane Hepatoblastomzelllinie) mit einem Teil der erhaltenen Viruslösung infiziert und 48 Stunden später mit Hilfe von Dr. med. P. Nollau aus dem Institut für Klinische Chemie des UKE fluoreszenzmikroskopiert und photographiert (Abb. 27).



Abb. 27: GFP Expression in HepG-2-Zellen nach Infektion mit Ad.CMV-GFP

Der virale Vektor wurde, wie unter 3.5.2.2 und 3.5.2.3 beschrieben, auf 50 144 mm Petrischalen vermehrt, aufgereinigt und durch einen Plaque-Assay getitert. Der erhaltene Titer betrug: 1\*10<sup>10</sup> pfu/ml bei einem Gesamtvolumen der Viruspräparation von 5,1 ml. Das entspricht 5,1\*10<sup>10</sup> infektiösen Partikeln.

# 4.6.2 Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Fixierung der murinen Gewebe für die Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden MCA-26-Zellen mit dem adenoviralen Vektor Ad.CMV-GFP bzw. Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc infiziert und der Zellmonolayer auf verschiedene Weise für die weitere Bearbeitung fixiert. Bei den Zellen, die mit Ad.CMV-GFP infiziert wurden, erfolgte eine direkte fluoreszenzmikroskopische Darstellung des *Green Fluorescent Proteins*. Die, durch den Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc vermittelte, Luciferaseexpression wurde im Institut für Pathologie des UKE durch immunhistologische Färbung mit einem primären Anti-Luciferase-Antikörper und einem *Texas Red*<sup>TM</sup> markierten Zweitantikörper detektiert und anschließend fluoreszenzmikroskopiert.

	Stärke der Fluoreszenz bei:			
Fixierungsart	Ad.CMV-GFP	Ad.DF3/MUC1- binSystLuc		
Formalin (10 Minuten)	-	-		
Formalin (6 Stunden)	-	-		
Alkohol (10 Minuten	++	++		
Alkohol (6 Stunden)	+	+		
Azeton (10 Minuten)	+++	+++		
Azeton (6 Stunden)	++	++		
Luft	+++	+++		

Tabelle 6: Stärke der Fluoreszenz bei unterschiedlichen Fixierungen (experimentelle Beobachtung)

+++ : stark, ++ : mittel, + : schwach, - : gar nicht

Es konnte gezeigt werden, dass eine Fixierung auf Azetonbasis die besten Ergebnisse für die Fluoreszenzmikroskopie darstellt (Tabelle 8). Zur Ermittlung eines geeigneten Verfahrens zur späteren Leberfixation wurden MCA-26-Zellen mit dem GFP-Vektor bzw. dem Luciferase-Vektor infiziert und 48 Stunden später als Zellpellet in der auf Azetonbasis aufgebauten HOPE I Lösung fixiert. Die weitere Fixierung, die Paraffineinbettung sowie die Immunhistologie wurde im Institut für Pathologie des UKE durchgeführt und die Fluoreszenz an den Paraffinschnitten photodokumentiert (Abb. 28).



Abb. 28: Adenoviral infizierte MCA-26 Kolonkarzinomzellen

Links: HE-Kontrollfärbung, Mitte: nach Infektion mit GFP exprimierenden Adenoviren unter CMV-Kontrolle (Ad.CMV-GFP), Rechts: nach Infektion mit Luciferase exprimierenden Adenoviren unter DF3/MUC1-binSyst.-Kontrolle (Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc) und Detektion durch einen *Texas-Red*<sup>TM</sup> markierten Zweitantikörper.

## 4.6.3 Tumorspezifische, adenovirale Genexpression im murinen Tiermodell

Bei zwanzig 12-15 Wochen alten, weiblichen Inzuchtmäusen des Stammes Balb/c wurde durch intrasplenische Tumorzellinjektion ein Multimetastasenmodell in der Leber erzeugt und die Tiere anschließend splenektomiert. Am vierten Tag nach Tumorzellgabe erfolgte die Applikation von 100 µl eines äquimolaren Gemisches der Vektoren Ad.CMV-GFP und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc über die Schwanzvene. Jedes Tier erhielt eine Vektormenge von 5\*10<sup>8</sup> pfu pro Adenovirus.

Jeweils sechs Tiere wurden am 2. Tag, am 4. Tag sowie am 7. Tag nach Virusinjektion terminiert und jede Leber zur Hälfte in Formalin sowie in der HOPE I Lösung fixiert. Die weitere Fixierung und Paraffineinbettung wurde im Institut für Pathologie des UKE durchgeführt. Hier erfolgte auch die immunhistologische Detektierung der Luciferase sowie die fluoreszenzmikroskopische Darstellung.

Nach der intrasplenischen Tumorzellapplikation mit anschließender Splenektomie sind alle zwanzig Versuchstiere aus der intraperitonealen Narkose aufgewacht. Am nächsten Tag verstarb eine Maus und ein weiteres Tier überlebte die Schwanzveneninjektion in der Zwangsröhre am vierten Tag *post operationem* nicht.

In den HE-gefärbten Leberschnitten waren bei allen 18 Versuchstieren mikroskopische Lebermetastasen zu erkennen, wobei keine bevorzugte Lokalisation in Bezug auf die Läppchenstruktur der Leber eruierbar war. Es ist eine deutliche Zunahme der durchschnittlichen Metastasengröße über den Verlauf der sieben Tage zu erkennen (Abb. g bis i). Bei den Mäusen, die 4 bzw. 7 Tage nach Vektorapplikation terminiert wurden, waren auch makroskopische Tumore bei der Leberpräparation zu erkennen. Die zuletzt getöteten Tiere wiesen zudem stark vergrößerte, indurierte Lebern auf, die massiv mit Tumoren durchsetzt waren (Abb. i). Es zeigte sich weiterhin eine makroskopische Prädilektionsstelle der Metastasen um den Leberhilus herum. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der, durch den unspezifischen Vektor Ad.CMV.GFP vermittelten, *Green Fluorescent Protein* Expression zeigte sich eine panlobuläre Expressionsverteilung über die gesamte Leber mit Aussparung der Kolonkarzinommetastasen (Abb. a, c und e). Nur sehr vereinzelnt wurden intratumoral Fluoreszenzsignale gefunden. Innerhalb der Läppchenstruktur konnte keine Lokalisationspräferenz der GFP Expression festgestellt werden. Die Transgenexpression wies zudem keinen wesentlichen Unterschied zwischen den drei Beobachtungsgruppen auf. Jeweils ein Tier der Gruppe A (Terminierung 2 Tage p. i.) und eines der Gruppe B (Terminierung 4 Tage p. i.) zeigten für GFP sowie für *Texas Red<sup>TM</sup>* nur marginale Fluoreszenzsignale. Bei beiden Tieren gab es Probleme bei der Schwanzveneninjektion, bei der ein Teil des Gemisches paravasal appliziert wurde.

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Luciferaseexpression unter der Kontrolle des amplifizierten DF3/MUC1 Promotors zeigte in der Gruppe A (Terminierung 2 Tage p. i.) nur eine sehr vereinzelte *Texas Red*<sup>™</sup> Expression in den Hepatozyten. Bei keinem der Tiere war eine abgrenzbare, intratumorale Transgenexpression detektierbar (Abb. a und b). In den Gruppen B und C war hingegen eine immunhistologische Detektion der Luciferase in den Metastasen möglich. Hierbei wiesen kleine Metastasen deutlich bessere Fluoreszenzsignale auf als Tumore einer mittleren Größe, die nur am Rand und in der peritumoralen Zone eine nachweisbare Luciferaseexpression zeigten (Abb. d). In großen Metastasen, die vorwiegend in der dritten Gruppe gefunden wurden, war bei keinem der Versuchstiere eine nennenswerte Transgenexpression feststellbar. In der dritten Gruppe wiesen jedoch kleine Metastasen ebenfalls eine kräftige Luciferaseexpression auf (Abb. f). Die Fluoreszenzsignale in den Hepatozyten blieben bei den drei Gruppen vergleichbar und wiesen eine deutlich geringere Ausprägung im Vergleich zur CMV-vermittelten GFP Expression auf (Abb. a bis f).





#### Abb. 29 a – i: Intrahepatische und intratumorale Transgendetektion durch Immunfluoreszenz

Vier Tage nach intrasplenischer Tumorzellapplikation wurde über die Schwanzvene von Balb/c Mäusen ein äquimolares Gemisch der beiden adenoviralen Vektoren Ad.CMV-GFP und Ad-DF3/MUC1-binSyst.-Luc injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere terminiert und die tumorinfiltrierten Lebern durch Immunfluoreszenzmikroskopie auf die Transgenexpression hin untersucht. Bei dem Luciferase-Vektor erfolgte zuvor eine immunhistologische Luciferasedetektion mit einem *Texas Red<sup>TM</sup>*-markierten Zweitantikörper. Zusätzlich wurde das Metastasenwachstum durch eine HE-Färbung im Zeitverlauf dokumentiert.

**Bild a und b** zeigen repräsentative Leberschnitte aus der Gruppe A (Terminierung 2 Tage p. i.) (100fache Vergrößerung). **Bild c und d** zeigen die Gruppe B (Terminierung 4 Tage p. i.) (100fache Vergrößerung). **Bild e und f** repräsentieren die Gruppe C (Terminierung 7 Tage p. i.) (100fache Vergrößerung). Die HE-Färbungen g (2 Tage p. i.) (100fach), **h** (4 Tage p. i.) (50fach) und **i** (7 Tage p. i.) (25fach) sollen die vorherrschende Metastasengröße zu den drei verschiedenen Zeitpunkten dokumentieren.

## **5** Diskussion

Der nachfolgende Diskussionsteil ist inhaltlich in drei Abschnitte gegliedert. Der erste befasst sich mit der Konstruktion und Charakterisierung von therapeutischen, tumorspezifischen Vektoren, die das murine Interleukin-12 Fusionsprotein kodieren. Dieser Teil reicht von der Charakterisierung des konstruierten adenoviralen Expressionsplasmids über die Untersuchung des hergestellten nichtamplifizierten, tumorspezifischen Vektors bis zur Diskussion der fehlgeschlagenen Kontruktionsversuche des Vektors zur amplifizierten Genexpression.

Im zweiten Abschnitt werden die Versuche zur näheren Charakterisierung des amplifizierten, tumorspezifischen Vektors mittels des Markergens Luciferase in der murinen Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 sowie die qualitative Untersuchung der Tumorspezifität in einem murinen, hepatischen Multimetastasenmodell diskutiert.

Der letzte Teil befasst sich mit einem Ausblick über die systemische adenovirale Gentherapie von hepatisch metastasierten Tumorerkrankungen sowie mögliche Verbesserungen des adenoviralen Vektors.

# 5.1 Konstruktion von tumorspezischen, adenoviralen Vektoren zur antitumoralen Therapie mit dem Interleukin-12 Fusionsprotein

# 5.1.1 Single-chain Interleukin-12 Expressionsvergleich nach Transfektion von adenoviralen Expressionsplasmiden in verschiedene eukaryotische Zelllinien

Das klonierte, adenovirale Expressionsplasmid pAd.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12 wurde durch Calciumphosphat-Transfektion in verschiedenen muzin-positiven und muzin-negativen Zelllinien charakterisiert. Ein Vergleich erfolgte mit den Plasmiden pAd.DF3/MUC1-mscIL-12 sowie pAd.CMV-mscIL-12.

Der Amplifikationsfaktor des binären Systems ist in den murinen Kolonkarzinomzellen MCA-26 sowie in der Affen-Nierenzelllinie COS-7 mit 154fach bzw. 254fach nach 48 Stunden am höchsten. Nur die beiden muzin-positiven Zelllinien MCA-26 und SW-620 zeigen eine Überlegenheit des amplifizierten, tumorspezifischen Konstrukts gegenüber dem CMV Promotor, der im Vergleich mit dem alleinigen DF3/MUC1 Promotor in allen Zellen eine stärkere Expression des Interleukin-12 Fusionsproteins vermittelt.

Ein generelles Problem bei dieser Versuchsanordnung ist die unterschiedliche Fähigkeit der einzelnen Zelllinien, calciumphosphat-vermittelt Plasmid-DNS aufzunehmen. So zeigten Kontrollexperimente mit dem Plasmid pRC.CMV-ß-Gal, dass 293- und COS-7-Zellen sehr gut, Hepa1-6- und MCA-26- moderat und SW-620-Zellen schlecht zu transfizieren sind (Daten nicht abgebildet).

