

Aus dem Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie  
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Leiter: Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

**Adenovirale Gentherapie von Xenotransplantaten der Nacktmaus:  
Implementierung einer Methode zur intratumoralen Mikroinjektion  
und Bestimmung der transgenen Transfektionseffizienz in  
Abhängigkeit der zellulären CAR-Expression**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin  
aus dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Günther Martin Bohlen  
aus  
Leer/Ostfriesland

Hamburg, 2006

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

**„Die Wahrheit ist nackt am schönsten und der  
Eindruck den sie macht, um so tiefer,  
als ihr Ausdruck einfacher war.“**

Arthur Schopenhauer  
(1788-1860)

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1. Gentherapie.....	7
1.2. Vektoren in der Gentherapie.....	8
1.3. Die Bedeutung der intratumoralen Injektion im Rahmen der Gentherapie	11
1.4. Zielsetzung.....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1. Verwendete Zelllinien.....	14
2.1.1. Bedingungen der Zellkultur.....	14
2.1.2. Etablierung von Xenotransplantaten.....	14
2.2. Tumor-Wirt-System.....	15
2.2.1. Versuchstiere.....	15
2.2.2. Tumoren.....	15
2.2.2.1. Transplantationen.....	15
2.2.2.2. Bestimmung des Tumolvolumens.....	16
2.3. Quantifizierung mittels Durchflußzytometrie.....	16
2.4. Immunhistochemischer Nachweis der Expression des Coxsackie- und Adenovirus Rezeptor(CAR).....	17
2.5. Bestimmung der tumoralen Transfektionseffizienz in vivo.....	18
2.5.1. Intratumorale Injektion.....	18
2.5.1.1. Das Mikroinjektionssystem MAGD.....	18
2.5.1.2. Prozedere der intratumoralen Injektion mittels MAGD.....	23
2.6. Darstellung des Tumoringektionserfolges mit Hilfe der Magnetresonanztomographie.....	25
2.6.1. Prozedere der MRT-Aufnahme.....	25
2.6.2. Methodische Vorversuche.....	26
2.6.2.1. Bestimmung der optimalen Kontrastmittelkonzentration.....	26
2.6.2.2. Bestimmung des optimalen Injektionsvolumens für die intratumorale Mikroinjektion.....	28
2.6.2.3. Auswertung der MRT-Bilder.....	31
2.6.2.4. Bestimmung der optimalen Tumorgröße für die intratumorale Mikroinjektion.....	31
2.7. Quantifizierung der tumoralen Transfektionseffizienz in vivo.....	35

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1. Vergleich der adenoviralen Transfektionseffizienz verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien in vitro.....	36
3.2. Vergleich der GFP-Expression verschiedener Plattenepithel- karzinomzelllinien nach intratumoraler AdV-Infektion mittels MAGD.....	42
3.3. Immunhistochemische Bestimmung der Expression der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptors (CAR) der verschiedenen Zelllinien.....	45
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1. Intratumorale Injektion unter Verwendung des Mikroinjektionssystems MAGD.....	51
4.2. Vergleichende Untersuchung der adenoviralen Transfektionseffizienz unterschiedlicher Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs.....	53
4.3. Die Bedeutung des Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptors (CAR) für die adenovirale Transfektion.....	54
4.4. Mögliche Lösungen der Problematik niedriger Transfektionsraten bei der adenoviralen Gentherapie.....	57
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>58</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Anhang: experimentelle Protokolle.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>74</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>75</b>
<b>10. Erklärung.....</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AdV-eGFP	eGFP tragender Adenovirus
CAR	Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DA	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fe	Eisen
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	Green Fluorescent Protein
Hcl	Chlorwasserstoff
HIV	Human Immunodeficiency Virus
K	Kilo
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
MAGD	Microinjektionssystem for adenoviral gene delivery
MEM	minimal essential medium
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOI	multiplicity of infektion
MRT	Magnetresonanztomographie
MuLV	Murine Leukaemia Virus
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxid
T	Tesla
Tse	turbo spin echo-Sequenz
µl	Mikroliter
µl/min	Mikroliter pro Minute
µm	Mikrometer

# **1. Einleitung**

## **1.1. Gentherapie**

Gentherapie bedeutet im allgemeinen die Einschleusung eines oder mehrerer Fremdgene in den Organismus mit therapeutischem Nutzen für das Individuum. Somatische Gentherapie hat zum Ziel, vererbte oder erworbene genetisch determinierte Erkrankungen durch das Einbringen von gesunden Genen in bestimmte Zielzellen des Körpers zu heilen. Das Konzept der Gentherapie entstand aus der initialen Beobachtung, dass bestimmte Erkrankungen durch einzelne, dysfunktionelle Gene entstehen. Diese monogenetischen Erkrankungen sind theoretisch durch die Insertion und Expression einer normalen Kopie des mutierten oder deletierten Gens in somatischen Zellen heilbar. 1990 wurde weltweit die erste gentherapeutische Behandlung der monogenetischen SCID (Severe Combined Immunodeficiency) durchgeführt und stellte den Beginn gentherapeutischer Verfahren auch in klinischen Ansätzen dar.

Aus diesen Ursprüngen ist die Gentherapie polygenetischer Erkrankungen wie z.B. die Therapie maligner Tumoren hervorgegangen. Maligne Erkrankungen bieten eine Reihe von gentherapeutischen Ansatzpunkten. Die Steigerung der Immunogenität eines Tumors, die Einschleusung eines Suizid-Gens oder die Reexpression eines verlorenen Gens der Zell-Zyklus-Kontrolle sind nur einige Beispiele für solche gentherapeutische Ansätze bei der Behandlung von Tumoren (Galanis and Russell, 2001). Ein weiterer Grund ist die nur transient notwendige Expression des therapeutischen Gens in der Tumorthherapie im Gegensatz zur möglichst lebenslangen Expression einer funktionellen Kopie bei monogenetischen Erkrankungen (Roth and Christiano, 1997; Anklesaria, 2000).

Desweiteren stellen die Krebserkrankungen eine zunehmende Majorität in der Morbidität westlicher Gesellschaften dar. Bösartige Tumore sind in Deutschland nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Schmoll, 1996). Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Krebstodesursache bei Männern (Herold, 2005). In Deutschland erkrankten im Jahr 2000 bundesweit im Jahr 394.700 Personen an einer Krebserkrankung. Das mittlere Erkrankungsalter für eine maligne Erkrankung liegt bei 66 Jahren für Männer und bei 67 Jahren für Frauen. Insgesamt verstarben im Jahr 2000 in Deutschland 209.184 Personen an Krebs (Krebsregister des Robert-Koch-

Instituts, 2004). Anhand dieser Zahlen wird die Bedeutung der Behandlung maligner Tumoren deutlich. Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie stellen die drei wichtigsten Säulen der Therapie maligner Tumore dar. Als innovatives Konzept in der onkologischen Therapie wird die Gentherapie im Rahmen von experimentellen und klinischen Studien durchgeführt.

## **1.2. Vektoren in der Gentherapie**

Als Vehikel für einen Gentransfer werden zurzeit virale und nicht virale Vektoren eingesetzt. Ist die Entscheidung für einen der in Frage kommenden Vektoren getroffen, gibt es zwei Möglichkeiten der weiteren Vorgehensweise: die ex vivo-Therapie, bei der dem Patienten die eigenen Zellen entnommen werden, um sie nach der Behandlung mit Vektoren zu reimplantieren, und die in vivo-Therapie, die eine direkte Applikation der Vektoren beim Patienten erfordert. Da Viren die biologische Eigenschaft besitzen, ihr Genmaterial in Fremdorganismen einzuschleusen, lag es nahe, sie als Vektoren einzusetzen, wobei für die gentherapeutische Anwendung generell die folgenden Virustypen Verwendung finden: Retroviren, Lentiviren, AAV und Adenoviren. Retroviren wie MuLV (Murine Leukaemia Virus) werden ca. in 60 % aller klinischen Studien eingesetzt. Sie transferieren Gene zum Wirtsgenom und ermöglichen so eine stabile Genexpression. Allerdings können Retroviren nur Genmaterial in eine sich teilende Zelle transduzieren. Da innerhalb eines Tumors nicht alle Zellen sich in Teilung befinden werden, werden andere virale Vektoren benötigt, die unabhängig vom Prozess der Zellteilung wirken. Einen solchen Vektor stellen die Lentiviren dar. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist HIV (Human Immunodeficiency Virus). Der Gentransfer mit Hilfe von HIV kann sowohl in sich teilenden als auch in ruhenden Zellen erfolgen. Dabei beobachtet man eine längere Expressionsdauer des transduzierten Genmaterials als bei einem Gentransfer durch andere Retroviren. Jedoch wird diskutiert, dass Lentiviren wie HIV auf das Wirtsgenom einen mutagenen Effekt ausüben könnten, der seinerseits zu einer Malignombildung führen kann.

Als weitere Virusgruppe in der Gentherapie sind die sogenannten AAV (Adeno-assoziierte Viren) zu nennen. Diese sind nicht pathogene Einzelstrang-DNA-Viren, die zur eigenen Replikation Helferviren benötigen. AAV-Vektoren transduzieren sowohl proliferierende wie ruhende Zellen und führen zu einer stabilen Expression der übertragenen Gene. Auf Grund fehlender Pathogenität

gelten sie als sichere Vektoren. Jedoch können AAV-Vektoren nur Gene in der Größe von 3,5 bis 5,0 Kilobasen übertragen. Ein weiterer Nachteil ist die weit verbreitete Antikörperpräsenz in der Bevölkerung. So besitzen etwa 80 % aller Erwachsenen Antikörper gegen AAV (Verma und Somia, 1997; Kay et al., 1997; Anderson, 1998).

Eine der wichtigsten Klassen der in der Gentherapie eingesetzten Viren sind die Adenoviren. Der Adenovirus ist ein DNA-Virus, der die oberen Atemwege infiziert und einen natürlichen Tropismus für das Epithel der oberen Atemwege, die Hornhaut des menschlichen Auges sowie den Gastrointestinaltrakt hat (Brody et al., 1994). Bei Adenoviren handelt es sich um nicht-behüllte DNA-Viren. Ihr Capsid besteht aus einem icosaedrischen Protein, aus dem Proteinfibrillen nach außen hinausragen. Am Ende dieser Fibrillen befindet sich C-terminal eine Kopf-Domäne, die für die Bindung an seinen zellulären Rezeptor verantwortlich ist (Bergelson et al., 1997; Bewley et al. 1999; Roelvink et al., 1999). Die Aufnahme des Virus in die Zelle wird durch rezeptorvermittelte Endozytose vermittelt (Greber et al., 1993). In diesem Zusammenhang wurde ein 46-kDa großes, membranständiges Protein identifiziert, welches als Bindungspartner für Adenoviren sowie für Coxsackie B-Viren dient und entsprechend mit der Kurzbezeichnung CAR benannt wurde (Bergelson et al., 1997). Die rezeptorgebundenen Viren werden über Integrine eingeschleust und über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Leopold et al., 2000).

Für die gentherapeutische Anwendung werden rekombinante, aus dem Adenovirus 5 abgeleitete Viren verwendet. Im Gegensatz zu Retroviren, deren Tropismus auf sich teilende Zellen beschränkt ist, können Adenoviren ein breites Spektrum von Zellen infizieren, die Zellteilung stellt keine Bedingung zur Infektion dar. Die Effektivität der Infektion ist hoch, doch wird die transfizierte DNA meist nicht in das Genom der Wirtszelle integriert und somit werden die transfizierten Gene nur für eine beschränkte Zeitdauer exprimiert. In der Zellkultur wird ein Maximum der Expression transfizierter Gene nach 2-4 Tagen erreicht und fällt dann kontinuierlich ab. Nach 7 Tagen post infektionem ist nur noch eine geringfügige Expression adenoviral transfizierter Gene nachweisbar (Field, 2005).

Adenovirale Vektoren in der Gentherapie können bis zu 8 kb fremde DNA aufnehmen. Die Gene E1A und E1B, die die Information für die adenovirale Replikation enthalten, werden ersetzt. An ihre Stelle treten die einklonierten therapeutischen Gene, wobei zur Kontrolle dieser Gene verschiedene Promotoren vorgeschaltet werden. Häufig kommt als Promotor der Cytomegalievirus-Promotor zum Einsatz, der in humanen Zellen zu einer hohen Genexpression führt. Durch die Deletion der adenoviralen Gene E1A und E1B ist der Virus nicht replikationsfähig. In der Produktion von adenoviralen Vektoren wird häufig die 293-Zelllinie verwendet, die die Replikationsmaschinerie zur Vermehrung der adenoviralen Vektoren zur Verfügung stellt.

Adenovirale Vektoren werden aufgrund ihrer Fähigkeit, verschiedene Zelltypen zu infizieren, für ein großes Spektrum gentherapeutischer Ansätze *in vivo* eingesetzt (Nemunaitis et al, 2001; Hasenburger et al, 2001). Da Adenoviren viele menschliche Zellen befallen können, sind sie für systemische Gentherapien nur bedingt geeignet, da es auch zur Infektion von Normalgewebszellen kommt. Ein Problem ist die ungewollte, zum Teil hohe Entzündungsreaktion, welche als Nebenwirkung der adenoviralen Vektoren auftreten können. Bei systemischen Gentherapien mit adenoviralen Vektoren kommt es zudem zu einem hohen First-Pass-Effekt der systemisch injizierten Vektoren in der Leber, bei dem ein erheblicher Teil der in der Blutbahn zirkulierenden Vektoren in die Hepatozyten aufgenommen werden.

In den Hepatozyten werden die aufgenommenen Vektoren abgebaut und kehren nicht mehr in den Kreislauf zurück. Aufgrund der Infektion der Hepatozyten durch adenovirale Vektoren kann konsekutiv eine Hepatitis entstehen in Abhängigkeit der Konzentration der systemisch applizierten Viren. Diese Umstände können verhindern, dass der nötige therapeutische Virustiter im Zielgewebe bei systemischer Applikation erreicht werden kann. Deshalb wird in gentherapeutischen Ansätzen die lokale Gabe des Vektors bevorzugt, um eine Schonung des umgebenden Normalgewebes vor den adenoviral transduzierten Effekten zu gewährleisten.

### **1.3. Die Bedeutung der intratumoralen Injektion im Rahmen der Gentherapie**

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs eignen sich dafür aufgrund ihrer meist oberflächlichen Lage sehr und werden in verschiedenen Phase II-Studien untersucht (Birmingham et al, 2001; Galanis et al, 2001; Pfeiffer et al, 2001, Khuri et al, 2000). Betrachtet man die Studienlage, so werden in der Gentherapie maligner Kopf-Hals-Tumore in acht von 22 laufenden Studien adenovirale Vektoren verwendet (Jee et al, 2002). In den anderen Studien werden z.B. Retroviren oder auch Adeno-assoziierte Viren verwendet.

Die Adenoviren stellen die Majorität der in gentherapeutischen Studien von Kopf-Hals-Tumoren verwendeten Vektoren dar. Eine besondere Bedeutung kommt bei diesem therapeutischen Verfahren der intratumoralen Injektion zu. Voraussetzung für das Gelingen einer adenoviralen Gentherapie ist die möglichst vollständige Beimpfung des Tumorgewebes mit einer ausreichend hohen Virusmenge. Das Transgen kann nur dort erfolgreich exprimiert werden, wo die Zellen ausreichenden Kontakt zum Virus hatten. Dies bedeutet, dass alle Tumorzellen mit dem Virus in Kontakt kommen müssen, um eine hohe Transfektionsrate des transduzierten therapeutischen Gens in den zu behandelnden Tumorzellen zu gewährleisten. Eine effektive Injektion der Vektoren ist somit ein entscheidender methodischer Bestandteil der adenoviralen Gentherapie. Die direkte Injektion einer Viruslösung in den Tumor bietet sich überall dort an, wo der Tumor gut zugänglich lokalisiert ist, wie im Beispiel der Hals-Kopf-Tumoren.

Für die systematische Untersuchung der transgenen Expression und ihrer bestimmenden Faktoren bietet sich die Verwendung humaner Tumoren als Xenotransplantat auf der Nacktmaus an. Da es sich bei den Xenotransplantat-Tumoren in einem solchen Tiermodell um relative kleine Strukturen handelt, ist die manuelle Handhabung von Injektionsgeräten problematisch. Wichtige Parameter wie Injektionstiefe und Nadelposition können bei manueller Injektionsführung nicht kontrolliert werden. Die Folge ist eine ungleichmäßige bzw. willkürliche Verteilung der injizierten Flüssigkeiten, was die Transfektion des injizierten Tumors beeinträchtigen kann. Der Erfolg einer intratumoralen Injektion wird durch eine Anzahl verschiedener Faktoren beeinflusst wie der Anzahl und Positionierung der Nadeln sowie der Flussrate während der Injektion.

Zudem sind Gewebedruckspitzen zu vermeiden, durch welche die injizierte Flüssigkeit wieder austreten könnte. Die Gesamtheit der oben genannten Parameter sind für einen maximalen Injektionserfolg zu untersuchen.

Lammering et al. konnten nachweisen, dass ein Zurückziehen der Injektionsnadeln während des Injektionsprozesses den Transfektionserfolg verbessert, doch ist ein kontrolliertes Zurückziehen der Kanülen bei so kleinen Tumoren wie auf der Nacktmaus schwierig zu handhaben und nicht reproduzierbar. Es ist davon auszugehen, dass der Erfolg einer adenoviralen Gentherapie maßgeblich von der Qualität der Injektion bestimmt wird, eine niedrige transgene Expression muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass die Expression per se nicht funktioniert, sondern kann durchaus methodisch, d.h. durch eine ungünstige Virusverteilung nach Injektion bedingt sein. Die in der Literatur beschriebenen unbefriedigenden Ergebnisse einer experimentellen adenoviralen Gentherapie (Jee et al, 2002) lassen sich durch suboptimale Injektionsmethoden erklären.

Ein methodisches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Injektionssystem zu entwickeln, welches ein kontrolliertes Vorschieben von Injektionsnadeln unter Ausschluss äußerer Einflüsse und eine Infusion definierter Volumina ermöglicht. Mit Hilfe der Magnetresonanztomographie wurde die intratumorale Verteilung der Injektionsflüssigkeit beurteilt, während der Nachweis adenoviraler Genprodukte in den injizierten Tumoren als funktioneller Endpunkt verwendet wurde.

