

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
I. Medizinische Klinik und Poliklinik  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. A. W. Lohse

**Adenovirale Tetracyclin-supprimierbare  
Zytokingenexpression für die *In-vivo*-Gentherapie  
kolorektaler Karzinome**

**Dissertation**

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

Seda Cinar  
aus Hamburg  
Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 02.04.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. A. de Weerth

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. M. Bläker

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. T. Strate

Für meine Eltern

Resmiye Cinar und Yasar Cinar

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Aufgabenstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Tumoren.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Tumorentstehung und Tumorimmunologie.....	2
2.1.2. Kolorektale Tumoren.....	5
2.1.3. Gegenwärtige Therapie kolorektaler Karzinome und ihrer Metastasen .....	8
<b>2.2. Gentherapeutische Ansätze beim kolorektalen Karzinom .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Methoden bei der Gentherapie .....	9
2.2.2. Virale Vektoren in der Gentherapie .....	11
<b>2.3. Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Struktur und Vermehrungszyklus von Adenoviren.....	13
2.3.2. Adenovirale Vektorgenerationen .....	16
2.3.3. Therapeutische Gene in der adenoviralen Therapie kolorektaler Karzi- nome .....	18
<b>2.4. Zytokintherapie bei Tumoren.....</b>	<b>20</b>
2.4.1. Die Rolle von Zytokinen bei der Immunantwort und bei der Tumor- therapie.....	20
2.4.2. Aufbau und Eigenschaften von Interleukin-12.....	21
2.4.3. Das Interleukin-12-Fusionsprotein .....	25
2.4.4. Tumorthherapie mit Interleukin-12 und IL-12-kodierenden Adenoviren .....	26
2.4.5. Aufbau und Eigenschaften von Interleukin-18.....	29
2.4.6. Tumorthherapie mit Interleukin-18 und IL-18-kodierenden Adenoviren .....	31
2.4.7. Die Rolle der Interleukin-12/Interleukin-18-Kombination in der Tumor- therapie.....	32
<b>2.5. Tetracyclin-regulierbare Zytokingenexpression .....</b>	<b>34</b>
2.5.1. Vorteile regulierbarer Zytokingenexpression in der Gentherapie.....	34
2.5.2. Tetracyclin-supprimierbare und –induzierbare Expressionssysteme .....	35
2.5.3. Verwendung des autoregulativen Tet-OFF-Systems.....	37
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>39</b>
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	39

---

3.1.2. pH-Puffer .....	41
3.1.3. Reagenzienkits .....	41
3.1.4. Enzyme, Molekulargewichtsstandards, Oligonukleotide, Sequenzierungs- zusätze, Antikörper .....	41
3.1.5. Plasmidvektoren .....	42
3.1.6. Bakterien .....	42
3.1.7. Adenoviren .....	42
3.1.8. Zelllinien .....	42
3.1.9. Geräte.....	42
3.1.10. Weitere Materialien.....	43
3.1.11. Tiere .....	44
<b>3.2. Methoden <i>in vitro</i> .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Sterilisationstechniken .....	45
3.2.2. Bakterienkultur.....	45
3.2.3. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien .....	45
3.2.4. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	46
3.2.5. Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese .....	46
3.2.6. DNA-Sequenzierung .....	47
3.2.7. Zellkultur.....	48
3.2.8. Synthese rekombinanter Adenoviren .....	50
3.2.9. Identifizierung generierter Viren .....	53
3.2.10. Vermehrung und Reinigung von Adenoviren.....	53
3.2.11. Titerung von Adenoviren mittels Plaque-Assay.....	56
3.2.12. Infektion von MCA-26-Zellen und Ermittlung der Genexpression .....	57
3.2.13. Gewinnung von Zytokinen von adenoviral infizierten HT-29-Zellen.....	58
3.2.14. Bioassay.....	58
3.2.15. Nachweis und Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA ...	61
<b>3.3. Methoden <i>in vivo</i>.....</b>	<b>63</b>
3.3.1. Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen und Versuchstier- haltung.....	63
3.3.2. Doxycyclinbestimmung im Mäusefutter.....	63
3.3.3. Ermittlung der adenoviralen Genexpression im Mausmodell.....	64
3.3.4. Ermittlung der systemischen Wirkung von Ad.3r.mscIL-12 .....	65
3.3.5. Histologische Untersuchung der Organe viral infizierter Mäuse .....	65
3.3.6. Subkutanes Tumormodell in der Maus.....	66
3.3.7. Intratumorale Virusapplikation.....	67

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>68</b>
<b>4.1. Ergebnisse <i>in vitro</i></b> .....	<b>68</b>
4.1.1. Amplifikation von pAd.3r.msclL-12.....	68
4.1.2. Sequenz des murinen single-chain-Interleukin-12 von pAd.3r.msclL-12 ...	69
4.1.3. Synthese und Identifizierung von Ad.3r.mIL-18.....	70
4.1.4. Virustiter nach der Virusreinigung .....	71
4.1.5. Regulierbare Expression in MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.- msclL-12.....	72
4.1.6. Regulierbare Expression in MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.mIL- 18 .....	73
4.1.7. Zytokinsynthese in HT-29-Zellen für einen Bioassay.....	73
4.1.8. IFN- $\gamma$ -Synthese in murinen Lymphozyten nach Inkubation mit IL-18- und IL-12-haltigen HT-29-Kulturüberständen.....	74
<b>4.2. Ergebnisse <i>in vivo</i></b> .....	<b>75</b>
4.2.1. Doxycyclingehalt des Mäusefutters.....	75
4.2.2. Regulierbare Luciferasegenexpression in Mäusen nach Infektion mit Ad.3r.-luc .....	76
4.2.3. Toxizität von Ad.3r.msclL-12.....	77
4.2.4. Histologische Analyse von Leber und Lunge nach Virusinjektion .....	80
4.2.5. Gentherapie subkutaner Tumoren mit Ad.3r.msclL-12.....	82
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>86</b>
<b>5.1. Adenovirale Tetracyclin-supprimierbare Zytokingenexpression für       die Gentherapie kolorektaler Karzinome</b> .....	<b>86</b>
<b>5.2. Die Sequenz des msclL-12-Gens: Bewertung der Mutationen</b> .....	<b>88</b>
<b>5.3. Charakterisierung Zytokin-kodierender Vektoren</b> .....	<b>89</b>
5.3.1. Die Regulationskapazität von Ad.3r.msclL-12 in MCA-26-Zellen .....	89
5.3.2. Die Regulationskapazität von Ad.3r.mIL-18 in MCA-26-Zellen.....	89
5.3.3. Die geringe Ausbeute von synthetisiertem IL-18 in HT-29-Zellen im Hinblick auf dessen Ausschleusungsverhalten.....	90
5.3.4. IFN- $\gamma$ -Synthese nach Stimulation mit einer IL-12/IL-18-Kombination.....	91
<b>5.4. Diskussion der Versuche mit dem Reporter gen Luciferase</b> .....	<b>92</b>
5.4.1. Doxycyclingehalt des Mäusefutters.....	92
5.4.2. <i>In-vivo</i> -Charakterisierung des Tet-OFF-Systems .....	92
<b>5.5. Toxizitätsstudie</b> .....	<b>93</b>
5.5.1. Wahl der Mauslinie C57BL/6.....	93

---

5.5.2. Einschätzung der Ergebnisse der Toxizitätsstudie .....	94
<b>5.6. Therapie eines murinen Kolonkarzinommodells .....</b>	<b>95</b>
5.6.1. Wahl der Virusdosis für die Tumorthherapie .....	95
5.6.2. Analyse der Ergebnisse der Tumorthherapie .....	95
<b>5.7. Ausblick .....</b>	<b>97</b>
5.7.1. Postinfektiöse Kontrolle der Transgenexpression .....	97
5.7.2. Weitere Untersuchung der durch die Gentherapie entstandenen Tumor- immunität.....	98
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>122</b>
9.1. Abkürzungsverzeichnis und Erklärung von Fachbegriffen.....	122
9.2. Bezugsquellenverzeichnis .....	127
9.3. Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren ..	129
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>130</b>
<b>11. Lebenslauf .....</b>	<b>131</b>
<b>12. Erklärung .....</b>	<b>132</b>

## 1. Aufgabenstellung

Bei der zytokingestützten adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen gelten die Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-18 (IL-18) als besonders wirkungsvoll.

Eine Tetracyclin-regulierbare Transgenexpression stellt bei potenziell toxischen Zytokinen einen wesentlichen Sicherheitsfaktor dar.

Die vorliegende Arbeit soll der Gewinnung erforderlicher präklinischer Daten für die Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren zur Expression der humanen Zytokingene und für entsprechende klinische Studien dienen. Sie hat zwei Ziele:

Zum einen soll in einer Toxizitätsstudie der Sicherheitsaspekt adenoviraler, Tetracyclin-regulierbarer Zytokingenexpression im Tiermodell untersucht werden.

Zum anderen soll in einer Effizienzstudie mit diesen regulierbaren Vektoren ein etabliertes Tumormodell in der Maus therapiert werden.

Von den für diese Arbeit benötigten Adenoviren liegt ein IL-12-Gen-exprimierender Vektor bereits vor, während ein entsprechender IL-18-kodierender Vektor aus bereits bestehenden Plasmiden generiert werden soll.

*In vitro* soll nach einer Amplifizierung und Charakterisierung beider Vektoren die Bioaktivität der synthetisierten Zytokine bei unterschiedlichen Mengenverhältnissen eruiert werden.

*In vivo* soll der Sicherheitsaspekt des regulierbaren Systems durch eine intravenöse Gabe Zytokin-kodierender Adenoviren untersucht und eine subletale Virusdosis gefunden werden. Hierfür gilt es, die durch die Zytokine bedingten toxischen Nebenwirkungen bei Mäusen ohne und mit Suppression des regulierbaren Systems zu vergleichen und durch histopathologische Organuntersuchungen zu verifizieren.

Zur Untersuchung der Vektoreffizienz eignet sich ein subkutanes Tumormodell in Balb/c-Mäusen mit der syngeneten kolorektalen Karzinomzelllinie MCA-26. Die Wirksamkeit der Therapie soll nach intratumoraler Virusapplikation nach Standardparametern und histopathologischen Untersuchungen bestimmt werden.

## 2. Einleitung

### 2.1. Tumoren

#### 2.1.1. Tumorentstehung und Tumorimmunologie

##### Tumorentstehung

Bei der Entstehung von Tumoren spielen Onkogene und Antionkogene (Tumorsuppressorgene) eine entscheidende Rolle.

Das Zusammenwirken mehrerer genetischer Veränderungen führt zur Transformation von einer gesunden in eine maligne Zelle. Diese genetischen Veränderungen können durch verschiedene Faktoren, z.B. physikalische, chemische und virale Kanzerogene, induziert werden (Petrides, 1998 a).

Onkogene leiten sich von Proto-Onkogenen ab, welche in normalen Zellen vorkommen und an der Transduktion von Wachstumssignalen beteiligt sind. Durch Mutationen an diesen Proto-Onkogenen entstehen die Onkogene, dessen Wirkung dominant ist. Es reicht also die Mutation an einem Allel aus, um eine tumorigene Wirkung zu vermitteln. Diese Mutation führt zu Veränderungen an Rezeptoren bzw. an deren Liganden und bewirkt somit eine ständige Wachstumssignaltransduktion. Alternativ können auch Veränderungen an Genen vorkommen, welche am programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt sind, so dass es zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von Zellen kommt. Diese Ereignisse führen zu einem unkontrollierten Wachstumsprozess (Petrides, 1998 a).

Antionkogene (Tumorsuppressorgene) sind Hemmstoffe des Zellwachstums, welche in normalen Zellen vorkommen. Durch Mutationen kommt es zum Verlust ihrer Funktionen, was ebenfalls zum deregulierten Wachstumsprozess führt. Antionkogene wirken rezessiv, es müssen also beide Allele mutiert sein, um eine onkogene Wirkung herbeiführen zu können (Petrides, 1998 a; Otto, 2001), so dass eine Mischerbigkeit einen begünstigenden Faktor darstellt. Eine somatische Mutation kann aber hinterher zum Verlust dieser Heterozygotie führen (Petrides, 1998 a).

Der Verlust der Heterozygotie ist die meist verbreitete genetische Veränderung, welche in humanen Tumoren beobachtet wurde, wobei mehr als die Hälfte der Verluste nur Anteile und nicht ganze Chromosomen betrifft (Thiagalingam *et al.*, 2001).

##### Tumorimmunologie

Für die Bekämpfung eines Tumors durch das Immunsystem, muss der Tumor als „fremd“ erkannt werden. Hierzu dienen die Antigene, welche von den Tumorzellen präsentiert werden. Diese sind durch normale zelluläre Gene, mutierte Zellgene oder virale Gene kodiert. Zu den durch normale Zellgene kodierten Tumor-Antigenen zählen die Antigene, welche nur in Tumorzellen aktiviert sind und solche, die auch in normalen Zellen

während der Zelldifferenzierung exprimiert werden. Letztere sind tumorassoziiert aber nicht tumorspezifisch. Die Expression dieser Antigene kann in entarteten Zellen das Vielfache der normalen Synthese betragen. Zu dieser Gruppe von Antigenen gehören auch die embryonalen und fetalen Gene, wie z.B. das gut untersuchte carcinoembryonale Antigen (CEA), das normalerweise nur in fetalen Darm-, Leber- und Pankreaszellen exprimiert wird, aber auch eine Expression in menschlichen Kolonkarzinomen zeigt. Durch physikalische oder chemische Mutationen an Genen, welche das Zellwachstum steuern, kann es ebenfalls zur Tumor-Antigenbildung kommen. Beispiele sind Mutationen am RAS-Protoonkogen und p53-Suppressorgen. Antigene, die durch virale Gene kodiert sind, werden durch bestimmte DNA- und RNA-Viren, z.B. SV40- und Polyoma-DNA-Viren, übertragen. Diese kodieren ähnliche Proteine, wie sie für die Tumorinduktion benötigt werden (Block *et al.*, 1998).

Tumorantigene werden dem Immunsystem durch MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert. Die meisten Zellen präsentieren ihre Antigene nach einer Prozessierung der Proteine im endoplasmatischen Retikulum über MHC-Klasse I-Moleküle. Einige Zellen präsentieren ihre Antigene nach Prozessierung von phagozytierten Proteinen in Lysosomen über MHC-Klasse II-Moleküle. Zu diesen Zellen zählen Makrophagen, dendritische Zellen, antigenpräsentierende Zellen (APCs), B-Zellen und aktivierte T-Zellen. Die MHC-Klasse II-Genexpression kann außerdem bei einer Vielzahl anderer Zellen durch Interferon- $\gamma$  induziert werden. Es wurde auch beschrieben, dass einige phagozytierte Proteine über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden können. Antigene, welche über MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden, werden von T-Lymphozyten erkannt (Block *et al.*, 1998). Für die Aktivierung und Induktion einer effektiven Funktion dieser T-Lymphozyten sind zwei Signale notwendig. Das spezifische Signal wird durch die Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem Antigen-MHC-Komplex bewirkt. Das zweite Signal ist unabhängig vom Antigen und wird durch die Verbindung von kostimulierenden Molekülen wie B7-1 und B7-2 auf APCs und deren Liganden auf T-Lymphozyten initiiert. Zu den Liganden der B7-Familie gehört der Oberflächenmarker CD28 auf T-Lymphozyten. Die B7-CD28-Interaktion führt zu einer T-Zellproliferation und zur vermehrten Interleukin-2-Rezeptor-Expression (zusammenfassend in Stremmel, 2002).

T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer Oberflächenmarker CD8 und CD4 in zwei Untergruppen unterteilt. Die CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten binden gleichzeitig mit ihrem CD8-Oberflächenmolekül und dem T-Zellrezeptor (TcR) an demselben MHC-Klasse I-Molekül. Während der TcR an die  $\alpha 1/\alpha 2$ -Domänen des MHC-Klasse I-Moleküls bindet, weist das CD8-Oberflächenmolekül eine Affinität zur  $\alpha 3$ -Domäne auf. Der T-Zellrezeptor erkennt

spezifische Antigene, welche in einem Hohlraum -gebildet von der  $\alpha 1/\alpha 2$ -Domäne-präsentiert werden. Diese T-Zellen reagieren mit der Ausschüttung von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Außerdem sind CD8+T-Lymphozyten in der Lage, antigenpräsentierende Zellen zu töten. Die wichtigste Fähigkeit der CD8+T-Lymphozyten ist jedoch die Zytokinfreisetzung, welche zu einer Immigration von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und Neutrophilen führt. CD4+T-Lymphozyten haben eine hohe Affinität zu den MHC-Klasse II-Molekülen und erkennen mit ihren TcR spezifische Antigene, welche von diesen MHC-Molekülen präsentiert werden. In diese Gruppe gehören die T-Helfer-1 ( $T_H1$ )-CD4+-Zellen und die T-Helfer-2 ( $T_H2$ )-CD4+-Zellen. Der gemeinsame Vorläufer dieser Zellen ist die T-Helfer-0 ( $T_H0$ )-CD4+-Zelle. Die  $T_H1$ -Lymphozyten haben ähnliche Eigenschaften wie die CD8+-Zellen, wie z.B. die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und die zelllytischen Eigenschaften. Sie können außerdem IL-2 synthetisieren, welches zur  $T_H1$ -Zellproliferation und zur lokalen CD8+T-Zellproliferation führt. Diese Eigenschaften machen aus  $T_H1$ -Lymphozyten wichtige Träger der zellvermittelten Immunität. Die  $T_H2$ -Lymphozyten haben keine lytischen Eigenschaften, können aber Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 produzieren. IL-4 führt zur B-Zell-Proliferation und IL-10 supprimiert die zellvermittelte Immunität. Diese Eigenschaften machen die  $T_H2$ -Lymphozyten zu Steuerelementen der humoralen Immunität (Block *et al.*, 1998).