Diese gute Transfizierbarkeit der 293- und COS-7-Zellen erklärt den hohen Amplifikationsfaktor. Bei diesen Zelllinien handelt es sich jedoch nicht um Tumorzellen, so dass eine unspezifische Aktivierung des DF3/MUC1 Promotors durch vermehrte ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, wie nachfolgend bei den Experimenten mit den Luciferase-Vektoren diskutiert, wenig wahrscheinlich ist. Der Anstieg der Amplifikation nach 24 Stunden ist durch eine zeitlich verzögerte Transkriptionsaktivierung durch das Gal4-Fusionsprotein zu erklären (Rowitch et al., 1999). In den muzin-positiven Zelllinien scheint für die MCA-26-Zellen, neben der moderaten Transfektionseffizienz die Muzinexpression entscheidend für den hohen Verstärkungsfaktor durch Gal4-VP16 zu sein. In der humanen Zelle SW-620 zeigt sich trotz einer starken Muzinexpression (Block et al., 2002) die schwächste Amplifikation. Es ist anzunehmen, dass die sehr niedrige intrazelluläre Plasmidkonzentration zu Beginn des Versuchs den limitierenden Faktor darstellt. Zu untersuchen wäre, ob über einen längeren Beobachtungszeitraum durch eine Akkumulation des Fusionsproteins die Transgenexpression in der Zelllinie noch einen Anstieg verzeichnet.

Im Vergleich zu dem konstitutiven Promotor weist das amplifizierte Konstrukt eine gute Spezifität auf. So zeigt sich in allen muzin-negativen Zelllinien eine schwächere Genexpression als die CMV-vermittelte, sogar bei sehr guter Transfektion der Zelle. Die beiden muzin-positiven Zellen weisen hingegen eine moderate Überlegenheit des spezifischen Konstruktes auf.

Die Tatsache, dass der alleinige DF3/MUC1 Promotor, der in allen Zelllinien schwächer ist als der CMV Promotor, jedoch in SW-620 die stärkste Genexpression aufweist, kann durch die hohe Muzinexpression, bei schlechter Transfektionseffizienz für alle Plasmide, erklärt werden.

#### 5.1.2 Charakterisierung des Vektors Ad.DF3/MUC1-mscIL-12

Der konstruierte adenovirale Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 wurde in den murinen Zelllinien MCA-26 und Hepa1-6 auf seine tumorspezifische Genexpression hin charakterisiert. Als Referenzvektor fungierte Ad.CMV-p40IRESp35 (Ad.CMVmIL-12).

In der muzin-positiven Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 zeigte der tumorspezifische DF3/MUC1 Promotor bei allen Viruskonzentrationen keinen signifikanten Unterschied zu dem konstitutiv exprimierenden Promotor. Ab einer m.o.i. von 10 ist in der Hepatomzelllinie Hepa1-6 der CMV Promotor dem tumorspezifischen Konstrukt signifikant überlegen (p < 0,02) und zeigt bei der höchsten Viruskonzentration eine 10,5fach stärkere Genexpression.

Die Interpretation dieser Ergebnisse muss kritisch erfolgen, da bei diesem Versuch nicht nur zwei verschiedene Promotoren, sondern auch unterschiedliche Transgene verwendet wurden. Der konstitutive CMV Promotor reguliert die Expression der beiden IRES-verbundenen Untereinheiten des murinen Interleukin-12 Gens. Dem tumorspezifischen Promotor ist jedoch ein Fusionsprotein aus beiden Untereinheiten nachgeschaltet. Auch wenn man eine identische Immunoreaktivität in dem murinen, p70-spezifischen ELISA zu Grunde legt, ergeben sich Unterschiede in der Ausschleusungseffektivität der beiden Proteine.

# 5.1.2.1 Effektivere Ausschleusung des Interleukin-12 Fusionsproteins (scIL-12)

Die p35 Untereinheit unterliegt einer posttranslatorischen Modifikation, die aus einer Abtrennung eines *N*-terminalen Signalpeptids sowie einer *N*- Glykosylierung besteht, die für die Sezernierung als Heterodimer mit der p40 Untereinheit essentiell zu sein scheint (Carra *et al.,* 2000; Murphy *et al.,* 2000). Die p40 Einheit er-

fährt dagegen vor dem Ausschleusen keine weitere Modifikation (Carra *et al.,* 2000). Bei dem Interleukin-12 Fusionsprotein ist an der p35 Untereinheit eine *N*-terminale Deletion von 22 Aminosäuren durchgeführt worden, die wahrscheinlich das Sekretionssignal beinhaltet. Die p35 Untereinheit ist zusätzlich über eine Brücke von 10 bis 15 Aminosäuren mit der p40 Einheit verbunden (Lieschke *et al.,* 1997) und vollzieht damit ohne Glykosylierung deren Sekretionsweg. Das IRES-Konstrukt benötigt hingegen weiterhin die Modifizierung der p35 Untereinheit. Es ist denkbar, dass dieser Prozess in entdifferenzierten Tumorzellen schlechter vollzogen wird und damit die Sezernierung ineffektiver ist als bei dem Fusionsprotein.

Vor diesem Hintergrund ist die nicht signifikant unterschiedliche Expression des alleinigen DF3/MUC1 Promotors gegenüber dem CMV-Konstrukt für die muzinpositive Zelle kritisch zu betrachten. Wie bei den Luciferase-Vektoren zu sehen ist, ist nach 24 Stunden bei 100 m.o.i. der CMV Promotor ca. siebenfach dem DF3/ MUC1 Promotor überlegen. Dieser Effekt wurde durch das bessere Ausschleusen des Fusionsproteins kompensiert. Ein ähnlicher Faktor ergibt sich bei der Betrachtung der murinen Hepatoblastomzelllinie.

In Bezug auf die Bioaktivität ist die Tatsache zu erwähnen, dass im IRES-Konstrukt die p40- im ersten und die p35-Untereinheit im zweiten Cistron der bicistronischen mRNS platziert ist. Das Gen im zweiten Cistron wird jedoch bis zu dem Faktor 3 schwächer exprimiert (Dirks *et al.*, 1993). Dies kann die Bildung von p40-Homodimeren begünstigen, die einen inhibitorischen Effekt auf den Interleukin-12 Rezeptor ausüben (Mattner *et al.*, 1993; Gillessen *et al.*, 1995). Block *et al.* (2003) konnten in diesem Zusammenhang eine geringere Bioaktivität des Heterodimers im Vergleich zum Fusionsprotein nachweisen.

Insgesamt zeigt dieses Experiment die Tumorspezifität des DF3/MUC1 Promotors im Vergleich zu dem konstitutiven CMV Promotor sowie den Sekretionsvorteil, den das Interleukin-12 Fusionsprotein gegenüber dem Heterodimer bietet.

89

## 5.1.3 Konstruktionsversuch der adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1binSyst.-mscIL-12 und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2

Für die Untersuchung der Tumorspezifität in einem murinen Tiermodell galt es, den Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 herzustellen und im Vergleich mit dem Virus Ad.CMV-GFP durch fluoreszenzmikroskopische Gewebsuntersuchungen zu charakterisieren. Zusätzlich sollte für ein mögliches therapeutisches, murines Tiermodell neben dem hergestellten Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 die Gal4-VP16 amplifizierte Form dieses Adenovirus (Ad.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12) generiert und *in vitro* charakterisiert werden. Mehrere Kopräzipitationen für beide adenovirale Vektoren führten jedoch zu keiner positiven Plaque. Auch die wiederholte Anwendung eines modifizierten Verfahrens (Zhang *et al.*, 1993) brachte keinen Erfolg.

Bei der Herstellung von Adenoviren für die Gentherapie ist eine Aufnahme von zwei Plasmiden in eine Verpackungszelle bei den angewendeten Verfahren nötig. Die Transfektionseffizienz sinkt jedoch linear mit der Plasmidgröße (Hanahan, 1983) und so zeigt das Shuttle-Plasmid mit 10 kb eine bessere Transfektion als das ca. 34 kb schwere pBHG-10. Sind beide Plasmide nun in einer 293-Zelle, so muss eine homologe Rekombination stattfinden, die ein prinzipiell seltenes Ereignis darstellt. Hat dieses stattgefunden, müssen die Verpackungszellen ca. 14 Tage unter der Agarose überleben, damit sich bei erfolgreicher Virusgeneration die entstandene Plaque radiär ausbreiten kann und damit sichtbar wird.

Trotz dieser Unsicherheiten wurde beim ersten Versuch der Vektor Ad.DF3/ MUC1-mscIL-12 generiert. Bei den anderen beiden Viren führten jedoch insgesamt 11 bzw. 10 Versuche zu keinem positiven Resultat. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist die Tatsache, dass bei dem Vektor mit dem Interleukin-12 Fusionsprotein ein potentiell zytotoxisches Protein kodiert wurde. Es ist, trotz des tumorspezifischen Promotors, immer damit zu rechnen, dass bei einer hohen Transfektionseffizienz ein gewisses Maß an unspezifischer Genexpression resultiert. Dies ist, wie weiter unten diskutiert, im Zusammenhang mit adenoviralen Enhancer-Sequenzen zu beobachten und zeigte sich sowohl für die Luciferase-Vektoren als auch für die Interleukin-12-Expressionsplasmide, die ebenfalls diese Sequenzen enthalten. Der von F. Puls hergestellte, tetrazyklin-regulierbare Vektor Ad.3r-msclL-12 konnte zudem nach mehreren Fehlversuchen erst generiert werden, nachdem die virale Interleukin-12 Expression durch Zusatz von Doxyzyklin in die Agaroseüberschichtung deutlich reprimiert worden war (F. Puls, persönliche Mitteilung).

Grupta und Mitarbeiter (2003) konnten zudem eine minimale DF3-Muzinexpression in 293-Zellen nachweisen, die über eine Zeit von 14 Tagen durchaus aufgrund einer Akkumulation spezifischer Transkriptionsfaktoren ins Gewicht fallen könnte.

Eine Reihe von Forschern berichtete ebenfalls über Probleme bei der Konstruktion eines adenoviralen Vektors, der für ein zytotoxisches Genprodukt kodiert (Larregina *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 1999; Kakawa *et al.*, 2000; Endholm *et al.*, 2001). Bei der Herstellung von Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 dürfte ein solches Phänomen allerdings nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es sind keine Arbeiten bekannt, die einen zelltoxischen Effekt des *Red Fluorescent Protein 2* auf Säugetierzellen zeigen konnten.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der jedoch bei der Diskussion der beiden fehlgeschlagenen Versuche zur Virusgeneration zu berücksichtigen ist, ist der sogenannte "Squelching-Effekt" der VP16 Domäne des Fusionsproteins. Darunter wird das Abfangen von endogenen, zelleigenen Transkriptionsfaktoren verstanden (Sadowski *et al.*, 1988). Dieser Effekt könnte durch eine verminderte endogene Syntheseleistung der Zelle, in einem Zeitraum von zwei Wochen, zu einem Vitalitätsverlust der Verpackungszellen geführt haben. Hierdurch ist es möglich, dass eine Ausbreitung der Virusplaques verhindert worden ist.

Die beiden Aspekte "Squelching-Effekt" und die Verwendung eines zytotoxischen Gens bei dem IL-12-Vektor könnten dazu beigetragen haben, dass es nicht gelungen ist, die adenoviralen Vektoren Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2 und Ad.DF3/MUC1-binSyst.-mscIL-12 zu generieren.

# 5.2 Vektorcharakterisierung in MCA-26-Zellen mittels Luciferase und hepatisches Multimetastasenmodell

## 5.2.1 Charakterisierung der tumorspezifischen adenoviralen Vektoren in der Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mittels Luciferase

Im Hinblick auf das murine Multimetastasenmodell wurden die muzin-positive, murine Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 sowie weitere Karzinomzelllinien durch drei verschiedene virale Luciferase-Vektoren charakterisiert.

Der adenovirale Vektor Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Luc zeigte in MCA-26-Zellen durch das Gal4-VP16 Fusionsprotein eine ca. 40fache Amplifikation der Genexpression im Vergleich zu dem alleinigen DF3/MUC1 Promotor. In den humanen Referenzzelllinien reichte dieser Verstärkungseffekt vom 146fachen in SK-CO1 (muzin-positiv) bis zum 247fachen in der Hepatoblastomzelllinie (muzin-negativ). Der amplifizierte Promotor wies in den muzin-negativen Zellen, bei den höheren Viruskonzentrationen, keinen signifikanten Unterschied zu dem konstitutiven CMV-Promotor auf. In den murinen Zellen war eine 2,1fache Überlegenheit des tumorspezifischen Ansatzes bei 100 m.o.i. zu sehen und in SK-CO1-Zellen erhöhte sich dieser Faktor bis auf 276. Bei dem Vergleich der humanen Zelllinien mit der murinen zeigte sich eine 3 bis 4 Dekaden stärkere Genexpression in der humanen Zelllinie für den amplifizierten Promotor. Für den CMV Promotor war ein derartiger Effekt nur in der Hepatoblastomzelllinie zu erkennen.