#### **1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:**

1. Entwicklung eines Injektionssystems zur kontrollierten intratumoralen Injektion von Tumor-Xenotransplantaten auf der Nacktmaus
2. Optimierung der Magnetresonanztomographie für die Darstellung des Injektionserfolgs der Tumor-Xenotransplantate, Auswahl eines geeigneten MR-Kontrastmittels und Bestimmung seiner optimalen Konzentration
3. Darstellung intratumoral injizierter Flüssigkeiten in der Magnetresonanztomographie und Analyse des Injektionserfolgs
4. Vergleichende Untersuchung der adenoviralen Transfektionseffizienz an verschiedenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs in Zellkultur und Tiermodell
5. Bestimmung der Expression des Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptors (CAR) und dessen Einfluss auf die adenovirale Transfektionseffizienz der untersuchten Plattenepithelkarzinomen

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Verwendete Zelllinien**

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden die Zelllinien FaDu, HuH7, UD-SCC-2, UD-SCC-6, und UD-SCC-7a verwendet. Es handelt sich dabei um Plattenepithelkarzinome unterschiedlicher Ursprungslokalisationen. Während der FaDu dem Hypopharynx entstammt, wurden die Zelllinien UD-SCC-2, UD-SCC-6, und UD-SCC-7a aus Karzinomen des Oro- und Hypopharynx etabliert. Bei der darüber hinaus verwendeten Zelllinie HuH7 handelt es sich um ein humanes Leberzellkarzinom. In Nacktmäusen wächst die FaDu-Zelllinie als wenig differenzierter Tumor mit einer medianen Verdoppelungszeit zwischen 100 mm<sup>3</sup> und 400 mm<sup>3</sup> von etwas über vier Tagen. Die Zelllinien UD-SCC-2, UD-SCC-6 und UD-SCC7a wurden freundlicherweise von Prof. Bier (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und aus Kultur auf Nacktmäuse verbracht und dort als Xenotransplantate etabliert.

#### **2.1.1. Bedingungen der Zellkultur**

Alle Zelllinien wuchsen in Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) und wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C Temperatur und in einer 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden regelmäßig etwa alle sieben Tage in einem Verhältnis von 1:4 gesplittet. FaDu- sowie HuH7-Zelllinien wurden in DMEM, die UD-SCC Zelllinien in MEM Medium kultiviert. Die Medien wurden mit 10% fötalem Kälberserum sowie 1% Penicillin/Streptomycin angereichert. Alle Medien und Zusätze wurden von der Firma Gibco bezogen.

#### **2.1.2. Etablierung von Xenotransplantaten**

Um vergleichende Untersuchungen von Zellen aus Kultur mit Tumorzellen im Gewebsverband zu ermöglichen, wurden aus den verschiedenen Zelllinien Xenotransplantate auf der Nacktmaus etabliert. Nach Induktion von Tumoren durch subkutane Injektion von 10<sup>6</sup> Tumorzellen wurden die entstehenden Tumoren entnommen, in Flüssigstickstoff gelagert und aus diesem Tumorstock sequentiell weiter transplantiert.

## **2.2. Tumor-Wirt-System**

Als Tumor-Wirtssystem wurde das Xenotransplantat auf der Nacktmaus verwendet. Der Vorteil dieses experimentellen Systems besteht in erster Linie darin, dass verschiedene humane Tumorzelllinien systematisch unter in vivo Bedingung, d.h. als solide wachsende Tumoren untersucht werden können.

### **2.2.1. Versuchstiere**

Es wurden ca. 12 Wochen alte Nacktmäuse des Stammes NMRI nu/nu verwendet. Die Tiere stammten aus der Tierzucht der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Tiere wurden in Filtertop-Käfigen (Makrolonkäfige Typ 3) auf Weichholzgranulat (Streu3/4R, Sniff bedding®) gehalten. Gefüttert wurde pelletierte Haltungsdiät (Altromin®) und Leitungswasser ad libitum. Streu, Futter und Wasser wurden vor Verwendung sterilisiert. Bei künstlichem Licht wurde ein Hell-Dunkelrhythmus von 12 Stunden eingehalten und die Luftfeuchtigkeit und Temperatur mittels Klimaanlage auf  $55\% \pm 5\%$  bzw.  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  eingestellt). Eine Genehmigung von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Hansestadt Hamburg zur Durchführung der Experimente lag vor.

### **2.2.2. Tumoren**

Bis auf die Zelllinie des FaDu, welche schon als Xenotransplantat vorlag, wurden alle anderen Zelllinien zunächst als solche etabliert. Somit standen fünf humane Tumoren für die vergleichende Untersuchung der Transfektionseffizienz zur Verfügung.

#### **2.2.2.1. Transplantationen**

Die zur Transplantation anstehende Nacktmaus wurde durch intraperitoneale Gabe von 100mg/kg KG Ketavet® (Fa. Parke-Davis) und 1,5mg/kg KG Rompun® (Fa. Bayer) anästhesiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde am Hinterlauf in Höhe der Oberschenkelmuskulatur ein etwa 3mm langer Hautschnitt ausgeführt und eine subkutane Gewebetasche gebildet. In diese Gewebetasche wurde nun ein etwa 8 mm<sup>3</sup> großes Tumorstück eingelegt, der aus dem Tumorstock entnommen worden war. Nach Einlage des Tumorstücks wurden die Wundränder deckungsgerecht aneinandergestellt. Ein primärer Wundverschluss mittels Hautnaht war nicht erforderlich.

### 2.2.2.2. Bestimmung des Tumolvolumens

Die Tumoren wurden mit Hilfe einer Schieblehre vermessen und das Tumorumfassen bestimmt. Unter der Annahme, dass es sich bei den Tumoren um Rotationsellipsoide handelt, wurde das Volumen mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$V = (a^2 * b * \pi) / 6 \quad (\text{Gleichung 1})$$

wobei  $a$  die größere,  $b$  die kleinere der senkrecht aufeinanderstehenden beiden Achsen beschreibt.

### 2.3. Quantifizierung der Transfektionseffizienz in vitro mittels Durchflußzytometrie

Es wurde ein enhanced green fluorescent protein (eGFP)- exprimierendes Adenovirus des Serotyps 5 verwendet, bei welchem die adenoviralen Gene E1A und E1B ersetzt und die genetische Information für eGFP inkliniert wurde. Dieses eingefügte Gen steht unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Das grünfluoreszierende Protein (GFP), welches natürlicherweise von der Ohrenqualle (*Aurelia aurita*) exprimiert wird, besitzt die Eigenschaft, intensiv grün zu fluoreszieren. Erfolgreich transfizierte Zellen lassen sich von Kontrollzellen anhand der intensiven Grünfluoreszenz unterscheiden. Die transfizierten Zellen lassen sich direkt im Fluoreszenzmikroskop betrachten oder im Flußzytometer quantifizieren. Der Virus wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Frank Schnieders (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Molekulare Zellbiologie, AG Gentherapie) zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung der adenoviralen Transfektionseffizienz wurden vorbereitend in einer 6-well Platte (Fa. Gibco ) zunächst  $2 \times 10^5$  Zellen pro well ausgesät und einen Tag später mit dem Virus transfiziert. Dabei wurde eine Viruskonzentration von 10 (MOI 10) bzw. von 100 (MOI 100) Partikeln pro Zellen eingesetzt. Die MOI wurde anhand der Zellzahl eines zu diesem Zweck mitgeführten Kontrollwell eingestellt. Der Virus wurde in 800 µl Medium den Zellen pro well zugegeben und 20 Minuten unter mehrfachem Schwenken darauf belassen. Im Anschluss wurde die Viruslösung abgesaugt und 3 ml Medium pro well zuge-

geben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert und die Grünfluoreszenz im Durchflusszytometer Cytomics FC 500 (Fa. Beckman Coulter) quantifiziert. Eine detaillierte Beschreibung der experimentellen Protokolls ist im Anhang beigefügt.

#### **2.4. Immunhistochemischer Nachweis der Expression des Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR)**

Der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) ist ein 46 kD großes Transmembran-Protein und stellt eine Komponente der Tight-Junction dar. Seine physiologische Funktion beinhaltet die Adhäsion von Zellen im Gewebsverband. Dieses Protein wird durch das Adenovirus zur Bindung an die Zelloberfläche und Internalisation in die Zelle genutzt und stellt den Hauptinfektionsweg des Adenovirus in die Zelle dar.

Unter der Annahme, dass das Ausmaß der CAR-Expression direkt mit der adenoviralen Transfektionseffizienz korreliert, wurde CAR für die verschiedenen Zelllinien in vitro immunhistochemisch bestimmt und mit der Transfektionseffizienz in vitro der Plattenepithelkarzinome verglichen.

Für den Nachweis des CAR-Rezeptors in Zellen aus Zellkultur wurde auf einen 6-Kammer Objektträger (Fa. Falcon) 10.000 Zellen pro Kammer der entsprechenden Zelllinien in 1ml Medium aufgebracht. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt, die Kunststoffkammern mit PBS gewaschen und anschließend die Kammern entfernt. Auf den verbleibenden Objektträgern ließen sich im Anschluss die Zellen für den immunhistochemischen Nachweis bearbeiten. Dazu wurden die Objektträger zu Beginn mit Paraformaldehyd und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit einem Serumgemisch aus Esel- und Pferdeserum inkubiert. Anschließend wurde der CAR nachweisenden Antikörper (anti-hCAR, Klon RmcB, Fa. Upstate, Charlottesville, USA) und nach mehreren Waschvorgängen ein zweiter Chromophor (Cy3)-Konjugat Antikörper (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) aufgebracht. Nach weiteren Waschgängen wurde eine spezifische Zellkernfärbung mit 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) angeschlossen und das Präparat unter Verwendung eines Tropfens Mowiol (Calbiochem, Bad Soden, Germany) eingedeckelt. Die Immunfluoreszenz wurde ermittelt und dokumentiert mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100 Mikroskops, ausgestattet mit einer AxioCam Digital Kamera. Eine detaillierte Beschreibung der Färbeprozedur ist im Anhang beigefügt.

## **2.5. Bestimmung der tumoralen Transfektionseffizienz in vivo**

Die Einbringung des Vektors in den Tumor stellt einen entscheidenden Schritt in der Effizienz einer adenoviralen Infektion von Tumorgewebe dar. Um diesen wichtigen Schritt optimal durchführen zu können, wurde ein pumpengesteuertes Mikroinjektionssystem entwickelt. Als Anforderungen für dieses System sollte ein kontrolliertes Vorschieben mehrerer Injektionsnadeln unter Ausschluss äußerer Einflüsse und eine Injektion definierter kleinster Volumina ermöglicht werden.

### **2.5.1. Intratumorale Injektion**

Es wurde ein Injektionssystem für die adenovirale Gentherapie auf der Nacktmaus benötigt, das folgende Bedingung erfüllt

- Die Injektionsnadeln sollen stabil an den Tumor angenähert werden, um das Zielen sowie die Festlegung der optimalen Position der Injektionsnadeln zu erreichen.
- Die festgelegte Nadelposition soll während der Injektion stabil bleiben
- Der Nadelvorschub während der Injektion soll kontrollierbar, die Injektionstiefe messbar sowie veränderbar sein.
- Gewährleistung größtmöglicher Anwendersicherheit beim Umgang mit Adenoviren

#### **2.5.1.1. Das Mikroinjektionssystem MAGD**

Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen wurde ein Injektionssystem zur intratumoralen Applikation von Adenoviren entwickelt, wobei das Volumen der Injektion im Bereich weniger Mikroliter liegt (Microinjectionsystem for Adenoviral Gene Delivery; MAGD). Das Mikroinjektionssystem MAGD besteht aus zwei Halterungen, die auf einer Plexiglasplatte von 40 x 40 cm Größe montiert sind, vier Injektionseinheiten sowie einer Pumpeneinheit (Abb. 2.1). Die Halterungen sind aus Kupferrohr konstruiert und bestehen aus zwei Pfeilern, die eine Verbindungsstange stützen, an der wiederum die Injektionseinheiten montiert sind. Die Kupferrohre haben einen Außendurchmesser von 12 mm und werden durch eine Gewindestange gestützt, deren metrisches Gewinde soweit runtergeschliffen wurde, so dass es exakt in das Kupferrohr eingeführt werden kann.

## MAGD

### Microinjectionsystem for Adenoviral Gene Delivery



Abb. 2.1 MAGD-System in der Übersicht von oben

Die Gewindestange ist 40 mm länger als das äußere Kupferrohr, sodass oben und unten das Rohr mittels einer passenden Mutter an die Grundplatte verschraubt werden kann. Die Grundplatte ist mit Bohrungen von 18 mm Durchmesser in verschiedenen Positionen versehen, so können die Halterungen variabel positioniert werden. Der Winkel der Halterung besteht aus einem passenden T-Stück aus Kupfer, welches durch Verwendung einer Haltemutter mit dem Pfeiler verbunden wird. Der rechtwinklige Ausgang des T-Stücks wird zur Verbindung der beiden gegenüberliegenden Pfeiler mit einem 12mm Kupferrohr genutzt. An diesen Verbindungsrohren werden die Injektionsarme angebracht, die die funktionelle Einheit des Bogens bilden.

Die Injektionsarme bestehen jeweils aus einer Mikrometerschraube mit stehender Spindel, an der mittels Plastikklemmen eine 27 Gauge-Injektionsnadel befestigt ist. Die stehende Spindel verhindert eine freie Rotation der Nadel und begrenzt deren Schubrichtung. Durch die Verwendung eines Luer-Anschlusses und eines 20 cm langen Perfusor®-Schlauches (Fa. Braun) wird die Verbindung des Mikroinjektionssystems mit dem Pumpensystem erreicht, wobei für jeden Arm eine separate Pumpe zur Verfügung steht. Die Verwendung von in der Medizintechnik üblichen Schlauch- und Nadelsysteme garantiert Kompatibilität der Komponenten sowie ein einfaches Wechseln der Injektionsnadel ohne Demontage der Injektionsarme. Die Mikrometerschraube bildet mit der Injektionskanüle eine Einheit und wird mittels eines 12 mm Kupferrohrs mit den Halterungen der Grundplatte verbunden. Hierzu ist eine spezielle Fixierung notwendig (Abb. 2.2). Diese besteht aus zwei 15 mm Kunststoffschellen aus der Hydrauliktechnik, die mittels einer 6 mm Schraube metrischen Gewindes verbunden sind. Die eine Schelle nimmt die Injektionseinheit auf, die andere verbindet die Injektionseinheit mit den rechtwinkligen Halterungen. Diese Konstruktion garantiert eine stabile Positionierung der Injektionseinheit. Um eine stufenlose Drehbarkeit der Injektionseinheit sowie eine stabile Fixierung in der angewählten Position zu ermöglichen, wurde auf einer Seite der Schellen eine Stahlplatte aufgeschraubt. Auf dieser Stahlplatte wurde ein 6 cm langes Edelstahlrohr aufgelötet, dessen Innendurchmesser den Außendurchmesser des Kupferrohrs der Injektionseinheit um 1/10mm übersteigt. Dadurch gleitet das Rohr der Injektionseinheit ohne Verwendung von Schmiermitteln ruckfrei in der Führung.

## MAGD

### Microinjectionsystem for Adenoviral Gene Delivery



Abb. 2.2 Injektionsarm und Halteeinheit des MAGD-Systems

Um das Gleiten der Injektionseinheit zu begrenzen, wurde ein Loch in die Edelstahlrohr-Führung gebohrt und auf diese Öffnung eine 6 mm Messing-Mutter aufgelötet. Im Gewinde dieser Mutter verläuft eine Flügelschraube, mit der manuell durch den Benutzer die Einstellung der Injektionseinheit festgestellt werden kann.

Die Verbindung der beiden Schellen stellt eine Besonderheit dar, da sie drehbar ausgeführt ist. Dazu wurde die Schraubverbindung der beiden Schellen um einen Sprengring definierter Härte ergänzt. Dieser Sprengring sorgt für die Verspannung der beiden Halteschellen untereinander und verhindert das Abgleiten der vom Benutzer gewählten Position der Injektionseinheit, da sich das Hauptgewicht am Ende des Armes befindet und somit eine große Hebelwirkung auf die Verstellung ausgeübt wird. Die Härte des verwendeten Sprengringes ist so gewählt, dass für eine Verstellung der beiden Halteschellen nur ein kleines Losbrechmoment bei gleichzeitig guter Positionsfixation des Haltearms vorhanden ist. Durch die Kombination dieser konstruktiven Einheiten ist eine Bewegung der Injektionsarme in allen drei Richtungen des Raumes möglich.

Ergänzt wird das Injektionssystem durch das Pumpensystem Bee hive (Fa. Bioanalytical, Cheshire, UK.) Dieses besteht aus vier Infusionspumpen sowie einem Infusionscontroller der die vier Pumpeneinheiten unabhängig voneinander steuert. So lässt sich die Flussrate jeder einzelnen Pumpe zwischen 0.1  $\mu\text{l}/\text{min}$  bis 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  anwählen. Beim Gebrauch einer 1.0 ml Spritze betragen die Flussraten zwischen 0.1  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 100.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Da die Pumpen außerhalb der Injektionseinheit liegen und nicht wesentlich größer als die verwendeten Spritzen selbst sind, kann ein individueller Aufbau des Pumpensystems ausgeführt werden. Die Pumpen werden mit der Injektionseinheit durch Perfusor®-Schläuche (Fa. Braun) verbunden.

### **2.5.1.2. Prozedere der intratumoralen Injektion mittels MAGD**

Auf Grundlage des Tumolvolumens wird das Injektionsvolumen definiert und jeweils dieses Gesamtinjektionsvolumen auf die vier Spritzen des Beehive-Systems verteilt. Die Flussrate wird definiert und entsprechend der beiden Parameter die Injektionszeit bestimmt. Bei einem Injektionsvolumen von z.B. 100  $\mu\text{l}$  wird also über jede der vier Spritzen jeweils 25  $\mu\text{l}$  appliziert, bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  ergibt sich eine Injektionszeit von 5 Minuten innerhalb derer das gesamte Injektionsvolumen in den Tumor verbracht wird.

Das tumortragende Tier wird durch intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg KG Ketavet<sup>®</sup> (Fa. Parke-Davis) und 1,5 mg/kg KG Rompun<sup>®</sup> (Fa. Bayer) anästhesiert und auf der Grundplatte mittels Leukosilk<sup>®</sup>-Streifen locker fixiert. Nachdem die Injektionsarme manuell so eingestellt wurden, dass die Injektionsnadeln in einem Winkel von 45° zur Grundplatte und je 90° zur nächsten Injektionsnadel stehen, erfolgt der Vorschub der Injektionsnadel mittels der Mikrometerschraube, die Injektionstiefe ist an der Rändelschraube an einer Mikrometerskala ablesbar. Abbildung 2.3 zeigt den experimentellen Aufbau und die unter Verwendung des MAGD-Systems am tumortragenden Tier. Sind die Nadeln appliziert, folgt die Infusion, wobei die Injektionsnadeln alle 30 Sekunden um 1mm zurückgezogen wurde. Am Ende der Applikation des Injektionsvolumens verbleiben die Nadeln für 30 Sekunden im Tumor, anschließend werden die Nadeln entfernt und bei großen Injektionsvolumina die Injektionsstellen mittels Gewebekleber (Histoacryl<sup>®</sup>, Fa. Braun) verschlossen, um eine Leckage der injizierten Lösung zu verhindern.