Weitere Träger der zellulären Immunantwort sind Natürliche Killerzellen, welche eine Untergruppe von Lymphozyten darstellen und die Fähigkeit haben, Tumorzellen unabhängig von MHC-Molekülen zu eliminieren. Tumorzellen mit geringerer MHC-Synthese sind anfälliger gegenüber NK-Zellen, was bedeutet, dass eine MHC-Synthese Tumorzellen vor einer Lyse durch NK-Zellen schützen kann. Die Zytotoxizität von NK-Zellen ist nicht tumorspezifisch und kann somit auch das Wachstum von nicht-neoplastischen Stammzellen beeinflussen (Block *et al.*, 1998). Lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK-Zellen) sind periphere Zellen, welche zum größten Teil aus NK-Zellen hervorgehen und in ihrer Funktion unabhängig von einer MHC-Expression sind (Heiss *et al.*, 2001). Sie können *in vitro* mit rekombinantem IL-2 aktiviert werden. Während die meisten nicht-malignen Zellen resistent gegenüber LAK-Zellen sind, können Tumorzellen, welche resistent gegenüber NK-Zellen sind, *in vitro* von LAK-Zellen getötet werden. Makrophagen wirken normalerweise nicht zytotoxisch auf Tumorzellen, können aber *in vitro* dazu veranlasst werden, selektiv zytolytisch zu wirken. Die Elimination von Tumorzellen veranlassen Makrophagen sowohl durch die Sekretion zytolytischer Substanzen als auch durch Phagozytose (Block *et al.*, 1998).

### 2.1.2. Kolorektale Tumoren

Kolorektale Tumoren sind hauptsächlich epithelialen Ursprungs. Gutartige kolorektale Tumoren kommen häufiger vor als kolorektale Karzinome, welche einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt haben (Otto, 2001). Das kolorektale Karzinom ist in den U.S.A. die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache, wobei Afroamerikaner die höchste Inzidenz und Mortalität aufweisen (Shokar *et al.*, 2005). Von der American Cancer Society wurden für das Jahr 2002 in den U.S.A. 1.284.900 neue Tumorfälle registriert, wovon 148.300 dem kolorektalen Karzinom zuzuordnen waren. Es wurden 56.600 Todesfälle durch das kolorektale Karzinom verzeichnet (Jemal *et al.*, 2002). Für das Jahr 2005 werden 145.290 Neuerkrankungen und 56.290 Sterbefälle erwartet (Shokar *et al.*, 2005). In Deutschland wurden für das Jahr 2002 71.400 Neuerkrankungen und 28.868 Todesfälle durch das kolorektale Karzinom registriert (GEKID, 2006).

90% der kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus gutartigen kolorektalen Tumoren (Adenomen) (Otto, 2001). Diese nennt man sporadische kolorektale Karzinome (Petrides, 1998 a). 1% der kolorektalen Karzinome entsteht aus der *familiären adenomatösen Polyposis* (FAP), 5 bis 8% basieren auf Mutationen in HNPCC-Genen (hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome) (Otto, 2001). Ebenfalls können chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Classen, 2005) und die Ernährung, wie z.B. hoher Eiweißgehalt, wenig Ballaststoffe, Nitrit-Pökelsalz, Chenodesoxycholsäure und Alkohol, tumorbegünstigend wirken (Woltmann, 2001).

Für die Entwicklung sporadischer kolorektaler Karzinome aus Adenomen spielt die Adenom-Karzinom-Sequenz eine wichtige Rolle, bei der es nicht auf den zeitlichen Ablauf, sondern auf die Akkumulation genetischer Veränderungen für die Progression vom Adenom zum Karzinom ankommt. Hierbei kommt es zu Mutationen in dem *Adenomatosis Polyposis Coli*-Gen (APC-Gen) auf Chromosom 5q21, zu DNA-Hypomethylierungen mit Auswirkungen auf die DNA-Kondensation und zu Mutationen im ras-Onkogen. Im Übrigen kommt es zum Verlust verschiedener Regionen von Chromosom 17. Die Region p12-13, die das p53-Antionkogen enthält, ist ebenfalls betroffen. Außerdem kommt es zum Allelverlust im Chromosom 18q21-22. Das hier gelegene dcc-Gen (deleted in colorectal carcinomas) kodiert für ein Polypeptid, das zur Familie der Zelladhäsionsproteine gehört. Daneben können andere Mutationen ebenfalls zur karzinorektalen Tumorigenese beitragen (Petrides, 1998 a; Otto, 2001). Das Entartungsrisiko von Adenomen ist von ihrer Größe, ihrer histologischen Differenzierung, dem Grad und Ausmaß zellulärer Atypien und von der Wuchsform abhängig. Villöse und breitbasig aufsitzende Adenome haben ein höheres Entartungsrisiko (Otto, 2001).

Die FAP (Synonym: Adenomatosis Polyposis Coli=APC) ist eine obligate Präkanzerose, welche autosomal-dominant vererbt wird. 20% bis 30% der Fälle treten durch spontane Neumutationen im FAP-Gen auf (Otto, 2001). Das FAP-Gen liegt auf Chromosom 5q21 und kodiert für ein Tumorsuppressorgen (Petrides, 1998 a). Die Erkrankung manifestiert sich bei zwei Drittel der Patienten vor dem 40. Lebensjahr. Es treten gleichzeitig mehr als 100 kolorektale Adenome auf. Unbehandelt entwickeln alle Patienten im Laufe ihres Lebens Karzinome, so dass die Therapie der Wahl der FAP die totale Proktokolektomie bzw. die restaurative und kontinenzhaltende Kolektomie mit rektaler Mukosektomie und pouch-analer Anastomose ist (Otto, 2001).

Die hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinome werden autosomal-dominant vererbt und manifestieren sich im 4. Lebensjahrzehnt. Diese Tumoren basieren auf einer Störung im DNA-Mismatch-Repair-System. In den meisten Fällen kommt es zu Mutationen in den Genen MSH2 (Chromosom 2p16) oder MLH1 (Chromosom 3p21-23). Durch den Ausfall des DNA-Reparatursystems kommt es zur Akkumulation von Replikationsfehlern, die sich als Mikrosatelliteninstabilität bemerkbar macht (Otto, 2001). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verlust des *Transforming-Growth-Factor-β* (TGF-β)-Typ II-Rezeptors und der Entstehung von hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinomen beschrieben (Wang *et al.*, 1995). TGF-β ist ein multifunktionales Polypeptid, welches das Zellwachstum, die Produktion von extrazellulärer Matrix und die Immunsuppression reguliert. Auf die Zellproliferation wirkt es inhibierend (Moses *et al.*, 1991; Bodmer *et al.*, 1989). Zellen, die die Fähigkeit verlieren, TGF-β zu produzieren oder auf TGF-β zu reagieren, unterliegen eher einem unkontrollierten Wachstum und damit einer malignen Entartung als normale Zellen (Wang *et al.*, 1995).

Bei kolorektalen Karzinomen unterscheidet man makroskopisch schüsselförmig ulzerierende, polypoide und diffus-infiltrierende Wachstumsformen. Histologisch unterscheidet man Adenokarzinome, muzinöse Adenokarzinome, Siegelringzell-Karzinome, adeno-squamöse Karzinome, Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Karzinome und undifferenzierte Karzinome. Nach dem Differenzierungsgrad unterscheidet man niedrigmaligne Karzinome (gut differenziert (G1), mäßig differenziert (G2)) und hochmaligne Karzinome (schlecht differenziert (G3), undifferenziert (G4)) (Otto, 2001). Die TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1) beschreibt das lokale Wachstumsverhalten und die Metastasierung, welche lymphogen entlang der arteriellen Versorgung und hämatogen zuerst in die Leber (75%), danach in die Lunge (15%) und in den Knochen (5%) erfolgt (Otto, 2001; Woltmann, 2001).

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis popria
T3	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nichtperitonealisierte parakolische bzw. pararektale Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe
<b>N</b>	<b>Regionale Lymphknoten</b>
NX	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 parakolischen bzw. pararektalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr parakolischen bzw. pararektalen Lymphknoten
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation der kolorektalen Karzinome** (Quelle: Otto,2001)

Die Stadieneinteilungen nach Dukes und Turnbull sind im Vergleich zur Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation und dessen Zuordnung zu den UICC-Stadien in Tabelle 2 zu sehen. Die Überlebensraten betragen im Stadium I (Dukes A) 90%, im Stadium II (Dukes B) ca. 80% und im Stadium III (Dukes C) 50-70%. Im Stadium Dukes D mit synchronen Organmetastasen betragen die 5-Jahres-Überlebensraten von 0 bis 4%. Der Hauptgrund für die Mortalität ist die synchrone Fernmetastasierung bei Diagnosestellung und die hohe Rezidivrate dieser Tumore (Hartmann und Kanz, 2004).

UICC	T	N	M	Dukes/Turnbull
0	Tis	N0	M0	A
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
II	T3	N0	M0	B
	T4	N0	M0	B
III	jedes T	N1	M0	C
	jedes T	N2	M0	C
IV	jedes T	jedes N	M1	D

**Tabelle 2: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms** (Quelle: Woltmann, 2001)

### 2.1.3. Gegenwärtige Therapie kolorektaler Karzinome und ihrer Metastasen

Nach Möglichkeit sollte jedes kolorektale Karzinom radikal reseziert werden. Wenn präoperativ keine Lymphknotenmetastasen vermutet werden, kann bei T1-Rektumkarzinomen eine transanale Vollwandexzision ausreichen. Bei großen, infiltrierenden Rektumkarzinomen wird zur Verkleinerung des Tumors eine neoadjuvante Radiochemotherapie der Operation vorgeschaltet. Bei Dukes C-Karzinomen wird postoperativ eine adjuvante Radiochemotherapie eingesetzt, um die Lokalrezidivrate zu senken. Bei Fernmetastasen, wie z.B. Lebermetastasen, welche sich bei 50% der an kolorektalen Tumoren erkrankten Patienten entwickeln, gilt die alleinige Chemotherapie nur als palliative Behandlung. Die operative Entfernung von Lebermetastasen kann die Überlebensrate der Patienten erhöhen, wobei aber nur ca. 25% der Patienten resektable Lebermetastasen haben. Auch hier führt eine neoadjuvante Chemotherapie zu resektableren Tumoren (Leonard *et al.*, 2005). Bei Inoperabilität des Karzinoms kann als supportive Therapie eine Umgehungsoperation oder eine Stomaanlage durchgeführt werden (Woltmann, 2001).

Die Kombinationschemotherapie kann allerdings zusammen mit einer supportiven Behandlung die Überlebenszeiten im Vergleich zur alleinigen supportiven Therapie mehr als verdoppeln (Scheithauer *et al.*, 1993). Als Chemotherapeutikum wird hauptsächlich eine Kombination von 5-Fluoruracil in Kombination mit Leucovorin verwendet. Ebenfalls findet das nicht zytotoxische Capecitabine als eine Vorstufe von 5-Deoxy-5-Fluoruridin als Chemotherapeutikum Verwendung, welches nach oraler Gabe im Tumorgewebe mit Hilfe von Thymidinphosphorylasen in 5-Fluoruracil umgewandelt wird (Cutsem *et al.*, 2000). Neuere Chemotherapeutika sind der Topoisomerase I-Inhibitor Irinotecan, die Platinkomponente Oxaliplatin und Thymidylat-Synthase-Inhibitoren wie Raltitrexed (Napier und Ledermann, 2000). In einer Phase-II-Studie zeigte eine Kombination von Irinotecan und Raltitrexed trotz erheblicher Nebenwirkungen wie Durchfall und Neutropenie eine Ansprechrate von 46% bei Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen. Die 1-Jahresüberlebensrate betrug 63%. Diese Kombinationstherapie könnte somit bei Kontraindikationen gegenüber 5-Fluoruracil bei kolorektalen Karzinomen zur Anwendung kommen (Carnaghi *et al.*, 2002). Trotz der Kombinationschemotherapie beträgt die 5-Jahresüberlebensrate bei Dukes C-Karzinomen mit einer Radiochemotherapie nur etwa 50% (Schumpelick *et al.*, 2003).

Zu den neueren Therapieansätzen gehören immuntherapeutische Ansätze wie beispielsweise die Anwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Komponenten maligner Zellen gerichtet sind. Bevacizumab und Cetuximab sind Beispiele solcher Antikörper. Bevacizumab bindet an den *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) und verhindert somit die Bindung dieses Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor und

somit die Angiogenese. Cetuximab bindet an die extrazelluläre Domäne des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und verhindert somit kompetitiv die Bindung von Wachstumsfaktoren. Dadurch wird der intrazelluläre Signaltransduktionsweg blockiert und somit die Zellproliferation inhibiert. Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs mit diesen Antikörpern in mehreren Studien gezeigt werden (zusammenfassend in Chung und Saltz, 2005).

## **2.2. Genterapeutische Ansätze beim kolorektalen Karzinom**

### **2.2.1. Methoden bei der Genterapie**

Obwohl die Standardverfahren (Tumorresektion, Chemotherapie, Radiatio) bei der Therapie von Tumoren in den letzten Jahrzehnten verbessert wurden und neuere Therapieverfahren (immuntherapeutische Ansätze) hinzugekommen sind, bleiben die fortgeschritteneren Tumoren wie die Dukes D-Karzinome nahezu unheilbar. Die Genterapie stellt eine alternative, noch in der Entwicklung stehende Therapieoption dar. Die erste Genterapie fand 1990 statt und betraf einen Patienten, der unter einer schweren angeborenen Immunschwäche (severe combined immunodeficiency, SCID) litt. Diese Erkrankung ist auf einen Adenosindesaminase (ADA)-Mangel zurückzuführen. T-Lymphozyten des Patienten wurden *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor, der das normale menschliche ADA-Gen enthielt, stabil transfiziert, und dann dem Patienten retransfundiert, wonach sich dessen Immunabwehr deutlich besserte (Petrides, 1998 b). Strategien zur genterapeutischen Beeinflussung von Tumorerkrankungen umfassen die Einbringung von Zytokinen, Suizidgenen, natürlichen Tumorsuppressorgenen über virale oder nichtvirale Transfermethoden. Andere Methoden basieren auf der Regulation von Onkogenen, dessen Expression in Tumoren verändert ist. Für den bei der Genterapie wichtigen Gentransfer stehen chemisch-physikalische und virale Transfermethoden zur Verfügung:

#### Chemisch-physikalische Methoden

Für die Transfektion der Zielzellen mit Genen stehen unter anderem Liposomen zur Verfügung. Die Fremd-DNA wird in Liposomen verpackt und den Zellen angeboten. Die Aufnahme in die Zellen ist sehr effizient. Allerdings besitzen Zellen keinen Mechanismus, der die DNA aus dem Liposomen-DNA-Komplex in den Zellkern überträgt, so dass der größte Teil des Lipids und der DNA von intrazellulären Abbausystemen zerstört wird. Der Vorteil dieser Gentransfermethode liegt darin, dass Liposomen keine Immunantwort des Wirtsorganismus hervorrufen. Lee und Mitarbeiter (2004) erzielten im Mausmodell mit dem oralen liposomen-vermittelten Transfer des *Adenomatosis Polyposis Coli*-Gens (APC-Gen) eine 25%ige Polypenreduktion im Vergleich zu Kontrollgruppen.

Die Elektroporation ist ein weiteres Verfahren für den Gentransfer. Hierbei werden die Zellen in einem elektrischen Feld kurzzeitig einer hohen Spannung ausgesetzt, welche die Zellen permeabler für Fremd-DNA macht (Andreason und Evans, 1988). In einem subkutanen Tumormodell aus murinen Kolonkarzinomzellen konnte durch Elektroporation und intratumoraler Injektion eines Plasmides, das für die Thymidinkinase des *Herpes-Simplex-Virus* (HSV) kodiert, und anschließender systemischer Gabe von Ganciclovir, welches durch die Thymidinkinase phosphoryliert hemmend auf die DNA-Synthese wirkt, das Tumorstadium unterdrückt werden (Goto *et al.*, 2000). Tamura und Mitarbeiter (2001) zeigten in dem selben Tumormodell eine signifikante Verzögerung des Tumorstadiums nach intratumoraler Injektion von Interleukin-12-kodierenden Plasmiden und Elektroporation. Die Technik der Elektroporation ist somit sehr effektiv, aber dennoch sehr aufwendig, weil hiermit nur relativ kleine Zellzahlen transformiert werden können.

Nachteile der chemisch-physikalischen Gentransfermethoden sind ihre Aufwendigkeit und die Schwierigkeit, die übertragene DNA mit Sicherheit in den Zellkern zu übertragen. Hierfür sind virale Gentransfermethoden besser geeignet.