In der Expressionskinetik stieg der Amplifikationsfaktor des Gal4-Fusionsproteins in der Kolonkarzinomzelllinie von anfangs 25 bis auf über 1100 in einen Zeitraum von 7 Tagen. In Hepa1-6-Zellen ist dagegen der maximal erreichte Faktor 569. Die Überlegenheit des amplifizierten Promotors gegenüber dem CMV Promotor beträgt in MCA-26-Zellen bis zum 15fachen im Vergleich zum 4,5fachen in Hepa1-6-Zellen. Insgesamt steigt die Genexpression durch das DF3/MUC1-binSyst.-Konstrukt im Verlauf von 7 Tagen über 2 Dekaden (124fach) an, wohingegen das CMV-Konstrukt nur einen Zuwachs um den Faktor 36 zeigt. In den Hepatoblastomzellen sinkt nach dem zweiten Tag für alle Promotorkonstrukte die Genexpression und ist am 7.Tag für sämtliche Vektoren schwächer als in MCA-26.

## 5.2.1.1 Abhängigkeit des Amplifikationsfaktors des Fusionsproteins von der Transduktionseffizienz

Der unterschiedliche Amplifikationsfaktor des Fusionsproteins, bezogen auf die verwendeten Zelllinien lässt sich gut mit einer postulierten unterschiedlichen Transduktionseffizienz erklären, die in den humanen Zelllinien, auch bezogen auf den Muzinpromotor, deutlich besser ist. Block *et al.* (2002) konnten für die humanen Zelllinien sehr ähnliche Werte für den Amplifikationsfaktor nachweisen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für ein solches Phänomen ist die Interaktion des humanen Adenovirus mit seinen Rezeptoren. Die hauptsächliche Transduktion erfolgt durch den Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor (Tomko *et al.*, 2000) sowie sekundär durch  $\alpha\nu\beta\beta/\alpha\nu\beta5$ -Integrine (Mathias *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass CHO-Zellen, die mit der cDNS des CA-Rezeptors transfiziert sind, die Fiberproteine des Adenovirus Serotyp 5 signifikant stärker binden können, wenn sie die humane Variante anstatt der murinen exprimieren (Bergelson *et al.*, 1998).

Block und Kollegen (2000) konnten, vor dem Hintergrund, dass eine murine Kolonkarzinomzelle zum Teil mit humanen Referenzzelllinien verglichen wurde, mit einem adenoviralen RSV-β-Galaktosidase-Vektor eine 10- bis 1700fach stärkere Transduktion von humanen Kolonkarzinomzelllinien gegenüber der murinen MCA-26-Zelle zeigen. Hierbei muss von der Annahme ausgegangen werden, dass alle Zelllinien die Transkription durch einen konstitutiven Promotor in äquimolarer Menge initiieren und damit ausschließlich die Anzahl der intrazellulären Vektoren für die Menge der Transgenexpression verantwortlich ist.

Addison *et al.* (1997) wiesen dagegen eine 10- bis 100fach höhere Aktivität des humanen CMV Promotors in humanen Zelllinien im Vergleich zu murinen oder Rattenzelllinien nach. Der murine CMV Promotor zeigte hingegen in allen drei Spezies eine vergleichbare oder sogar stärkere Genexpression als der humane Promotor. Diese Tatsache lässt einen Vergleich von humanen und murinen Zelllinien bei Verwendung des humanen CMV-Vektors schwer zu. Für den von Block *et al.* (2000) verwendeten RSV Promotor sowie für den humanen DF3/MUC1 Promotor ist ein derartiger Effekt nicht beschrieben. Für die stromaufwärts der TATA-Box gelegenen Abschnitte des Muzinpromotors konnte zudem eine 74 %ige Homologie der humanen und der murinen Form nachgewiesen werden (Spicer *et al.*, 1991).

Die Gal4-induzierte Transgenaktivierung hat zudem eine Latenz von ungefähr 24 Stunden (Rowitch *et al.*, 1999). Die Zellen wurden jedoch bereits nach dieser Zeit Iysiert und die Luciferase im Überstand bestimmt. Eine nennenswerte posttransduktale Akkumulation von Gal4-VP16 war folglich nicht möglich. In den humanen Zelllinien wurde diese Tatsache durch eine größere Zahl von adenoviralen Vektorkopien in Folge der besseren Transduktion effektiver kompensiert.

## 5.2.1.2 Verstärkender Effekt der Muzinexpression in Kombination mit der intrazellulären Konzentration der spezifischen Vektoren

Für die SK-CO-1-Zellen, die in früheren Untersuchungen eine bis zu 590fach stärkere Luciferaseexpression für das amplifizierte Konstrukt im Vergleich zu dem CMV Promotor zeigten, konnte immunhistologisch eine starke Muzin-1 Expression nachgewiesen werden (Block *et al.,* 2002). Identische immunhistologische Untersuchungen für die Zelllinie MCA-26 zeigten jedoch hier nur eine moderate Muzinexpression (A. Block, persönliche Mitteilung). Diese starke Antigenexpression in der humanen Zelllinie trägt zu der Überlegenheit beider tumorspezifischer Konstrukte gegenüber dem konstitutiven Promotor für alle Viruskonzentrationen bei, erreicht jedoch nicht ganz die Spitzenwerte, die Block *et al.* (2002) zeigen konnten. In MCA-26-Zellen dagegen kann, aufgrund der geringeren MUC1spezifischen Transkriptionsfaktoren, erst durch eine hohe intrazelluläre Viruskonzentration bei 100 m.o.i. dieser Mangel kompensiert werden.

Als weiterer Faktor spielt hier die erwähnte unterschiedliche Transduktionseffizienz der beiden Spezies eine Rolle, die in SK-CO-1-Zellen eine höhere postinfektiöse Gal4-VP16 Transkription ermöglicht und so innerhalb der 24 Stunden eher einen synergistischen Effekt durch das Gal4-Fusionsprotein erzielen kann als in der murinen Zelllinie. Die Tatsache, dass der Amplifikationsfaktor durch das binäre System in beiden muzin-positiven Zelllinien, jedoch nicht in der Hepatoblastomzelle, eine Konzentrationsabhängigkeit zeigt, wurde von Block *et al.* (2002) für drei humane, muzinpositive Kolonkarzinomzelllinien sowie für HepG-2-Zellen ebenfalls nachgewiesen. Dies zeigt für die tumorspezifischen Vektoren eine selektive Verstärkung durch die Muzinexpression in Kombination mit einer hohen intrazellulären Vektorkonzentration.

# 5.2.1.3 Akkumulation von Gal4-VP16 in der Kolonkarzinomzelllinie im Verlauf von 7 Tagen und ein zunehmender, amplifizierender Effekt

Wie schon bei dem Vergleich von MCA-26-Zellen mit den beiden humanen Karzinomzelllinien zu erkennen war, ist der Amplifikationsfaktor durch Gal4-VP16 für den vorgeschalteten DF3/MUC1 Promotor abhängig von der intrazellulären Muzinexpression. Obwohl die Transduktionseffizienz, gemessen an der CMV-vermittelten Luciferaseexpression für Hepa1-6-Zellen um den Faktor 50 bis 60 höher war, beträgt der Amplifikationsfaktor in dieser Zelle maximal die Hälfte der Stärke, die in den muzin-positiven Zellen zu beobachten war.

Die Beobachtung von Rowitch *et al.* (1999), wonach eine Gal4-vermittelte Genexpression eine Latenz von ca. 24 Stunden aufweist, wird durch die zeitliche Betrachtung der Genexpression bestätigt. Nach 24 Stunden steigt die Überlegenheit des amplifizierten Vektors gegenüber dem konstitutiven Promotor in den muzinpositiven Zellen signifikant vom Faktor 4 auf 15 an (p < 0,002). Dieses Phänomen ist am besten mit einer Akkumulation des intrazellulär prozessierten Fusionsproteins zu erklären. Da Gal4-VP16 an fünf möglichen Bindungsstellen die Transgenexpression initiieren kann, kommt es zu einem gegenüber einer einzelnen Bindungsstelle synergistischen Effekt auf die Transkription (Carey *et al.*, 1990). Diese Tatsache macht sich nach Lin *et al.* (1990) stärker bemerkbar, wenn alle Bindungsstellen durch ein Gal4-Derivat abgesättigt sind. Dieser synergistische Effekt korreliert folglich mit der Menge an intrazellulärem Fusionsprotein.

Neben den Ungenauigkeiten, die die Titerung der viralen Vektoren durch einen Plaque-Assay mit einer Variation von 9,9 % (Bewig und Schmidt, 2000) mit sich bringt, spielt bei der Eruierung von Fehlermöglichkeiten dieser Expressionskinetik
zusätzlich das Zellwachstum über die Zeit eine wichtige Rolle. Zwar wurden die gemessenen Luciferasemengen auf die Gesamt-Zellproteinmenge bezogen und damit der Zellproliferation Rechnung getragen, doch zeigten die Hepa1-6-Zellen nach dem vierten Tag ein deutliches Überwachsen der Kulturschalen und einen mikroskopisch sichtbaren Vitalitätsverlust (experimentelle Beobachtung). Dies könnte ein Grund für die nach dem zweiten Tag abfallende Genexpression in dieser Zelllinie sein und sollte zu einer kritischen Bewertung der Daten zum Ende des Experimentes führen.

#### 5.2.1.4 Reduktion der Tumorspezifität des DF3/MUC1 Promotors durch Gal4-VP16 in muzin-negativen Karzinomzellen

Für die muzin-negativen Hepatomzellen zeigte sich für den nicht-amplifizierten DF3/MUC1 Promotor eine deutliche Tumorspezifität im Vergleich zum CMV-Vektor. Mit einem hohen Amplifikationsfaktor kompensiert das Fusionsprotein diese Differenz, so dass eine vergleichbare Genexpression zum konstitutiven Promotorkonstrukt besteht. Die eigenen sowie frühere Untersuchungen von Block *et al.* (2002) zeigten eine bis zu siebenfache Überlegenheit des amplifizierten Konstruktes in HepG-2-Zellen.

Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist wiederum in der Transduktionseffizienz zu suchen. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die gleiche adenovirale Transduktion, gemessen an der CMV-vermittelten Luciferaseexpression, in HepG-2- und SK-CO1-Zellen erreicht werden kann, wenn 17fach weniger Virus bei der Infektion der humanen Hepatomzelle verwendet werden (Block *et al.*, 2002). Es ist also davon auszugehen, dass die höchste Kopienzahl an Adenoviren in den Hepatomzellen im Vergleich zu der muzin-positiven Zelllinie vorhanden ist.

Diese Annahme erklärt jedoch noch nicht, warum in einer muzin-negativen Zelllinie der amplifizierte DF3/MUC1 Promotor eine starke unspezifische Genexpression initiiert. In diesem Zusammenhang stellten andere Arbeitsgruppen fest, dass bei Verwendung eines tumorspezifischen CEA Promotors in HepG-2 und anderen Karzinomzelllinien, die CEA-negativ sind, *in vitro* keine Tumorspezifität erzielt werden konnte. Erst durch die Verwendung von primären Hepatozytenkulturen konnte eine spezifische Expression erreicht werden (Brand *et al.,* 1998). Ein Grund hierfür könnten die große Zahl von intrazellulären Transkriptionsfaktoren sein, die für eine sich schnell teilende, transformierte Zelle charakteristisch sind. In der Sequenz des DF3/MUC1 Promotors wurde eine Reihe von ubiquitär vorkommenden cis-regulierenden Elementen gefunden wie eine TATA-Box, CCAAT-, Eund GC-Boxen (Zaretsky *et al.*, 1999). Die gleiche Arbeitsgruppe identifizierte zudem eine Reihe von DNS-Motiven, die ubiquitäre Transkriptionsfaktoren wie ER, AP-2, AP-3 und SP1 binden können. Diese Tatsache würde eine unspezifische Aktivierung des DF3/MUC1 Promotors in transformierten, jedoch muzin-negativen Zellen erklären. Wie die eigenen Ergebnisse, aber auch die Beobachtungen von Block *et al.* (2002) ergaben, ist der alleinige DF3/MUC1 Promotor in muzinnegativen Zellen zu schwach, so dass diese unspezifische Aktivität nicht nennenswert ins Gewicht fällt. Erst durch den synergistischen, amplifizierenden Effekt des Gal4-Fusionsproteins kommt dieser unspezifische Effekt in transformierten Zellen zum Tragen.