## MAGD

### Microinjectionsystem for Adenoviral Gene Delivery

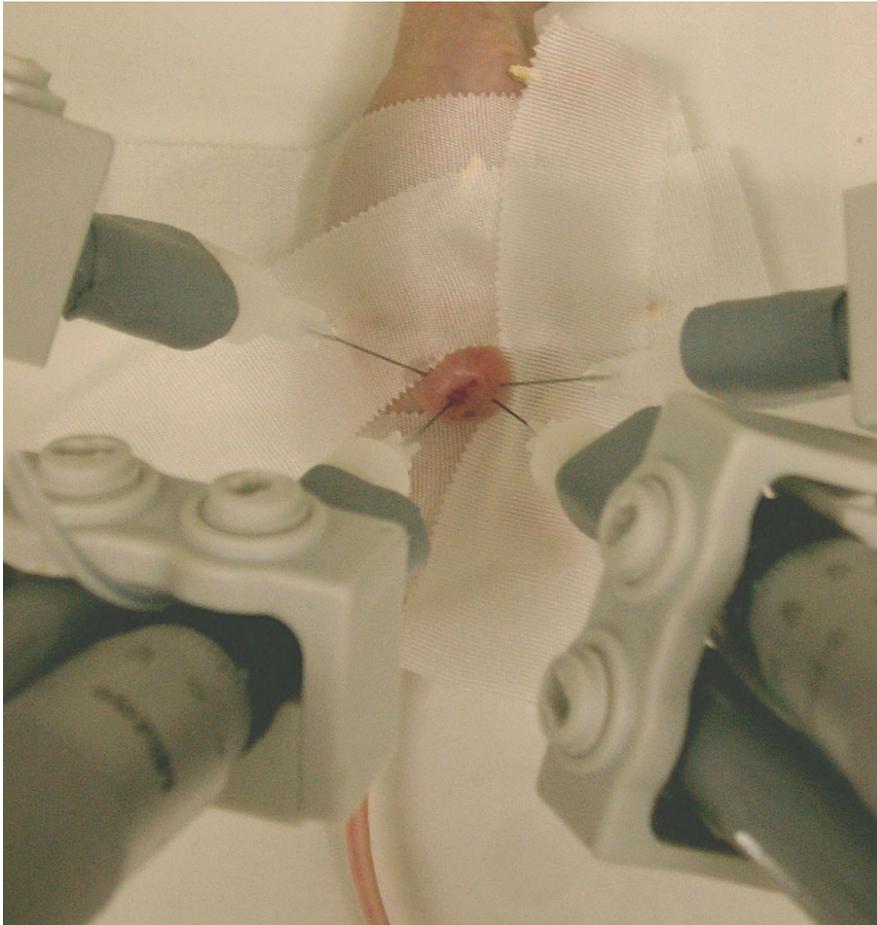


Abb. 2.3 Experimentelle Anwendung von MAGD bei einer intratumoralen Injektion

## **2.6. Darstellung der Tumorinjektionserfolges mit Hilfe der Magnetresonanztomographie**

Die Verteilung der intratumoral applizierten Flüssigkeit wurde mit Hilfe der Magnetresonanztomographie dargestellt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Ortsauflösung im Bereich weniger Millimeter, welche für die Darstellung von subkutan implantierten Tumoren auf der Nacktmaus notwendig ist. Die Anwendung dieser diagnostischen Methode wird dadurch erleichtert, dass sie nicht mit einer Strahlenbelastung für Tier oder Experimentator verbunden ist. Da die Mäuse klein und somit die Summe der Messsignale ebenfalls sehr gering sind, musste das experimentelle Setup um weitere Spulen im Untersuchungsfeld ergänzt werden. Die Injektion kann nur vor und nicht während der Messung erfolgen, da die magnetisierbaren Injektionsnadeln nicht im Magnetfeld bestehen können. Wie unter 2.5.1.2 beschrieben, wurde den Tumoren mit Hilfe des MAGD-System Kontrastmittel injiziert und die Tiere 10 Minuten nach Injektion der Untersuchung im Magnetresonanztomographen zugeführt.

### **2.6.1. Prozedere der MRT-Aufnahme**

Für die MRT-Untersuchungen erhielten die Tiere eine wie unter 2.5.1.2 beschriebene Generalanästhesie mit Rompun/Ketavet. Der verwendete Magnetresonanztomograph „Magnetom Symphony“ der Fa. Siemens (Magnetfeldstärke 1,5 Tesla) wurde für die Aufnahmen mit einer Kopfspule sowie zusätzlich mit zwei Kiefergelenksspulen ausgestattet, um eine maximale Signalaufnahme zu erreichen. Die anästhesierte Maus wurde auf der Seite liegend in die Kopfspule gelegt, entsprechend abgepolstert und der Tumor jeweils oberhalb und unterhalb mit einer Kiefergelenksspule belegt.

Zur Untersuchung des Tumors kam eine T1-Sequenz sowie eine T2\*-tse-Sequenz zum Einsatz. Die Anzahl der MRT-Schnitte eines Tumors schwankte je nach Tumorgröße zwischen 4 und 8 transversalen Schnittbildern pro Tumor. Die Schichtdicke der MRT-Schnitte betrug 1,5 mm. Die Anzahl der MRT-Schnitte wurde begrenzt durch die Untersuchungszeit sowie die Erwärmung des Gewebes während der MRT-Aufnahmen im Magnetresonanztomographen. Dadurch war keine weitere engere Wahl der Schichtdicken möglich.

## 2.6.2. Methodische Vorversuche

### 2.6.2.1. Bestimmung der optimalen Kontrastmittelkonzentration

Zur Kontrastierung der injizierten Flüssigkeit wurde ein spezielles MR-Kontrastmittel verwendet (SPIO-Kontrastmittel, Resovist®, Fa. Schering diagnostics, Berlin, Germany). Dieses Kontrastmittel besteht aus Eisenoxid-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), die mit einer Carboxydextran-Hülle umgeben sind und etwa eine Größe von 45 nm besitzen. Durch die paramagnetischen Eigenschaften des Eisenoxids nimmt es im Magnetfeld des MR-Tomographen Einfluss auf die Relaxationszeiten und führt bei den in dieser Arbeit verwendeten MR-Sequenzen zu einem Signalverlust innerhalb des örtlichen Wirkungsbereichs.

Die optimale Verdünnung des zur Injektion verwendeten Kontrastmittels ist ein entscheidender Parameter der erfolgreichen Bilddarstellung. Eine zu hohe Konzentration des verwendeten SPIO-Kontrastmittels induziert ungewollte Suszeptibilitätseffekte, die die Darstellung injizierter Kontrastmittellösung beeinträchtigen und zu einer Verfälschung des Injektionsergebnisses führen.

In einem Vorversuch wurde die optimale Verdünnung des Kontrastmittels bestimmt. Dazu wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße mit unterschiedlichen SPIO-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen magnetresonanztomographisch untersucht und die Signalauslöschung bestimmt. Als Simulation der in vivo-Injektion wurde zudem Hühnerfleisch mit den SPIO-Lösungen unterschiedlicher Konzentration parallel injiziert und magnetresonanztomographisch vermessen. Abbildung 2.4 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Auf der Ordinate ist die Konzentration des SPIO-Kontrastmittels in mol/l, auf der Abszisse die Signalintensität in relativen Einheiten aufgetragen. Bei Konzentrationen der SPIO-Partikel von weniger als  $1 \times 10^{-6}$  mol/l ist die Signalauslöschung für eine aussagekräftige Messung nicht ausreichend, daher sind diese nicht für die Anwendung empfehlenswert. Bei Werten von  $1 \times 10^{-6}$  Partikeln findet eine komplette Signalauslöschung statt. Diese Konzentration wurde für alle Messungen und Bilderstellungen verwendet. Höhere Konzentrationen, die größer sind als  $1 \times 10^{-6}$  SPIO-Partikel, führen zu einer erhöhten Signalauslöschung und das magnetresonanztomographische Bild deckt sich durch zu hohe Kontrastierung nicht mit dem realen Bild. Es wird mehr erreichte Fläche angezeigt als es in Wirklichkeit besteht und dies führt zu falsch positiven Werten für die durch die Injektion erreichte Tumorfläche.

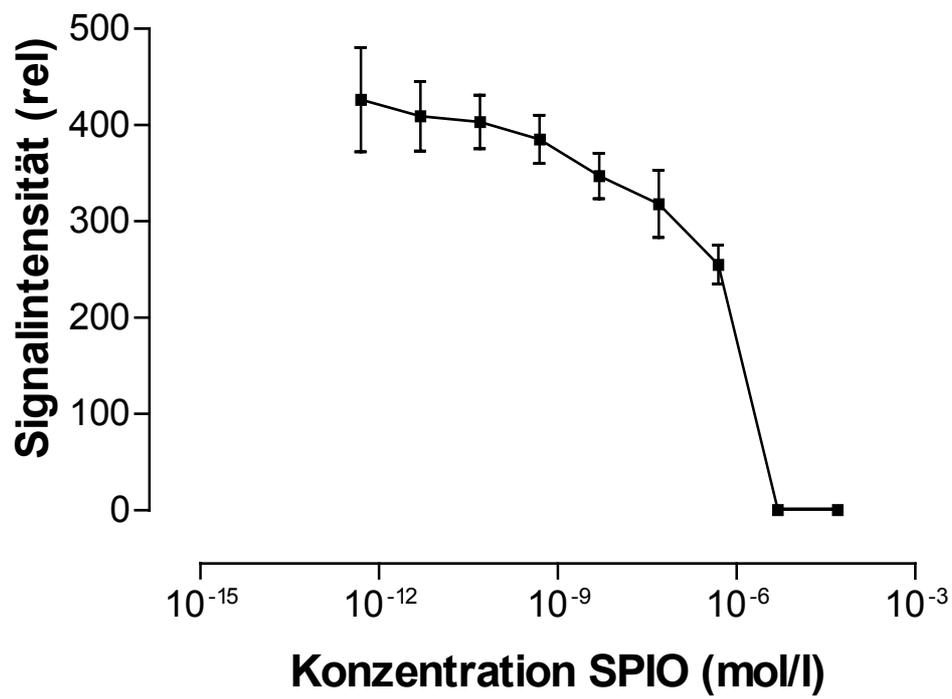


Abb. 2.4 Signalintensität der Magnetresonanztomographie als Funktion der Konzentration an SPIO-Partikeln. SPIO-Konzentrationen höher als  $10^{-6}$  führen zu einem starken Signalverlust.

Außerdem führt eine zu hohe SPIO-Konzentration zu ungewollten Suszeptibilitätseffekten, die zu einer Unschärfe des kontrastierten Bezirks führen und die Auswertung beeinträchtigen.

Zur Simulation der in-vivo Situation wurde 50 µl Kontrastmittel steigender Konzentrationen mittels MAGD in Hühnerfleisch injiziert und wiederum die Signalauslöschung bestimmt. Abbildung 2.5 zeigt die Ansammlung des Kontrastmittel am Injektionsort, die signalarmen, dunklen Flächen entsprechen dem injizierten Kontrastmittel. Die Konzentration des Kontrastmittels nimmt von links nach rechts ab. Es zeigt sich bei hohen Kontrastmittelkonzentrationen, dass die Fläche geringer Signalintensität höher ist als bei niedrigeren Konzentrationen. In Relation zum injizierten Kontrastmittelvolumen ist diese Fläche zu groß. Niedrige Konzentrationen des Kontrastmittels führen zu keiner Kontrastierung mehr und führen zu einem zum Muskelgewebe isointensen Signalverhalten. Bei der Verwendung von  $10^{-6}$  mol/l SPIO-Partikel ist ein zufriedenstellender magnetresonanztomographischer Nachweis gewährleistet.

#### **2.6.2.2. Bestimmung des optimalen Injektionsvolumen für die intratumorale Mikroinjektion**

Es wurden FaDu-Tumoren auf der Nacktmaus mit verschiedenen Volumina von Kontrastmittel mittels MAGD injiziert und der Injektionserfolg magnetresonanztomographisch kontrolliert. Das Untersuchungsverfahren ist unter 2.6.1 beschrieben. Es wurden Kontrastmittelmengen von 10, 25 und 50 % des Tumorumens vergleichend untersucht und Abb. 2.6 zeigt exemplarische Ergebnisse dieser Untersuchung. Es zeigte sich bei injizierten Kontrastmittelmengen von 10 % des Tumorumens (Abb. 2.6b) eine zu geringe Infiltration des Tumors. Bei Kontrastmittelmengen von mehr als 50 Prozent des Tumorumens (Abb. 2.6a) wurde zwar eine hohe Infiltration des Tumors mit Kontrastmittel beobachtet, jedoch traten aber ungewünschte Leckagen des injizierten Kontrastmittels aus den Injektionsstellen auf. Bei einem Injektionsvolumen von 25 % des Tumorumens zeigten sich befriedigende Ergebnisse und diese wurde für alle weiteren Versuche als Standard-Injektionsvolumen festgelegt.

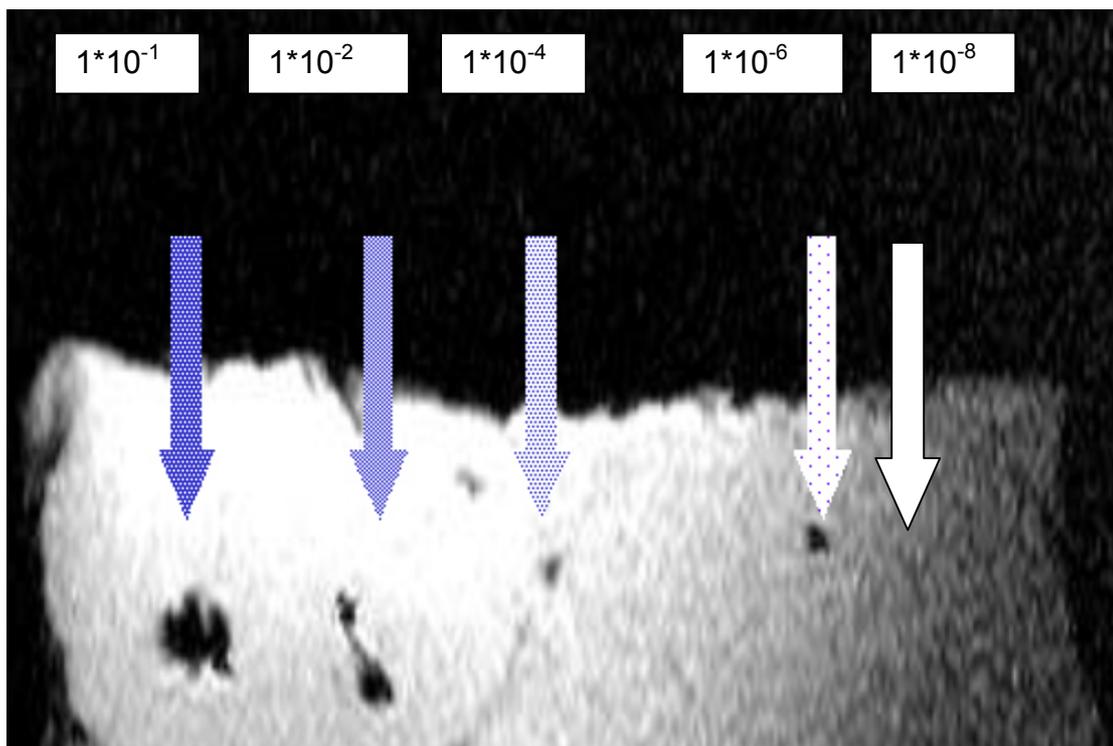


Abb.2.5 Injektionen von unterschiedlichen Kontrastmittelkonzentrationen in Hühnerfleisch bei gleichem Injektionsvolumen. Die Pfeile geben die Injektionsorte und die Konzentrationen an.

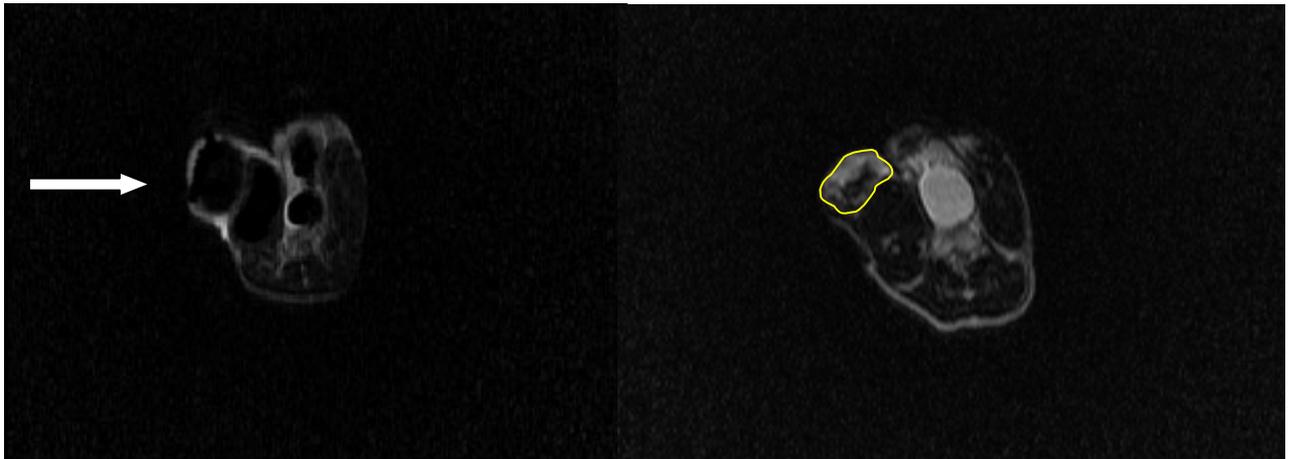


Abb. 2.6 a und b Darstellung einer Leckage (Panel A) und einer ungenügenden injizierten Kontrastmittelmenge (Panel B). In Panel A sind die gute Infiltration des Tumors bei einem Injektionsvolumen von 50% des Tumorumfanges erkennbar. Gleichzeitig lässt sich die Leckage des Injektionsmediums erkennen (Pfeil). Panel B zeigt eine ungenügende Kontrastmittelinfiltration. Es wurden 10% des Tumorumfanges als Injektionsvolumen verwendet. Die Grenzen des Tumors sind mit einer gelben Linie gekennzeichnet. Innerhalb des Tumors findet sich das Injektionsvolumen als signalarmes Areal neben helleren, nicht injizierten Tumorebenen.