### Virale Methoden

Bei den meisten gentherapeutischen Verfahren werden virale Vektoren eingesetzt. Viren haben eine hohe Transfektionseffizienz und den Vorteil, dass bestimmte Viren nur bestimmte Zellen infizieren, was man sich in der Gentherapie zu Nutze macht, um bestimmte Gene in bestimmte Zellen (z.B. Darmepithelzellen) einzuschleusen. Durch die Fähigkeit von einigen Viren, ihr Genom in das der infizierten Zellen zu integrieren und der Möglichkeit, fremde DNA in das virale Genom einzubauen, bieten Viren eine optimale Voraussetzung für einen Gentransfer. Nachteilig ist die Induktion der Immunabwehr in infizierten Organismen, welche die Genexpression zeitlich beschränkt. Zu beachten ist, dass bei viralen Gentransfermethoden die für die Wirtszelle schädlichen Genomanteile der Viren, z.B. die Replikationsfähigkeit, ausgeschaltet werden. Damit Viren einen idealen Gentransfervektor darstellen, müssen sie folgende Bedingungen erfüllen:

- einfache Herstellbarkeit
- Verfügbarkeit in hoher Konzentration oder hohen Titern
- Hohe Kapazität für Fremd-Gen-Aufnahme
- Zelltypspezifischer Gentransfer (z.B. Tumorzellen)
- Regulierbare und starke Transgenexpression
- Keine Auslösung von Immunreaktionen beim Wirt
- Keine Produktion von Wildtypviren

### 2.2.2. Virale Vektoren in der Gentherapie

Die für den Gentransfer am häufigsten verwendeten Viren sind Adenoviren, Retroviren, Poxviren, Vacciniaviren, Herpes-Simplex-Viren und Adeno-assoziierte Viren.

Keiner der in der Gentherapie verwendeten Viren erfüllt alle Eigenschaften für eine optimale Gentherapie. Nachfolgend sind die Vor- und Nachteile der Viren für den Gentransfer beschrieben:

#### Adenoviren

Adenoviren sind hüllenlose Viren mit einer linearen Doppelstrang-DNA.

*Vorteile* für die Gentherapie sind die Fähigkeit von Adenoviren, eine Vielzahl von Zellen und Geweben zu infizieren, unabhängig davon, ob es ruhende oder sich teilende Zellen sind und die hohe Transduktionseffizienz. Außerdem können große Fremd-DNA-Mengen in Adenoviren eingebaut werden. Diese Mengen reichen von 6,5 kb bei Erstgenerationsvektoren bis zu 36 kb bei Drittgenerationsvektoren (Russel, 2000; zusammenfassend in Goverdhana *et al.*, 2005). Die einfache Herstellung mit hohen Titern bis zu  $10^{12}$  p.f.u./ml ist ein weiteres positives Merkmal von Adenoviren (Russell, 2000; Alves J). Ein Vorteil von Adenoviren für die Tumorthherapie ist, dass diese Viren ihr Genom und somit auch das therapeutische Gen nicht in das Wirtsgenom integrieren. Somit kommt es nur zu einer transienten Genexpression, was bei der Tumorthherapie einen Vorteil darstellt, da hier die weitere Expression nach einer Heilung nicht erwünscht ist. Eine länger anhaltende Genexpression, welche für die Therapie genetisch bedingter Erkrankungen erwünscht ist, kann durch Drittgenerationsvektoren, den Gutless-Adenoviren, erreicht werden. Diesen fehlt der größte Teil des viralen Genoms, so dass sie eine geringe Immunogenität aufweisen und somit eine geringe Immunantwort des Wirtes auslösen.

*Nachteil* von Adenoviren ist die Möglichkeit der Kreuzung dieser Viren mit Wildtyp-Viren, da Adenoviren sehr weit verbreitet sind, was zu replikationsfähigen Viren führen würde. Bei der Verwendung von Erstgenerationsvektoren stellt die weite Verbreitung von Adenoviren in der Bevölkerung und die damit verbundene Antikörperbildung gegen die stark immunogenen Viren einen weiteren Nachteil bei der Verwendung in der Gentherapie dar (zusammenfassend in Goverdhana *et al.*, 2005).

#### Retroviren

Retroviren sind Hüllen tragende RNA-Viren, welche das Enzym Reverse Transkriptase besitzen, welches die RNA in DNA umwandelt, so dass diese in das Wirtsgenom integriert werden kann.

*Vorteile* für den Gentransfer mit Retroviren sind, dass diese ihr Genom in das der Wirtszelle integrieren, was zu einer kontinuierlichen Genexpression führt. Diese kontinuier-

liche Genexpression ist eine wesentliche Voraussetzung für die Therapie chronischer Erkrankungen. Weiterer Vorteil ist, dass diese Viren mit sehr geringen Anteilen des viralen Genoms produziert werden können (Alves J).

*Nachteile* sind die niedrigen Titerpräparationen und die Einschränkung der Infektion auf sich teilende Zellen (Ausnahme: Lentiviren). Nachteilig ist außerdem die Möglichkeit der malignen Transformation der Zielzelle durch den Einbau des viralen Genoms, der an beliebigen Orten des Wirts-Genoms stattfinden kann (Alves J; Block *et al.*, 1997 b).

### Vacciniaviren

Vacciniaviren besitzen eine Hülle und lineare Doppelstrang-DNA.

*Vorteile* dieser Vektoren für die Gentherapie sind die große Aufnahmekapazität für Fremd-Gene. Es können bis zu 25 kb Fremd-DNA eingebaut werden (ZKBS, 1997). Außerdem zeigen Vacciniaviren eine starke Expression (Alves J) und haben einen breiten Zelltropismus.

*Nachteile* von diesen Viren sind die starke Immunogenität (Alves J) und das Fehlen einer Langzeitexpression. Somit spielen Vacciniaviren bei der Therapie chronischer Erkrankungen eine untergeordnete Rolle. Nach Infektion von Zellen und Transkription des Genoms der Vacciniaviren findet kein Spleißen statt (ZKBS, 1997), so dass bei einer Gentherapie mit DNA, welche Introns enthält, die Verwendung von Vacciniaviren als Vektoren nicht in Frage kommt.

### Herpes-Simplex-Viren

Herpes-Simplex-Viren sind Hüllen tragende Viren mit linearer Doppelstrang-DNA.

*Vorteile* dieser Viren sind deren Stabilität und der breite Zelltropismus, einschließlich Nervenzellen. Sie verfügen über etwa 80 Gene, von denen ungefähr die Hälfte nicht-essenziell ist. Somit besteht die Möglichkeit, große Mengen an Fremd-DNA an die Stelle der nichtessenziellen Gene einzubauen. Die Kapazität für eine Fremd-Gen-Aufnahme beträgt bis zu 150 kb (zusammenfassend in Goverdhanan *et al.*, 2005; Alves J).

*Nachteilig* ist die kurzzeitige Genexpression, da Herpes-Simplex-Viren ihr Genom nicht in das Wirtsgenom integrieren. Somit sind sie für die Therapie chronischer Erkrankungen ungeeignet. Die hohe Durchseuchungsrate der Bevölkerung und die damit verbundene Antikörperbildung stellt ein Hindernis für die Anwendung dieser Viren in der Gentherapie dar. Weitere Nachteile sind die starke Immunogenität und Toxizität dieser Viren (Alves J). Ebenfalls ist die Gefahr der Kreuzung mit Wildtyp-Viren nicht zu vernachlässigen.

### Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren sind unbehüllte Viren mit einer linearen Einzelstrang-DNA.

*Vorteil* ist das Fehlen einer humanen Pathogenität und somit der Beeinflussung des Zellwachstums. Die Fähigkeit, eine Vielzahl von Zellen zu infizieren, wozu auch sich nicht teilende Zellen gehören, stellt einen weiteren Vorteil dar. Außerdem führt die Infektion zu einer Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom, so dass es zu einer dauerhaften Genexpression kommt (Alves J; Block *et al.*, 1997 b). Diese Fähigkeit ist bei der Therapie chronischer Erkrankungen vorteilhaft.

*Nachteil* ist, dass diese Viren eine kleine Aufnahmekapazität für Fremd-Gene haben. Es kann Fremd-DNA von ca. 4,5 kb eingebaut werden (Alves J). Ein weiterer Nachteil ist, dass diese Viren für ihre Replikation Adenoviren benötigen, so dass es zu Kontaminationen mit Adenoviren kommen kann (Block *et al.*, 1997 b).

## **2.3. Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie**

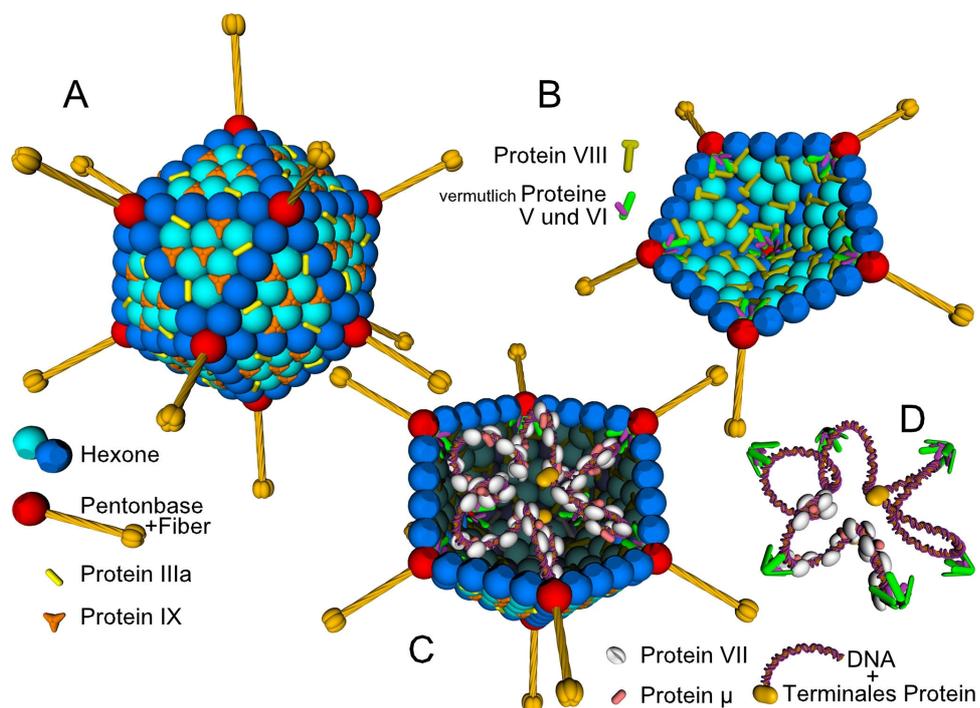
### **2.3.1. Struktur und Vermehrungszyklus von Adenoviren**

Adenoviren wurden 1953 erstmals aus Adenoidgewebe von Rowe isoliert. Sie verursachen Erkrankungen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes und der Augen. Zu den häufigsten Erkrankungen gehören die Erkältungskrankheiten, die Pharyngitis und die Gastroenteritis. Die adenoviralen Infektionskrankheiten sind sehr weit verbreitet, die meisten verlaufen asymptomatisch (Eggers, 2001; Sander, 1999).

Adenoviren werden in zwei Gattungen unterteilt: die Aviadenoviren, welche Vögel infizieren, und die Mastadenoviren, welche Säugetiere (auch humane Adenoviren genannt) infizieren. Die humanen Adenoviren lassen sich in 51 Serotypen unterteilen, welche in die Subgruppen A bis F eingeteilt werden. Die unbehüllten Viren haben eine Größe zwischen 60 und 90 nm. Das ikosaedrische Kapsid besteht aus 252 Kapsomeren, welche aus drei Hauptproteinen zusammengesetzt sind: 240 Hexonproteine (II), 12 Pentonbasisproteine (III) und Fiberproteine (IV), welche der Anheftung der Viren an die Zelle dienen. Diese wirken mit Hilfe eines enthaltenen Antigens  $\gamma$  als Hämagglutinine. Die Innenseite der Hexonproteine ist Träger des allen Mastadenoviren gemeinsamen Antigens  $\alpha$ . An der Außenseite der Hexonproteine liegen die Serotyp-spezifischen Antigene. Der Hexonverbund wird durch die kleineren Polypeptide VI, VIII und IX stabilisiert. Die Pentonbasisproteine enthalten das Antigen  $\beta$ . Dieses Pentonbasisprotein ist mit fünf weiteren Molekülen des Proteins IIIa assoziiert. Aus dem Zentrum jedes Pentons ragt ein Fiberprotein (Eggers, 2001; Sander, 1999).

Das ca. 35 kb lange Genom ist eine lineare und doppelsträngige DNA, an dessen 5'-Ende ein terminales Protein (TP) kovalent gebunden ist (Rekosh *et al.*, 1977). Hier befinden sich auch die für die Replikation wichtigen *inverted terminal repeats* (ITRs). Die DNA ist außerdem mit dem hochbasischen Protein VII und einem kleinen Peptid, *mu* genannt, assoziiert (Anderson *et al.*, 1989). Protein V verbindet diesen DNA-Komplex mit dem Kapsid mit Hilfe von Protein VI (Matthews und Russel, 1995).

Das Virus enthält außerdem eine Protease, welche für die Prozessierung von strukturellen Proteinen bei der Produktion infektiöser Partikel notwendig ist (Webster *et al.*, 1989). Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht über die adenovirale Struktur.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des adenoviralen Partikels** (Quelle: modifiziert nach Russel, 2000 und Fabry *et al.*, 2005)

A, B: Anordnung der Kapselproteine (A: Außenansicht; B: Innenansicht). C: Integration des Viruskerns in der Kapsel. D: Anordnung der Kernkomponenten.

Der adenovirale Vermehrungszyklus lässt sich in eine frühe und eine späte Phase einteilen. Die frühe Phase dauert ca. 6 bis 8 Stunden und beinhaltet den Eintritt des Virus in die Wirtszelle, den Eintritt des Virusgenoms in den Zellkern und die selektive Transkription und Translation von frühen Genen (*Early Genes*). Diese Gene modulieren die Zellfunktionen, so dass die Virusreplikation und die Transkription und Translation der späten Gene (*Late Genes*) erleichtert wird. In der späten Phase, welche 4 bis 6 Stunden dauert, werden die strukturellen Proteine transkribiert, so dass es am Ende zur Zusammensetzung von infektiösen Viren kommt (Russel, 2000).

Die Adsorption des Adenovirus in die Zielzelle erfolgt durch die Bindung des Fiberproteinkopfes an den *Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor* (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997).

Einige Serotypen haben noch weitere Rezeptorspezifitäten wie z.B. das MHC Klasse I-Molekül (Hong *et al.*, 1997). Als nächstes interagiert das Pentonbasisprotein mit zellulärem  $\alpha_v$ -Integrin, woraufhin die Clathrin-vermittelte Endozytose folgt (Mathias *et al.*, 1998). Die viruseigene Protease hilft im nächsten Schritt, das Viruskapsid zu lysieren (Greber *et al.*, 1996), so dass das Virusgenom durch die Kernporen in den Kern gelangt. Bereits 1 Stunde nach Infektion beginnt somit die Transkription der *Early Genes*. Hierzu gehören die E1A-, E1B-, E2-, E3- und E4-Gene, wobei die ersten Genprodukte die E1A-Proteine sind, welche gemäß ihrer Aminosäureanzahl 289R und 243R genannt werden. Diese Proteine sorgen für eine Veränderung des Zellmetabolismus, um die Zelle potenter für die Virusreplikation zu machen. Sie beeinträchtigen den Zellteilungsprozeß und die Regulation von p53 und dem Transaktivator NF- $\kappa$ B (zusammenfassend in Russell, 2000). Außerdem bedingen sie die Expression weiterer Virusgene. Die E1B-Proteine sind zusammen mit dem E1A-Protein für die Zelltransformation durch Adenoviren notwendig (Eggers, 2001). Das E1B-Protein inaktiviert p53 und verhindert so die Apoptoseinduktion.