Um *in vitro* eine Abschätzung treffen zu können, wie *in vivo* die Tumorspezifität des stark hepatotropen adenoviralen Vektors aussehen könnte, ist das Modell von Brand und Kollegen (1998) wesentlich besser geeignet als die Verwendung einer transformierten Leberzelle. Diese Arbeitsgruppe isolierte primäre Hepatozyten aus einer Rattenleber und konnte nach viraler Transduktion bei einem *RNS-Protection Assay* keine CEA-vermittelte Genexpression nachweisen. Hepatozyten, die sich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden, weisen zwar eine hohe Syntheseleistung auf, haben jedoch geringere Mengen an Transkriptionsfaktoren als sich schnell teilende, transformierte Zellen.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Beobachtung, dass ein selektiver Promotor einen Teil seiner Spezifität einbüßt, wenn er in das adenovirale Genom kloniert wurde (Ring *et al.*, 1996; Imler *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang ist die Lage der Expressionskassette in dem adenoviralen Genom zu berücksichtigen. Das Konstrukt aus DF3/MUC1 Promotor, binärem System und Transgen wurde in einer Rechtsorientierung in die deletierte E1-Region kloniert. Rubinchik und Kollegen (2001a) konnten nachweisen, dass eine derartige Lokalisation der Expressionskassette, unter Verwendung eines tumorspezifischen PSA Promotors, bei Viruskonzentrationen bis 125 m.o.i. eine ca. 6fach stärkere Expression in PSA-negativen Zellen zeigte, wenn als Vergleich ein Kontrukt verwendet wurde, bei dem sich die heterologe DNS in der E4-Region befindet. Die Orientierung scheint hierbei keine entscheidende Rolle zu spielen. Als Ursache wird eine unspezifische Interaktion des Promotors mit der starken, viralen E1A Enhancer Sequenz angesehen, die sich mit essentiellen Verpackungssignalen des Virus überlappt und daher nicht mit entfernt werden kann (Gräble und Hearing, 1992).

Vor diesem Hintergrund könnte das Vorhandensein von ubiquitären DNS-Motiven für aktivierende Transkriptionsfaktoren in der Sequenz des DF3/MUC1 Promotors (Zaretsky *et al.*, 1999), in Kombination mit der amplifizierenden Wirkung des Fusionsproteins, eine wichtige Einflussgröße für die Einbußen in der Tumorspezifität sein. *In vitro* Untersuchungen an primären Mäusehepatozyten könnten zeigen, ob sich auch für den amplifizierten DF3/MUC1-Vektor die Tumorspezifität erhöht.

### 5.2.2 *In vivo* Experimente am murinen, hepatischen Multimetastasenmodell

Durch eine intrasplenische Applikation der syngenen Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 in Balb/c Mäusen und nachfolgender Splenektomie wurde über eine portalvenöse Metastasierung eine diffuse Tumorzellinfiltration in der Leber erzeugt. Nach vier Tagen wurde ein Gemisch aus den adenoviralen Vektoren Ad.CMV-GFP und, an Stelle von Ad.DF3/MUC1-binSyst.-Red2, dem Vektor Ad.DF3/MUC1binSyst.-Luc über die Schwanzvene injiziert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten terminiert und die Lebern fluoreszenzmikroskopisch auf die Gewebeverteilung der adenoviral vermittelten Genexpression hin untersucht.

In Bezug auf die konstitutive Expression des *Green Fluorescent Proteins* zeigte sich zu allen drei Terminierungszeitpunkten eine homogene, panlobuläre Verteilung im Lebergewebe. Es konnten keine Metastasen identifiziert werden, die eine abzugrenzende GFP Expression aufwiesen. Die immunhistologische Detektion der Luciferase zeigte bei allen drei Gruppen eine deutlich geringere Expression in Hepatozyten. Es waren nur sehr vereinzelt Fluoreszenzsignale zu erkennen. Ab dem zweiten Terminierungszeitpunkt ließ sich jedoch eine Luciferaseexpression in kleinen Metastasen sowie an den Rändern von Tumoren einer mittleren Größe erkennen. Größere Metastasen zeigten keine Transgenexpression.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es sich ausschließlich um einen qualitativen Vergleich einer tumorspezifischen mit einer konstitutiven Genexpression handelt. Trotz dieser Einschränkung lässt sich eine deutliche Tumorspezifität des amplifizierten DF3/MUC1 Promotors im Vergleich zum CMV Promotor erkennen.

#### 5.2.2.1 Deutliche Spezifität des DF3/MUC1 Promotors in Hepatozyten

In den in vitro Experimenten wies der alleinige DF3/MUC1 Promotor eine bis zum Faktor 100 schwächere Genexpressionsrate im Vergleich zur CMV-vermittelten Expression in der muzin-negativen Hepatomzelllinie Hepa1-6 auf. Der, durch das binäre System amplifizierte, DF3/MUC1 Promotor wies in dieser Referenzzelllinie jedoch eine vierfach stärkere Expression, als durch den CMV Promotor vermittelt, auf. Einen Erklärungsansatz für die deutliche Spezifität in vivo bieten die oben erwähnten Untersuchungen von Brand et al. (1998). Diese Arbeitsgruppe machte eine erhöhte Menge von Transkriptionsfaktoren, die charakteristisch für sich schnell teilende, transformierte Zellen sind, für den Verlust der selektiven Expression eines tumorspezifischen Promotors in vitro verantwortlich. In primären Hepatozytenkulturen konnten sie jedoch eine Spezifität nachweisen. Diese Hypothese erscheint auch im Hinblick auf die vorliegenden in vivo Resultate plausibel. Es ist davon auszugehen, dass sich in jeder Zelle, die eine GFP Expression zeigte, potentiell auch ein Vektor mit dem tumorspezifischen DF3/MUC1.binSyst.-Konstrukt befindet. Die deutlich schwächere Luciferaseexpression in den Hepatozyten lässt sich gut mit einer verminderten Transkriptionsrate durch den tumorspezifischen Promotor erklären.

#### 5.2.2.2 Selektive Luciferaseexpression durch den DF3/MUC1 Promotor in Kolonkarzinommetastasen bei geringer Transduktion

Die Spezifität des Muzinpromotors beschränkt sich nicht nur auf die geringere Transgenexpression in den muzin-negativen Hepatozyten, sondern zeigt auch eine Überlegenheit in der tumorspezifischen Genexpression im Vergleich zum CMV Promotor. Wie die Luciferaseexpressionskinetik *in vitro* zeigt, ist der DF3/MUC1 Promotor nach 48 Stunden um den Faktor 15, nach 24 Stunden jedoch erst 4fach stärker als der CMV Promotor. Rowitch *et al.* (1999) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Gal4-vermittelte Transgenexpression eine Latenz von 24 Stunden aufweist. Diese Beobachtung wurde *in vitro* auch für das Gal4-VP16 Fusionsprotein gemacht und könnte die Tatsache erklären, dass erst nach einer Expressionszeit von vier Tagen eine Luciferaseexpression in den Metastasen detektierbar war.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nur Metastasen einer kleineren bis mittleren Größe eine Luciferaseexpression aufwiesen. Shayakhmetov et al. (2002) stellten fest, dass die peritumorale Bildung einer extrazellulären Matrix einen entscheidenden Einfluss auf die Transduktionseffizienz durch adenovirale Vektoren besitzt. Diese Arbeitsgruppe wies immunhistologisch eine extrazelluläre Matrix aus Kollagen und Laminin um hepatische Metastasen einer Mammakarzinomzelllinie nach. Diese extrazelluläre Matrix war nur spärlich mit Blutgefäßen durchsetzt und erschwerte damit den direkten Kontakt der Vektoren mit den Tumorzellen. Nur kleinere Metastasen, die eine geringere Bindegewebsummantelung aufwiesen, wurden effizient infiziert. Für die Bildung dieser extrazellulären Matrix um Metastasen von soliden Tumoren sind myofibroblasten-ähnliche Zellen verantwortlich (Ooi et al., 1997). Bestätigt wird die Annahme, dass diese peritumorale Bindegewebskapsel eine bedeutsame anatomische Barriere für die virale Transduktion darstellt, durch die Untersuchungen von Fechner et al. (1999), die nachweisen konnten, dass in vivo keine Korrelation zwischen der Expression des CA-und des av-Integrinrezeptors und der adenoviralen Transduktion besteht.

Das Vorhandensein dieser anatomischen Barriere würde zu der Schlussfolgerung führen, dass eine deutlich geringere adenovirale Transduktionseffizienz in den Kolonkarzinommetastasen im Vergleich zu den Hepatozyten vorliegt. In den Leberzellen führt hingegen eine Kombination aus guter Vaskularisierung, fenestriertem Endothel und hoher CAR Expression zu einer hohen adenoviralen Infektion (Fechner *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass kleinere Metastasen eine geringere extrazelluläre Matrixkapsel aufweisen als größere, erklärt die eigene Beobachtung, dass derartige Tumore die stärkste Transgenexpression aufweisen.

Einen additiven Effekt auf die erniedrigte Transduktionseffizienz könnte neben der anatomischen Barriere aus extrazellulärer Matrix auch die Muc1 Expression der Kolonkarzinomzellen ausüben. So konnten Arcasoy *et al.* (1997) *in vitro* nachweisen, dass die adenovirale Infektion von Epithelzellen durch die Expression des transmembranösen Glykoproteins Muzin1 fünffach schwächer ist als in muzinnegativen Zellen. Ein ähnlicher Effekt wäre auch bei Kolonkarzinomzellen vorstellbar.

Die verzögerte Detektierbarkeit der Luciferaseexpression in den Kolonkarzinommetastasen ist gut mit dieser geringen Transduktionseffizienz in Kombination mit der Expressionslatenz durch das Gal4-VP16 Fusionsprotein zu erklären. Die geringe Transduktion ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass bei keinem Tier eine intratumorale GFP Expression nachweisbar war. Hier zeigt sich die muzin-abhängige Tumorspezifität des DF3/MUC1 Promotors in Verbindung mit der amplifizierenden Wirkung des binären Systems. Bestätigt wird dies wiederum durch die *in vitro* Ergebnisse in der Expressionskinetik, bei der eine 15fache Überlegenheit des amplifizierten DF3/MUC1 Promotors gegenüber dem CMV Konstrukt nachgewiesen wurde.

Die Untersuchungen von Mazzolini *et al.* (2001) bestätigen die Beobachtung, dass bei den vorliegenden *in vivo* Experimenten Metastasen einer mittleren Größe vorwiegend im Grenzbereich zum umliegenden Leberparenchym eine Luciferaseexpression aufweisen. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine singuläre, hepatische Kolonkarzinommetastase hauptsächlich peritumoral eine Transgenexpression aufweist. Als Erklärungsansatz dient eine hochregulierte  $\alpha v\beta 3$  Integrinexpression auf peritumoralem angiogenetischem Epithel (Eliceiri und Cheresh, 1999). Dieser adenovirale Korezeptor wurde jedoch nur in minimalen Mengen auf ruhendem, ausdifferenziertem Endothel gefunden.

# 5.3 Ausblick zur adenoviralen Gentherapie kolorektaler Lebermetastasen

#### 5.3.1 Systemische Vektorapplikation für die Therapie von Metastasen

Die systemische Applikation eines adenoviralen Vektors wurde in den vergangenen Jahren sehr kontrovers diskutiert und in jüngerer Zeit von einer Reihe von Wissenschaftlern sehr kritisch beurteilt (Nasto, 2002). Der Grund hierfür war ein tragischer Zwischenfall im *ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency trial* der Universität von Pennsylvania im September 1999. Der 18jährige Jesse Gelsinger war einer von insgesamt 18 jugendlichen Probanden, die alle eine milde Form dieser Stoffwechselerkrankung aufwiesen, die bislang diätetisch und medikamentös behandelt wurde. Er entwickelte vier Stunden nach Injektion von 3,8\*10<sup>13</sup> viralen Partikeln hohes Fieber und zeigte am nächsten Morgen eine disseminierte intravasale Gerinnung. Nach vier Tagen starb Gelsinger an einem Multiorganversagen. Die Autopsie zeigte eine direkte Beziehung mit der Virusapplikation. Obwohl der Vektor in die Leberarterie injiziert wurde, erreichte eine bedeutende Virusmenge den systemischen Kreislauf und mediierte über eine Akkumulation in der Milz, den Lymphknoten sowie im Knochenmark eine massive immunologische Reaktion, die zu dem tödlichen Verlauf führte (Thomas *et al.*, 2003).