### **2.6.2.3. Auswertung der MRT-Bilder**

Die in den Versuchen aufgenommenen Bilder wurden in eFilm workstation® (Fa. Merge, Version 1.8.3, Toronto, Kanada) selektiert und in ImageJ (Version 1.3j, National Institute of health, USA) ausgewertet. Dazu wurden die selektierten Bilder in ImageJ importiert und die Fläche des Tumors berechnet. Anschließend wurde die injizierte Schnittebene importiert und die Fläche des injizierten Areals, welche sich dunkler darstellte, bestimmt (Abb. 2.7a und b).

Außer der Fläche wurden der mittlere Grauwert, dessen statistische Standardabweichung und der minimale sowie maximale Grauwert bestimmt. Bei strittigen Entscheidungen, ob eine Fläche noch injiziert war oder nicht, wurde zusätzlich der mittlere Grauwert mit in die Analyse einbezogen. Dabei galt die Reduktion des mittleren Grauwertes um 50% im Vergleich zum Nativbild als noch durch die Injektion erreichte Fläche, kleinere Werte in angrenzenden Flächen wurden ausgenommen. Zur Auswertung kamen die T2\*-Sequenzen und zum Vergleich die T1-Sequenzen. Um eine Memorierung der Bilder durch den Untersucher zu vermeiden, wurden die Bilder in sechsmonatigem Abstand ein zweites Mal verblindet ausgewertet und die Ergebnisse verglichen.

Aus der Grundfläche des Nativbildes und der Fläche des durch die Injektion erreichten Areals wurde als relativer Ausdruck des Injektionserfolges der prozentuale Anteil der erreichten Grundfläche ermittelt und für jede einzelne Schnittebene berechnet.

### **2.6.2.4. Bestimmung der optimalen Tumorgöße für die intratumorale Mikroinjektion**

Die Tumorgöße ist ein wichtiger Parameter zur Erlangung einer optimalen intratumoralen Injektion. Da sich die Tumoren auf der Nacktmaus in ihrer Größe im Bereich weniger Millimeter bewegen, ist eine Mindesttumorgöße für ein günstiges Handling des Tumors erforderlich. Zudem muss für spätere histologische Untersuchungen und die Tumorzellvereinzelung eine ausreichende Gewebemenge und Tumorzellpopulation gewonnen werden. Die Größe des Tumors wird durch die systemischen Effekte des Tumorstadiums auf der Nacktmaus begrenzt. Nekrotische Tumoren sind für eine intratumorale Injektion durch Leckagebildung nicht verwendbar, zudem sind solch große Tumoren für das Versuchstier eine Belastung.

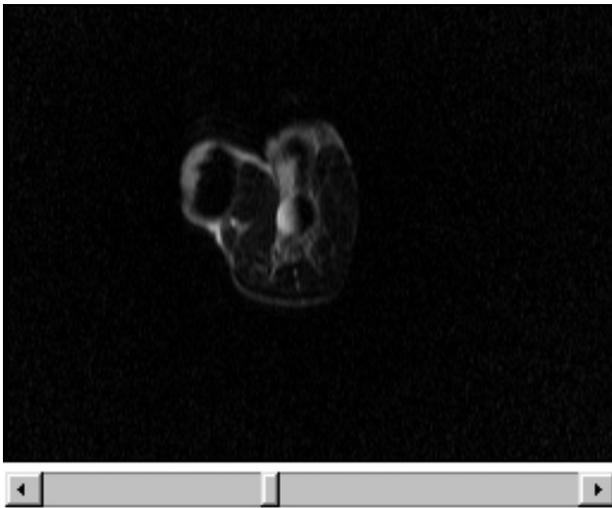


Abb.2.7a Koronarschnitt eines mit SPIO-Kontrastmittel injizierten Plattenepithelkarzinoms auf der Nacktmaus unter Verwendung von ImageJ. Man beachte die Signalreduktion im Bereich des Tumors (Pfeil).

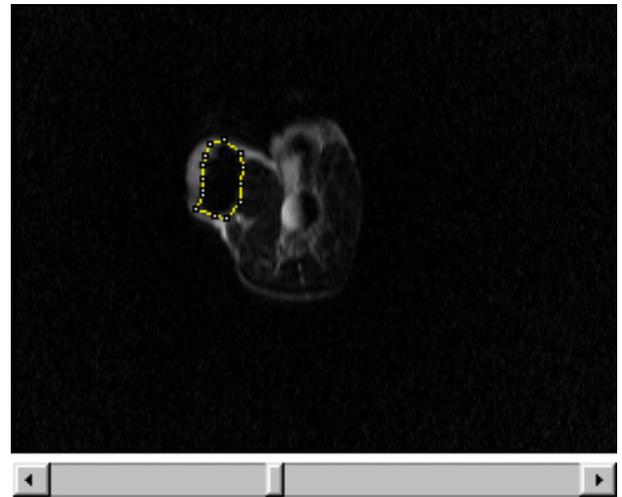


Abb.2.7b Anlage eines Messtools aus ImageJ zur Bestimmung der injizierten Fläche. Die Grenzfläche wird durch die gelbe Linie innerhalb des Tumors angezeigt. Durch Verschiebung der Punkte kann diese Fläche verändert werden.

Zur Bestimmung der optimalen Tumorgröße wurden Größenklassen von 10-80 mm<sup>3</sup>, 80-120 mm<sup>3</sup>, 120-400 mm<sup>3</sup> festgelegt und jeweils fünf Tumoren pro Größenklasse untersucht. Für jeden untersuchten Tumor wurde die Infiltration mit dem SPIO-Kontrastmittel nach MAGD vermittelter Tumoringjektion bestimmt. Injektion sowie die Analyse der magnetresonanztomographischen Aufnahmen wurde nach dem unter 2.5.1.2 sowie 2.6.1 genannten Protokollen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.8 zusammengefasst. Dargestellt ist die Effizienz der intratumoralen Injektion als prozentualer Anteil des erreichten Tumorumfanges. Es sind jeweils die Ergebnisse der magnetresonanztomographischen Aufnahmesequenzen für die drei verschiedenen Volumengruppen gegenübergestellt. Zudem ist das Ergebnis der im Abstand von sechs Monaten geführte zweite Auswertung vergleichend in gleicher Weise aufgeführt. Für alle drei Größengruppen konnte mittels des Mikroinjektionssystems MAGD und dem entwickelten Protokoll eine Injektion der Tumoren unabhängig ihrer Größe von über 90% der Tumorfläche im Schnitt erreicht werden. Diese zeigte sich vom Tumorumfang unabhängig. Die Variation innerhalb der Gruppen liegt bei wenigen Prozent bei niedriger Standardabweichung vom Mittelwert. Die zweite Auswertung der magnetresonanztomographischen Schnitte brachte ein annähernd gleiches Ergebnis. Hieraus lässt sich schließen, dass für die intratumorale Injektion durch das Mikroinjektionssystem MAGD und das aufgeführte Protokoll eine effiziente Methode zur erfolgreichen Injektion von adenoviralen Vektoren zur Verfügung steht. Für die weiteren Untersuchungen der adenoviralen Transfektionseffizienz im in vivo-Tumormodell auf der Nacktmaus wurde das oben aufgeführte Tumorumfang von 80 mm<sup>3</sup> bis 120 mm<sup>3</sup> ausgewählt, da dieses Volumen eine ausreichende Gewebegewinnung für histologische und flusszytometrische Analysen des Tumors bei optimalem Handling und niedriger Belastung der tumortragender Nacktmaus verspricht.

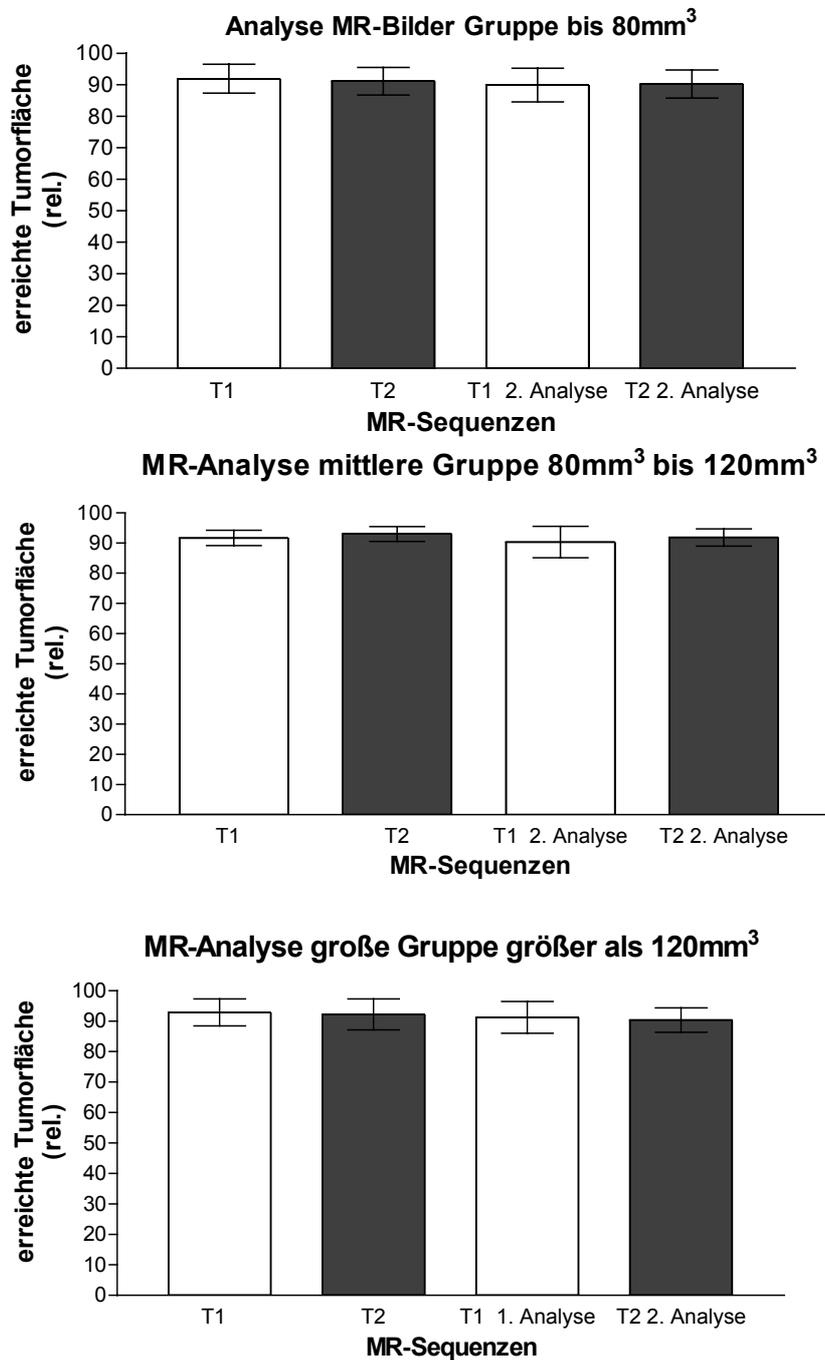


Abb. 2.8 Analyse der magnetresonanztomographisch erhobenen Daten der Injektion mittels MAGD und einer Injektionsvolumen von 25% des Tumolvolumens. Dargestellt ist die erreichte Tumorfläche in Prozent der drei Tumolvolumengruppen und die 2. Analyse der verblindeten Untersuchung. Erkennbar ist die für alle Gruppen gültige Infiltration des Tumors von 90% seiner Tumorfläche.

## **2.7. Quantifizierung der tumoralen Transfektionseffizienz in vivo**

Es wurden Xenotransplantate der Zelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6, UD-SCC-7a und HuH7 untersucht. Mittels MAGD wurden jeweils pro Tumor ca.  $10^7$  Viruspartikel verabreicht. Die Tumorumfänge zum Zeitpunkt der Injektion betrugen zwischen  $80 \text{ mm}^3$  und  $230 \text{ mm}^3$ . Eine Woche nach Injektion wurde das Tier getötet ( $\text{CO}_2$ ) und der Tumor entnommen. Das entnommene Gewebe wurde mit Hilfe einer Gewebepresse zerkleinert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Bis zur Weiterverarbeitung fand eine Kühlung des Gewebes auf Eis statt. 1,5 ml eines Enzymgemisches aus Collagenase, Hyaluronidase und Desoxyribonuklease wurde auf das Gewebe gegeben und anschließend im Rüttelinkubator bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 800 U/min 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde kurz in 2 ml ACK-Puffer homogen per Vortex suspendiert und die Lyse sofort durch Zugabe von 3 ml eiskaltem PBS gestoppt. Anschließend zentrifugierte die Suspension 5 min bei 800 U/min und  $4^\circ\text{C}$ , der Überstand wurde anschließend entfernt. Dem angedauten Gewebe wurde 2 ml PBS zugegeben, in eine 5 ml Spritze aufgenommen und durch ein Filcon Filter ( $70\mu\text{m}$  Porenweite) gepresst. Anschließend fand eine Analyse der Zellen und Bestimmung der Expression des Transgens eGFP im Flusszytometer (Fa. Beckman Coulter). Die Bestimmung des Anteils GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie fand analog zu dem unter 2.3. beschriebenen Verfahren statt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Vergleich der adenoviralen Transfektionseffizienz verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien in vitro.**

Die verwendeten Zelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6, UD-SCC-7a und HuH7 wurden unter den Bedingungen der Zellkultur mit AdV-eGFP infiziert. Dabei wurden die Zellen mit einer adenoviralen Partikelzahl von 10 bzw. 100 Partikel pro Zelle (MOI 10 und MOI 100) transfiziert. Erfolgreich transfizierte Zellen exprimieren das GFP-Gen, dessen Produkt die Grünfluoreszenz der Zellen bedingt. Diese wurde flusszytometrisch bestimmt und als Parameter der Transfektionsrate quantifiziert. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt in halblogarithmischer Darstellung als Intensität der Grünfluoreszenz (Abszisse) als Funktion des sogenannten sideward scatter (Ordinate), ein Parameter, der die Granularität der Zellen beschreibt. Mit diesem Parameter lassen sich zelluläre von nicht-zellulären Strukturen in der Probe differenzieren. Da die Granularität für jede Zellpopulation in definierten Grenzen variabel ist, erscheint diese in der Darstellung als Punktwolke. Abbildung 3.1. zeigt exemplarisch den Vergleich der GFP-Expression einer untransfizierten (Panel A) und einer transfizierten Zellpopulation (Panel B) von 10.000 Zellen. Die Zellen zeigen eine geringe Eigenfluoreszenz, die aber begrenzt ist und nicht über einen Wert von 10 hinausgeht. Anhand dieser Kontrollmessung lässt sich ein Schwellenwert definieren. Alle Zellen, die in transfizierten Proben eine Grünfluoreszenz höheren Ausmaßes zeigen, werden als positiv bewertet und ihr Anteil an der Gesamtzahl der gemessenen Zellen berechnet. Der in dem Beispiel dargestellte Grenzwert zeigte sich auch bei wiederholten Messungen als reproduzierbar und wurde somit als Schwellenwert für alle Messungen der verschiedenen Zelllinien verwendet. Jede Messung beinhaltet die Erfassung von mindestens  $10^5$  Zellen .

Granularität (sideward scatter), rel. Einheiten

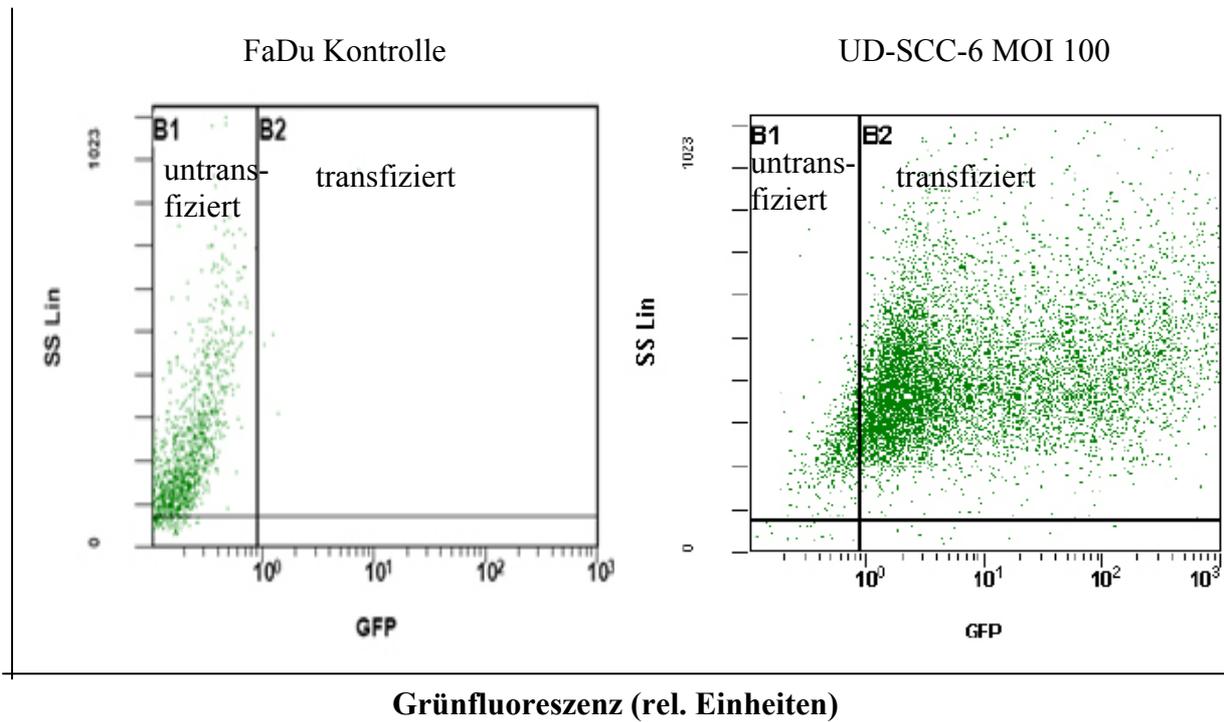


Abb. 3.1 Exemplarische Darstellung der mittels Flusszytometrie bestimmten Grünfluoreszenz von unbehandelten Kontrollzellen (links) der Zelllinie FaDu und mit einer MOI von 100 transfizierten Zellpopulation der Zelllinie UD-SCC-6.

Analog zu Abb. 3.1 sind in Abb. 3.2 und 3.3 die erreichte GFP-Expression in den verschiedenen Zelllinien dargestellt, wobei eine MOI von 10 (Abb. 3.2) bzw. von 100 (Abb. 3.3) verwendet wurde. Dabei fällt die Zunahme an GFP-positiven Zellen mit Steigerung der MOI von 10 auf 100 auf. Wie am Beispiel der Zelllinie HuH7 zu erkennen ist, liegen sämtliche in der Messung erfassten Zellen im als GFP-positiv definiertem Bereich. Dies bedeutet eine maximale Transfektion. Eine vergleichbar hohe Expressionsrate zeigen die Zelllinien UD-SCC-2 und UD-SCC-6. Die Expressionsmuster bleibt aber niedriger als bei der Zelllinie HuH7. Die Zelllinie UD-SCC-7a zeigt ein ähnlich niedriges Expressionsmuster wie die FaDu-Zelllinie.