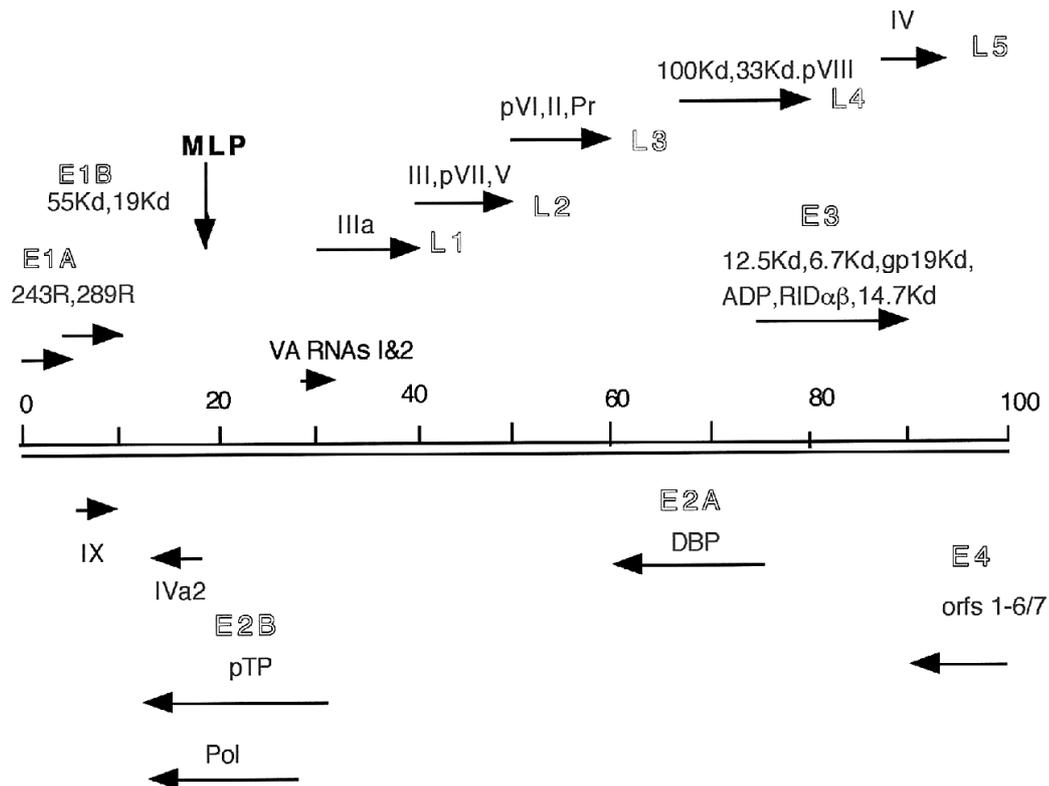
Die E2-Genprodukte bestehen aus dem DNA-bindenden Protein (DBP, E2A) und dem terminalen Protein (TP, E2B) und der DNA-abhängigen Polymerase (Pol, E2B). Neben zellulären Proteinen wie NFI, NFII und Topoisomerase I sind diese Proteine für die Replikation der Virus-DNA und die Sicherstellung der Transkription der *Late Genes* zuständig (zusammenfassend in Russell, 2000).

Die E3-Genprodukte sind für die Virusvermehrung in Zellkultur überflüssig. Sie sorgen für die Untergrabung der Immunantwort des Wirtes. Das E3 19K Protein bindet an die schwere Kette des MHC Klasse I-Moleküls und verhindert deren Transport an die Zelloberfläche und somit die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (Bennett *et al.*, 1999). Die E3-Proteine RID $\alpha$ & $\beta$  und 14.7K inhibieren proapoptotische Wege (Russell, 2000). Ein Genprodukt wird *adenovirus death protein* (ADP) genannt, weil es die Zytolyse der infizierten Zelle und die Virusfreisetzung erleichtert (Tollefson *et al.*, 1996).

E4-Proteine erleichtern den viralen mRNA-Metabolismus und hemmen die Proteinsynthese des Wirtes. Außerdem sind sie mit den Resistenzmechanismen der durch zytotoxische T-Zellen induzierten Lyse assoziiert (zusammengefasst in Russell, 2000).

Mit der DNA-Replikation beginnt die späte Phase des adenoviralen Vermehrungszyklus. Die Replikation erfolgt durch die virale Polymerase und benötigt die Sequenzen im ITR als Startsignal. Nach Beginn der Replikation der viralen DNA werden die verzögert frühen Gene IVa2 und IX in großen Mengen exprimiert. Hiernach werden die *Late Genes* L1-L5 unter Aktivierung des *major late promoters* (MLP) transkribiert. Diese kodieren für virale Strukturproteine und führen zum Zusammenbau von Kapsid und Genom (zusammenfassend in Russell, 2000), wobei der Zusammenbau durch Verpackungssequenzen

in der viralen DNA, welche aus AT-reichen Sequenzen bestehen, eingeleitet wird (Hearing *et al.*, 1987). Diese Ereignisse führen zu Veränderungen der Kernmembran und zur Zytolyse durch das *adenovirus death protein* mit der Freisetzung von infektiösen Viren. Abbildung 2 zeigt die Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms.



**Abbildung 2: Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms** (Quelle: Russel, 2000)  
(ADP: adenovirus death protein, DBP: DNA bindendes Protein, MLP: major late promoter, Pol: DNA-abhängige Polymerase, pTP: terminales Protein).

### 2.3.2. Adenovirale Vektorgenerationen

Die Eigenschaften von Adenoviren, eine Vielzahl von Zellen und Geweben zu infizieren und in hohen Konzentrationen produzierbar zu sein, machen diese Viren zu wichtigen Vektoren in der Gentherapie. Das adenovirale Genom wird nicht in das Genom der Zielzelle eingebaut. Es kommt dementsprechend nur zu einer transienten Genexpression, was bei der Gentherapie von Tumoren erwünscht ist. Hier könnte die weitere Genexpression nach einer Heilung zu einer unnötigen Belastung des Körpers führen. Durch die Möglichkeit des Einbaus von Fremd-DNA in das adenovirale Genom können therapeutische Gene in Zellen eingeschleust werden. In einem Wildtyp-Virus ist der Einbau von maximal 2 kb möglich, ohne die Stabilität und Infektiosität zu beeinflussen. Für den Einbau längerer Sequenzen ist die Deletion viraler DNA-Abschnitte notwendig. Es gibt eine

Vielzahl publizierter Manipulationen des adenoviralen Genoms, so dass in dieser Arbeit nur ein Überblick über die wichtigsten Vektorgenerationen gegeben werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendeten Erstgenerationsvektoren sind E1-/E3-deletiert und erlauben einen Einbau von Fremd-DNA zwischen 6,5 kb (zusammenfassend in Russell, 2000) und 7,8 kb (Bett *et al.*, 1994). Unter Belassung der ITRs und der Verpackungssequenz ist eine 3,2 kb-Deletion der E1-Region durchführbar (Bett *et al.*, 1994). Dabei muss die Sequenz für das Protein IX belassen werden, weil sie für die Verpackung des viralen Genoms in Virione von Bedeutung ist (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1987). Somit kann mit diesen Mitteln heterologe DNA von insgesamt 5,2 kb eingebaut werden. Die Entfernung der E1-Region hat den Vorteil der Transkriptionsverminderung von E1-abhängigen E2-Genen und somit einer verminderten Virus-DNA-Replikation und der Kapsidproduktion. Hiermit wird der virale Zyklus beeinflusst, so dass die infizierten Zellen nicht mehr lysiert werden können. Für die Produktion solcher E1-deletierter Adenoviren sind Zelllinien notwendig, welche die fehlenden adenoviralen Genprodukte zur Verfügung stellen. Hierzu dient die von Graham und Mitarbeitern 1977 etablierte menschliche embryonale Nierenzelllinie 293, welche mit 11% des Adenovirus 5-Genoms stabil transfiziert ist (Graham *et al.*, 1977). Die Replikation von E1-deletierten Adenoviren ist also in diesen Zellen möglich. Für den Einbau größerer DNA-Abschnitte in das adenovirale Genom kann zusätzlich zu der E1-Region die für die Virusreplikation nicht essenzielle E3-Region partiell entfernt werden (Bett *et al.*, 1994).

Nachteil dieser Erstgenerationsvektoren ist die starke Immunogenität, welche die virale Genexpressiondauer vermindert und die Möglichkeit einer mehrmaligen Virusapplikation verhindert (zusammenfassend in Russell, 2000). Sie sind somit für eine Therapie chronischer Erkrankungen nicht geeignet.

Um diese starke Immunogenität zu umgehen, wurden weitere Manipulationen im adenoviralen Genom vorgenommen. So entstanden die Zweitgenerationsvektoren, welche zusätzliche Deletionen der E2- bzw. E4-Regionen aufweisen. Die Deletion der E2A-Region führt zu einer Verminderung der Transkription der *Late Genes*. Somit kommt es zu einer Reduktion der T-Zellantwort in infizierten Zellen, wodurch eine verlängerte virale Transgenexpression gewährleistet wird (Engelhardt *et al.*, 1994). Eine Deletion der E4-Region beeinträchtigt die Expression viraler Gene, welche für Proteine kodieren, die das Spleißen und den mRNA-Transport regulieren (Lusky *et al.*, 1998). Die Zweitgenerationsvektoren weisen eine Kapazität für Fremd-Gene zwischen 8,9 kb (Gorziglia *et al.*, 1996) und 14 kb (zusammenfassend in Alba *et al.*, 2005) auf. Die Verlängerung der Genexpression ist allerdings fraglich, da widersprüchliche Ergebnisse aus verschiedenen Studien existieren (Lusky *et al.*, 1998).

Die weitere Entwicklung adenoviraler Vektoren führte zu den Drittgenerationsvektoren, den Gutless-Adenoviren. Diesen fehlt der größte Teil des viralen Genoms, so dass sie bis zu 36 kb Fremd-DNA aufnehmen können. Sie enthalten nur die Sequenzen der ITR und die Verpackungssequenz und weisen im Vergleich zu Erst- und Zweitgenerationsvektoren eine viel geringere Immunogenität auf. Somit besteht die Möglichkeit einer länger anhaltenden Transgenexpression und einer wiederholten Virusapplikation. Für die Vermehrung dieser Viren werden Helferviren benötigt, deren Genom für Strukturproteine und Proteine für die Virusreplikation kodiert. Diese Gene werden den Gutless-Adenoviren für ihre Vermehrung *in trans* bereitgestellt. Hiermit ergeben sich die Nachteile bei der Verwendung dieser Drittgenerationsvektoren. Zu diesen Nachteilen gehören die Schwierigkeit bei der Herstellung hoher Viruskonzentrationen und die Möglichkeit der Kontamination mit Helfervirusgenomen trotz des Vorhandenseins mehrerer Methoden zur Verhinderung dieser Kontamination (zusammenfassend in Goverdhanas *et al.*, 2005 und Alba *et al.*, 2005).

### **2.3.3. Therapeutische Gene in der adenoviralen Therapie kolorektaler Karzinome**

Für eine Therapie von Tumoren können adenovirale Vektoren generiert werden, welche Gene für die Tumorsuppression und -elimination übertragen. Die Expression fremder Gene kann unter der Kontrolle adenoviraler oder heterologer, vor dem Transgen eingebauter Promotoren, stehen. Zu diesen heterologen Promotoren gehören der *Rous-Sarkoma-Virus* (RSV)- und der *Cytomegalie-Virus* (CMV)-Promotor, welche zu einer relativ starken Expression führen (zusammenfassend in Russell, 2000).

Die adenovirale Gentherapie von kolorektalen Karzinomen kann in drei Kategorien eingeteilt werden:

#### 1. Korrektur von Tumorsuppressorgen- und Onkogen-Mutationen

Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p53 oder p16 können durch adenoviralen Transfer durch korrekte Gene relativiert werden, was zur Apoptose der infizierten Zelle führt. Maron und Mitarbeiter (2001) konnten durch die intratumorale Injektion eines p53-Vektors, welchem ein CMV-Promotor vorgeschaltet war, in Kolonkarzinommetastasen einen therapeutischen Effekt nachweisen, nicht aber durch die intravenöse Injektion oder durch die Injektion in die Leberarterie.

Mutationen im Ras-Gen sind in 40-50% der kolorektalen Karzinome beschrieben. Die Einschleusung von intrazellulären, neutralisierenden Antikörpern (Y28) gegen p21-Ras in Kolonkarzinomzellen mit Hilfe von adenoviralen Vektoren konnte die Tumorzellproliferation *in vitro* signifikant hemmen.

Im Lebermetastasenmodell in der Ratte konnte erst durch die fünfmalige Wiederholung der Vektorinjektion in die Leberarterie ein therapeutischer Effekt beobachtet werden. Weder die isolierte Leberperfusion noch die intravenöse oder intratumorale Injektion führten zum Erfolg (Van Etten *et al.*, 2002).

## 2. Suizidgentherapie

In der Suizidgentherapie werden Gene für Enzyme, welche nichttoxische Substanzen (Prodrug) in zytotoxische Substanzen umwandeln, mit Hilfe von adenoviralen Vektoren übertragen. Ein Beispiel ist die Thymidinkinase des *Herpes-Simplex-Virus* (HSV-TK), welche Ganciclovir phosphoryliert. Das entstandene Ganciclovir-Monophosphat wird von zellulären Enzymen zum Triphosphat phosphoryliert, welches bei der Zellteilung als Nucleosidanalogon in die synthetisierte DNA inkorporiert wird und somit durch Kettenabbruch der DNA zum Zelltod führt (zusammenfassend in Chen *et al.*, 1994 und Block *et al.*, 1997 a). Der Transfer dieser HSV-TK wurde bereits in einer klinischen Phase I Studie getestet (Herman *et al.*, 1999).

Ebenso wird das im Menschen nicht vorhandene Enzym Cytosindeaminase (CD), das das nichttoxische 5-Fluorocytosin (5-FC) in das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) umwandelt, in der Suizidgentherapie verwendet. Es konnte in Mäusen mit inokulierten Kolonkarzinomzellen eine signifikante Reduktion der Lebermetastasen nach intravenöser Injektion eines CD-tragenden adenoviralen Vektors gezeigt werden (Block *et al.*, 2000).

## 3. Transfer von immunmodulatorischen Genen

Zu den immunmodulatorischen Ansätzen zählen der Transfer von Zytokin-kodierenden Genen, welche die antitumorale Immunantwort verstärken. Vorteil des zytokintherapeutischen Ansatzes ist, dass durch die lokale intratumorale Infektion eine systemische antitumorale Reaktion des Immunsystems erreicht wird (siehe 2.4.).

Auch zählt der Transfer tumorspezifischer Antigene mit Hilfe von adenoviralen Vektoren zu den immunmodulatorischen Ansätzen (Rosenberg *et al.*, 1998).

Eine *ex vivo*-Infektion von isolierten humanen dendritischen Zellen mit Adenoviren, welche für Tumor-Antigene kodieren und die anschließende Reimplantation dieser Zellen führte zur Verstärkung der Immunantwort (Crystal, 1999). Diese Strategie gehört folglich ebenfalls in die Gruppe der immunmodulatorischen Ansätze.

## 2.4. Zytokintherapie bei Tumoren

### 2.4.1. Die Rolle von Zytokinen bei der Immunantwort und bei der Tumorthherapie

Zytokine sind hormonähnliche Signalstoffe, die bei der Zusammenarbeit zwischen T-, B-, NK- und vielen anderen Immunzellen eine wichtige Rolle spielen. Gebildet werden sie von Lymphozyten (Lymphokine) und von mononukleären Phagozyten (Monokine) und entfalten ihre Wirkung über Oberflächenrezeptoren auf ihre Produzentenzelle (autokrin) oder auf andere Immunzellen (parakrin). Zytokine, welche hauptsächlich Zellinteraktionen beeinflussen, werden Interleukine genannt. Das von T-Helferzellen gebildete Interleukin-2 (IL-2) ist wichtig für die Proliferation dieser T-Helferzellen. Die Interleukine 4, 5, 6 und 13 spielen bei der Aktivierung von B-Zellen und ihrer Differenzierung zu Plasmazellen eine wichtige Rolle (Bauer, 2001).

In der Tumorthherapie werden Zytokine aufgrund ihrer Fähigkeit, das körpereigene Immunsystem zu verstärken, erfolgreich eingesetzt. Der Vorteil der Zytokintherapie ist, dass eine lokale intratumorale Therapie ausreicht, um eine systemische antitumorale Wirkung zu erreichen. Für die Zytokine IL-1, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Block *et al.*, 1998) und für IL-18 sind bereits antitumorale Wirkungen beschrieben (siehe 2.4.6.).

In einem murinen Kolonkarzinommodell führte die Kombinationstherapie von Ad.RSV-IL-2 mit Ad.RSV-TK und der intraperitonealen Ganciclovirgabe zu einer signifikanten Tumorreduktion. In einem nachfolgenden Challenge-Versuch mit subkutaner Applikation von Kolonkarzinom- und Mammakarzinomzellen war nur bei den kombiniert therapierten Tieren, nicht jedoch bei mit den einzelnen Vektoren vorbehandelten Mäusen das Wachstum von Kolonkarzinomen verhindert. Dem Wachstum von Mammakarzinomen wurde weder durch die Einzeltherapie noch durch die Kombinationstherapie vorgebeugt (Block *et al.*, 1998).

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) hat eine wichtige Funktion als Wachstumsfaktor hauptsächlich von Granulozyten-, Monozyten- und Eosinophilen-Vorläuferzellen. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle als immunpotenzierender Faktor, welcher zur Ausbreitung von antigenpräsentierenden Zellen führt und die Antigen-präsentierende Fähigkeit von Makrophagen steigert. In einem murinen Kolonkarzinommetastasenmodell konnte gezeigt werden, dass aus der Therapie mit der Dreierkombination aus Ad.RSV-IL-2, Ad.RSV-TK und Ad.RSV-GM-CSF im Vergleich zur Zweierkombination aus Ad.RSV-IL-2 und Ad.RSV-TK ein Langzeitüberleben resultierte (Block *et al.*, 1998).

Die antitumoralen Wirkungen der in der Tumorthherapie häufig verwendeten Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18 werden in den Abschnitten 2.4.4. (IL-12) und 2.4.6. (IL-18) beschrieben.