Einige Forscher sehen dieses tragische Geschehen in einem toxischen Effekt aufgrund einer hohen Vektorkonzentration begründet (Nasto, 2002). Als ein kritischer Titer werden Virusmengen von 10<sup>12</sup> bis 10<sup>13</sup> angesehen, bei denen die toxischen Wirkungen des Vektors von einer milden Form in ein lebensbedrohliches Ausmaß kippen können. Eine Schwierigkeit hierbei ist jedoch die Tatsache, dass einerseits eine große interindividuelle Varianz besteht und zudem die viralen Titerbestimmungen bis zu einer Log-Stufe variieren können.

Wenn nun den Kritikern einer systemischen Vektorapplikation zugestimmt wird, müssen zunächst die Alternativen näher beleuchtet werden. Bei einer Beschränkung dieser Betrachtung auf die Gentherapie von metastasierten kolorektalen Karzinomen ergibt sich hier die intratumorale Adenovirusinjektion. Für adenovirale Vektoren, die für Enzyme kodieren, welche eine nicht-toxische Substanz intrazellulär in einen toxischen Metaboliten konvertieren, existieren bereits klinische Studien. So zeigten Sung *et al.* (2001), dass bis zu 1\*10<sup>13</sup> Partikel des Vektors Ad.RSV-HSV1-tk in kolorektale Lebermetastasen injiziert werden konnten, ohne stärkere hepatotoxische Nebenwirkungen zu beobachten.

Obwohl die intratumorale Virusapplikation sicherlich geringere systemische Wechselwirkungen nach sich zieht, ist diese Art der Anwendung durch das vorliegende Ausmaß der Metastasierung limitiert. Es bieten sich beim Vorliegen einer singulären Lebermetastase mit der chirurgischen Resektion sowie mit anderen lokalen Therapieverfahren besser untersuchte Alternativen. In allen Fällen muss jedoch davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Metastasendiagnose bereits weitere, bildmorphologisch nicht identifizierbare Metastasen vorliegen, die für ein Rezidiv verantwortlich sind. Es sollte also eine Umformulierung der Zielsetzung dahingehend erfolgen, dass mit der adenoviralen Gentherapie ein Maximum an malignen Zellen therapeutisch angegangen werden kann. Dies ist auf zwei Wegen zu erreichen:

Zum einen bietet ein immunologischer Therapieansatz die Möglichkeit, dass die Transduktion einiger weniger malignen Zellen ausreicht, um durch eine konsekutive Expression von immunstimulierenden Proteinen eine antitumorale Reaktion des körpereigenen Immunsystems zu erreichen. Es müssen also nicht, wie bei Therapieansätzen, die einen genetischen Defekt korrigieren wollen, sämtliche Zellen adenoviral infiziert werden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden, zum Teil anerge immunologische Zellen aufweisen (Ochsenbein, 2002).

Ein anderer, spezifischerer Ansatz ist die Beschränkung der viral-vermittelten Genexpression auf die malignen Zellen. Dies lässt sich einerseits durch Modifikation des adenoviralen Kapsids erreichen, sodass der Vektor nicht mehr mit dem ubiquitär vorkommenden Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor, sondern mit tumorspezifischen Rezeptoren interagiert. Andererseits können gewebsspezifische Promotoren die Genexpression trotz unspezifischer Transduktion auf maligne Gewebe reduzieren. Bei derartigen Ansätzen sind geringere Nebenwirkungen bei einer systemischen Applikation zu erwarten, und es besteht zudem die Möglichkeit, auch Mikrometastasen therapeutisch anzugehen. Die geringeren Nebenwirkungen werden dadurch erreicht, dass einerseits die injizierte virale Dosis reduziert werden kann, zum anderen aber auch durch eine Beschränkung der Expression von potentiell zytotoxischen Genprodukten auf die transformierten Gewebe.

Gewebsspezifische Promotoren haben gegenüber starken, konstitutiven Promotoren wie dem RSV oder dem CMV Promotor jedoch den Nachteil nur eine schwache Expression zu vermitteln (Brand *et al.*, 1998 und Block *et al.*, 2002). Eine amplifizierte, spezifische Genexpression, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, vermittelt eine spezifische, dem CMV Promotor überlegene Genexpression, die in klinischen Studien eine Reduktion der applizierten Virusmenge ermöglichen könnte. Hohe kritische Dosen, die unabhängig vom Transgen eine starke antivirale Immunität induzieren, ließen sich hierdurch vermeiden.

Wie könnte nun eine klinische Studie zur systemischen adenoviralen Therapie von kolorektalen Lebermetastasen aussehen? Bei der Planung sollten keine Patienten im Stadium IV, also mit bildmorphologisch detektierbaren Fernmetastasen, einbezogen werden. In diesem Fall wäre die vorliegende Tumormasse wahrscheinlich zu groß, um eine effektive Tumorreduktion durch eine Stimulation des Immunsystems oder einen anderen therapeutischen Ansatz zu erzielen. Hepatische Metastasen wären zudem für eine effektive Transduktion zu groß. Viel versprechender erscheint in diesem Zusammenhang eine adjuvante Therapie von Karzinompatienten im Stadium III. Diese Patienten weisen primär keine detektierbaren Fernmetastasen auf, entwickeln jedoch in einem hohen Prozentsatz Leber- oder Lungenmetastasen. Dieses Patientenkollektiv bietet sich für einen systemischen tumorspezifischen Therapieansatz an. Es ist anzunehmen, dass viele dieser Patienten mikroskopische Metastasen in der Leber zum Zeitpunkt der Diagnostik aufweisen. Mit einem systemischen Ansatz könnte ein Maximum dieser malignen Zellen therapeutisch angegangen werden, da in einem solchen Stadium eine hemmende Bindegewebskapsel sicherlich nur eine untergeordnete Rolle spielt und die Tumormasse noch relativ klein ist. In diesem Fall wäre ein immunologischer Ansatz, auch bei einer nicht 100 %igen Infektion der Tumorzellen, ein viel versprechender.

### 5.3.2 Neue adenovirale Vektoren für die Therapie kolorektaler Metastasen

Für die adenovirale Gentherapie von multilokalen hepatischen Metastasen stellt die systemische, zumindest jedoch die regionale Applikation über die Pfortader oder die *A. hepatica* die attraktivste Möglichkeit dar, wenn die mehrheitliche Zahl der Metastasen therapeutisch angegangen werden soll. Um nun die Effizienz eines spezifischen Ansatzes noch weiter zu erhöhen, sind verschiedene Versuche unternommen worden, die auch im speziellen Fall der Gentherapie von kolorektalen Mikrometastasen eine Optimierung ermöglichen könnten.

So konnten Rubinchik und Kollegen (2001a) zeigen, dass ein tumorspezifischer PSA Promotor eine höhere Selektivität innerhalb des adenoviralen Genoms erreicht, wenn dieser sich in der deletierten E4 Region statt in der E1 Region befindet. Der Grund hierfür liegt, wie oben bereits diskutiert, in einer Interaktion der Expressionskassette mit der starken E1A Enhancer Sequenz am linken Ende der E1 Region (Hearing und Shenk, 1983).

Ein weiterer Ansatz, um eine mögliche unspezifische Genexpression zu unterdrücken, die zudem bei der Generierung von Vektoren ein Problem darstellen kann, wenn diese ein toxisches Transgen kodieren, stellt die Verwendung von so genannten Insulatoren dar. Vassaux *et al.* (1999) erreichten durch eine Flankierung der Expressionskassette mit einer Sequenz aus 250 Basenpaaren, die ein transkriptionales Stoppsignal des Rinder-Wachstumshormons darstellt, eine Beschränkung der ERBB2 promotor-vermittelten HSV1-tk Expression in ERBB2-positiven Zellen. Eine ähnliche Verbesserung der Spezifität wurde auch für metall-induzierte Promotoren durch einen HS-4 Insulator aus dem  $\gamma$ -Globinlocus des Huhns erreicht (Steinwaerder und Lieber, 2000). Demgegenüber stehen jedoch Beobachtungen von Buvoli *et al.* (2002), die einen Verlust der Gewebsspezifität eines herzspezifischen Promotors unter Verwendung eines Insulators nachwiesen.

Einen zusätzlichen Sicherheitsvorteil bei der Verwendung von potentiell zytotoxischen Transgenen wie dem Zytokin Interleukin-12 könnten regulierbare Promotoren darstellen. Block *et al.* (2003) konnten mit einem bidirektionalen, tetrazyklinregulierbaren Promotor *in vitro* Suppressionsraten von bis zu 6000fach für das murine Interleukin-12 Fusionsprotein erzielen. Rubinchik *et al.* (2001b) stellten ebenfalls in einem tetrazyklin-reprimierbaren Vektorsystem die Expression des Transaktivators unter die Kontrolle eines prostata-spezifischen Promotors. Dieser Ansatz ermöglicht gegenüber dem von Block *et al.* (2003), die einen unspezifischen Thymidinkinase Minimalpromotor für die Expression des Transaktivators verwendeten, neben einer generellen Reprimierbarkeit zudem eine gewebsspezifische Aktivierung. Ein Ansatz unter Verwendung eines DF3/MUC1 Minimalpromotors wäre bei einem bidirektional regulierten System zur spezifischen Expression des Transaktivators in muzin-positiven, kolorektalen Metastasen möglich. Es ist zudem denkbar, in einem ähnlichen Ansatz wie bei Rubinchik *et al.* (2001b) den Transaktivator und den Muzinpromotor in die E1 Region und das tetrazyklinregulierbare Element mit dem Transgen in die E3 oder die E4 Region zu klonieren.

Ein weiteres, viel versprechendes Konzept stellt die Kombination aus verschiedenen Ansätzen zur tumorspezifischen Genexpression dar. So kombinierten Reynolds *et al.* (2001) einen lungenspezifischen Promotor mit einer Modifikation der adenoviralen Fiberproteine. Sie verwendeten hierbei einen bi-spezifischen Antikörper, der durch Konjugation des Fab-Fragments eines Anti-Ad5-Fiberknob-Antikörpers mit einem Anti-ACE-Antikörper hergestellt wurde. Die kombinierte systemische Gabe dieses Antikörperkonjugats mit einem adenoviralen Vektor, der einen gewebsspezifischen Promotor zur Transgenexpression beinhaltete, führte zu einer synergistischen, 300.000fachen relativen Verstärkung der selektiven Genexpression in der Lunge im Vergleich zur Leber.

Durch die Identifikation von spezifischen Rezeptoren bzw. Zelloberflächenproteinen könnte über die Entwicklung eines entsprechenden Antikörpers ein ähnlicher Ansatz für kolorektale Lebermetastasen entwickelt werden und damit, unter Berücksichtigung der anatomischen Barrieren von hepatischen Metastasen, eine Erhöhung der spezifischen Transduktion erzielt werden.

### 6 Zusammenfassung

**Hintergrund**: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer, adenoviraler Therapieansatz des hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms mit tumorspezifischen Vektoren untersucht, die als Transgenpromotor einen amplifizierten Muzinpromotor (DF3/MUC1) beinhalten. Die Amplifizierung der promotorvermittelten Genexpression erfolgte durch ein binäres System aus einem Gal4-VP16 Fusionsprotein und fünf korrespondierenden Bindungsstellen über einen TATA-Minimalpromotor.

**Methoden und Ergebnisse**: *In vitro* erfolgte im Hinblick auf das murine Tumormodell eine Charakterisierung der murinen Kolonkarzinomzelllinie MCA-26 mit den drei Vektoren Ad.DF3/MUC1-Luc, Ad.DF3/MUC1.binSyst.-Luc und Ad.CMV-Luc. Es zeigte sich eine bis zu 15fache Überlegenheit des amplifizierten Kontrukts gegenüber dem konstitutiven CMV-Vektor in der muzin-positiven Zelle, die sich erst im Verlauf einer Expressionskinetik über eine Woche manifestierte. In muzinnegativen Zellen war zum Teil jedoch eine geringe Überlegenheit des spezifischen Konstruktes zu erkennen. Auch das konstruierte adenovirale Expressionsplasmid zur amplifizierten und tumorspezifischen Interleukin-12 Expression sowie der hergestellte Vektor Ad.DF3/MUC1-mscIL-12 zeigten eine ähnlich marginale Tumorspezifität *in vitro*.