Anhand der durchgeführten Transfektionen lässt sich feststellen, dass mit einer MOI von 10 eine nur unbefriedigende Transfektionsrate von maximal 53.2% erreicht wird.

Die Transfektionsraten bei der MOI 10 liegen bei  $2.1 \pm 1.1$  %,  $53.2 \pm 2.8$  %,  $23.4 \pm 3.7$  %,  $29.2 \pm 3.9$  %,  $3.4 \pm 2.3$  % der Zelllinien FaDu, HuH7, UD-SCC-2, UD-SCC-6 und UD-SCC-7a. Die Erhöhung der MOI von 10 auf 100 führt zu Transfektionsraten von  $99.1 \pm 1$  %,  $94.2 \pm 6.6$  % bzw.  $91.2 \pm 2.1$  % der Zelllinien HuH7, UD-SCC-2 bzw. UD-SCC-6. Die für die FaDu und UD-SCC-7a Zelllinien bestimmten Transfektionsraten sind im Vergleich dazu mit Werten von  $8.8 \pm 3.7$  % bzw.  $16.9 \pm 5.0$  % relativ gering.

Deutliche Unterschiede des Transfektionserfolges bestehen zwischen den verwendeten Zelllinien. Während FaDu und UD-SCC7a-Zellen auch bei einer MOI von 100 nur zu 8.8 % bzw. 16.9 % transfiziert werden, lassen sich HuH7, UD-SCC-2 und UD-SCC-6 Zellen mit einer MOI von 100 zu 99.1 %, 94.2 % bzw. 91.2 % erfolgreich transfizieren. Abbildung 3.4 stellt diese Ergebnisse als Mittelwerte und Standardabweichung der fünf unabhängig durchgeführten Experimente zusammenfassend dar.

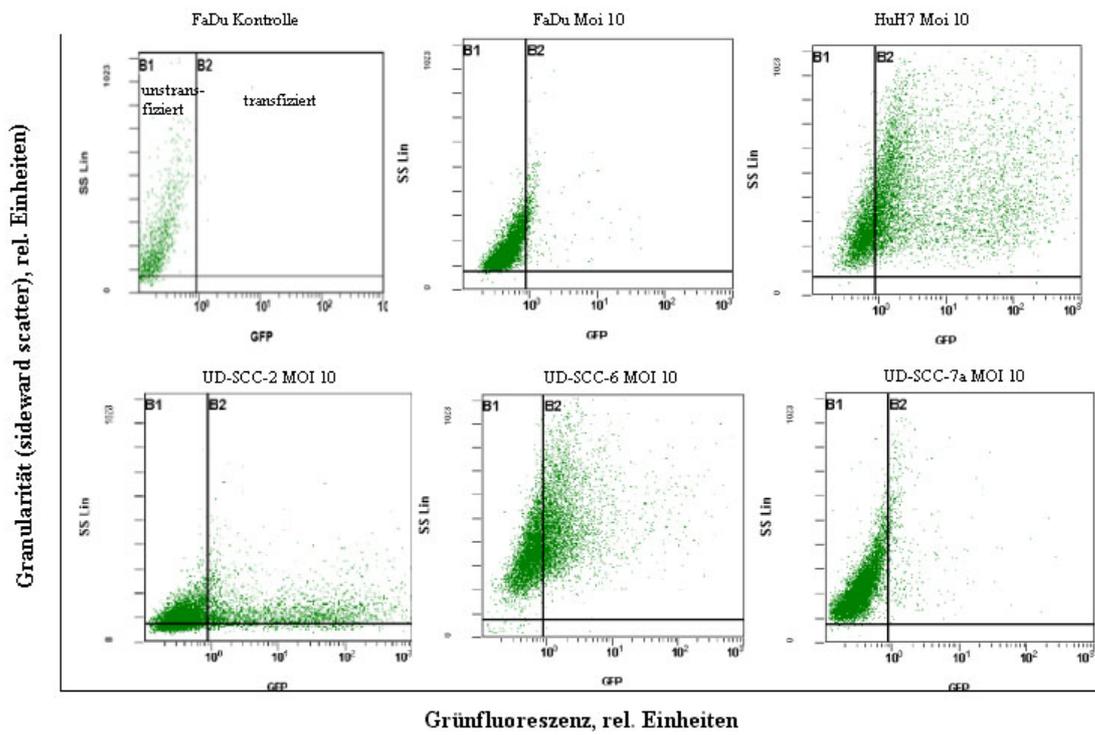


Abb. 3.2 Fluoreszenzzytometrie der untersuchten Tumorzelllinien bei einer MOI von 10.

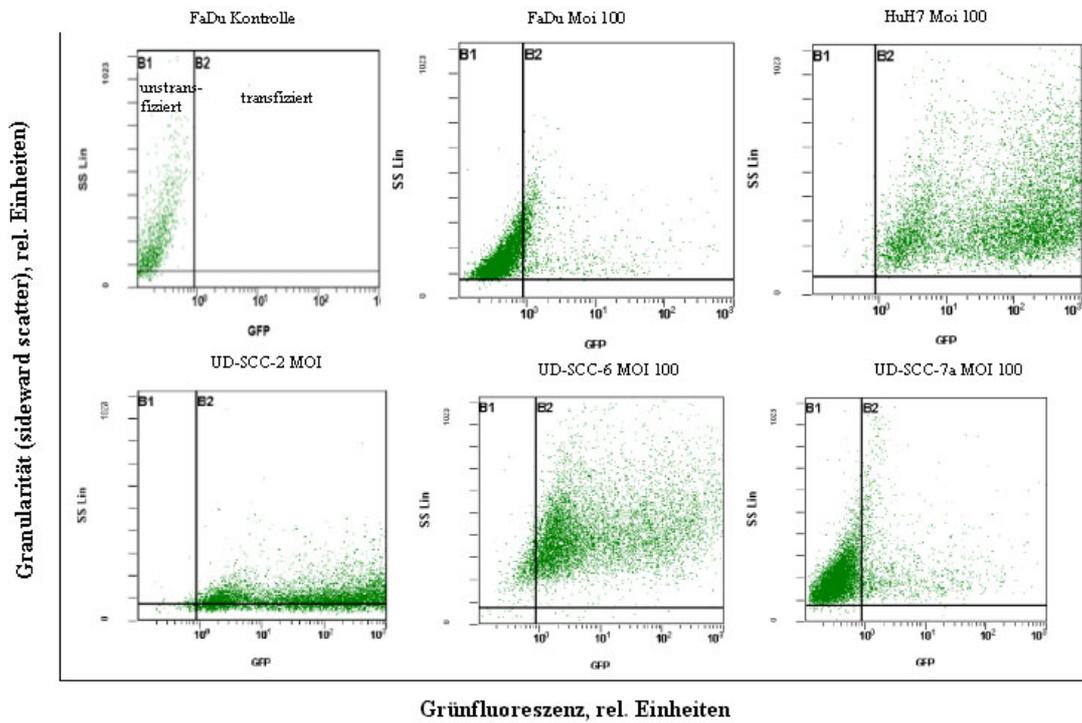


Abb. 3.3 Fluoreszenzzytometrie der untersuchten Tumorzelllinien bei einer MOI von 100.

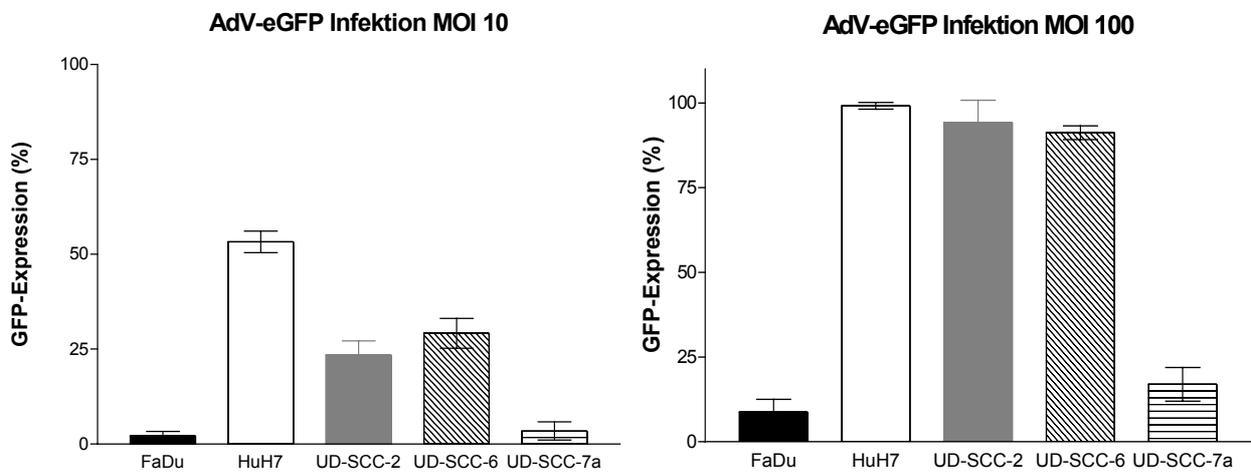


Abb. 3.4 Zusammenfassende Darstellung der mittleren Transfektions-effizienz der Zelllinien FaDu, HuH7, UD-SCC-2, UD-SCC-6, und UD-SCC-7a bei einer MOI von 10 (linkes Panel) bzw. von 100 (rechtes Panel). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an; n=5.

### **3.2. Vergleich der GFP-Expression verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien als Xenotransplantat nach intratumoraler AdV-Transfektion mittels MAGD**

Die Effizienz der adenoviraler Transfektion wurde für subkutan wachsende Tumoren der Zelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6 und UD-SCC-7a bestimmt. Die Tumoren wurden mit den in vitro verwendeten adenoviralen Vektor (AdV-eGFP) infiziert. Die Injektion erfolgte mit Hilfe des Mikroinjektionssystem MAGD. Es wurden jeweils  $10^7$  virale Partikel pro Tumor mit einer Flussrate von 5  $\mu$ l pro Minute eingebracht. Der Tumor wurde eine Woche nach Transfektion entnommen, vereinzelt und die GFP-Expression der Zellsuspension wie bei den Experimenten in Zellkultur flusszytometrisch bestimmt. Analog zu Abbildung 3.2 ist in Abbildung 3.5 das Ergebnis als Anteil GFP-positiver Zellen aus der Tumorzellsuspension von FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6 und UD-SCC-7a Tumoren dargestellt. Hier fällt auf, dass mit Ausnahme des FaDu-Tumors sich an den anderen untersuchten Tumorzelllinien in vivo eine GFP-Expression findet. Die GFP-Expression des FaDu-Tumors ist sehr gering, das Scattergramm liegt links von der Grenzlinie zur Grünfluoreszenz. Die verschiedenen UD-SCC-Zelllinien hingegen sind generell in vivo transfizierbar, da das Scattergramm dieser Zellpopulationen rechts der Grenzlinie im Bereich der Grünfluoreszenz liegen.

Es wurden jeweils fünf Tumoren der Zelllinien transfiziert und die mittlere Transfektionsrate bestimmt. Die Ergebnisse sind Abbildung 3.6 zusammengefasst. Für die Tumorzelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6 und UD-SCC-7a wurden mittlere Transfektionsraten von  $8.9 \pm 10.5$  %,  $39.0 \pm 21.0$  %,  $53.6 \pm 1.1$  % bzw.  $54.2 \pm 8.9$  % bestimmt. Dabei fällt auf, dass Zelllinien, die in vitro eine geringe Transfektionsrate aufweisen, wie z.B. der FaDu-Tumor auch als subkutan wachsenden Tumoren eine geringe Transfektionsrate zeigen. Die in vitro ebenfalls gering transfizierbare Zelllinie UD-SCC-7a zeigt demgegenüber als solide wachsender Tumor eine sehr hohe Transfektionsrate von  $54.2\% \pm 8.9$  %.

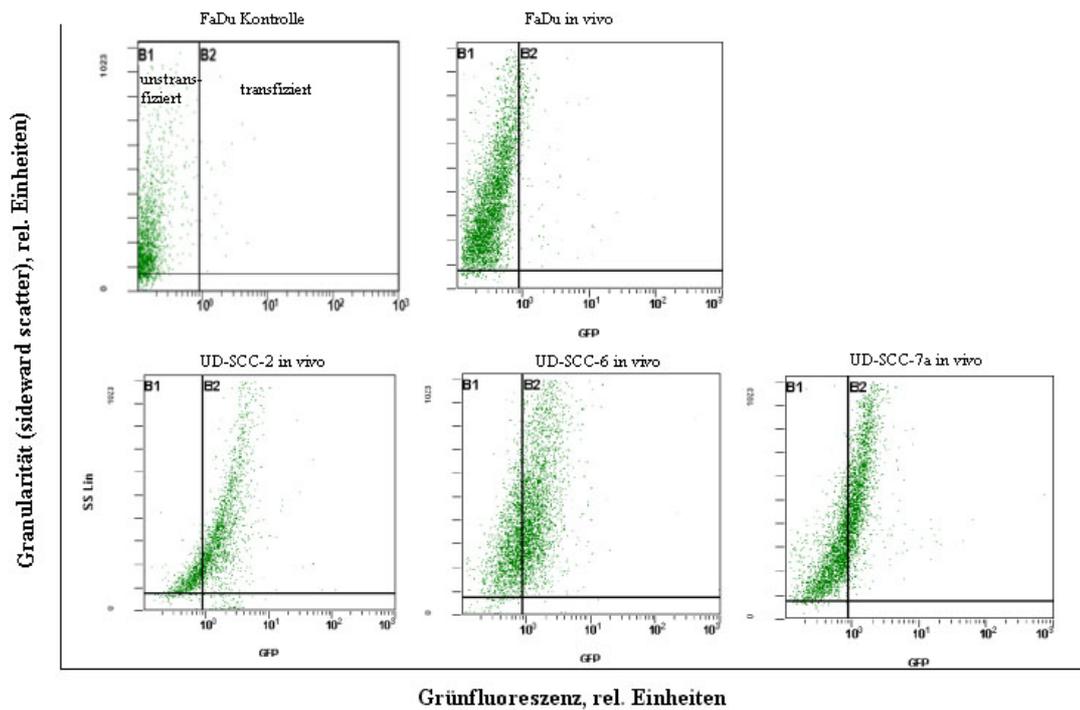


Abb. 3.5 Fluoreszenzzytometrisch bestimmte GFP-Expression nach intratumoralen AdV-Infektion in vivo. Für jede untersuchte Zelllinie ist exemplarisch ein Beispiel dargestellt.

### AdV-eGFP Infektion in vivo

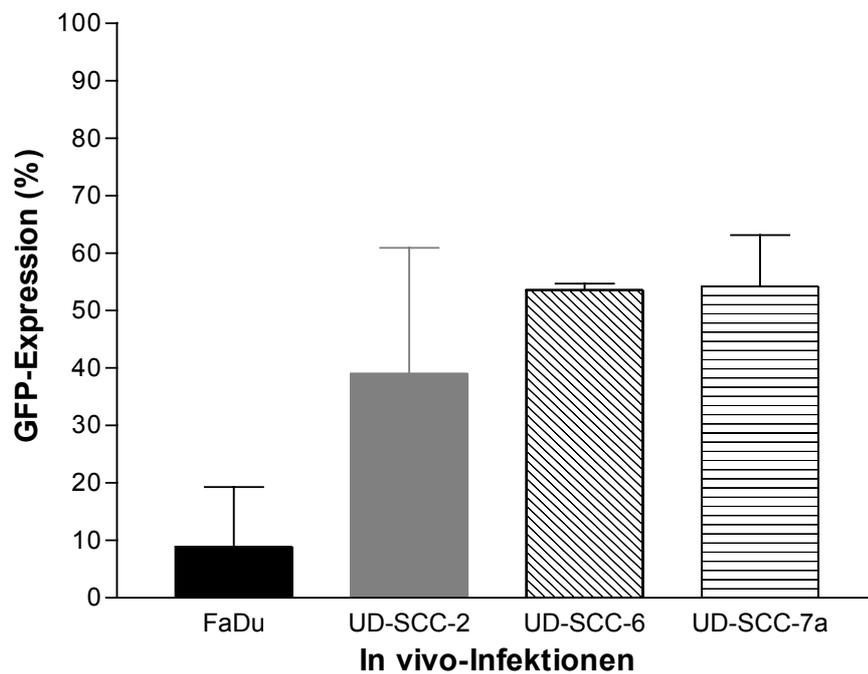
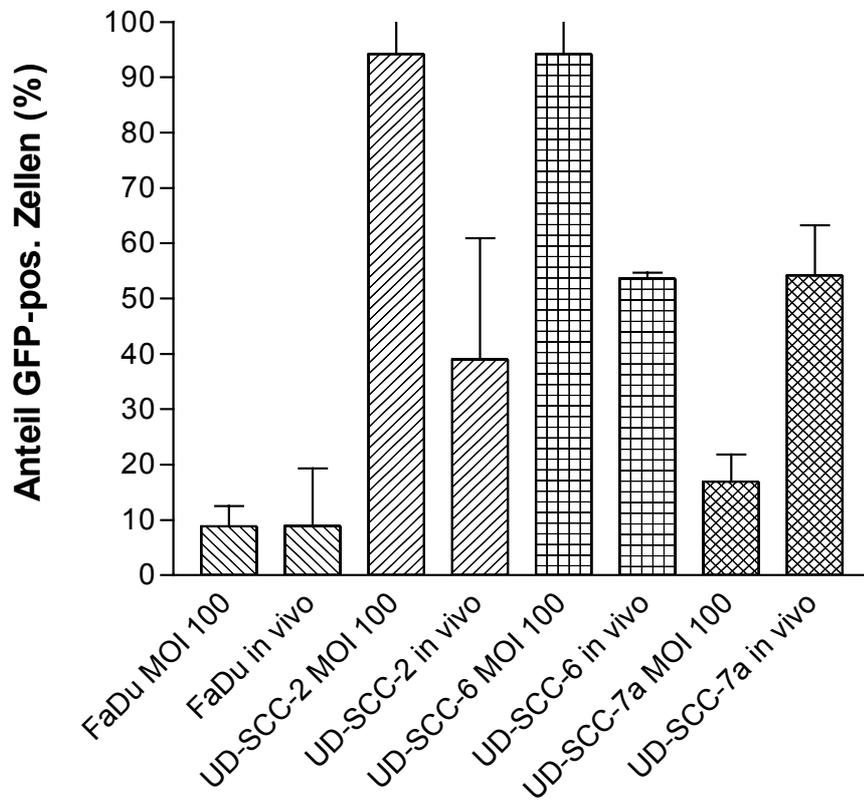


Abb. 3.6 Darstellung der statistischen Auswertung der infizierten Zelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6, und UD-SCC-7a in vivo. Angeben ist der rel. Anteil der grünfluoreszierenden Zellen und die dazugehörige Standardabweichung; n=5.