### 2.4.2. Aufbau und Eigenschaften von Interleukin-12

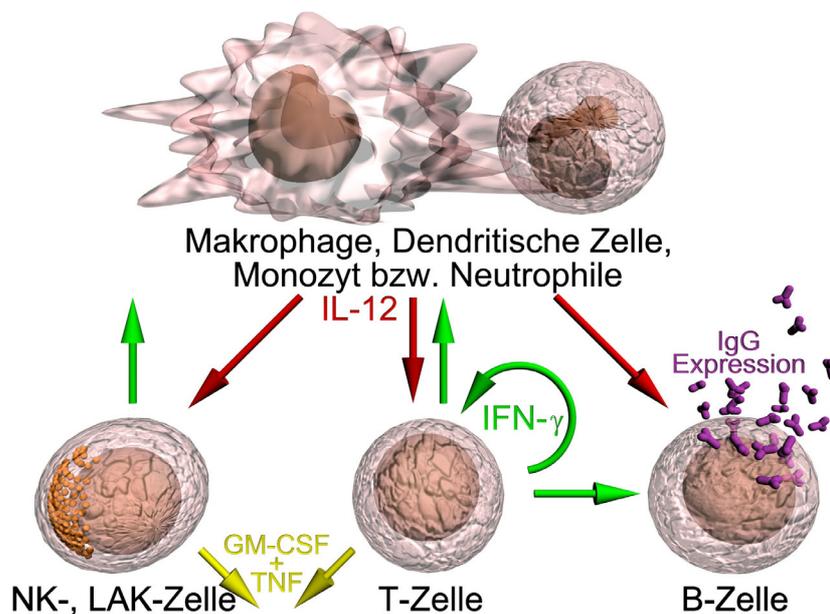
#### Interleukin-12 und seine biologische Funktion

Interleukin-12 wurde aus dem Überstand von *Epstein-Barr-Virus* (EBV)-transformierten B-Zellen isoliert, welcher natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren und ihre IFN- $\gamma$ -Produktion induzieren konnte. IL-12 ist ein Heterodimer, das sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt, welche p35 (IL-12 $\alpha$ ) bzw. p40 (IL-12 $\beta$ ) genannt werden. Die Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Kobayashi *et al.*, 1989). Während die p35-Untereinheit Homologien zu IL-6 aufweist, hat die p40-Untereinheit Ähnlichkeiten mit dem *ciliary neurotropic factor* (CNTF)-Rezeptor und der  $\alpha$ -Kette des IL-6-Rezeptors. Die p40-Untereinheit assoziiert nicht nur mit der p35-Untereinheit, sondern auch mit dem p19-Molekül, mit dem es das kürzlich beschriebene heterodimere IL-23 bildet (zusammenfassend in Trinchieri, 2003).

Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Mikrogliazellen und dendritische Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-12, die durch Infektionen mit Mikroorganismen zur IL-12-Produktion angeregt werden. Zytokine wie IL-4 und IFN- $\gamma$  können die Fähigkeit der Zellen, IL-12 zu produzieren, noch steigern. Die Regulation der Transkription der Gene für die beiden IL-12-Untereinheiten und deren Prozessierungswege nach der Translation unterscheiden sich. IL-10 ist ein potenter Inhibitor der IL-12-Synthese, indem es die Transkription beider Untereinheiten blockiert. Der *Transforming-Growth-Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), TNF, IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  können die IL-12-Produktion ebenfalls supprimieren (zusammenfassend in Trinchieri, 2003).

IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität reguliert. Es induziert nicht die Proliferation von ruhenden T- und NK-Zellen im peripheren Blut, sondern nur die Proliferation der voraktivierten Form dieser Zellen. IL-12 verstärkt die Generierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) und lymphokinaktivierten Killerzellen (LAKs) und begünstigt die Differenzierung der T-Helfer 1-Zellen (T<sub>H</sub>1-Zellen). IL-12 wirkt außerdem induzierend auf die Produktion von TNF, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor und hauptsächlich von IFN- $\gamma$  durch NK- und T-Zellen. Die IL-12 induzierte IFN- $\gamma$ -Produktion benötigt die Anwesenheit von TNF und IL-1, welche von T- und NK-Zellen produziert werden und autokrin wirken (zusammenfassend in Trinchieri, 2003). IL-12 fördert synergistisch mit IL-18 (Nakahira *et al.*, 2002), IL-2 (Kobayashi *et al.*, 1989) und dem kostimulatorischen Molekül B7 (Kubin *et al.*, 1994) die IFN- $\gamma$ -Produktion. IFN- $\gamma$  aktiviert die antimikrobielle Funktion von Phagozyten, steigert die Aktivierung und Proliferation von T<sub>H</sub>1-Zellen und verstärkt die humorale Immunantwort durch Induktion von T<sub>H</sub>1-assoziierten Immunglobulinklassen wie IgG2a (Trinchieri, 2003).

Der IL-12-Rezeptor setzt sich aus der IL-12R $\beta$ 1- und der IL-12R $\beta$ 2-Kette zusammen, die nach Bindung von IL-12 den Janus-Kinase (JAK)-STAT (signal transducer and activator of transcription)-Weg aktivieren, wobei die IL-12R $\beta$ 2-Kette als Signaltransduktor wirkt. Die spezifischen zellulären IL-12-Effekte beruhen auf der Aktivierung von STAT 4. Der IL-12-Rezeptor wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen synthetisiert, wobei die  $\beta$ 2-Ketten-Synthese zusätzlich durch IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und durch Kostimulation mit CD28 gesteigert wird (zusammenfassend in Trinchieri, 2003).



**Abbildung 3: Die biologische Wirkung von IL-12** (Quelle: modifiziert nach Trinchieri, 2003)  
 (GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor, IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma, IgG: Immunglobulin G, IL: Interleukin, LAK-Zelle: lymphokinaktivierte Killerzelle, NK-Zelle: Natürliche Killerzelle, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor).

### Toxizität von IL-12

IL-10 ist ein sehr effizienter Inhibitor der IL-12-Produktion (D'Andrea *et al.*, 1993). Die IL-12-Toxizität konnte somit in IL-10-knockout-Mäusen, welche mit avirulenten Parasitenstämmen infiziert wurden, gezeigt werden. Die deutlich höheren IL-12- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in diesen Mäusen im Vergleich zu IL-10-kompetenten Kontrollmäusen waren mit dem Bild einer Hepatitis assoziiert (Gazzinelli *et al.*, 1996). Ebenso konnte durch die Gabe von IL-12- und IFN- $\gamma$ -Antikörpern die Letalität bei der durch Endotoxine ausgelösten Schwartzman-Reaktion verhindert werden (Ozmen *et al.*, 1994). Die nach systemischer IL-12-Gabe auftretende Toxizität äußerte sich bei Mäusen durch verminderte Bewegung, geringere Nahrungsaufnahme und ungepflegtes Fell. Später kamen noch pulmonale Erkrankungen, Transaminasenanstieg, Leukopenie und Thrombozyto-

penie hinzu. Die IL-12-Toxizität ist zu einem großen Teil IFN- $\gamma$ -bedingt, da sie durch neutralisierende IFN- $\gamma$ -Antikörper deutlich reduziert wird (Mazzolini *et al.*, 2001). Dabei spielt Stickstoffoxid (NO), dessen Produktion von IFN- $\gamma$  induziert wird, eine besondere Rolle. NO wirkt bei den immunmodulierenden Effekten von IL-12 über eine Verstärkung der T-Zell-Aktivität mit. Geringe NO-Konzentrationen wirken immunstimulierend, während hohe NO-Konzentrationen immunsupprimierend wirken (Koblish *et al.*, 1998; Lasarte *et al.*, 1999). Diese Effekte wurden durch eine Koimmunisierung von Mäusen mit zwei Adenoviren deutlich. Das eine Adenovirus kodierte für das *Hepatitis-C-Virus* (HCV)-Core- und E1-Protein und das andere für IL-12. Während geringe Konzentrationen von IL-12-kodierenden Adenoviren (zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^7$  p.f.u.) zu einer Verstärkung der zellulären Immunität der Mäuse gegen HCV-Antigene führten, kam es bei Dosen von  $1 \times 10^8$  p.f.u. zu einer Immunitätsreduktion, welche assoziiert war mit hohen NO- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen und niedrigen IL-2-Konzentrationen. Die hohen NO-Konzentrationen führten zu einer erhöhten T-Zellapoptose in der Milz (Lasarte *et al.*, 1999).

Durch eine intraperitoneale IL-12-Gabe, eine Woche vor der täglichen IL-12-Gabe, konnte die Zytokintoxizität in Mäusen deutlich reduziert werden und eine sichere IL-12-Gabe in einer vier- bis achtfach höheren Dosierung verabreicht werden. Allerdings wurde die frühe antitumorale Wirkung von IL-12 bei diesen Mäusen ebenfalls durch eine vorherige IL-12-Verabreichung abgeschwächt. Dies zeigte sich in einer Verminderung der IL-12-charakteristischen Verzögerung einer Tumorentstehung (Coughlin *et al.*, 1997). Während eine tägliche intraperitoneale Gabe von IL-12 in einer Konzentration von 400 ng für 5 Tage zu einer Gewichtsabnahme und Nahrungsverweigerung führte, verhinderte eine vorherige IL-12-Gabe in einer Konzentration von 200 ng/Maus 14 Tage vor der eigentlichen IL-12-Gabe diese Nebenwirkungen (Sacco *et al.*, 1997).

In einer Phase-I-Studie wurde eine Dosisescalation mit intravenös verabreichtem rekombinantem humanem IL-12 in Dosen von 3 bis 1000 ng/kg/Tag durchgeführt. Nach einer Bolusinjektion wurde vor erneuten Gaben eine zweiwöchige Pause eingeführt. Zu den allgemeinen toxischen Nebenwirkungen gehörten Fieber, Schüttelfrost, Abgeschlagenheit, Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen. Ebenfalls kam es zur Anämie, Neutropenie, Lymphozytopenie, Thrombozytopenie, Hyperglykämie und Hypoalbuminämie. Zur Dosis-limitierenden Toxizität gehörten orale Stomatitis und Leberfunktionsstörungen mit erhöhten Transaminasen. 500 ng/kg wurde als maximal tolerierbare Dosis (MTD) bestimmt (Atkins *et al.*, 1997).

In einer Phase-II-Studie traten bei Krebspatienten nach intravenöser IL-12-Gabe in einer Dosis, welche in der Phase-I-Studie als MTD ermittelt wurde, fatale Nebenwirkungen auf. Im Gegensatz zur Phase-I-Studie wurde in der Phase-II-Studie auf eine zweiwöchige Pause nach einer IL-12-Einzeldosisinjektion verzichtet, was zu höheren IFN- $\gamma$ -Produktionen führte. Von 17 behandelten Patienten verstarben 2 an einem hypovolämischen Schock assoziiert mit hämorrhagischer Kolitis und Sepsis-ähnlichen Bildern. Andere Nebenwirkungen waren Leukopenie (65%), Hyperbilirubinämie (47%), Transaminasenanstieg (ASAT: 47%, ALAT: 35%), Abgeschlagenheit (35%), Atemnot (29%), Stomatitis (24%) und Thrombozytopenie (24%) (Leonard *et al.*, 1997). Im Vergleich zu einer subkutanen IL-12-Einzeldosis zeigte die mehrmalige IL-12-Injektion in einer erneuten Phase-I-Studie bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen geringere Nebenwirkungen (Portielje *et al.*, 1999). Durch regelmäßige subkutane IL-12-Gaben nahm die Serumkonzentration von IL-12 und die IL-12-Wirkung bei Mäusen und bei Menschen ebenfalls deutlich ab (Rakhit *et al.*, 1999). Die niedrigeren IFN- $\gamma$ -Konzentrationen nach vorheriger Gabe einer IL-12-Einzeldosis sind wohl durch die Reduktion des STAT4-Signalproteins zu erklären (Wang KS *et al.*, 2001).

Dieser Effekt könnte sich bei der Therapie von Tumoren negativ auswirken, da die anti-tumorale Wirkung von IL-12 ebenfalls größtenteils durch die IFN- $\gamma$ -Produktion bedingt ist (siehe 2.4.4.).

Mazzolini und Mitarbeiter (2001) zeigten die unterschiedliche Wirkung von IL-12 auf verschiedene Mausstämme. Während eine systemische Gabe von  $2,5 \times 10^9$  p.f.u. IL-12-kodierender Adenoviren bei C57BL/6-Mäusen ausnahmslos zum Tode führte, überlebten 100% gleich behandelte BALB/c-Mäuse. Diese Tatsache wird durch die unterschiedliche Gentransduktionsrate in den Lebern verschiedener Mausstämme erklärt. Dieser genetische Unterschied in der IL-12-Toxizität könnte auch auf den Menschen übertragen werden (Mazzolini *et al.*, 2001).

### 2.4.3. Das Interleukin-12-Fusionsprotein

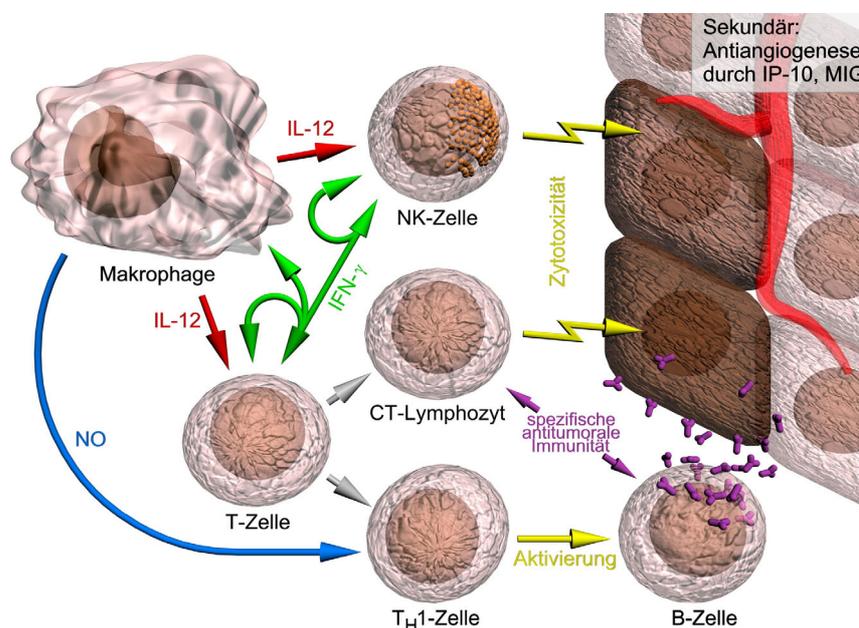
Für die Verwendung von IL-12-Gen-exprimierenden Vektoren in der Gentherapie ist es wichtig, dass die p35- und die p40-Untereinheiten im äquimolaren Verhältnis synthetisiert werden, da die p40-Untereinheit p40-Monomere und durch Disulfidbrücken verbundene Homodimere bildet, wenn sie im Überschuss exprimiert wird. Das p40-Homodimer ist biologisch nicht aktiv, bindet aber an die IL-12R $\beta$ 1-Kette des IL-12-Rezeptors mit ähnlicher Affinität wie das IL-12-Heterodimer und inhibiert somit die IL-12-Wirkung (Gillissen *et al.*, 1995). Bei der Kotransfektion von zwei Plasmiden, von denen jedes für eine IL-12-Untereinheit kodiert (Tahara *et al.*, 1994), und bei dem Ansatz, beide Genuntereinheiten in ein Plasmid bzw. Virus zu integrieren (Bramson J *et al.*, 1996), bleibt das Problem der nicht-äquimolaren Expression beider Gene erhalten. Bei dem Ansatz, die cDNA beider Untereinheiten mit der *internal ribosome entry site* (IRES) aus dem *Encephalomyocarditis-Virus* zu verbinden, so dass ein bicistronisches Gen entsteht (Qiao *et al.*, 1999), bleibt ebenfalls die Möglichkeit einer ungleichmässigen Genexpression erhalten.

Die genannten Methoden teilen sich somit das Problem voneinander unabhängiger Expressionen beider Zytokingenuntereinheiten mit der Folge unterschiedlicher molarer Mengen von p35 und p40 (Lode *et al.*, 1998).

Um die Möglichkeit einer ungleichen Synthese der IL-12-Untereinheiten und somit das Problem einer Inhibierung der IL-12-Wirkung zu umgehen, wurden die DNA-Abschnitte beider Untereinheiten mit einem DNA-Fragment verbunden. Dieses Fragment kodiert für ein flexibles Linker-Protein, das aus 6-15 Aminosäuren (hauptsächlich Glycin und Serin) besteht. In einem IL-12 p40-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> Linker-p35-Konstrukt sind die Nukleotide, die für die ersten 22 Aminosäuren in der p35-Untereinheit kodieren, deletiert (Lieschke *et al.*, 1997). Diese bilden das Sekretionssignal für das IL-12-Heterodimer. Dieses Signal führt zu einer Abtrennung eines N-terminalen Signalpeptids sowie zu einer N-Glykosylierung. Diese posttranslatorischen Modifikationen finden für die p40-Untereinheit nicht statt (Carra *et al.*, 2000), so dass der Sekretionsweg bei diesem Fusionszytokin dem Weg der p40-Untereinheit folgt, welches physiologisch im 10-100fachen Überschuss zum Heterodimer sezerniert wird (zusammenfassend in Carra *et al.*, 2000). Block und Mitarbeiter (2003) zeigten eine höhere, dem rekombinanten, aufgereinigten IL-12 vergleichbarere Bioaktivität des p40-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> Linker-p35-Fusionsproteins (single-chain-IL-12) im Vergleich zum heterodimeren IL-12. Aufgrund der genannten Vorteile des Fusionszytokins wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich das p40-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-p35-Fusionsprotein für eine adenoviral vermittelte Gentherapie von kolorektalen Karzinomen verwendet.