*In vivo* konnte bei systemischer Vektorapplikation in einem hepatischen Multimetastasenmodell eine deutlich bessere, qualitative Tumorspezifität erzielt werden. Verglichen wurde die CMV-vermittelt *Green Flurescent Protein* Expression mit der amplifizierten, tumorspezifischen Luciferaseexpression, die immunhistologisch detektiert wurde. Kleine und mittelgroße Metastasen zeigten, nach einer Latenz von vier Tagen nach Vektorgabe, eine selektive Luciferaseexpression. Die übrige Leber wies zu allen Beobachtungszeitpunkten eine deutliche, panlobuläre GFP Expression, hingegen nur eine marginale Luciferaseexpression auf.

<u>Schlussfolgerung</u>: Mit dem tumorspezifischen Vektor zur amplifizierten Genexpression lässt sich bei systemischer Vektorapplikation im Vergleich mit dem CMV-Vektor eine selektive, intratumorale Transgenexpression in kleinen und mittleren Kolonkarzinommetastasen erzielen.

### 7 Literaturverzeichnis

Addison CL, Hitt M, Kunsken D, Graham FL (1997): Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors. J Gen Virol 78(Pt 7): 1653-1661

Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979): Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 282(5739): 615-616

Alexandrow M, Moses H (1995): Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. Cancer Res 55(7): 1452-1457

Andreason GL, Evans GA (1988): Indroduktion and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. Biotechniques 6(7): 650-660

Andrews CW Jr, Jessup JM, Goldman H, Hayes DF, Kufe DW, O'Hara CJ, Steele GD Jr (1993): Localization of tumor-associated glycoprotein DF3 in normal, in-flammatory, and neoplastic lesions of the colon. Cancer 72(11): 3185-3190

Arcasoy SM, Latoche J, Gondor M, Watkins SC, Henderson RA, Hughey R, Finn OJ, Pilewski JM (1997): MUC1 and Other Sialoglycoconjugates Inhibit Adenovirusmediated Gene Transfer to Epithelial Cells. Am J Respir Cell Mol Biol 17(4): 422-435

Baldus SE, Mönig SP, Hanisch F-G, Zirbes TK, Flucke U, Oelert S, Zilkens G, Madejczik B, Thiele J, Schneider PM, Hölscher AH, Dienes HP (2002): Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewis and sialyl-Lewis antigens in colorectal adenocarcinoma. Histopathology 40(5): 440-449

Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Staccini P, Saint-Paul MC, Rossi B (2002): Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. Hepatology 35(5): 1144-1152

Bercovich JA, Grinstein S, Zorzopulos J (1992): Effect of DNA concentration of recombinant plasmid recovery after blund-end ligation. Biotechniques 12(2): 190-193

Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, Crowell RL, Finberg RW (1998): The Murine CAR Homolog Is a Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses. J Virol 72(1): 415-419

Berkner KL, Schlaffhausen BS, Roberts TM, Sharp PA (1987): Abundant expression of polyomavirus middle T antigen and dihydrofolate reductase in an adenovirus recombinant. J Virol 61(4): 1213-1220

Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. Proc Natl Acad Sci USA 91(19): 8802-8806

Bett AJ, Prevec L, Graham FL (1993): Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. J Virol 67(10): 5911-5921

Bewig B, Schmidt WE (2000): Accelerated titering of adenoviruses. Biotechniques 28(5): 870-873

Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7(6): 1513-1523

Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, McCormick F (1996): An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science 274(5286): 373-376

Block A, Freund CTF, Chen SH, Nguyen KP, Finegold M, Windler E, Woo SLC (2000): Gene therapy of metastatic colon carcinoma: Regression of multiple hepatic metastases by adenoviral expression of bacterial cytosine deaminase. Gene Ther 7(3): 438-445

Block A, Milasinovic D, Müller J, Schäfer P, Schäfer HJ, Greten H (2002): Amplified, muc1-specific gene expression in colon cancer cells utilizing a binary system in adenoviral vectors. Anticancer Res 22(6A): 3285-3292

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

Bohm CM, Mulder MC, Zennadi R, Notter M, Schmitt-Graff A, Finn OJ, Taylor-Papadimitriou J, Stein H, Clausen H, Riecken EO, Hanski C (1997): Carbohydrate recognition on MUC1-expressing targets enhances cytotoxicity of a T cell subpopulation. Scand J Immunol 46(1): 27-34

Bordier C (1981): Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J Biol Chem 256(4): 1604-1607

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell 41(2): 521-530

Brand AH, Perrimon N (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118(2): 401-415

Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M, Dorken B (1997): Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. Cancer Gene Ther 4(1): 9-16

Brand K, Baker AH, Perez-Canto A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W (2000): Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. Cancer Res 60(20): 5723-5730

Brand K, Löser P, Arnold W, Bartels T, Strauss M (1998): Tumor cell-specific transgene expression prevents liver toxicity of the adeno-HSVtk/GCV approach. Gene Ther 5(10): 1363-1371

Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK (1995): Role of interferon-gamma in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. J Immunother 17(2): 71-77

Bui LA, Butterfield LH, Kim JY, Ribas A, Seu P, Lau R, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS (1997): In vivo therapy of hepatocellular carcinoma with a tumorspecific adenoviral vector expressing interleukin-2. Human Gene Ther 8(18): 2173-2182

Buvoli M, Langer SJ, Bialik S, Leinwand LA (2002): Potential limitations of transcription terminators used as transgene insulators in adenoviral vectors. Gene Ther 9(3): 227-231

Carey M, Lin YS, Green MR, Ptashne M (1990): A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by Gal4 derivates. Nature 345(6273): 361-364

Carra G, Gerosa F, Trinchieri G (2000): Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. J Immunol 164(9): 4752-4761

Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL, Xu B, Kosai KI, Finegold FJ, Woo SLC, Chen SH (1996): Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 93(21): 11302-11306

Chang C, Gralla JD (1993): Properties of initiator-associated transcription mediated by GAL4-VP16. Mol Cell Biol 13(12): 7469-7475

Check E (2002): Gene therapy: A tragic setback. Nature 420(6912): 116-188

Chen L, Chen D, Manome Y, Dong Y, Fine HA, Kufe DW (1995): Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. J Clin Invest 96(6): 2775-2782

Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL (1995): Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 92(7): 2577-2581 Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo SL (1996): Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. Cancer Res 56(16): 3758-3762

Cheng X, Chen VW, Steele B, Ruiz B, Fulton J, Liu L, Carozza SE, Greenlee R (2001): Subsite-specific incidence rate and stage of disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992-1997. Cancer 92(10): 2547–2554

Cotten M, Baker A, Saltik M, Wagner E, Buschle M (1994): Lipopolysaccharide is a frequent contamination of plasmid DNA preparation and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. Gen Ther 1(4): 239-246

Darlington GJ, Bernhard HP, Miller RA, Ruddle FH (1980): Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells. J Natl Cancer Inst 64(4): 809-819

Dirks W, Wirth M, Hauser H (1993): Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. Gene 128(2): 247-249

Dix BR, Edwards SJ, Braithwaite AW (2001): Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? J Virol 75(12): 5443-5447

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P (2000): Irinotecan combined with fluoruracil compared with fluoruracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. Lancet 355(9209): 1041-1047

Edholm D, Molin M, Bajak E, Akusjarvi G (2001): Adenovirus Vectors Designed for Expression of Toxic Proteins. J Virol 75(20): 9579-9584

Eliceiri BP und Cheresh DA (1999): The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. J Clin Invest 103(9): 1227-1230

Fearson ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5): 759-767

Fechner H, Haack A, Wang H, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker RG, van Veghel R, Houtsmuller AB, Schultheiss H-P, Lamers JMJ, Poller W (1999): Expression of Coxsackie adenovirus receptor and alpha<sub>V</sub>-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. Gene Ther 6(9): 1520-1535

Fogh J, Trempe G (1975): New human tumor cell lines. In: Fogh J (ed) Human Tumor Cells in vitro, Plenum Press, New York, S 115-154

Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001): Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. Proc Natl Acad Sci USA 98(15): 8809-8814

Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999): Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. Ann Surg 230(3): 309-318

Fusai G, Davidson BR (2003): Management of colorectal liver metastases. Colorectal Dis 5(1): 2-23

Gendler SJ, Spicer AP, Lalani EN, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Boshell M, Taylor-Papadimitriou J (1991): Structure and biology of a carcinomaassociated mucin, MUC1. Am Rev Respir Dis 144(3 Pt 2): S42-47

Ghosh-Choudhury G, Haj-Ahmad Y, Graham FL (1987): Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full length genomes. EMBO J 6(6): 1733-1739

Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, Chollet P, Llory JF, Letourneau Y, Coudert B, Bertheaut-Cvitkovic F, Larregain-Fournier D, Le Rol A, Walter S, Adam R, Misset JL, Lévi F (2000): Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluoruracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 18(1): 136-147 Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, Presky DH, Stern AS, Gately MK (1995): Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. Eur J Immunol 25(1): 200-206

Giniger E, Varnum SM, Ptashne M (1985): Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. Cell 40(4): 767-774

Glasel JA (1995): Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. Biotechniques 18(1): 62-63

Gluzman Y (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23(1): 75-182

Gnant MFX, Puhlmann M, Alexander HR Jr, Bartlett DL (1999): Systemic Administration of a Recombinant Vaccinia Virus Expressing the Cytosine Deaminase Gene and Subsequent Treatment with 5-Fluorocytosine Leads to Tumor-specific Gene Expression and Prolongation of Survival in Mice. Cancer Res 59(14), 3396-3403

Gräble M, Hearing P (1992): Cis and trans requirements for the selective packaging of adenovirus type 5 DNA. J Virol 66(2): 723-731

Graham FL, Prevec L (1991): Manipulation of adenovirus vectors. In: Walker JM, Murray EJ (ed) Methods in Molecular Biology 7. New Jersey, The Humana Press Clifton S 109-128

Graham FL, Prevec L (1995): Methods for construction of adenovirus vectors. Mol Biotechnol 3(3): 207-220

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36(1): 59-74

Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A (1996): The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. EMBO J 15(8): 1766-1777

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, *et al.* (1991): Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. Cell 66(3): 589-600

Grothey A, Kellermann L, Schmoll HJ (2002): Defizite in der Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom in Deutschland. Med Klinik 97(5): 270-277

Günzburg WH, Salmons B (1997): Gentransfer in Säugetierzellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Gupta VK, Park JO, Kurihara T, Koons A, Mauceri HJ, Jaskowiak NT, Kufe DW, Weichselbaum RR, Posner MC (2003): Selective gene expression using a DF3/MUC1 promoter in a human esophageal adenocarcinoma model. Gen Ther 10(3): 206-212

Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166(4): 557-580

Hanski C, Stole B, Riecken EO (1992): Tumorigenicity, mucin production and AM-3 epitope expression in clones selected from the HT-29 colon carcinoma cell line. Int J Cancer 50(6): 924-929

Hayashi S, Emi N, Yokoyama I, Uchida K, Takagi H (1997): Effect of gene therapy with the herpes simplex virus-thymidine kinase gene on hepatic metastasis in murine colon cancer. Surg Today 27(1): 40-43

Hearing P, Samulski RJ, Wishart WL, Shenk T (1987): Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. J Virol 61(8): 2555-2558

Hearing P, Shenk T (1983): The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. Cell 33(3): 695-703

Herz J, Gerard RD (1993): Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. Proc Natl Acad Sci USA 90(7): 2812-2816

Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myohanen S, Paakkonen M, Marin S, Kosma VM, Janne J (1997): Hypermethylation of the APC (Adenomatous Polyposis Coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. Int J Cancer 70(6): 644-648

Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS (1993): Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res 53(3): 641-651

Hodge DL, Martinez A, Julias JG, Taylor LS, Young HA (2002): Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. Mol Cell Biol 22(6): 1742-1753

Huard J, Lochmuller H, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpati G (1995): The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. Gene Ther 2(2): 107-115

Huber BE, Austin EA, Good SS, Knick VC, Tibbels S, Richards CA (1993): In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine desaminase. Cancer Res 53(19): 4619-4626

Imler JL, Dupuit F, Chartier C, Accart N, Dieterle A, Schultz H, Puchelle E, Pavirani A (1996): Targeting cell-specific gene expression with an adenovirus vector containing the lacZ gene under the control of the CFTR promoter. Gene Ther 3(1): 49-58

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan MA, Shibata D, Perucho M (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363(6429): 558-561

Ishizuka D, Shirai Y, Sakai Y, Hatakeyama K (2001): Colorectal carcinoma liver metastases: clinical significance of preoperative measurement of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels. Int J Colorectal Dis 16(1): 32-37

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun MJ (2002): Cancer statistics, 2002. CA Cancer Clin 52(1): 23-47

Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM (1996): Transfection mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucleic Acids Res 24(4): 596-601

Kagawa S, Pearson SA, Ji L, Xu K, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B (2000): A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene bax. Gene Ther 7(1): 75-79