Einen abschließenden Vergleich der in vitro und in vivo erhobenen Daten zeigen die Abbildungen 3.7 und 3.8. Abbildung 3.7 zeigt für jede Zelllinie die in vitro mit einer MOI von 100 und die entsprechenden im gewachsenen Tumor erreichten Transfektionsraten. Für FaDu, UD-SCC-2 und UD-SCC-6 konnten generell die in vitro bestimmte Transfizierbarkeit durch die in vivo Bestimmung bestätigt werden, wobei die beiden UD-SCC-Zelllinien als gut transfizierbar und der FaDu als gering transfizierbar zu bewerten sind. Der UD-SCC-7a stellt, wie schon erwähnt, insofern eine Besonderheit dar, als dass er die in vitro bestimmte Transfektionsrate in vivo deutlich übersteigt. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3.8 als Punktdiagramm dargestellt, in der die Transfektionsraten in vitro in Korrelation zu der in vivo bestimmten Transfektionsraten aufgetragen sind. Die Datenpunkte, die die Ergebnisse des UD-SCC-7 zeigen, liegen weit einer linearen Korrelation.

### **3.3. Immunhistochemische Bestimmung der Expression der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptoren (CAR) der verwendeten Zelllinien**

Die Ausstattung einer Zelle mit dem membranständigen (CAR)-Rezeptor wird direkt mit dem Erfolg adenoviraler Transfektion in Verbindung gebracht. Diese membranständigen Rezeptoren werden interzellulär an den Berührungspunkten der Zellmembran exprimiert und stellen die Penetrationsstelle der Adenoviren in das Zytoplasma der nun infizierten Zelle dar. Es wird davon ausgegangen, dass die Transfektionsrate direkt mit dem Ausmaß der Rezeptorexpression korreliert. Zur Überprüfung der Annahme, dass die Rezeptorexpression der verwendeten Zelllinien gemäß ihrer divergenten Transfektionsraten sichtlich stark ausgeprägt ist, wurden die Zellen aus Kultur auf die Expression von CAR immunhistochemisch untersucht. Die Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch für die Zelllinien FaDu und UD-SCC-2 ein Beispiel der Rezeptorexpression. Diese Aufnahmen wurden nach Fixierung, immunhistochemischer Färbung auf den CAR-Rezeptor an einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiss (Axiovision) erstellt.



### infizierte SCC-Zelllinien

Abb. 3.7 Zusammenfassende Darstellung der statistischen Auswertung der infizierten Zelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6, und UD-SCC-7a in vitro und in vivo. Angegeben ist der rel. Anteil der grünfluoreszierenden Zellen und die dazugehörige Standardabweichung.

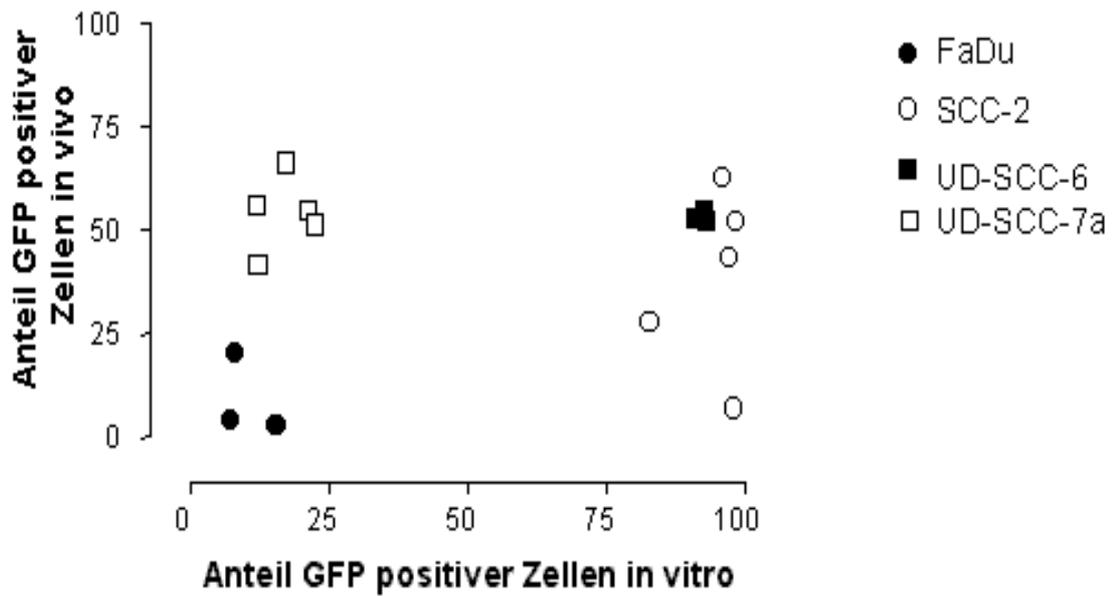


Abb. 3.8 Zusammenfassende Darstellung der statistischen Auswertung der infizierten Zelllinien FaDu, UD-SCC-2, UD-SCC-6, und UD-SCC-7a in vitro und in vivo als Punktdiagramm. Die Transfektionseffizienz der einzelnen Zelllinie in vitro ist gegen die Transfektionseffizienz in vivo aufgetragen.

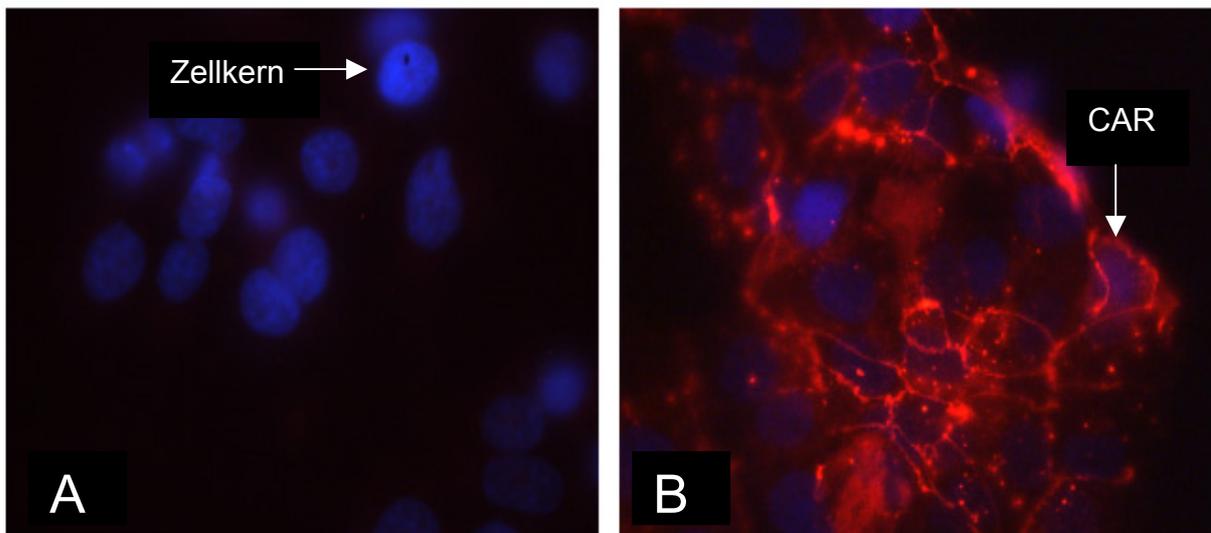
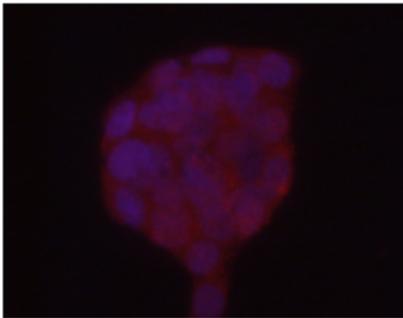


Abb. 3.9 Vergleich der Immunfluoreszenz auf CAR der Zelllinien FaDu (Panel A) und HuH7 (Panel B). Die Zellkerne sind mittels DAPI blau eingefärbt, rote Fluoreszenz zeigt die Expression von CAR an. Auffallend ist die nicht vorhandene Rotfluoreszenz bei der FaDu-Zelllinie im Gegensatz zur Zelllinie HuH7.

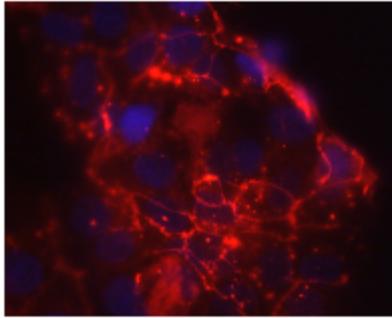
Die mikroskopischen Aufnahmen lassen die blaugefärbten Zellkerne erkennen (ZK). Die rote Fluoreszenz zeigt Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptoren (CAR) an, die sich an den interzellulären Kontakten befinden. Generell zeigen die verschiedenen Zelllinien ein unterschiedliches Expressionsmuster in der CAR-Rezeptoren (Abb. 3.10). Die FaDu-Zelllinie (Panel A) zeigt nur vereinzelt die Expression von CAR-Rezeptoren. Es fallen nur die dichtgedrängt stehenden Zellkerne und eine unspezifische Rotfluoreszenz im Hintergrund auf. Eine nennenswerte Expression von CAR-Rezeptoren ist nicht erkennbar. Anders verhält es sich bei der HuH7-Zelllinie (Panel B), hier ist die Rotfluoreszenz sehr ausgeprägt. Es finden sich einzelne rote Punkte und gleichmäßig rot fluoreszierende Linien, die eine hohe Expression der CAR-Rezeptoren anzeigt. Bestätigt wird dies durch die Verteilung der Rotfluoreszenz, die sich an den interzellulären Zonen der Tumorzellen befindet, zytoplasmatische Fluoreszenz findet sich nicht.

Die UD-SCC-2 Zelllinie (Panel C) zeigt ebenso eine hohe Rotfluoreszenz. Die Verteilung stellt sich aber im Vergleich zur HuH7-Zelllinie mehr punktförmig dar. Zellen der Linie UD-SCC-6 (Panel D) zeigen eine ausgeprägte, auf die interzelluläre Zone beschränkte Rotfluoreszenz. Hier lässt sich deutlich erkennen, wie die CAR-Rezeptoren an der Zelloberfläche in Erscheinung treten. Die UD-SCC-7a Zelllinie (Panel E) zeigt eine andere Rotfluoreszenz im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Die Rotfluoreszenz ist geringer ausgeprägt und punktförmig an der Zelloberfläche angeordnet. Die Expression ist auch nicht gleichförmig, es finden sich Zonen mit höherer Fluoreszenz im Wechsel mit Zonen geringerer Aktivität der Fluoreszenz. Insgesamt ist die Verteilung der Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen UD-SCC-Zelllinien deutlich geringer aber immer noch höher als die bei FaDu-Zellen dargestellte Expression.

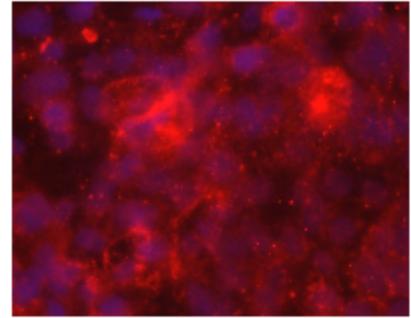
Panel A: Zelllinie FaDu



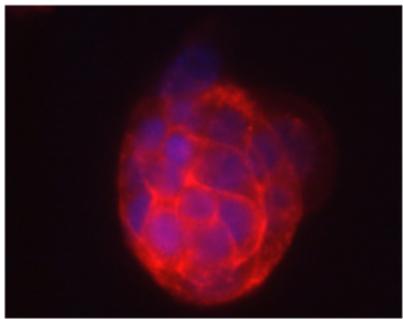
Panel B: Zelllinie HuH7



Panel C: Zelllinie UD-SCC-2



Panel D: Zelllinie UD-SCC-6



Panel E: Zelllinie UD-SCC-7a

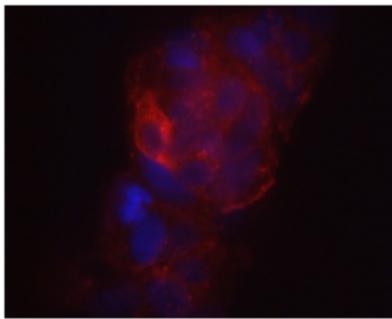


Abb. 3.10 Immunfluoreszenz auf CAR der untersuchten Tumorzelllinien FaDu, HuH7, UD-SCC-2, UD-SCC-6 und UD-SCC-7a.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Intratumorale Injektion unter Verwendung des Mikroinjektionssystems MAGD**

Im Rahmen einer adenoviralen Gentherapie stellt die sichere und effektive Virusapplikation in das Zielgewebe den entscheidenden Schritt für den Erfolg der Gentherapie dar. Die lokale Vektorapplikation oberflächennaher Tumoren hat sich gegen die systemische Gabe adenoviraler Vektoren durchgesetzt, da limitierende Nebenwirkungen wie die Virussegregation in den Hepatozyten mit der Folge einer geringen systemischen Viruskonzentration sowie eine damit verbundene Hepatitis und Aktivierung des Immunsystems entfallen. Eine sichere Deponierung des Vektors im Tumor ist für eine erfolgreiche Gentherapie von zentraler Bedeutung. In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur lokalen Vektorapplikation beschrieben. Zaharoff et al. sowie Li et al. versuchen, die Transfektionsrate durch in vitro bewährte Verfahren wie die Elektroporation schon bei der Vektorapplikation zu verbessern. Allgemein anerkannt ist die intratumorale Mikroinjektion zur Anlieferung des adenoviralen Vektors in den Tumor. Diese wird in verschiedenen Studien durch eine manuelle Applikation der Injektionsnadeln in den Tumor und die manuelle oder pumpengesteuerte Infusion des Vektors in den Tumor bewerkstelligt. Die manuelle Handhabung von Injektionsnadeln und die manuelle Infusion verringert die Reproduzierbarkeit des Injektionserfolgs und erhöht das Risiko unerwünschter Freisetzung der Vektoren.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur kontrollierten Injektion von Tumoren auf der Nacktmaus und der lokalen Applikation adenoviraler Vektoren in die so erreichten Tumoren. Lammering et al. bedienen sich einem Mikroinjektionssystem zur kontrollierten Infusion definierter Volumina, wobei die Injektionsnadeln manuell platziert werden. (Lammering et al. 2001, Lammering et al. 2003). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Veränderung der Nadeltiefe während der Injektion die Transfektionsrate signifikant verbessern kann. Dieses Ergebnis wurde bei der Konstruktion des Mikroinjektionssystems MAGD berücksichtigt und ein Verfahren entwickelt, das bei maximaler Anwendersicherheit die Durchführung standardisierter Injektionsprotokolle ermöglicht. Durch die pumpengesteuerte Injektion ist eine unerwünschte

Kontamination durch die Freisetzung adenoviraler Vektoren weitgehend verhindert. Außerdem bietet das MAGD-System die Möglichkeit, kontrolliert während der Injektion die Nadelposition kontrolliert zu verändern. So können auch für solche Anwendungen mit Veränderung der Nadeltiefe standardisierte Injektionsprotokolle erreicht werden.

Zum Nachweis der erfolgreichen Injektion kam in dieser Arbeit die Magnetresonanztomographie zum Einsatz. Unter Verwendung spezieller Kontrastmittel konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz des MAGD-Systems Tumoren einer Größe von  $80\text{mm}^3$  bis  $200\text{mm}^3$  mit einem Viertel ihres Volumens vollständig beimpft werden können.

Die wesentlichen Vorteile des MAGD-Systems sind neben der Verbesserung der Anwendersicherheit eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse intratumoraler Injektionen. Im Rahmen der biologischen Varianz ist es nun möglich, innerhalb eines Experiments eine Serie von Tumoren bei gleichbleibendem Injektionserfolg mit einem adenoviralen Vektor zu beimpfen. Somit wird unter Verwendung des MAGD-Systems eine sichere Vektorapplikation ermöglicht und die Reproduzierbarkeit intratumoraler Injektionen gewährleistet.

Nachteile des MAGD-Systems sind der gesteigerte Zeitaufwand der Injektion sowie die etwas sperrige Handhabung. Technisch kann die hier vorgestellte Methode sicherlich noch optimiert werden. Wünschenswert wäre eine Automatisierung der Bedienung des MAGD-Systems gänzlich ohne eine manuelle Bedienung am Gerät. Zudem wäre eine magnetresonanztomographische Darstellung und Verfolgung der injizierten adenoviralen Vektoren in Echtzeit denkbar. Zu diesem Zweck wäre ein Umbau des hier vorgestellten MAGD-Systems unter Verwendung von Metallen wie Titan oder Kunststoffen erforderlich, um die magnetresonanztomographische Bildgebung nicht zu beeinflussen. Um eine Darstellung des Vektors während der Injektion im Magnetresonanztomographen zu erreichen, müssten Kontrastmittel vom SPIO-Typ an die adenovirale Hülle gekoppelt oder in das Capsid eingeschleust werden. Die Kopplung von SPIOs an verschiedene molekulare Strukturen ist bereits gelungen und Gegenstand intensiver Forschung (Frank et al. 2004, Himes et al. 2004, Toma et al. 2005).

Vergleicht man die guten Ergebnisse der intratumoralen Injektionen mittels MAGD und die Transfektionseffizienz der intratumoral applizierten Adenoviren, so stellt sich eine Diskrepanz zwischen der guten Effektivität der Injektionsmethode und der zum Teil unbefriedigenden Transfektionseffizienz der mit AdV-eGFP injizierten Tumoren dar. Die zum Teil nur geringen Transfektionsraten können nicht mit einer ineffektiven Transfektionsmethode erklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass nicht technische, sondern biologische Mechanismen der schwankenden Transfektionseffizienz zu Grunde liegen.