#### 2.4.4. Tumorthherapie mit Interleukin-12 und IL-12-kodierenden Adenoviren

Aufgrund der Fähigkeit von Interleukin-12, die Immunantwort von  $T_H1$ -Zellen und von zytotoxischen T-Lymphozyten zu erhöhen, hat es eine stimulierende Aktivität auf die antigenspezifische Immunität und ist somit in der antitumoralen Therapie sehr wirksam (Colombo und Trinchieri, 2002). Über eine IL-12-vermittelte  $IFN-\gamma$ -Produktion kommt es zu einer Induktion der NO-Synthese. NO wirkt über eine Verstärkung der T-Zell-Aktivität immunstimulierend. Allerdings können hohe NO-Konzentrationen die Immunreaktion (Koblish *et al.*, 1998; Lasarte *et al.*, 1999) und somit die Tumorabwehr vermindern. IL-12 ist zusätzlich in der Lage, die Produktion von opsonierenden und Komplement-bindenden IgG-Antikörpern, welche *in vivo* antitumorale Wirkungen zeigten, zu verstärken (zusammenfassend in Trinchieri, 2003). Im Mausmodell wurden  $IFN-\gamma$ -abhängig ebenfalls Antiangiogenese-Mechanismen durch IL-12 induziert (Voest *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 2000). Andere Chemokine wie das induzierbare Protein 10 und Monokine spielen bei der Antiangiogenese ebenfalls eine Rolle. Die Zerstörung von Tumorgefäßen geschieht durch polymorphonukleäre Zellen (Cavallo *et al.*, 1999). Andrews und Mitarbeiter (2000) zeigten auch eine IL-12-assoziierte Hemmung der Angiogenese. Abbildung 4 zeigt die wichtigsten Mechanismen der antitumoralen Aktivität von IL-12.



**Abbildung 4: Die antitumorale Wirkung von IL-12** (Quelle: modifiziert nach Trinchieri, 2003)  
(CT-Lymphozyt: zytotoxischer T-Lymphozyt, IL: Interleukin, IP-10: induzierbares Protein-10, MIG:  $IFN-\gamma$ -induzierbares Monokin, NK-Zelle: Nürliche Killerzelle, NO: Stickstoffoxid,  $T_H1$ -Zelle: T-Helfer-1-Zelle).

Die Wirksamkeit von Interleukin-12 als antitumorales Zytokin konnte in mehreren Tiermodellen gezeigt werden. Endogen gebildetes IL-12 spielt für die Abwehr von transplantierbaren Tumoren (Fallarino *et al.*, 1996) und von Methylcholanthren-induzierten Tumoren (Smyth *et al.*, 2000) eine sehr große Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit IL-12 die Entwicklung von Tumoren verhindern und die Regression von bereits entwickelten Tumoren induzieren kann. Im Mausmodell konnten subkutanes Melanomwachstum und Lungenmetastasen durch eine intraperitoneale IL-12-Gabe reduziert und das Überleben verlängert werden. Auch konnten transplantierte Lebermetastasen, subkutane Retikulumzell-Sarkome und renale Adenokarzinome effektiv mit IL-12 behandelt werden. Die lokale peritumorale Behandlung von subkutan transplantierten Tumoren führte zu deren Regression (Brunda *et al.*, 1993). Eine frühzeitige intramuskuläre Injektion von IL-12-kodierenden Plasmiden zeigte starke antimetastatische Effekte gegen Lungenmetastasen, welche auch gegen 9 Tage später verabreichte Tumorzellen wirkten (Schultz *et al.*, 1999). Das Auftreten von 3-Methylcholanthren-induzierten Tumoren konnte durch eine intraperitoneale IL-12-Behandlung entweder reduziert oder verzögert werden. Diese Effekte waren abhängig von der Methylcholanthren- und von der IL-12-Dosierung (Noguchi *et al.*, 1996). Die intraperitoneale Gabe von IL-12 bzw. die kombinierte Gabe von allogenen Tumorzellen und IL-12 konnte das Auftreten von Mammakarzinomen bei HER-2/neu-transgenen Mäusen reduzieren und deren Progression hemmen (Nanni *et al.*, 2001; Boggio *et al.*, 1998; Boggio *et al.*, 1999). Ebenfalls konnte im Mausmodell die intraperitoneale IL-12-Gabe in Kombination mit der Gabe von dendritischen Zellen, welche mit lysierten Tumorzellen vorinkubiert wurden, zu einem Wachstumsrückgang von hepatozellulären Karzinomen führen (Tatsumi *et al.*, 2001).

In einer klinische-Phase-I-Studie wurden Patienten mit metastasierten Melanomen mit autologen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), welche mit Tumorzellen vorinkubiert wurden, und einer subkutanen Koadministration von rekombinantem IL-12 immunisiert. Alle Patienten, welche diese Koinjektion erhielten, entwickelten eine CD8+ T-Zell-Antwort, und 6 von 8 Patienten zeigten eine Regression ihrer Metastasen (Gajewski *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie wurden Patienten mit resezierten malignen Melanomen der Stadien III oder IV zusätzlich zu einer Multipeptidimpfung intradermal mit IL-12 behandelt. Die zusätzliche IL-12-Behandlung führte zum Anstieg von IFN- $\gamma$  und von zytotoxischen T-Zellen, hatte aber keinen Einfluss auf den Rückfallzeitpunkt (Lee *et al.*, 2001). In einer Studie mit Patienten, welche ebenfalls fortgeschrittene Tumoren hatten, wurden peritumoral IL-12-Gen-transfizierte autologe Fibroblasten injiziert, was teilweise zu einer Tumorreduktion führte (Kang *et al.*, 2001). In einer Phase-I-Studie, in der Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen subkutan bzw. intraläsional mit rekombinantem IL-12 behandelt wurden, sprach ein Teil der Patienten komplett, ein anderer Teil

partiell oder nur gering auf die subkutane Therapie an. Nur 1 von 9 Patienten zeigte kein Ansprechen auf die Therapie. Die intraläsionale Therapie führte zu einer Tumorregression bei 2 von 2 Patienten (Rook *et al.*, 1999).

Klinische Phase-II-Studien, in denen Patienten mit Nierenzell- bzw. Ovarialkarzinom mit rekombinantem IL-12 subkutan bzw. intravenös behandelt wurden, waren enttäuschend. Die Ansprechraten waren beim Nierenzellkarzinom lediglich 7% und beim Ovarialkarzinom nur 3,8% (Motzer *et al.*, 2001; Hurteau *et al.*, 2001). Bei einer weiteren klinischen Phase-II-Studie wurden Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) bzw. mit Hodgkin-Lymphomen (HD) mit entweder intravenöser oder subkutaner IL-12-Gabe (NHL) bzw. nur mit subkutaner IL-12-Gabe (HD) therapiert. Bei 21% der Patienten mit NHL führte die Therapie zu einer totalen oder teilweisen Tumorregression, während keiner der Patienten mit HD positiv auf die Therapie reagierte (Younes *et al.*, 2004).

Die Möglichkeit der toxischen Nebenwirkungen des IL-12 bei einer systemischen Gabe ist ein limitierender Faktor in der Tumorthherapie. Bramson JL und Mitarbeiter (1996) untersuchten im Mausmodell die Wirksamkeit der direkten intratumoralen Injektion von IL-12-kodierenden Adenoviren. Sie konnten eine effektive Regression eines metastasierten Mammakarzinoms zeigen. Ebenso konnte in einem murinen Lebermetastasenmodell die Tumorgroße mit der intratumoralen Injektion IL-12-kodierender Adenoviren reduziert und das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert werden (Caruso *et al.*, 1996). Eine Regression von Kolonkarzinomen konnte bei 94% der intratumoral mit IL-12 behandelten Mäuse erreicht werden (Mazzolini *et al.*, 1999). Der adenovirale intratumorale Kotransfer der Gene von IL-12 und des synergistisch wirkenden Membranproteins B7-1, welches auf antigenpräsentierenden Zellen induziert wird, führte in mehreren Modellen zu einer systemischen antitumoralen Immunität (Pützer *et al.*, 1997; Hull *et al.*, 2000). Zu einer systemischen Immunität kam es genauso durch die intratumorale Injektion eines adenoviralen Vektors, welcher für IL-12 und das kostimulatorische Molekül 4-1BBL kodiert, das auf der T-Zelloberfläche gebunden die T-Zell-Immunität (hauptsächlich CD8<sup>+</sup>-Zellen) verstärkt (Martinet *et al.*, 2000).

In einer klinischen Studie wurden neun Patienten mit metastasierten Melanomen intratumoral mit IL-12-kodierenden Canarypoxviren behandelt. Dabei führte die Behandlung bei einem Patienten zu einer kompletten Regression von behandelten und unbehandelten Metastasen und bei einem Patienten zu einer Stabilisierung der Erkrankung. Eine Dosis-limitierende Toxizität wurde nicht beobachtet (Tiozzi *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit durchgeführte antitumorale Genterapie mit IL-12-kodierenden Adenoviren erfolgt im Hinblick auf die Möglichkeit von letalen Nebenwirkungen bei systemischer Applikation ausschließlich intratumoral.

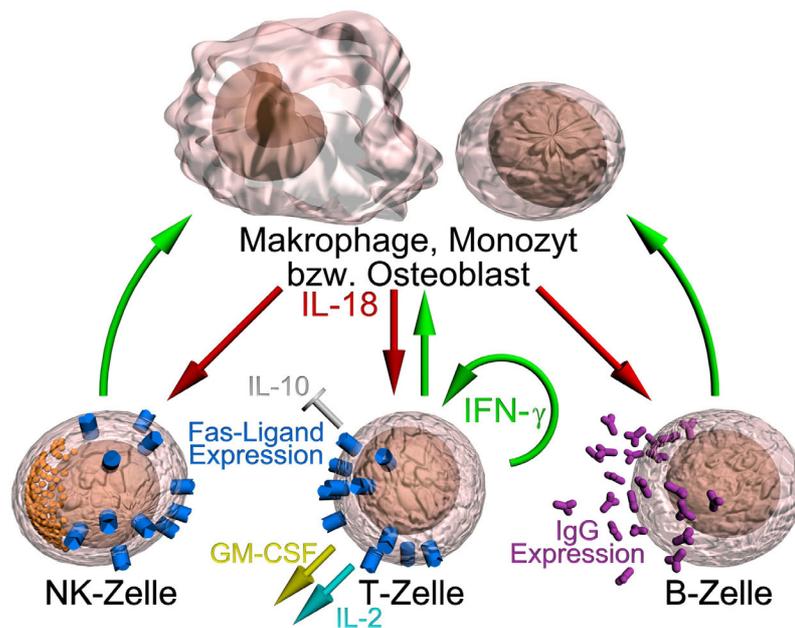
#### 2.4.5. Aufbau und Eigenschaften von Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18), auch bekannt als IFN- $\gamma$ -induzierender Faktor, ist ein Zytokin, welches aus Lebern von Mäusen isoliert wurde, welche zuvor mit hitzeinaktiviertem *Propionibacterium acnes* infiziert und anschließend einem Challenge mit Lipopolysacchariden zur Induktion eines toxischen Schocks unterzogen wurden (Okamura *et al.*, 1995).

Das Gen für IL-18 liegt beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 11 und bei Mäusen auf dem Chromosom 9 (NCBI). Während die murine IL-18-mRNA für ein 192 Aminosäuren langes Precursorprotein kodiert, enthält die humane IL-18-mRNA eine 193 Aminosäuren kodierende Nukleotidfolge, welche mit der murinen 65% Homologien aufweist. Von diesen Precursorproteinen wird mit Hilfe des *IL-1B-converting-enzymes* (ICE) eine 35 Aminosäuren lange Peptidsequenz nach einer Asparaginsäure abgespalten, so dass biologisch aktives IL-18 entsteht (Ushio *et al.*, 1996; zusammenfassend in RDI).

Durch die Interaktion zwischen T<sub>H</sub>1-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC) der Milz wird IL-18 wie IL-12 in Gegenwart von spezifischen Antigenen freigesetzt (Kohno *et al.*, 1997). IL-18 wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten, Makrophagen wie Kupfer-sche Sternzellen und Osteoblasten synthetisiert (RDI; Udagawa *et al.*, 1997) und wirkt als Kostimulanz für T<sub>H</sub>1-Zellen bei der IFN- $\gamma$ -, IL-2- und GM-CSF-Produktion, indem es die IL-2R  $\alpha$ -Kettengenexpression und die T<sub>H</sub>1-Zellproliferation fördert (RDI). Auf die T<sub>H</sub>2-Zell-Differenzierung wirkt IL-18 ebenfalls fördernd (Xu *et al.*, 2000). Außerdem steigert IL-18 wie IL-12 die NK-Zell-Aktivität, inhibiert die IL-10-Produktion (Ushio *et al.*, 1996) und vermittelt die Fas-Ligand-Synthese (Dinarello *et al.*, 1998).

Der IL-18-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, die mit IL-18-R $\alpha$  und IL-18-R $\beta$  bezeichnet werden. IL-18-R $\alpha$  ist mit dem *IL-1-Receptor-related-Proteine* (IL-1-RrP), einem Mitglied der IL-1-Rezeptor-Familie, identisch (Torigoe *et al.*, 1997; zusammenfassend in Dinarello *et al.*, 1998). IL-18-R $\beta$  ist mit dem *IL-1-Receptor-accessory-protein* verwandt und wird deswegen auch AcPL (accessory protein-like) genannt (Born *et al.*, 1998). Nach der Bindung von IL-18 an IL-18-R $\alpha$  entsteht ein hochaffiner Komplex durch die zusätzliche Bindung von IL-18-R $\beta$ , wodurch die Signaltransduktion durch die *IL-1-R-activating-kinase* (IRAK) vermittelt wird. Die Signaltransduktion endet mit einer Translokation des *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) in den Kern (zusammenfassend in Dinarello, 1998). Obwohl IL-18 wie IL-12 eine IFN- $\gamma$ -Produktion induziert, haben beide Zytokine unterschiedliche Signaltransduktionswege (Kohno *et al.*, 1997).



**Abbildung 5: Die biologische Wirkung von IL-18**

(GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor, IFN- $\gamma$ : Interferon-gamma, IgG: Immunglobulin G, IL: Interleukin, NK-Zelle: Natürliche Killerzelle, TNF: Tumornekrose-Faktor).

Wie Interleukin-12 zeigt auch Interleukin-18 toxische Effekte. IL-18-knock-out-Mäuse zeigten eine abgeschwächte Sensitivität gegenüber Lipopolysaccharid-induziertem lethalem Schock (Hochholzer *et al.*, 2000). Die intravenöse Gabe von rekombinantem murinem IL-18 in Mäuse führte zu einer Reduktion der roten Blutkörperchen, zu einer Vermehrung der weißen Blutkörperchen und zu einer Hyperplasie von Milz und Lymphknoten. Höhere Dosen führten zu einer Eiweißverlustnephropathie. Die intravenöse Gabe von rekombinantem humanem IL-18 in Affen führte zur Reduktion der roten Blutkörperchen, der neutrophilen Granulozyten und der Thrombozyten. Außerdem kam es zum Anstieg von Monozyten und ebenfalls zur Milz- und Lymphknotenhyperplasie. Bei höheren Dosen erfolgte auch hier eine Eiweißverlustnephropathie (zusammenfassend in Herzyk *et al.*, 2003).

Diese möglichen toxischen Effekte können in der Tumorthherapie einen limitierenden Faktor darstellen.

#### 2.4.6. Tumorthherapie mit Interleukin-18 und IL-18-kodierenden Adenoviren

Die antitumorale Wirkung von IL-18 ist im Wesentlichen mit der antitumoralen Wirkung von IL-12 synergistisch (siehe Abbildung 4). Sie wird hervorgerufen durch die Förderung einer NK-Zell- und CD8+-vermittelten antitumoralen Immunität und des CD4+-Zell-vermittelten immunologischen Gedächtnisses (Micallef *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2000). IL-18 verstärkt die Aktivität von NK-Zellen, welche Tumorzellen abtöten, so dass diese von dendritischen Zellen prozessiert werden. Diese fördern wiederum die Reifung von zytotoxischen T-Lymphozyten aus Vorläufer-T-Zellen (Tanaka *et al.*, 2000). Die antitumorale NK-Zell-Aktivität ist von Fas/Fas-Liganden-Interaktionen, welche auch durch IL-18 induziert werden, abhängig. Die antitumorale Wirkung von IL-18 beinhaltet ebenso die Induktion von IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und vom Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) (zusammenfassend in Jonak *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 1999).