Kakidani H, Ptashne M (1988): GAL4 activates gene expression in mammalian cells. Cell 52(2): 161-167

Kim JC, Gong G, Roh SA, Park KC (1999): Carcinoembryonic antigen gene and carcinoembryonic antigen expression in the liver metastasis of colorectal carcinoma. Mol Cells 9(2): 133-137

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989): Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J Exp Med 170(3): 827-846

Köhne CH, Kretzschmar A, Wils J (1998): First-Line Chemotherapy for Colorectal Carcinoma – We are Making Progress. Onkologie 21: 280-289

Kovarik A, Peat N, Wilson D, Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J (1993): Analysis of the Tissue-specific Promoter of the MUC1 Gene. J Biol Chem 268(13): 9917-9926

Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G (1994): Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. J Exp Med 180(1): 211-222

Kwong KY, Zou Y, Day CP, Hung MC (2002): The suppression of colon cancer cell growth in nude mice by targeting  $\beta$ -catenin/TCF pathway. Oncogene 21(54): 8340-8346

Lafreniere R, Rosenberg SA (1986): A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastases in a murine model. J Natl Cancer Inst 76(2): 309-322

Larregina AT, Morelli AE, Dewey RA, Castro MG, Fontana A, Lowenstein PR (1998): FasL induces Fas/Apo1-mediated apoptosis in human embryonic kidney 293 cells routinely used to generate E1-deleted adenoviral vectors. Gene Ther 5(4): 563-568

Latham JP, Searle PF, Mautner V, James ND (2000): Prostate-specific antigen promoter/enhancer driven gene therapy for prostate cancer: construction and testing of a tissue-specific adenovirus vector. Cancer Res 60(2): 334-341

Lee SC, Wu JW, Wu PY, Huan YL, Wu CW, Tao MH (2003): Inhibition of Established Subcutaneous and Metastatic Murine Tumors by Intramuscular Electroporation of the Interleukin-12 Gene. J Biomed Sci 10(1): 1265-1276

Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB III, McCoy CE, Mazur KC, Mabry NO (1976): Classification of human colorectal cell lines. Cancer Res 36(12): 4562-4569

Li A, Goto M, Horinouchi M, Tanaka S, Imai K, Kim YS, Sato E, Yonezawa S (2001): Expression of MUC1 and MUC2 mucins and relationship with cell proliferative activity in human colorectal neoplasia. Pathol Int 51(11): 853-860

Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP, Wang Z, Hsieh JT (1999): Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. Cancer Res 59(2): 325-330

Lieschke GJ, Rao PK, Gately MK, Mulligan RC (1997): Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. Nat Biotechnol 15(1): 35-40

Lin YS, Carey M, Ptashne M, Green MR (1990): How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously. Nature 345(6273): 359-361 Lipinski KS, Djeha AH, Ismail T, Mountain A, Young LS, Wrighton CJ (2001): Highlevel, beta-catenin/TCF-dependent transgene expression in secondary colorectal cancer tissue. Mol Ther 4(4): 365-371

Lorenzi M, Vindigni C, Minacci C, Tripodi SA, Iroatulam A, Petrioli R, Francini G (1997): Histopathological and prognostic evaluation of immunohistochemical findings in colorectal cancer. Int J Biol Markers 12(2): 68-74

Ma J, Przibilla E, Hu J, Bogorad L, Ptashne M (1988): Yeast activators stimulate plant gene expression. Nature 334(6183): 631-633

Mackensen A, Lindemann A, Mertelsmann R (1997): Immunostimulatory cytokines in somatic cells and gene therapy of cancer. Cytokine Growth Factor Rev 8(2): 119-128

Mannino RJ, Gould-Fogerite S (1988): Liposome mediated gene transfer. Biotechniques 6(7): 682-690

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan R, Zborowska E, Kinzler K, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 268(5215): 1336-1338

Maron DJ, Tada H, Moscioni AD, Tazelaar J, Fraker DL, Wilson JM, Spitz FR (2001): Intra-arterial delivery of a recombinant adenovirus does not increase gene transfer to tumor cells in a rat model of metastatic colorectal carcinoma. Mol Ther 4(1): 29-35

Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Chen L, Chen SH (2000): Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. J Natl Cancer Inst 92(11): 931-936

Mathias P, Galleno M, Nemerow GR (1998): Interactions of soluble recombinant integrin  $\alpha\nu\beta5$  with human adenoviruses. J Virol 72(11): 8669-8675

Matsuda K, Masaki T, Watanabe T, Kitayama J, Nagawa H, Muto T, Ajioka Y (2000): Clinical significance of MUC1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma. Jpn J Clin Oncol 30(2): 89-94

Matthews DA, Cummings D, Evelegh C, Graham FL, Prevec L (1999): Development and use of a 293 cell line expressing lac repressor for the rescue of recombinant adenoviruses expressing high levels of rabies virus glycoprotein. J Gen Virol 80(Pt 2): 345-353

Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E, Germann T (1993): The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. Eur J Immunol 23(9): 2202-2208

Mazzolini G, Narvaiza I, Bustos M, Duarte M, Tirapu I, Bilbao R, Qian C, Prieto J, Melero I (2001):  $\alpha\nu\beta$ 3 Integrin-Mediated Adenoviral Transfer of Interleukin-12 at the Periphery of Hepatic Colon Cancer Metastases Induces VCAM-1 Expression and T-Cell Recruitment. Mol Ther 3(5): 665-672

McCormick F (2000): ONYX-015 selectivity and the p14ARF pathway. Oncogene 19(56): 6670-6672

Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK (2001): Structural organization and classification of the human mucin genes. Front Biosci 6: D1192-1206

Moolten FL (1986): Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinasegenes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res 46(10): 5276-5281

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kuzler KW (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 275(5307): 1787-1790

Murphy FJ, Hayes MP, Burd PR (2000): Disparate Intracellular Processing of Human IL-12 Preprotein Subunits: Atypical Processing of the p35 Signal Peptide. J Immunol 164(2): 839-847 Nakahira M, Ahn HJ, Park WR, Gao P, Tomura M, Park CS, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H (2002): Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. J Immunol 168(3): 1146-1153

Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, Duarte M, Zaratiegui M, Qian C, Melero I, Prieto J (2000): Intratumoral Coinjection of Two Adenoviruses, One Encoding the Chemokine IFN-g-Inducible Protein-10 and Another Encoding IL-12, Results in Marked Antitumoral Synergy. J Immunol 164(6): 3112-3122

Nasto B (2002): Questions about Systemic Adenovirus Delivery. Mol Ther 5(6): 652-653

Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G, Maples P, Netto G, Tong A, Randlev B, Olson S, Kirn D (2001): Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. Gene Ther 8(10): 746-759

Nevins JR (1981): Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1 A gene product. Cell 26(2 Pt 2): 213-220

Ochsenbein AF (2002): Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. Cancer Gene Ther 9(12): 1043-1055

Ooi LP, Crawford DH, Gotley DC, Clouston AD, Strong RW, Gobe GC, Halliday JW, Bridle KR, Ramm GA (1997): Evidence that "myofibroblast-like" cells are the cellular source of capsular collagen in hepatocellular carcinoma. J Hepatol 26(4): 798-807

Pearson B, Wolf PL, Vazquez J (1963): A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize  $\beta$ -galactosidase in tissues. Lab Invest 12: 1249-1259

Pham-Nguyen KB, Yang W, Saxena R, Thung SN, Woo SL, Chen SH (1999): Role of NK and T cells in IL-12-induced anti-tumor response against hepatic colon carcinoma. Int J Cancer 81(5): 813-819

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature 359(6392): 235-237

Qian C, Idoate M, Bilbao R, Sangro B, Bruna O, Vazquez J, Prieto J (1997): Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. Hum Gene Ther 8(3): 349-358

Qiao J, Chen SH, Pham-Nguyen KB, Mandeli J, Woo SL (1999): Construction and characterization of a recombinant adenoviral vector expressing human interleukin-12. Cancer Gene Ther 6(4): 373-379

Qiao J, Doubrovin M, Sauter BV, Huang Y, Guo ZS, Balatoni J, Akhurst T, Blasberg RG, Tjuvajev JG, Chen SH, Woo SL (2002): Tumor-specific transcriptional targeting of suicide gene therapy. Gene Ther 9(3): 168-175

Rao L, Perez D, White E (1996): Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. J Cell Biol 135(6 Pt 1): 1441-1455

Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Andrews J, Romel L, Hatfield M, Rubin J, Kirn D (2001): Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. Gene Ther 8(21): 1618-1626

Rekosh, DM, Russell, WC, Bellet, AJ, Robinson, AJ (1977): Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. Cell 11(2): 283-295

Reynolds PN, Nicklin SA, Kaliberova L, Boatman BG, Grizzle WE, Balyasnikova IV, Baker AH, Danilov SM, Curiel DT (2001): Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression in vivo. Nat Biotech 19(9): 838-842

Richardson CC, Schildkraut CL, Aposhian HV, Kornberg A (1964): Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XIV: Further purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase of Escherichia coli. J Biol Chem 239: 222-232

Ring CJ, Harris JD, Hurst HC, Lemoine NR (1996): Suicide gene expression induced in tumour cells transduced with recombinant adenoviral, retroviral and plasmid vectors containing the ERBB2 promotor. Gene Ther 3(12): 1094-1103

Rowitch DH, St.-Jacques B, Lee SMK, Flax JD, Snyder EY, McMahon AP (1999): Sonic hedgehog Regulates Proliferation and Inhibits Differentiation of CNS Precursor Cells. J Neurosci 19(20): 8954-8965

Rubin J, Galanis E, Pitot HC, Richardson RL, Burch PA, Charboneau JW, Reading CC, Lewis BD, Stahl S, Akporiaye ET, Harris DT (1997): Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. Gene Ther 4(5): 419-425

Rubinchik S, Lowe S, Jia Z, Norris J, Dong J (2001a): Creation of a new transgene cloning site near the right ITR of Ad5 results in reduced enhancer interference with tissue-specific and regulatable promoters. Gene Ther 8(3): 247-253

Rubinchik S, Wang D, Yu H, Fan F, Luo M, Norris JS, Dong JY (2001b): A Complex Adenovirus Vector That Delivers FASL–GFP with Combined Prostate-Specific and Tetracycline-Regulated Expression. Mol Ther 4(5): 416-426

Sadowski I, Bell B, Broad P, Hollis M (1992): GAL4 fusion vectors for expression in yeast or mammalian cells. Gene 118(1): 137-141

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988): GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. Nature 335(6190): 563-564

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74(12): 5463-5467

Sarnow P, Hearing P, Anderson CW, Halbert DN, Shenk T, Levine AJ (1984): Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. J Virol 49(3): 692-700

Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D (1993): Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. BMJ 306(6880): 752-755

Schmidt EV, Christoph G, Zeller R, Leder P (1990): The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. Mol Cell Biol 10(8): 4406-4411

Sears HF, Atkinson B, Mattis J, Ernst C, Herlyn D, Steplewski Z, Hayry P, Koprowski H (1982): Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. Lancet 1(8275): 762-765

SEER Cancer Statistics Review, 1973-1998

Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G (1996): Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. Blood 87(9): 3877-3882

Shayakhmetov DM, Li Z-Y, Ni S, Lieber A (2002): Targeting of Adenovirus Vectors to Tumor Cells Does Not Enable Efficient Transduction of Breast Cancer Metastases. Cancer Res 62(4): 1063-1068

Shi Q, Wang Y, Worton R (1997): Modulation of the specificity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector. Hum Gene Ther 8(4): 403-410

Shirakawa T, Ko SC, Gardner TA, Cheon J, Miyamoto T, Gotoh A, Chung LW, Kao C (1998): In vivo suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis with intravenous osteocalcin promoter-based toxic gene therapy. Cancer Gene Ther 5(5): 274-280

Shively JE, Beatty JD (1985): CEA-related antigens: molecular biology and clinical significance. Crit Rev Oncol Hematol 2(4): 355-399

Souza RF, Lei J, Yin J, Appel R, Zou TT, Zhou X, Wang S, Rhyu MG, Cymes K, Chan O, Park WS, Krasna MJ, Greenwald BD, Cottrell J, Abraham JM, Simms L, Leggett B, Young J, Harpaz N, Meltzer SJ (1997): A transforming growth factor beta 1 receptor type II mutation in ulcerative colitis associated neoplasms. Gastroenterology 112(1): 40-45

Spicer AP, Parry G, Patton S, Gendler SJ (1991): Molecular Cloning and Analysis of the Mouse Homologue of the Tumor-associated Mucin, MUC1, Reveals Conservation of Potential O-Glycosylation Sites, Transmembrane, and Cytoplasmic Domains and a Loss of Minisatellite-like Polymorphism. J Biol Chem 266(23): 15099-15109