#### **4.2. Vergleichende Untersuchung der adenoviralen Transfektionseffizienz unterschiedlicher Xenotransplantate von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs**

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten MAGD-Systems wurden die Transfektionsfähigkeit verschiedener Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches als Xenotransplantat im Mausmodell durch Adenoviren untersucht und diese mit der Transfektionseffizienz der entsprechenden Zelllinie *in vitro* verglichen. Die untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigten *in vitro* wie *in vivo* ausgeprägte Unterschiede in der Effektivität der Transfektion, wobei diese Unterschiede nicht notwendigerweise direkt korrelierten. So lag bei den untersuchten Zelllinien *in vitro* die Transfektionsrate bei Raten von 8.8 % bei der FaDu-Zelllinie bis zu einer Rate von 94.2 % bzw. 91.2 % bei der Zelllinie UD-SCC-2 und UD-SCC-6. Diese hohen Transfektionsraten zeigten generell eine ausgeprägte Fähigkeit zur Aufnahme adenoviraler Vektoren an. Die Zelllinie UD-SCC-7a ließ sich ähnlich wie die FaDu-Zelllinie nur zu 17.2 % mit dem adenoviralen Vektor transfizieren. Die zum Vergleich hinzugezogene Zelllinie HuH7, ein primäres Leberzellkarzinom, zeigte mit 99.1 % eine sehr hohe Transfektionsrate. Für diese Zelllinie ist eine hohe adenovirale Transfektionsfähigkeit bekannt (Ye et al., 2005). Fast alle Zellen dieser Zelllinie konnten zur Expression des Transgens eGFP gebracht werden. Vergleicht man die Transfektionsraten dieser Zelllinie mit den für die Zelllinien UD-SCC-2 und UD-SCC-6 erhobenen Daten, so zeigt sich auch für diese Plattenepithelkarzinome eine sehr gute Transfektionsfähigkeit. Im Gegensatz dazu stehen die Transfektionsergebnisse der ebenfalls untersuchten Plattenepithelkarzinomen FaDu und UD-SCC-7a. In der Literatur ist die unterschiedliche Effektivität der Transfektion mit Adenoviren innerhalb von Plattenepithelkarzinomen ähnlicher Topik wie in dieser Arbeit gezeigt worden (Jee et al. 2002).

Die in vivo erhobenen Daten zeigen für die einzelnen Zelllinien untereinander ebenfalls Unterschiede der Transfektionsfähigkeit, dabei liegt die Transfektionsfähigkeit in vivo generell unter der in Zellkultur nachgewiesenen Transfektionseffizienz. Dies ist möglicherweise auf eine höhere adenovirale Vektorkonzentration in vitro zurückzuführen, die sich in vivo nicht erreichen lässt, da dort eine exakte Zellzahlbestimmung nicht möglich ist und die Zellen im Gewebeverband von den adenoviralen Vektoren weniger gut erreicht werden als unter den optimalen Bedingungen der Zellkultur. Zudem wird die Konzentration des adenoviralen Vektors in vivo durch das Tiermodell begrenzt da zu hohe Vektorkonzentrationen zu immunologischen Allgemeinreaktionen an den injizierten Versuchstieren führen.

#### **4.3. Die Bedeutung des Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) für die adenovirale Transfektion**

Vergleicht man die in vivo erreichte Transfektionsrate der Zelllinie UD-SCC-7a mit der Transfektionseffizienz der Zellen in Kultur, so kann eine signifikante Erhöhung der Transfektionsrate in vivo festgestellt werden. Somit stellt diese Zelllinie insofern einen Sonderfall dar, da die unter den optimalen Bedingungen der Zellkultur nachgewiesenen Transfektionsraten von 20 % im Tumorgewebe mit über 50% deutlich überschritten wurde. Diese Unterschiede des Transfektionserfolges in vivo und in vitro lassen sich möglicherweise mit den zellulären, rezeptorvermittelten Prozessen der Bindung und Aufnahme des adenoviralen Vektors erklären. Als verantwortlich für die adenovirale Bindung gilt der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR), von dem bekannt ist, dass er bei der Transfektion von Normal- wie Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielt.

Die Adenovirus-Subtypen 2 und 5 benötigen die Anwesenheit von CAR sowie die vitronektin- bzw. fibronektinbindenden Integrine an der Zelloberfläche, um die Zellen effizient zu infizieren. CAR vermittelt die erste Bindung des Adenovirus an die Zellen, während Integrine für die Internalisierung des Virus in die Zellen verantwortlich sind. Die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  sind dabei entscheidend für die Internalisierung der rezeptorgebundenen Viren in die Zellen nach der Bindung an CAR, Mikrotubuli transportieren die eingeschleusten Viren in den Zellkern (Wickham et al. 1993, Leopold et al. 2000).

CAR stellt ein Zelladhäsionsmolekül an Normal- wie an Tumorzellen dar, dass sich bei subkonfluent wachsenden Zellen in Kultur an ihren interzellulären Kontakten nachweisen lässt. In differenzierten humanen Atemwegsepithelien

wurden CAR im Bereich der basolateralen Membran nachgewiesen, insbesondere an basolateralen Zelladhäsionen.

Eine Reihe von Studien haben die Expressionshöhe von CAR und die Adenovirus-Zellbindung, -Zellinfektion oder adenovirale Transgenexpression in einer positiven Relation zueinander beobachtet (Bergelson et al. 1997; Hemmi et al. 1998; Li et al. 1999; Tomko et al. 1997; Wickham et al. 1993). Die Bedeutung von CAR bei der adenoviralen Transfektion als primärer Bindungspartner konnte deutlich nachgewiesen werden. Zellen, die einer adenoviralen Infektion gegenüber resistent waren und keine CAR-Expression zeigten, wurden durch eine Transfektion eines CAR-exprimierenden Plasmids adenoviral infizierbar. Dies konnte an CHO-Zellen (Bergelson et al. 1997), Blasenkarzinom-Zellen (Li et al. 1999) und humanen Fibroblasten (Hidaka et al. 1999) gezeigt werden. CAR wurde somit eindeutig als wesentlicher Bindungspartner für Adenoviren an der Zelloberfläche identifiziert (Bergelson et al. 1997, Tomko et al. 1997). Jedoch sind weitere Moleküle erforderlich, um die Internalisierung der Viruspartikel zu vermitteln. Integrine dürften somit ebenso für den adenoviralen Transduktionsprozeß limitierend sein. Als Hauptbindungspartner stellt CAR einen der Hauptfaktoren für eine effektive Transfektion durch adenovirale Vektoren innerhalb der adenoviralen Gentherapie dar.

Das Expressionsmuster des CAR-Proteins wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenz an subkonfluent gewachsenen Zellen aus Kultur analysiert. In der Immunfluoreszenz zeigen sich an interzellulären Kontakten intensive CAR-Färbungen. Dabei folgten die Unterschiede in der Intensität der CAR-Färbung generell den Unterschieden der Transfektionseffizienz der Zelllinien *in vitro*. Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der CAR-Expression, wie sie für die Infektion von Normal- und Tumorzellen ebenso gezeigt werden konnte (Colin et al. 2000, Koi et al. 2001, Hutchin et al. 2000, Kasono et al. 1999, Li et al. 1999, Carson et al. 1999).

Betrachtet man die Ergebnisse der Transfektionseffizienz *in vivo*, so wird deutlich, dass diese nicht mit den Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen korrelieren. So zeichnet sich die Zelllinie UD-SCC-7a in Kultur durch eine erhöhte Transfektionsrate aus, während die anderen Zelllinien unter den *in vitro* bestehenden Transfektionsraten zurückbleiben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die CAR-Expression in Zellkultur anders als im Gewebe ausgeprägt sein könnte. Bei den *in vivo* infizierten Zellen liegt eine solide gewachsene,

dreidimensionale Tumormatrix vor, während für die in vitro-Untersuchungen ein zweidimensionaler Monolayer untersucht wurde. Eine Erklärung für die bessere Transfektionseffizienz der Zelllinie UD-SCC-7a in vivo wäre eine absolut erhöhte CAR-Expression gegenüber der Rezeptordichte in vitro durch die dreidimensionale Tumormatrix und damit vermehrten interzellulären Adhäsionen, an denen die CAR-Rezeptoren exprimiert werden.

Dem gegenüber muß die Verschlechterung in vitro gut transfizierbarer Zelllinien wie UD-SCC-2 zur Transfektionseffizienz in vivo diskutiert werden. Es wäre vorstellbar, dass eine dreidimensionale Anordnung der Tumorzellen bei hoher CAR-Rezeptordichte die Infektion der Tumorzellen durch adenovirale Vektoren erschwert, z.B. durch eine homophile Assoziation von CAR bei höherer CAR-Expression an der Zellmembran (Runnebaum, 2001). Insofern könnte eine homophile Assoziation von CAR bei der interzellulären Adhäsion die adenovirale CAR-Bindung behindern. Weiterführende Untersuchungen wären sinnvoll, um zu überprüfen, ob Zellen in Kultur möglicherweise generell eine veränderte CAR-Expression aufweisen als Zellen im Gewebeverband. Diese Fragestellung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, ist aber Gegenstand fortführender Arbeiten.

Neben dem Einfluss der CAR-Expression auf Tumorzellen im Rahmen einer adenoviralen Gentherapie muß auch die Rolle der Integrine für den Erfolg der Transfektion diskutiert werden. Bei Ovarialkarzinom-Zellen ist der Verlust der Integrin-Expression ein stärkerer limitierender Faktor für die adenovirale Transduktion als der Verlust von CAR (Brüning et al. 2001). Gering differenzierte Ovarialzellkarzinome zeichnen sich häufig durch den Verlust der Integrin- $\beta_3$ -Untereinheit aus. Die Wiederherstellung der Expression der  $\beta_3$ -Untereinheit in hoch metastatischen Melanomzellen verhinderte einen aggressiven Phänotyp (Danen et al. 1996). Denkbar wäre, dass der Differenzierungsgrad eines Tumors generell dessen Transfizierbarkeit bestimmt und niedrig differenzierte Tumore sich am wenigsten für die adenovirale Gentherapie eignen. Dies steht jedoch nicht in Bezug auf eine reduzierte CAR-Expression, sondern eher in Bezug zur reduzierten Expression von Integrin-Untereinheiten. Somit muß bei einem Verlust der ehemals guten Transfektionsfähigkeit eines experimentellen Tumors in hoher Passage neben dem Verlust der CAR-Expression auch an eine Veränderung der Integrin-Expression an der Zelloberfläche gedacht werden.

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der unterschiedlichen Transfektionsrate an Plattenepithelkarzinomen wäre eine Veränderung der Integrin-Expression durch das Wachstum der Zellen in einer dreidimensionalen Struktur. Die Expression von Integrin  $\alpha_v\beta_5$  sowie  $\alpha_5\beta_1$  könnte im Gegensatz zum Wachstum als Monolayer in der Zellkultur beim Wachstum als solider Tumor gesteigert sein. Dieser Effekt könnte die Bahnung des Adenovirus in die Zelle vereinfachen und zu einer erhöhten Transfektionseffizienz führen. Dieser Sachverhalt kann neben einer Erhöhung der CAR-Expression als Erklärungsansatz für die verbesserte Transfektionsrate von Plattenepithelkarzinomen in vivo herangezogen werden und könnte die erhöhte Transfektionsrate der Zelllinie UD-SCC-7a in vivo erklären.

#### **4.4. Mögliche Lösungen der Problematik niedriger Transfektionsraten bei der adenoviralen Gentherapie**

Eine weitere Möglichkeit der Lösung des Problems der niedrigen adenoviralen Transfektionseffizienz liegt neben der Steigerung der CAR-Expression der Zielzelle in der molekularen Veränderung adenoviraler Strukturen. Curiel et al. und Dehari et al. konnten in ihren Arbeiten eine tausendfache Steigerung der Transgenexpression durch Veränderung der „Fiber knobs“ erreichen. Diese aus dem adenoviralen Capsids herausragenden adenoviralen Anteile sind eine der wichtigsten Schaltstellen zur Bindung des Virus an den CAR-Rezeptor. Veränderungen dieser entscheidenden Capsid-Strukturen führen zu einer verbesserten Bindung an den CAR-Rezeptor und somit an die Zielzelle. Diese Veränderungen führten auch zu einer Veränderung der Aufnahme des systemisch applizierten Vektors in der Leber. An entscheidenden Capsidanteilen veränderte Adenoviren werden vom Hepatozyten nicht mehr aufgenommen und die Adenoviren verbleiben in der Zirkulation. Der First-Pass-Mechanismus der Leber kann damit effektiv umgangen und die Effektivität einer systemischen adenoviralen Gentherapie gesteigert werden.

Eine weitere Problemlösung zur Steigerung der adenoviralen Transfektionseffizienz liegt in der Applikationsform des therapeutischen adenoviralen Vektors. Lee et al. (2000) konnten durch eine Einbindung des adenoviralen Vektors in polykationische Liposomen eine signifikante Steigerung der Transfektionsrate in vivo erreichen.

## **5. Zusammenfassung und Ausblick**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Systems zur kontrollierten Injektion von Tumoren auf der Nacktmaus und der lokalen Applikation adenoviraler Vektoren in Xenotransplantate verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Mikroinjektionssystem MAGD steht eine Methode zur Verfügung, mit dem eine ortsgenaue und volumenkontrollierte Injektion von relativ kleinen Tumoren auf der Nacktmaus möglich ist. Die Parameter der Injektion lassen sich am Gerät und dem dazugehörigen Pumpensystem so modifizieren, dass ein Vielzahl von Möglichkeiten zur Festlegung eines optimalen Injektionsprotokolls zur Verfügung stehen. Durch die Verwendung einer Mikrometerschraube ist die kontrollierte Veränderungen der Injektionsnadel während des Injektionsprozesses möglich. Neben der Variabilität liegt der Vorteil des Systems in der Reproduktionsfähigkeit von intratumoralen Injektionen innerhalb der biologischen Varianz. Mittels Magnetresonanztomographie ließ sich ein Nachweisverfahren etablieren, mit dem intratumoral injizierte Volumina mit der Hilfe von SPIO-Kontrastmitteln sehr sensitiv und spezifisch zur Darstellung kommen können. Die offene Konstruktion des Mikroinjektionssystems MAGD lässt Raum für Veränderungen und ist ausreichend flexibel für die Anwendung in unterschiedlichen Tiermodellen. Das in dieser Arbeit verwendete Setup der Mikroinjektion hat sich bewährt und kann zur sicheren intratumoralen Injektion kleinster Volumina im Tiermodell bei guter Reproduzierbarkeit der Injektionsparameter erfolgreich eingesetzt werden.

Desweiteren wurde die Transfektionseffizienz von Plattenepithelkarzinomen durch adenovirale Vektoren in Zellkultur und im Tiermodell vergleichend untersucht. Es fand sich ein signifikanter Unterschied der Transfektionseffizienz innerhalb der untersuchten Tumorzelllinien *in vitro*, die von sehr niedrigen Raten von 2.1 % zu sehr hohen Raten von 99.1 % der Transfektionseffizienz reichten. Auch *in vivo* zeigten sich Unterschiede in der Transfektionseffizienz, die aber nicht generell mit der *in vitro* bestimmten Transfektionsrate korrelierten. Es ist davon auszugehen, dass die Transfektionseffizienz direkt von der Expression des Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) abhängt. Die Unterschiede der in Zellkultur ermittelten Transfektionseffizienz korrelieren mit der Expression von CAR *in vitro*.

In vivo unterscheidet sich die Transfektionseffizienz maßgeblich von den Ergebnissen in Zellkultur. Dies könnte möglicherweise auf die Veränderung der Wachstumsbedingungen zurückzuführen sein, welche die Tumorzellen erfahren, wenn sie aus einer in vitro- in eine in vivo-Situation gebracht werden. Diese Hypothese wird gegenwärtig im Rahmen weiterer experimenteller Untersuchungen überprüft. Dazu wird der CAR-Expressionsstatus in vivo immunhistochemisch bestimmt und verglichen, in wieweit sich diese von der CAR-Expression der Zellen in Kultur unterscheidet. Diese fortführenden Untersuchungen dienen zum einen die Verifizierung des Systems durch einen anderen Experimentator sowie der Korrelation der Transfektionsrate in vivo mit dem in vivo exprimierten CAR.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Intensität der CAR-Expression mit zunehmender Passagierung eines Tumors im Tiermodell möglicherweise verändert und infolgedessen auch die Transfektionseffizienz. Diesbezüglich wäre eine systematische Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Tumorpassage, CAR-Expressionsintensität und Transfektionseffizienz eine sinnvolle Weiterführung der experimentellen Arbeiten. Als experimentelles Vorgehen wäre vorzuschlagen, verschiedene Tumorzelllinien zu untersuchen, welche deutliche Unterschiede der Transfektionseffizienz in Kultur aufweisen. Als Xenotransplantate werden dann diese Tumorzelllinien seriell transplantiert und nach jeder Passagierung die adenovirale Transfektionseffizienz sowie die CAR-Expression des Tumorgewebes bestimmt. Mit Hilfe der Ergebnisse lassen sich die erreichten Transfektionsraten der Xenotransplantate mit Veränderungen der CAR-Expression über die fortlaufende Passagierung des Experimentaltumors korrelieren und somit die Dynamik und Determinanten des adenoviralen Transfektion möglicherweise identifizieren.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Anderson (1998): Human gene therapy. *Nature Supp.* 392, A25-30.
2. Anklesaria P (2000): Gene therapy: a molecular approach to cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther* 2, 426-432
3. Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.I., and Finberg, R.W. (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenovirus 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.
4. Bergelson, J.M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M.S., Wickham, T., Crowell, R.I., and Finberg, R.W. (1998): The murine CAR homolog is a receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol* 72, 415-9.
5. Bertz J, Hentschel St, Hundsdörfer G, Kaatsch P, Katalinic A, Lehnert M, Schön D, Stegmaier Ch, Ziegler H (2004): Krebsregister der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 4. Ausgabe, ISBN 3-9808880-2-9
6. Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P., and Flanagan, J. M. (1999): Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286, 1579-83.
7. Birmingham K (2001): Fifteen-year follow up for gene therapy patients. *Nat Med* 7: 1263
8. Bowles KR, Gibson J, Wu J, Shaffer LG, Towbin JA and Bowles NE (1999): Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus receptor gene. *Hum Genet* 105, 354-359.

9. Brody, S. L., and Crystal, R. G. (1994): Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci* 716, 90-101; discussion 101-3.
10. Brody, S. L., Jaffe, H. A., Han, S. K., Wersto, R. P., and Crystal, R. G. (1994): Direct in vivo gene transfer and expression in malignant cells using adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 5, 437-47.
11. Brüning, A., Kohler, T., Quist, S., Wang-Gohrke, S., Moebus, V. J., Kreienberg, R., and Runnebaum, I. B. (2001): Adenoviral transduction efficiency of ovarian cancer cells can be limited by loss of integrin beta3 subunit expression and increased by reconstitution of integrin alphavbeta3. *Hum Gene Ther* 12, 391-9.
12. Carson SD, Hobbs JT, Tracy SM, and Chapman NM (1999): Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: Regulation in response to cell density. *J Virol* 73: 7077-7079.
13. Colin M, Maurice M, Trugnan G, Kornpropst M, Harbottle RP, Knight A, Cooper RG, Miller AP, Capeau J, Coutelle C and Brahimi-Horn MC (2000): Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells. *Gene Therapy* 7, 139-152.
14. Danen, E. H., van Kraats, A. A., Cornelissen, I. M., Ruiter, D. J., and van Muijen, G. N. (1996): Integrin beta 3 cDNA transfection into a highly metastatic alpha v beta 3-negative human melanoma cell line inhibits invasion and experimental metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 226, 75-81.
15. Davison, E., Diaz, R. M., Hart, I. R., Santis, G., and Marshall, J. F. (1997): Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *J Virol* 71, 6204-7.
16. Field, *Field's Virology*, 4. Auflage, Vol.1, S. 237, 2005.