Sowohl die intraperitoneale als auch die intravenöse Gabe von IL-18, nicht aber die subkutane Gabe, konnte antitumorale Effekte in Sarkom-tragenden Mäusen steigern. Die zweifache Vorbehandlung mit IL-18 führte bei den Mäusen zum Überleben und zu einer systemischen Immunität gegen syngene Sarkomzellen (Micallef *et al.*, 1997). Ebenfalls konnte durch die intraperitoneale Gabe von IL-18 das Wachstum von Melanomen und Fibrosarkomen bei Mäusen reduziert werden (Osaki *et al.*, 1998). Die subkutane IL-18-Administration in Plasmozytom-tragende Mäuse führte zum Rückgang dieser Tumoren und teilweise zu einer systemischen Immunität (Jonak *et al.*, 2002). IL-18-Gen-transfizierte Nierenkarzinomzellen und Melanomzellen zeigten eine reduzierte Tumorigenität im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen der gleichen Linie, wobei 50% der Mäuse, welche die transfizierten Nierenkarzinomzellen implantiert bekamen, tumorfrei blieben. 75% dieser Mäuse blieben bei einem Rechallenge-Versuch mit Wildtyptumoren tumorfrei (Tan *et al.*, 1998). Die kombinierte intraperitoneale Gabe von mit pro-IL-18-bzw. ICE-transfizierten Leukämiezellen in Mäuse verhinderte die Ansammlung von blutigem Aszites und führte bei einem Teil der Mäuse zum Langzeitüberleben (Zhang *et al.*, 2004). Die intratumorale Injektion von IL-18-kodierenden Adenoviren führte zur Eradikation von murinen Fibrosarkomen (Osaki *et al.*, 1999).

Eine Kombinationstherapie von Melanomen mit IL-18- bzw. Cytosindeaminase-kodierenden Adenoviren führte nach intratumoraler Injektion bei Mäusen zu einer signifikanteren Reduktion des Tumorwachstums als die alleinige Monotherapie mit den die jeweiligen Transgene exprimierenden Adenoviren (Ju *et al.*, 2000). Ebenfalls führte der adenoviral-vermittelte intratumorale IL-18-Gentransfer zusammen mit einer Therapie mit einem Fusionsprotein aus dem *Staphylokokken-Enterotoxin-A* (SEA) und der Fab-

Region von tumorspezifischen C215-Antikörpern zu einer signifikanteren Tumordinhibition von Melanomen als die alleinige Therapie mit diesem Fusionsprotein. Die Kombinationstherapie steigerte die Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten und die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  (Wang Q *et al.*, 2001). Die gleichzeitige intratumorale Gabe von unreifen dendritischen Zellen und IL-18-kodierenden Adenoviren in Fibrosarkome bzw. in Adenokarzinome führte zur kompletten Tumorreduktion und zur systemischen Immunität (Tanaka *et al.*, 2002).

Ein Problem der IL-18-Anwendung in der Tumorthherapie ist, dass für die Entstehung von reifem, biologisch aktivem IL-18 das ICE benötigt wird, welches allerdings nur in einigen Zellen vorhanden ist. Das in dieser Arbeit verwendete IL-18-Gen enthält nur den biologisch aktiven Teil der IL-18-cDNA mit einem zusätzlich eingeführten Startcodon, womit die Notwendigkeit einer ICE-Aktivität umgangen wird.

#### **2.4.7. Die Rolle der Interleukin-12/Interleukin-18-Kombination in der Tumorthherapie**

Obwohl sowohl IL-12 als auch IL-18 -wenn auch geringer- eine deutliche antitumorale Wirkung zeigen, konnte mit einer kombinierten Therapie beider Zytokine ein effektiverer systemischer antitumoraler Schutz erreicht werden. Die Kombinationstherapie mit IL-12-Gen-transfizierten und IL-18-Gen-transfizierten Mammakarzinomzellen konnte 70% der Mäuse vor nicht transfizierten Tumorzellen, welche an einer anderen Stelle als die transfizierten Tumorzellen inokuliert wurden, schützen. 30% der Mäuse waren vor 3 Tage zuvor entstandenen Tumoren geschützt (Coughlin *et al.*, 1998). Das schnelle Wachstum von Sarkomen konnte durch den kombinierten Transfer beider Zytokingene in die Muskulatur inhibiert und die Überlebenszeit von Ratten mit diesem Tumor verlängert werden (Ajiki *et al.*, 2003). Zellen von Antikörper-aktivierten Tumor-drainierenden Lymphknoten, welche mit einer IL-12/IL-18-Kombination kultiviert wurden, reduzierten nach einer intravenösen Gabe Lungenmetastasen effizienter als Zellen, welche mit IL-12 oder IL-18 allein kultiviert wurden (Li *et al.*, 2005). Die Tripeltherapie mit IL-12-, pro-IL-18- und ICE-Genen führte zu der höchsten antitumoralen Aktivität im Vergleich zu den jeweiligen Einzeltherapien (Oshikawa *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse deuten auf einen synergistischen Effekt beider Zytokine in der Tumorabwehr hin, was sich auch in der Kotherapie von murinem Blasenkrebs mit IL-12-Gen-transfizierten Blasenkrebszellen und einer systemischen IL-18-Gabe zeigte. Bei einer zusätzlichen Gabe von IFN- $\gamma$ -neutralisierenden Antikörpern wurde dieser synergistische Effekt reduziert, was auf die Bedeutung von IFN- $\gamma$  bei diesem Synergismus schließen lässt (Yamanaka *et al.*, 1999). Trotzdem wird die IFN- $\gamma$ -Promotor-Aktivität von den Zytokinen unterschiedlich reguliert. Der IFN- $\gamma$ -Promotor besitzt unterschiedliche Zielstellen für die Signaltransduktion von IL-

12 bzw. IL-18. Während IL-18 die Bindung des Aktivator-Protein-1 (AP-1) und damit die IFN- $\gamma$ -Promotor-Aktivität direkt induziert, ist bei IL-12 eine Kostimulation mit  $\alpha$ CD3/CD28 erforderlich. Darüber hinaus induziert IL-12 eine STAT4-vermittelte Promotoraktivierung (Barbulescu *et al.*, 1998). Der IL-12-induzierte STAT4-Transkriptionsfaktor bildet mit dem IL-18-induzierten AP-1-Transkriptionsfaktor bei einer Kostimulation mit beiden Zytokinen einen Komplex, der die Aktivität von AP-1 und somit die IL-18-Wirkung verstärkt (Nakahira *et al.*, 2002). Der synergistische Effekt beider Zytokine auf die IFN- $\gamma$ -Produktion kommt ebenfalls durch eine Hochregulation der IL-18-Rezeptor-Synthese auf Th1-Zellen und B-Zellen durch IL-12 zustande (Yoshimoto *et al.*, 1998). Die IFN- $\gamma$ -Produktion ist bei IL-18- bzw. ICE-defizienten Mäusen reduziert, was das Vorhandensein von IL-18 für die IL-12-induzierte IFN- $\gamma$ -Produktion notwendig erscheinen lässt (Fantuzzi *et al.*, 1999). IL-18 wirkt stimulierend auf die Bildung der  $\beta$ 2-Untergruppe des IL-12-Rezeptors und somit auf die IFN- $\gamma$ -induzierende Wirkung von IL-12 in Th1-Zellen (Chang *et al.*, 2000). Die zusätzliche Gabe dieser beiden Zytokine zur Therapie mit dendritischen Zellen, welche mit tumoraler cDNA behandelt wurden, führte ebenfalls zur erhöhten antitumoralen Immunität bei Mäusen mit malignen Gliomen (Yamanaka *et al.*, 2002). Allerdings berichten Osaki und Mitarbeiter (1998) über Nebenwirkungen wie Durchfälle und Gewichtsverlust, hämorrhagische Kolitis und Thymusatrophie bei Mäusen, welche mit einer Kombination beider Zytokine systemisch behandelt wurden. Außerdem führte die intraperitoneale Koadministration beider Zytokine in Mäuse zu einer fatalen systemischen Entzündungsreaktion, die sich durch erhöhte Serumkonzentration proinflammatorischer Zytokine, erhöhten Akut-Phase-Proteinen und multiplen Organschäden von Leber, Lunge und Darm äußerte. Bei höheren IL-18-Konzentrationen (0,5  $\mu$ g/d) führte die kombinierte Gabe zu einer 100%igen Letalität. Die genannten toxischen Effekte sind abhängig von der NK-Zell-induzierten IFN- $\gamma$ -Produktion (Carson *et al.*, 2000). Die kombinierte intraperitoneale Gabe von IL-12 und IL-18 führte im Vergleich zur Einzelgabe in Mäusen zu einer fettigen Leberdegeneration mit Transaminasenanstieg, Anstieg der Fibrinogenkonzentration im Serum und zu einer Reduktion der Thrombozytenzahl. Ferner wurde eine Reduktion der ATP-Konzentration in der Leber und eine Verminderung der Parenchymdurchblutung beobachtet. Außerdem kam es auch hier zum Gewichtsverlust (Kaneda *et al.*, 2003).

## 2.5. Tetracyclin-regulierbare Zytokingenexpression

### 2.5.1. Vorteile regulierbarer Zytokingenexpression in der Gentherapie

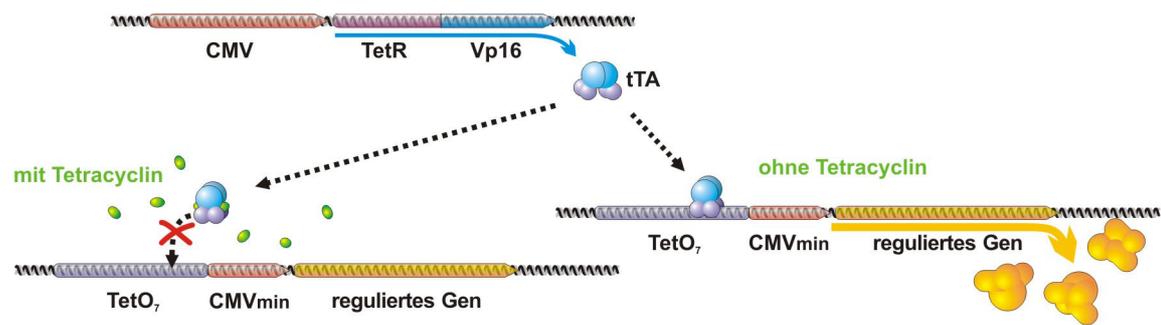
Der Nutzen Zytokin-kodierender Adenoviren in der Gentherapie ist durch die oben genannte Zytokintoxizität beschränkt. Erwünscht wird eine Möglichkeit der Anpassung der Genexpression an die Bedürfnisse mit der Option einer postinfektiösen Kontrolle der Expression. Regulierbare Expressionssysteme, die in der Gentherapie verwendet werden, sollten spezifisch sein und nur das therapeutische Gen beeinflussen. Zelleigene Expressionen sollten nicht beeinflusst werden. Wünschenswert ist ebenfalls, dass diese Systeme im aktiven Zustand hohe Transgenexpressionen aufweisen, während sie im supprimierten Zustand eine niedrige Expression zeigen. Die Regulierbarkeit sollte einen schnellen Wechsel vom aktivierten in den supprimierten Zustand und umgekehrt erlauben. Es existiert bereits eine Reihe von regulierbaren Systemen, wozu das Pristinamycin-regulierbare-System (Fussenegger *et al.*, 2000), das Progesteron-regulierbare-System (PRS), das Ecdysone-regulierbare-System (ERS), das Rapamycin-regulierbare-System (RRS) und das Tetracyclin-repress-regulierbare-System (TrRS) gehören (zusammenfassend in A-Mohammadi und Lotze, 2000), wobei im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich auf die Tetracyclin-regulierbaren Expressionssysteme näher eingegangen wird. Ein Vorteil der Tetracyclin-regulierbaren Systeme ist die Verwendung von Tetracyclin bzw. seinen Derivaten als Suppressor bzw. Induktor. Die Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und die Nebenwirkungen von Tetracyclin sind bestens bekannt, was die Anwendung dieses Antibiotikums in der Gentherapie erleichtert. Außerdem hat Tetracyclin eine hohe Affinität zum Tetracyclin-abhängigen Repressor (siehe 2.5.2.), so dass niedrige Tetracyclinkonzentrationen zu geringen Nebenwirkungen führen, welche bei Progesteron- und Rapamycin-Aktivatoren in großen Mengen vorkommen (A-Mohammadi und Lotze, 2000).

Regulierbare Expressionssysteme werden außer in der Gentherapie ebenfalls in anderen biologischen und medizinischen Gebieten, wie z.B. in Genregulations- und Genfunktionsstudien genutzt (Shockett und Schatz, 1996).

### 2.5.2. Tetracyclin-supprimierbare und -induzierbare Expressionssysteme

Die Tetracyclin-regulierbaren Expressionssysteme basieren auf dem Tetracyclin-Resistenz-Operon von *E.coli*. Die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin und seiner Derivate erreicht das Bakterium durch das Tetracyclin-Resistenzprotein TetA, welches ein Membranprotein ist, das für den Transport von Tetracyclin aus dem zytoplasmatischen in den periplasmatischen Raum der Bakterienmembran sorgt (Eckert und Beck, 1989 b). Dieser Transport ist ein energiegebundener aktiver Prozess (McMurry *et al.*, 1980), der das Antibiotikum im Austausch gegen ein Proton ausschleust. Hohe TetA-Konzentrationen führen allerdings zu Veränderungen des Membranpotentials und bedrohen somit die Vitalität der Zelle (Eckert und Beck, 1989 a). Deshalb verhindert bei Abwesenheit von Tetracyclin die Bindung des Tetracyclin-abhängigen Repressors (TetR) an die Operatorsequenz die Expression des TetA-Gens. Die Bindung von Tetracyclin an den TetR bewirkt eine Konformationsänderung und vermindert dadurch die Affinität des Repressors zum Operator und macht somit die Transkription des TetA-Gens möglich. Durch die Fusionierung des TetR mit dem C-terminalen Ende der Transkriptionsaktivator-domäne des Virusproteins 16 (VP16) des *Herpes-Simplex-Virus* (HSV) entsteht ein Tetracyclin-abhängiger Transaktivator (tTA), welcher in Säugetierzellen verwendet werden kann. Durch die Bindung des TetR-Anteils an eine Sequenz eines heptamerisierten Operators kann der VP16-Anteil des Fusionsproteins die Transkription eines minimalen CMV-Promotors stimulieren. Durch Hinzugabe von Tetracyclin wird die Bindung des Fusionsproteins und somit die Transkription verhindert (Gossen und Bujard, 1992).

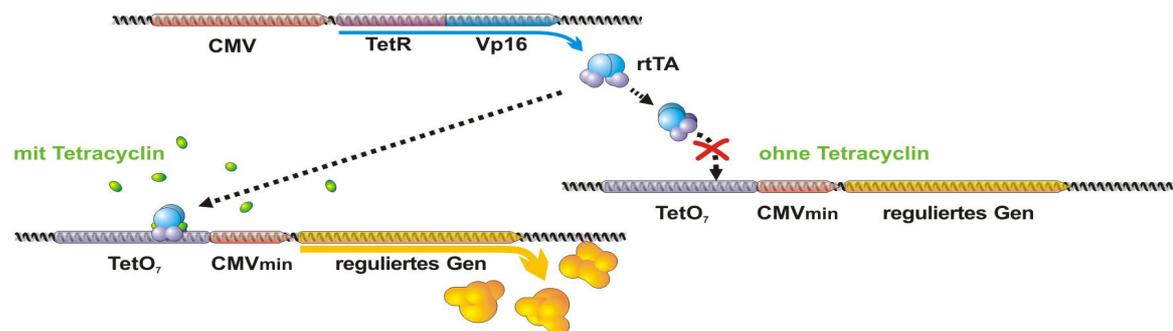
Neben Tetracyclin können auch die Derivate Anhydrotetracyclin, Oxytetracyclin, Minocyclin und Doxycyclin für die Regulation der Transkription verwendet werden, wobei aber Doxycyclin den längsten Effekt zeigt, was bei der Anwendung von potenziell toxischen Transgenen eine nützliche Eigenschaft ist (A-Mohammadi *et al.*, 1997). Außerdem zeigt Doxycyclin vorteilhafte pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften. Es hat eine effiziente orale Absorptionsrate, eine lange Halbwertszeit (14-22 Stunden), eine sehr gute Gewebepenetration und eine gute hepatische Ausscheidungsrate (zusammenfassend in A-Mohammadi *et al.*, 1997). Es ist bereits in einer subantimikrobiellen nichttoxischen Dosis unter 2 µg/ml in der Anwendung als Suppressor einer Transgenexpression sehr effizient (Block *et al.*, 2003). Somit wird in dieser Arbeit ausschließlich Doxycyclin als Regulator des Tetracyclin-regulierbaren Systems verwendet.



**Abbildung 6: Funktionsweise des Tetracyclin-supprimierbaren Systems (Tet-OFF)**

Der Tetracyclin-abhängige Transaktivator (tTA) bindet in Abwesenheit von Tetracyclin mit der TetR (Tetracyclin-abhängiger Repressor)-Domäne an die spezifische Sequenz des Operators (TetO<sub>7</sub>), so dass die VP16 (virales Protein 16 des *Herpes-Simplex-Virus*)-Domäne des Fusionsproteins die Transkription eines minimalen *Cytomegalie-Virus* (CMV<sub>min</sub>)-Promotors stimuliert. Durch Hinzugabe von Tetracyclin wird die Bindung des Fusionsproteins und dadurch die Transkription verhindert.

Neben dem oben beschriebenen Tet-OFF-System, existiert noch das Tet-ON-System, bei dem die Transgenexpression durch Tetracyclin induziert werden kann. Dieser „reverse“ Transaktivator (rtTA) entsteht durch den Austausch von vier Aminosäuren im TetR-Anteil des Fusionsproteins tTA (Gossen *et al.*, 1995).