Steinwaerder DS, Lieber A (2000): Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 7(7): 556-567

Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM (1993): Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron micros-copy. EMBO J 12(7): 2589-2599

Sung MW, Yeh HC, Thung SN, Schwartz ME, Mandeli JP, Chen SH, Woo SL (2001): Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. Mol Ther 4(3): 182-191

Tamm I, Schumacher A, Karawajew L, Ruppert V, Arnold W, Nussler AK, Neuhaus P, Dorken B, Wolff G (2002): Adenovirus-mediated gene transfer of P16INK4/CDKN2 into bax-negative colon cancer cells induces apoptosis and tumor regression in vivo. Cancer Gene Ther 9(8): 641-650

Tamura T, Nishi T, Goto T, Takeshima H, Dev SB, Ushio Y, Sakata T (2001): Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer. Hum Gene Ther 12(10): 1265-1276

Teh JG, Mckenzie IF (1990): Monoclonal antibodies to carcino-embryonic antigen. Immunol Cell Biol 68(Pt 4): 263-268 Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B (1996): Evaluation of candidate tumor suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. Nat Genet 13(3): 343-346

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH Jr, O'Connell MJ (1998): Microsatellite instability in colorectal cancer: Different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. Cancer Res 58(8): 1713-1718

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA (2003): Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nature Rev 4(5): 346-358

Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS (1996): The E3-11.6kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. Virology 220(1): 152-162

Tomko RP, Johansson CB, Totrov M, Abagyan R, Frisen J, Philipson L (2000): Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. Exp Cell Res 255(1): 47-55

Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL (1988): Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. Genes Dev 2(6): 718-729

Trinchieri G (2003): Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol 3(2): 133-146

Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischer E, Rutter WJ, Goodman HM (1977): Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. Science 196(4296): 1313-1319

Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegel WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P; Xeloda Colorectal Cancer Study Group (2001): Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. J Clin Oncol 19(21): 4097-4106

Van de Wiel-van Kemenade E, Ligtenberg MJ, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL, Melief CJ, Hilkens J, Figdor CG (1993): Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocytetarget cell interaction. J Immunol 151(2): 767-776

Van der Eb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FHE, van Krieken JHJM, van der Eb AJ, Borel Rinkes IHM, van de Velde CJH, Hoeben RC (1998): Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. Gene Ther 5(4): 451-458

Van Etten B, ten Hagen TL, de-Vries MR, Ambagtsheer G, Huet T, Eggermont AM (2002): Prerequisites for effective adenovirus mediated gene therapy of colorectal liver metastases in the rat using an intracellular neutralizing antibody fragment to p21-Ras. Br J Cancer 86(3): 436-442

Vandenhaute B, Buisine MP, Debailleul V, Clement B, Moniaux N, Dieu MC, Degand P, Porchet N, Aubert JP (1997): Mucin gene expression in biliary epithelial cells. J Hepatol 27(6): 1057-1066

Varda-Bloom N, Shaish A, Gonen A, Levanon K, Greenbereger S, Ferber S, Levkovitz H, Castel D, Goldberg I, Afek A, Kopolovitc Y, Harats D (2001): Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. Gene Ther 8(11): 819-827

Vassaux G, Hurst HC, Lemoine NR (1999): Insulation of a conditionally expressed transgene in an adenoviral vector. Gene Ther 6(6): 1192-1197

Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP (1995): Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. J Immunol May 154(9): 4685-4692

Wang Y, O'Malley BW Jr, Tsai SY, O'Malley BW (1994): A regulatory system for use in gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 91(17): 8180-8184

Waring MJ (1965): Complex formation between ethidium bromide and nucleic acid. J Mol Biol 13(1): 269-282

Webster N, Jin JR, Green S, Hollis M, Chambon P (1988): The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 transactivator. Cell 52(2): 169-178

Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC, (1968): Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4. J Biol Chem 243(17): 4543-4555

Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J (1995): Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. J Cell Biol 129(1):255-265

Wickham TJ (2000): Targeting adenovirus. Gene Ther 7(2): 110-114

Wold WSM, Gooding LR (1991): Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interaction. Virology 184(1): 1-9

Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG (1997): Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. Hum Gene Ther 8(1): 37-44

Ychou M, Pelegrin A, Faurous P, Robert B, Saccavini J, Guerreau D, Rossi J, Fabbro M, Buchegger F, Mach J, Artus J (1998): Phase-I/II radio-immunotherapy study with lodine-131- labeled anti-CEA monoclonal antibody F6 F(ab')2 in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer. Int J Cancer 75(4): 615-619.

Zaretsky JZ, Sarid R, Aylon Y, Mittelman LA, Wreschner DH, Keydar I (1999): Analysis of the promoter of the MUC1 gene overexpressed in breast cancer. FEBS Letters 461(3): 189-195 Zhang K, Sikut R, Hansson GC (1997): A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells. Cell Immunol 176(2): 158-165

Zhang WW, Fang X, Branche CD, Mazur W, French BA, Roth JA (1993): Generation and Identification of Recombinant Adenovirus by Liposome-Mediated Transfection and PCR Analysis. Biotechniques 15(5): 868-872

# 8 Anhang

## 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ad.	Adenovirus
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
A. hepatica	Arteria hepatica
Amp.	Ampicillinresistenz
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
binSyst.	binäres System
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
С°	Grad Celsius
ca.	circa
Ca15-3	Karzinomantigen 15-3
CA-Rezeptor	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CAT	Gen der Chloramphenicoltransferase
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	copy DNS
CEA	Carcinoembryonales Antigen
СНО	Chinese Hamster Ovary
CPE	zytopathischer Effekt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DF3/MUC1	humaner DF3/Muzin1 Promotor
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMRIE-DOPE	(±)-N-(2-Hydroxyethyl)-N,N-Dimethyl-2,3-bis(Tetradecyloxy)-1-
	Propanaminiumbromid / Dioleoylphosphatidylethanolamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5-triphosphat

DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERBB2	v-erb-b2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Ho-
	molog 2
et al.	et alii
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Gauge
Gal4-VP16	amplifizierendes Fusionsprotein aus der Gal4 DNS-Bindungs-
	domäne und der VP16 Transkriptionsaktivierungsdomäne
β-Gal	beta-Galaktosidase
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyten-Magrophage-Koloniestimulierender Faktor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HLA-B7	humanes Lymphozytenantigen B7
i.v.	intra venös
IFN-γ	Interferon gamma
lgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
I	Liter
Log	Logarithmus
Luc	Gen der Firefly-Luciferase
Μ	Mol
m.o.i.	Multiplicity of Infection
MHC	Major Histocompatibility Complex
-----------	--------------------------------------------------------------
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNS	messanger Ribonukleinsäure
mscIL-12	murines single-chain Interleukin-12
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
Ν	Normalität
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
р	piko, Plasmid
pА	siehe polyA
p.A.	pro analysis
pAd.	adenovirales Expressionsplasmid
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pfu	Plaque Forming Units
рН	negativer dekadischer Log. der H <sup>+</sup> -Konzentration
p.i.	post injectionem
polyA	Polyadenylierungssignal
PSA	Prostataspezifisches Antigen
q	kurzer Arm eines Chromosoms
Red2	Red Fluorescent Protein 2
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

S2	Sicherheitsstufe 2
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SS	einzelsträngig
SV40	Simian Virus 40
TBE	Trisbase-Borsäure-Ethylendiamin-Tetraessigsäure
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/w	Volumen/Gewicht
w/o	ohne
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Bezugsquellenverzeichnis

Abcam, Cambridge, MA, USA über Acris, Bad Nauheim, Deutschland A&D Instruments, Karlsruhe, Deutschland Amersham International, Amersham, Grossbritannien American Tissue Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA Applied Biosystems, Foster City, CA, USA Beckman-Coulter, München, Deutschland Becton Dickinson, Sparks, MD, USA Bio-Rad, München, Deutschland Boehringer-Roche, Mannheim, Deutschland BioZym, Hess. Oldendorf, Deutschland Braun Diessel Biotech International, Melsungen, Deutschland Cenco, Breda, Holland Charles River, Wilmington, MA Clontech, Heidelberg, Deutschland DCS, Hamburg, Deutschland EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland Ethicon, Hamburg, Deutschland Fluka, Ulm, Deutschland Gerbu, Gaiberg, Deutschland GFL, Burgwedel, Deutschland Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland Gilson, Middleton, WI, USA GraphPad, San Diego,CA, USA Greiner, Frickenhausen, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland Hund, Wetzler, Deutschland Hybaid, Ashford, England Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland J. T. Baker, Deventer, Niederlande Köttermann, Uetze, Deutschland

Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Milipore, Eschborn, Deutschland MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland Nalge Nunc, Wiesbaden-Biebrecht, Deutschland Nalgene, Rochester, NY, USA New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Deutschland Pharmingen, San Diego, CA, USA über Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Pierce, Rockford, IL, USA über KMF, St. Augustin, Deutschland Promega, Mannheim, Deutschland Qualilab, Olivet, Frankreich Qiagen, Hilden, Deutschland R&D Systems, Minneapolis, MN, USA Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland Soft Gene, Berlin, Deutschland Stratagene, Heidelberg, Deutschland Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland Wolf, Geislingen, Deutschland WTW, Weilheim, Deutschland

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas de Weerth aus der Medizinischen Kernklinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für seine Bereitschaft die Funktion des Doktorvaters für die vorliegende Arbeit zu übernehmen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Block aus der Medizinischen Kernklinik und Poliklinik I, der mir bei der Durchführung der Versuche, bei Fragen und Problemen jederzeit hilfreich zur Seite stand. Ich danke ihm für die außerordentliche Betreuung und Unterstützung, die ständig gewährte Diskussionsbereitschaft, sein förderndes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die wertvollen Ratschläge, Ideen und Denkanstöße während der gesamten Promotionsphase.

Des Weiteren danke ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Schäfer aus dem Institut für Pathologie und Frau Schmidt für die freundliche Durchführung der histologischen Untersuchungen sowie Herrn Dr. Peter Nollau aus dem Institut für Klinische Chemie und Herrn Dr. rer. nat. Frank Schnieders aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Weiter möchte ich mich herzlich bei dem gesamten Labor für Gentherapie und Endokrinologie der Medizinischen Kernklinik I für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt Seda Cinar, Henning Lange, Jürgen Müller, Henning Ortlepp, Doris Pankoke und Susan Starke. Besonders bedanken möchte ich mich bei Florian Puls, Holger Wulff und Dragan Milasiniovic für die vielen guten Tipps und anregenden Diskussionen in Bezug auf die Durchführung meiner Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung mein Studium und die Promotion wohl kaum möglich gewesen wären sowie bei meiner Freundin Nadja für die moralische Unterstützung bei der Ausarbeitung des Manuskripts.

## 10 Lebenslauf

Name:	Philipp Breuch
Anschrift:	Liethberg 4, 22529 Hamburg
Geburtsdatum/-ort:	17. September 1977, Hamburg
Staatsbürgerschaft:	deutsch
Familienstatus:	ledig
Eltern:	Heinrich Breuch, Oberstudiendirektor a. D. Ingrid Breuch, geb. Türmer, Lehrerin
Geschwister:	Bruder (28)
Schullaufbahn:	Sept. 1984 – Juli 1988 Grundschule Strenge, Hamburg Aug. 1988 – Juni 1997 Gymnasium Grootmoor, Hamburg
Zivildienst:	Aug. 1997 – Aug. 1998 Wirtschaftsgymnasium City Nord, Betreuung von behinderten Schülerinnen und Schüler
Studium:	Okt. 1998 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universi- tät Hamburg Sept. 2000 Ärztliche Vorprüfung, <i>Note: 1</i> Aug. 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, <i>Note: 1</i> März 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, <i>Note: 2</i> April 2004 Hochschulwechsel an die TU Dresden April 2004 – April 2005 Praktisches Jahr an der Medizini- schen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden
Famulaturen:	1 Monat Innere Medizin – AK Eilbek Hamburg 1 Monat Radiologie – Uniklinik Hamburg-Eppendorf 1 Monat Neurologie – Uniklinik Hamburg-Eppendorf 1 Monat Unfallchirurgie – Uniklinik Hamburg-Eppendorf
Publikationen:	Block A, <b>Breuch P</b> , Milasinovic D, Schäfer HJ, Ameis D, Gre- ten H (2004): Efficient, muc1-specific gene expression in he- patic metastasis of colorectal cancer after systemic ad- ministration of adenoviral vectors utilizing a binary system. Digestive Disease Week in New Orleans 1520. Mai 2004 Abstract ID: 103569

Hamburg, den 01.04.2004