17. Frank JA; Anderson SA; Kalsih H; Jordan EK; Lewis BK; Yocum GT; Arabab AS (2004): Methods for magnetically labeling stem and other cells for detection by in vivo magnetic resonance imaging. *Cytotherapy*; Vol 6 (6); p. 621-5.
18. Freimuth, P., Springer, K., Berard, C., Hainfeld, J., Bewley, M., and Flanagan, J. (1999): Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J Virol* 73, 1392-8.
19. Fooks AR (2000): Development of oral vaccines for human use. *Curr Opin Mol Ther* 2, 80-86
20. Galanis E and Russell S (2001): Cancer gene therapy clinical trials: lessons for the future. *Br J Cancer* 85: 1432-1436
21. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1990): Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 60, 849-59.
22. Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477-86.
23. Hasenburg A, Tong XW, Fischer Ph D DC, Rojas-Martinez A, Nyberg-Hoffman C, Kaplan AL, Kaufman RH, Ramzy I, Aguilar-Cordova E and Kieback DG (2001): Adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy in combination with topotecan for patients with recurrent ovarian cancer: 2.5-year follow up. *Gynecol Oncol* 83: 549-554
24. Hemmi, S., Geertsen, R., Mezzacasa, A., Peter, I., and Dummer, R. (1998): The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 9, 2363-73.
25. Herold G (2005) *Innere Medizin*, S. 334, Ausgabe 2005

26. Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P. L., Bergelson, J. M., Hackett, N. R., Finberg, R. W., Wickham, T. J., Koveshi, I., Roelvink, P., and Crystal, R. G. (1999): CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest* 103, 579-87.
27. Himes N; Min JY; Lee R; Brown C; Shea J; Huang X; Xiao YF; Morgan JP; Burstein D; Oettgen P (2004): In vivo MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*; Vol 52 (5), p. 1214-9
28. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
29. Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T., and Boulanger, P. A. (1997) : Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* 16, 2294-306.
30. Hutchin ME, Pickles RJ and Yarbrough WG (2000): Efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to oropharyngeal epithelial cells correlates with cellular differentiation and human coxsackie and adenovirus receptor expression. *Hum Gene Ther* 11, 2365-2375.
31. Jee, Youn Suk; Lee, Sang Goo; Lee, June Chul; Kim, Min Jung; Lee, Jae Jung; Kim, Dong Young; Park, Suk Woo; Sung, Myung-Whun and Heo, Dae Seog. (2002): Reduced expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) in tumor tissue to normal epithelium in head and neck squamos cell carcinoma patients. *Anticancer Research*, Vol. 22, pp. 2629-2634

32. Kasono, K; Blackwell, JL; Douglas, JT; Dmitriev, I; Strong, TV; Reynolds, P; Kropf, DA; Carroll, WR; Peters, GE; Bucy, RP; Curiel, DT; Krasnykh, V (1999): Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5:2571-2579.
33. Kay, M.A., Liu, D. and Hoogerbrugge, P.M. (1997). Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12744-12746.
34. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusco P, Kaye SB, Hong WK and Kirn DH (2000) A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6(8): 879–885
35. Kay, M.A., Liu, D. and Hoogerbrugge, P.M. (1997). Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12744-12746.
36. Koi H, Zhang J, Makrigiannakis A, Getsios S, MacCalman CD, Kopf GS, Strauss JF 3<sup>rd</sup> and Parry S (2001): Differential expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor regulates adenovirus infection of the placenta. *Biol Reprod* 64, 1001-1009.
37. Lammering G, Hewit Th H, Hawkins WT, Contessa JN, Reardon DB, Lin P-S, Valerie K, Dent P, Mikkelsen RB, Schmidt-Ullrich RK (2001): Epidermal growth factor receptor as genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization, *Journal of the National Cancer Institute* 93, 921-929.
38. Lammering G, Hewit Th H, Lin P-S, Contessa RK, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK (2003): Anti-erbB receptor strategy as a gene therapeutic intervention to improve radiotherapy in malignant human tumours. *Int J Radiat Biol* 79, 561-568.

39. Lee, Sang Goo; Yoon, Seong Jun; Kim, Chun Dong; Kim, Kyungjin; Lim, Dong Soo; Yeom, Young Il; Sung, Myung-Whun; Heo, Dae Seog and Kim, Noe Yeong (2000) : Enhancement of adenoviral transduktion with polycationic liposomes in vivo, *Cancer Gene Therapy*, Vol. 7, pp. 1329-1335
40. Leopold, P. L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K. K., Rodriguez-Boulan, E., and Crystal, R. G. (2000): Dynein- and micro-tubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* 11, 151-65.
41. Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31.
42. Leon RP, Hedlund T, Meech SJ, Shaobin L, Schaack J, Hunger SP, Duke RC and DeGregori J (2001): Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Cancer Res* 59: 325-330
43. Li, Y., Pong, R. C., Bergelson, J. M., Hall, M. C., Sagalowsky, A. I., Tseng, C. P., Wang, Z., and Hsieh, J. T. (1999): Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 59, 325-30.
44. Li S, Thang X, Xia X (2002): Regression of Tumor Growth and Induction of Long-Term Antitumor Memory by Interleukin 12 Elektro-Gene Therapy. *J National Cancer Institute*, Vol 94, pp. 762-768.
45. Li D, Duan L, Freimuth P and O'Mally BW Jr (1999): Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5: 4175-4181.

46. McDonald, D., Stockwin, L., Matzow, T., Blair Zajdel, M. E., and Blair, G. E. (1999): Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumour cells. *Gene Ther* 6, 1512-9.
47. Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner m, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S and Kirn D (2001): Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol* 19: 289-298.
48. Nielsen, L. L., Gurnani, M., Syed, J., Dell, J., Hartman, B., Cartwright, M., and Johnson, R. C. (1998): Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer: efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models. *Hum Gene Ther* 9, 681-94.
49. Nielsen, L. L., Lipari, P., Dell, J., Gurnani, M., and Hajian, G. (1998): Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer. *Clin Cancer Res* 4, 835-46.
50. Nielsen, L. L. and Maneval, D. C. (1998): P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther* 5, 52-63.
51. Panchal RG, Williams Da, Kitchener PD, Reilly AM, Khan J, Bowser DN and Petrou S (2001): Gene transfer: manipulating and monitoring function in cells and tissues. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 687-691.
52. Pfeifer A and Verma IM (2001): Gene therapy: promises and problems. *Annu rev Genomics Hum Genet* 2: 177-211

53. Roelvink, P. W., Mi Lee, G., Einfeld, D. A., Kovessi, I., and Wickham, T. J. (1999): Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286, 1568-71.
54. Roth, J. A. (1996): Modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wildtype p53 and cisplatin. *Hum Gene Ther* 7, 1013-30.
55. Roth JA and Cristiano RJ (1997) Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 89: 21–39
56. Runnebaum M (2001) Expression des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors in Ovarialkarzinomzellen und ihr Bezug zur adenoviralen Gentherapie. Med. Dissertation, Universität Freiburg
57. Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (1996): Kompendium der Internistischen Onkologie Teil 1, Springer Verlag Berlin, S. 281ff.
58. Suzuki K and Curiel DT (2001): Viral therapy of cancer. *Rec Inst Clin* 53: 346-356.
59. Toma A; Otsuji E; Kuriu Y; Okamoto K; Ichikawa D; Hagiwara A; Ito H; Nishimura T; Yamagishi H (2005): Monoclonal antibody A7-superparamagnetic iron oxide as contrast agent of MR imaging of rectal carcinoma. *British journal of cancer*, Vol 93, p. 131-6.
60. Tomko, R. P., Xu, R., and Philipson, L. (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3352-6.
61. Tütting T, Gambotto A, Robbins PD, Storkus WJ, DeLeo AB (1999): Co-delivery of T helper 1-biasing cytokine genes enhances the efficacy of gene gun immunization of mice: studies with the model tumor antigen  $\beta$ -galactosidase and the BALB/c Meth A p53 tumor specific antigen. *Gene Therapy*, Vol 6, pp. 629-636.

62. Verma, I. M. and Somia, N. (1997): Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-42.
63. Vile, R. G., Russell, S. J., and Lemoine, N. R. (2000). Cancer gene therapy: hard lessons and new courses. *Gene Ther* 7, 2-8.
64. Wang J, Murakami T, Hakamata Y, Ajiki T, Jinbu Y, Akasaka Y, Ohtsuki M, Nakagawa H, Kobayasi E (2001): Gene gun-mediated oral mucosal transfer of interleukin 12 cDNA coupled with an irradiated melanoma vaccine in a hamster model: Successful treatment of oral melanoma and distant skin lesion. *Cancer Gene Therapy*, Vol 8 (10), pp. 705-712.
65. Wang, X. and Bergelson, J. M. (1999): Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 73, 2559-62.
66. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresch, D. A., and Nemerow, G. R. (1993): Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-19.
67. Wills, K. N., Maneval, D. C., Menzel, P., Harris, M. P., Sutjipto, S., Vailancourt, M. T., Huang, W. M., Johnson, D. E., Anderson, S. C., Wen, S. F., and et al. (1994): Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding human p53 for gene therapy of cancer. *Hum Gene Ther* 5, 1079-88.
68. Ye X, Lu Q, Zhao Y, Ren Z, Ren XW, Qiu QH, Tong Y, Liang M, Hu F, Chen HZ.(2005): Conditionally replicative adenovirus vector carrying TRAIL gene for enhanced oncolysis of human hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*.16(6):1179-84.
69. Zaharoff DA, Barr RC, Li C-Y, Yuan F (2002): Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Therapy*, Vol 9, pp.1286-1290.

70. Zou, L., Zhou, H., Pastore, L., and Yang, K. (2000): Prolonged transgene expression mediated by a helper-dependent adenoviral vector (hdAd) in the central nervous system. *Mol Ther* 2, 105-13.

## **7. Anhang: experimentelle Protokolle**

Auflistung der verwendeten Antikörper und Lösungen:

- Rompun-Stock: 20 mg/ml (Rompun 2%, Bayer; PZN-1320422)
- Betäubungsgemisch: 6 mg/ml Ketanest, 1,6 mg/ml Rompun in 0,9% NaCl  
(für 50 ml: 12 ml Ketamin (25/mg/ml), 4 ml Rompun (2%), 34 ml 0,9% NaCl)
- ACK-Puffer (Lysepuffer): 500ml ACK-Puffer enthalten 4,012 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,692 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (M(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=138,21 g/mol), 100 µl 0,5 M EDTA, H<sub>2</sub>O ad 400 ml, der pH wird auf 7,2-7,4 mit 1 N HCl eingestellt, ad 500 ml; der Puffer wird gefiltert (0,2 µm)
- Medium für Enzymgemisch CHD: RPMI-1640 with Glutamax-I (Invitrogen Corporation, Cat.No.61870-010)
- CHD-Gemisch: 2 ml enthalten 100 µl 40 mg/ml Collagenase (Sigma, Cat.No. C 5138), 100 µl 6 mg/ml Desoxyribonuklease I (Sigma, Cat.No. D 5025), 100 µl 6 mg/ml Hyaluronidase V (Sigma, Cat.No. H6254) ad 2 ml RPMI-Medium with Glutamax-I (Invitrogen Corporation, Cat.No. 61870-010)
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O, autoklaviert
- PGS: 0.5% Glycin (1.5g), 0.05% Saponin (150mg) in PBS pH 7.4 (300mL) pro Stände
- Donkey/Horse/BSA-Mix: 10 % (v/v) Donkey Serum, 5 % (v/v) Horse Serum, 1 % (w/v) BSA in PGS
- anti-hCAR Antikörper, Klon RmcB, Fa Upstate, Charlottesville, USA
- Cy3-Konjugat Antikörper, Fa. Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
- DMEM, Medium für Zellkultur als Trockenpulver, Fa. Gibco, No. 31600, angesetzt mit 1M Hepes, 10% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin,
- MEM, Medium für Zellkultur, Fa. Gibco, No. 11012, angesetzt mit 10% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin

- Penicillin/Streptomycin: Invitrogen, Karlsruhe, No. 15140-122, 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin
- Trypsin-EDTA: Invitrogen, Karlsruhe, No. 25300-054, 0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA
- Fötale Kälberserum (FCS): Invitrogen, Karlsruhe, No. 10270-106
- Paraformaldehyd (PFA), Fa. Merck, No. 8.18715.0100

## **Prozeduren & Protokolle:**

### **Tumorzellenvereinzellung für die Messung im Durchflusszytometer:**

- 1) Betäubung des Tieres
- 2) Tumorentnahme
- 3) Die Gewebelöcke werden mittels Gewebepresse zerkleinert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt
- 4) Aufbewahrung des Gewebes bis zur Weiterverarbeitung auf Eis
- 5) 1,5 ml des CHD-Gemisches werden zugegeben und die Falcons im Rüttelinkubator bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert
- 6) Die gewonnene Zellsuspension wird bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt
- 7) Das Pellet wird in 2 ml ACK-Puffer homogen suspendiert und die Lyse sofort durch Zugabe von 3 ml eiskalten PBS gestoppt
- 8) Zentrifugation bei 200 x g für 5 min und 4°C, entfernen des Überstandes
- 9) Aufnehmen der Zellen in 1-2 ml PBS
- 10) Das angedaute Gewebe wird mit einer Spritze durch ein Filcon (Porenweite 50 µm) gepreßt
- 11) Zählen der Zellen im Durchflußzytometer Cytomics FC 500 (Fa. Beckman Coulter)

## **Anti - hCAR Immunfluoreszenz**

- 1) Objektträger in 4% PFA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixieren
- 2) Waschen der Objektträger in PBS für 5 Minuten, dann 5mal wiederholen.  
Zuletzt für 5 Minuten in PGS waschen
- 3) Blockieren mit Donkey/Horse/BSA-Mix für 20 Minuten bei Raumtemperatur
- 4) anti-hCAR (RmcB) in Donkey/Horse/BSA-Mix für eine Stunde bei 37°C  
→ Verdünnung: 1:100
  
- 5) Objektträger 2 x in PBS kurz tauchen, 2 x für 5 Minuten in PGS waschen
- 6) Cy3-labeled Donkey anti-Mouse Antikörper für 45 Minuten bei 37°C  
inkubieren  
→ 1 : 500 in Donkey/Horse/BSA-Mix
- 7) 2 x kurz in PBS tauchen, 3 x für 5 Minuten in PBS waschen
- 8) Objektträger für 5 Minuten in DAPI bei Raumtemperatur inkubieren  
→ 50 µL DAPI stock-Lsg. (5mg DAPI / 20 mL @ 4°C) auf 100ml PBS
- 9) Objektträger für 3 x für jeweils 5 Minuten in PBS waschen
- 10) Objektträger in MOWIOL mit PPD (anti-fading reagent) eindeckeln

## **Protokoll AdV-GFP Infektion von Kulturzellen**

### **Tag 0:**

1. Die zu untersuchenden Tumorzellen in 6-well-Platten aussähen, Zelldichte  $2-4 \cdot 10^5$  Zellen pro well,
2. Pro Zelllinie 1 well für Negativkontrolle einplanen

### **Tag 1:**

1. Zellzahl der ausgesähten Zellen bestimmen
2. AdV-GFP für MOI 10 und MOI 100 berechnen
3. Medium vollständig abnehmen
4. pro well 800µl Viruslösung (für die jeweilige MOI) hinzugeben, auf ausreichende Durchmischung der Viren mit dem Trägermedium achten
5. 3h bei 37°C im Inkubator belassen, Virus komplett entfernen und mit 3ml Medium pro Well auffüllen
6. 48 Stunden Inkubationszeit

### **Tag 4:**

1. Abtrypsinieren der Zellen und Analyse der Transgenexpression mittels FACS

## **8. Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Annette Raabe für die Überlassung des Themas, die sehr freundliche und unermüdliche Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit, die Hilfestellung bei der Betreuung der Versuchstiere und für ihre Bereitschaft, mir jede Art von Frage geduldig zu beantworten.

Herrn Privatdozent Dr. med. Jochen Dahm-Daphi danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie die Möglichkeit, die Einrichtungen des Labors zu nutzen.

Danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Frank Schnieders, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die Bereitstellung des Adenovirus, seiner Laboreinrichtungen und sein Wissen über adenovirale Gentherapie, welches er immer zu teilen bereit war.

Herrn Dr. med. Harald Ittrich aus der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der magnetresonanztomographischen Aufnahmen an der Nacktmaus.

Frau Fruszina Horvath, Denise Juhrs, Maria Omnischinsky und Lena Schliecker danke ich für die hervorragende Einführung in die Laborarbeit und die Tierbetreuung.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Theda und Peter Bohlen, die mir das Studium der Medizin erst ermöglicht haben und deren Rat und Tat ich mir zu jeder Zeit sicher sein konnte.

Meiner Schwester Dagmar und meiner Freundin Isabel Disper danke ich, da sie mich stets unterstützt haben und immer für mich da sind.

## **9. Lebenslauf**

Name: Günther Martin Bohlen  
Geburtsdatum: 8.11.1977  
Geburtsort: Leer/Ostfriesland  
Mutter: Theda Bohlen, geb. Lüttermann, \*13.08.1949  
Vater: Peter Bohlen, \*06.03.1945  
Schwester: Dagmar Bohlen, \*01.09.1971

### **Schulbildung:**

1983 – 1987 Grundschule Warsingsfehn-West  
1987 – 1989 Orientierungsstufe Warsingsfehn  
1989 - 1997 Ubbo-Emmius-Gymnasium, Leer  
9.6.1997 Abitur

### **Zivildienst und Ausbildung:**

Juli 1997 – August 1998 Zivildienst beim Rettungsdienst des DRKmedimobile  
Dienstleistungen in Leer

August 1998 – März 2000 Ausbildung zum Rettungsassistenten an der  
DRK-Rettungsschule Goslar und hauptamtliche  
Tätigkeit im Rettungsdienst des DRK in Leer.

### **Studium:**

April 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin am Uni-  
versitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
03.04.2002 Physikum  
November 2002 Beginn der Promotionsarbeit am Labor für Strahlen-  
biologie & Experimentelle Radioonkologie der Klinik  
für Strahlentherapie und Radioonkologie des Uni-  
versitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Leiter: Prof.  
Dr. Ekkehard Dikomey)  
16.04.2003 1. Staatsexamen  
08.04.2005 2. Staatsexamen  
25.04.2005 Beginn des Praktischen Jahres

## **10. Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen 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, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.