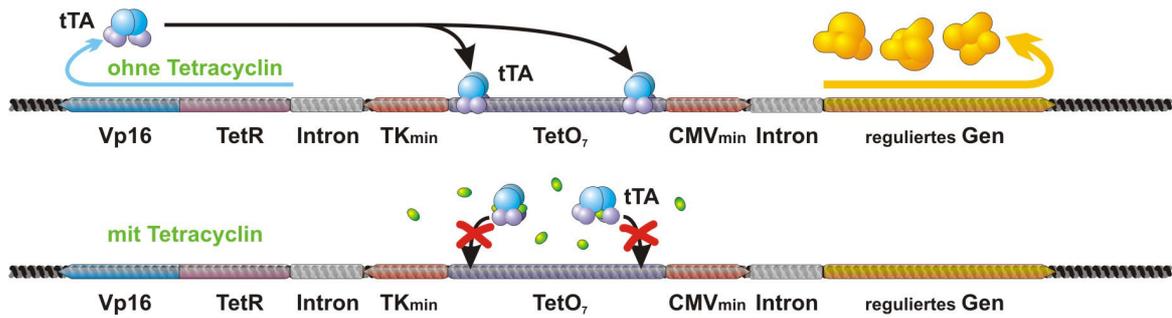
**Abbildung 7: Funktionsweise des Tetracyclin-induzierbaren Systems (Tet-ON)**

Hier bewirkt Tetracyclin die Bindung des reversen Tetracyclin-abhängigen Transaktivators (rtTA) an den Operator (Wirkung komplementär zu der Wirkung des supprimierbaren Systems. Siehe Abbildung 6).

Das Problem bei der Anwendung des Tet-ON-Systems ist die Basalexpression des Transgens im abgeschalteten Zustand. Diese kommt durch die Restaffinität des rtTA zum Operator zustande (Urlinger *et al.*, 2000). In einigen Studien wurden Verbesserungen dieses Systems vorgenommen. Forster und Mitarbeiter (1999) fusionierten den TetR mit der Repressordomäne vom *Säugetier-Kox1-Protein*, so dass ein Tetracyclin-abhängiger Transkriptionssilencer (tTS) entstand. Dieser bindet in Abwesenheit von Tetracyclin an den Operator und verhindert somit die Bindung von rtTA und die Transgenexpression. Die Basalexpression wird hiermit deutlich reduziert. Eine weitere Verbesserung des Systems wurde durch randomisierte Mutagenese gefolgt von Screeningmethoden erreicht, wobei die Fähigkeit des rtTA<sup>S</sup>-M2-Konstruktes zur verminderten Basalexpression erkannt wurde (Urlinger *et al.*, 2000). Es wird hier allerdings nicht weiter auf das Tet-ON-System eingegangen, da in dieser Arbeit ausschließlich das Tet-OFF-System verwendet wird.

### 2.5.3. Verwendung des autoregulativen Tet-OFF-Systems

Autoregulation bedeutet, dass die Expression des Transaktivatorgens unter der Kontrolle des Transaktivator-bindenden-Promotors steht. Die Verwendung des autoregulativen Tet-OFF-Systems hat gegenüber den herkömmlichen regulierbaren Systemen einige Vorteile. Im angeschalteten Zustand eines autoregulativen Systems kann der Level des Transaktivators stärker als in herkömmlichen Systemen erhöht werden. Somit ist auch die Expression der Transgene unter der Kontrolle des respondiblen Promotors höher. Im abgeschalteten Zustand wird die tTA-Genexpression und somit der toxische „squelching“-Effekt der VP16-Domäne vermindert (Shockett *et al.*, 1995). Unter dem „squelching“-Effekt wird eine Interaktion von VP16 mit zelleigenen Transkriptionsfaktoren und somit eine Verminderung ihrer Funktion verstanden (Sadowski *et al.*, 1988; Triezenberg *et al.*, 1988). Das von Strathdee und Mitarbeitern (1999) beschriebene und in dieser Arbeit verwendete autoregulative System ist bi-direktional und benutzt einen schwächeren minimalen Thymidinkinase (TK)-Promotor für die Expression des Transaktivatorgens und einen stärkeren minimalen CMV-Promotor für die Transgenexpression. Die Effektivität dieses Systems wurde durch zusätzliche Koppelung eines nukleären Lokalisationssignals an den Transaktivator verbessert (Strathdee *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit ist das autoregulative System in die E1-Region E1/E3-deletierter Adenoviren eingebaut. Außerdem enthält das hier verwendete System zwei zusätzliche Introns, von denen das eine vor dem Transaktivatorgen und das andere vor dem therapeutischen Gen liegt. Diese Introns dienen der Vermeidung von kryptischem Spleißen und der Erlangung von RNA-Stabilität. Die tTA-Genexpression, die unter der Kontrolle des TK-Minimal-Promotors steht, resultiert, in Abwesenheit von Tetracyclin, in einer positiven Feedbackschleife, was eine verstärkte Expression des therapeutischen Gens, welches unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht, nach sich zieht (Block *et al.*, 2003). Die Voraussetzung solch eines autoregulativen Systems ist eine gewisse basale Expression („Leakiness“), welche die zur Aktivierung der Feedbackschleife notwendige Transaktivatormenge bereitstellt. Die Effektivität dieses Tet-OFF-Systems zeigte sich in einer ca. 4254fach höheren Reporterexpression im Vergleich zur Expression unter der Kontrolle des häufig verwendeten CMV-Promotors. Die IL-12-Genexpression konnte unter geringer Doxycyclingabe (2µg/ml) bis zu 6000fach supprimiert werden. Diese hohe Sicherheit und die hohe Transgenexpression prädisponieren dieses System für eine Anwendung in der Tumorthherapie. Außerdem könnte die ca. 40fach stärkere Sensitivität des Tet-OFF-Systems im Vergleich zu standardisierten *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Verfahren eine Detektion von Doxycyclinmengen unterhalb der HPLC-Nachweisgrenze in der Human- und Veterinärmedizin ermöglichen (Block *et al.*, 2003).



**Abbildung 8: Funktionsweise des Tetracyclin-abhängigen autoregulativen Tet-OFF-Systems nach Strathdee *et al.*, 1999**

Während die Expression des Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (tTA)-Gens unter der Kontrolle eines minimalen Thymidinkinase (TK<sub>min</sub>)-Promotors steht, wird die Expression des regulierten Gens von einem stärkeren minimalen *Cytomegalie-Virus* (CMV<sub>min</sub>)-Promotor kontrolliert. Der tTA bindet in Abwesenheit von Tetracyclin mit seiner TetR (Tetracyclin-abhängiger Repressor)-Domäne an den heptamerisierten Operator (TetO<sub>7</sub>), so dass die VP16 (virales Protein 16 des *Herpes-Simplex-Virus*)-Domäne des Fusionsproteins die Transkription sowohl eines CMV<sub>min</sub>-Promotors als auch eines TK<sub>min</sub>-Promotors stimulieren kann. Durch Hinzugabe von Tetracyclin wird die Bindung des Fusionsproteins und dadurch die Transkription vermindert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Agarose (für die Gelelektrophorese)	(Merck, # 1.01236)
Agarose, Sea Plaque	(Cambrex, # 50101)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	(Merck, # 1.01145)
Ampicillin	(Roche, # 835269)
Assay-Diluent	(BD Pharmingen™, # 555213)
Borsäure	(Merck, # 1.120151)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galacto-Pyranosid (X-Gal)	(Fluka, # 16664)
Bromphenolblau	(Merck, # 1.11746)
Cäsiumchlorid (CsCl)	(Gibco, # 15507-025)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	(Merck, # 1.02083)
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	(Merck, # 1.02382)
Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 5x	(Promega, # E1531)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck, # 1.02950)
Doxycyclinhyclat (20 mg/ml Doxycyclin)	(Ratiopharm, Zulassungsnr.: 576.00.01)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium with high Glucose (HGDMEM)	(Gibco, # 41965-039)
Dulbecco`s Phosphate-buffered Saline (PBS) w/o Ca Mg	(Gibco, # 14190-094)
Ethanol absolut	(Merck, # 1.00983)
Ethidiumbromid	(Merck, # 1.11608)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Merck, # 1.12029)
F-12 (Ham) Nutrient Mixture + L-Glutamine	(Gibco, # 21765-029)
Fetal Bovine Serum (FBS)	(Gibco, # 10099-14)
Fetal Bovine Serum (FBS), tetracyclinfrei	(BD Clontech, # 8637-1)
Ficoll 400	(Merck, # 1.00498)
Glucose	(Merck, # 1.08337)
Glutaraldehyd	(Merck, # 8.20603)
Glycerin, wasserfrei	(Merck, # 1.04093)
Hefeextrakt	(Merck, # 1.03753)
HEPES (1 M)	(Gibco, # 15630-056)
Horse Serum	(Gibco, # 26050-088)
Isopropanol	(Merck, # 1.09634)
Kaliumchlorid (KCl)	(Merck, # 1.05001)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(Merck, # 1.04877)

---

Kaliumhexacyanoferrat (III) ( $C_6FeK_3N_6$ )	(Merck, # 1.04973)
Kaliumhexacyanoferrat (II) –Trihydrat ( $C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$ )	(Merck, # 1.04984)
Ketanest (25mg/ml)	(Pfizer, Zulassungsnr.: 39945.00.00)
L-Glutamin 200 mM (100x)	(Gibco, # 25030-024)
2-Mercaptoethanol	(Merck, # 1.15433)
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )	(Merck, # 8.14733)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	(Merck, # 1.05835)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	(Merck, # 1.05886)
McCoy's 5A Medium	(Gibco, # 26600-023)
Modified Eagle Medium 2x (MEM)	(Gibco, # 21935-028)
Natriumacetat ( $C_2H_3NaO_2$ )	(Merck, # 1.01539)
Di-Natriumcarbonat ( $Na_2CO_3$ )	(Merck, # 1.06392)
Natriumchlorid (NaCl)	(Baker, # 2781000)
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	(Merck, # 1.06370)
Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ )	(Merck, # 1.06329)
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	(Merck, # 1.06559)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ )	(Merck, # 1.06580)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ( $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ )	(Merck, # 1.06579)
10x NEBuffer 2	(NE Biolabs, # B7002S)
N,N-Dimethylformamid	(Merck, # 1.03053)
Penicillin/Streptomycin (100x)	(Gibco, # 15140-122)
Phenol Rot (Histo)	(Riedel-de Haën, # 252-057-8)
Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)	(Bayer, Reagenziennr.: R1061)
RPMI 1640	(Gibco, # 41965-025)
Salzsäure (HCL)	(Merck, # 1.00316)
Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ )	(Merck, # 1.00731)
Substrate Reagent A (Hydrogenperoxid)	(BD Pharmingen™, # 51-2606 KC)
Substrate Reagent B (Tetramethylbenzidin)	(BD Pharmingen™, # 51-2607 KC)
Sucrose	(usb, # 21938)
Tris (hydroxymethyl)aminomethan ( $NH_2C(CH_2OH)_3$ )	(SIGMA, # 123K5407)
Trypan-Blau-Lösung	(Merck, # 1.11732)

Trypsin-EDTA	(Gibco, # 25300-054)
Trypton-Wasser	(Merck, # 1.10859)
Tween-20	(Fluka, # 93773)
Xylenecyanol	(Merck, # 1.10590)

### 3.1.2. pH-Puffer

Die Lösungen, dessen pH zu ermitteln war, wurden gegen folgende Puffer im pH-Meter gemessen:

pH-Pufferlösung (pH 9,21)	(Mettler Toledo, # 51300193)
pH-Pufferlösung (pH 7,00)	(Mettler Toledo, # 51340059)
pH-Pufferlösung (pH 4,01)	(Mettler Toledo, # 51340057)

### 3.1.3. Reagenzienkits

Luciferase Assay Kit	(Promega, # TB101)
Murines IL-12 (p70) ELISA OptEIA™ Set	(Pharmingen, # 555256)
Murines IL-18 ELISA Kit	(MBL, Code.No. :7625)
Murines IFN- $\gamma$ ELISA OptEIA™ Set	(BD Pharmingen, # 2612KI)
Plasmid Midi Kit	(Qiagen, # 12143)

### 3.1.4. Enzyme, Molekulargewichtsstandards, Oligonukleotide, Sequenzierungs- zusätze, Antikörper

Restriktionsenzym XhoI	(NE Biolabs, # R0146S)
DNA-Marker VII	(Roche, # 1209264)
Oligonukleotidprimer für Sequenzierungsreaktion	(MWG-Biotech)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix	(Applied Biosystems)
2,5x Sequencing Buffer	(Applied Biosystems)
Polyklonaler Ziegen-anti-human CD28-IgG	(R&D Systems, # AF-342-PB)
Hamster-anti-mouse CD3-IgG	(R&D Systems, # MAB 484)

### 3.1.5. Plasmidvektoren

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

Plasmide	Resistenz	Bezugsquelle
pBHG-10	Ampicillin	F.Graham, McMaster University, Hamilton, ON, Canada
pRC.CMV- $\beta$ -Gal	Ampicillin	Perricaudet, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
pAd.3r.msclL-12	Ampicillin	Wurde innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert
pAd.3r.mIL-18	Ampicillin	Wurde innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

### 3.1.6. Bakterien

Kompetente *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

(Gibco, # 18258-012)

### 3.1.7. Adenoviren

Folgende Adenoviren lagen bereits vor und wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt:

Ad.3r.msclL-12	(Wurde innerhalb der Arbeitsgruppe konstruiert)
Ad.3r.luc	(Wurde innerhalb der Arbeitsgruppe konstruiert)
Ad.DL312	(Perricaudet, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France)

### 3.1.8. Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquellen
293-Zellen	Diese Zellen leiten sich von humanen embryonalen Nieren-Karzinomzellen ab.	Frank Graham, McMaster University, Hamilton, ON, Canada
HT-29-Zellen	Zellen aus einem humanen kolorektalen Karzinom	ATCC, Manassas, USA
MCA-26-Zellen	Murine Kolonkarzinomzelllinie	ATCC, Manassas, USA

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

### 3.1.9. Geräte

ABI Sequenator 377	(Applied Biosystems)
Auflichtmikroskop	(Hund)
Autoklav Sanoclav	(Wolf)
Brutschrank Bakterienkulturen	(Köttermann)
Brutschränke Zellkultur Hera Cell	(Heraeus)

Elektrophoresegelkammern und Powersupply	(Bio-Rad)
ELISA-Spektralphotometer Titertek Multiskan® Plus	(Labsystems)
Feinwaage HR-120	(A&D)
Gelgießstand	(Bio-Rad)
Homogenisator PT 3100	(Kinematica)
Homogenisator-Aufsatz, Polytron Aggregate 12 mm, PT-DA 3012/2	(Kinematica)
Luminometer Lumat LB 9507	(EG&G Berthold)
Magnetrührer	(Cenco)
Neubauer-Zählkammer	(Labor Optik)
PCR-Thermozykler PCR Sprint	(ThermoHybaid)
pH-Meter pH 538	(WTW MultiCal®)
Schüttler 3005	(GFL)
Spektralphotometer SmartSpec 3000	(Bio-Rad)
Sterilwerkbank HeraSafe	(Heraeus)
Tischzentrifuge Biofuge pico	(Heraeus)
Ultrazentrifuge Typ L7-35 (Rotor: SW 40 Ti)	(Beckman)
UV-Kammer zur Gelanalyse und Software Geldoc 2000	(Bio-Rad)
Vortexer	(Braun)
Wasserbad	(Braun)
Zentrifuge Typ 5804R (Rotoren: Type A4-44; Type F34-6-38; Type F-45-30-11)	(Eppendorf)

### 3.1.10. Weitere Materialien

Nachfolgend sind die für die Zellkultur verwendeten sterilen Labormaterialien aufgelistet:

Falcontubes (15 ml, 50 ml)	(BD Falcon)
Kryotubes	(Nunc)
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	(BD Falcon)
Polystyrentubes (12 ml)	(Nunc)
6-Well-Platten	(Greiner)
24-Well-Platten	(Greiner)
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	(Corning)
Zellkulturschalen (60 mm, 96 mm, 144 mm)	(Nunc)

Weiterhin oft gebraucht wurden:

Dialysemembranen Slide-A-Lyzer	(Pierce)
Einwegspritzen 1ml, 10ml, 50ml	(Braun)
Hamilton-Glasspritzen, 100 µl	(Hamilton ca, Rena, Nevada)
Pipetten (2µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	(Gilson)
Pipetten, 8fach und 12fach Multichannel	(Eppendorf)
Pipettenspitzen	(Greiner)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5ml, 2ml	(Merck)
Stericup Vakuumfilter	(Milipore)
Spritzenvorsatzfilter, Porenweite 0,22 µm	(Qualilab)
Ultrazentrifugenröhrchen ultra clear, 14 x 95 mm	(Beckman)
96-Well-Platten (Microtiterplatten)	(Nunc)
96-Well-Platten (Zellkultur)	(Falcon)

### **3.1.11. Tiere**

Beide Mausstämme stammten aus der Versuchstierhaltung Charles River, Wilmington, USA:

C57BL/6-Mäuse: weiblich, 56-70Tage alt, ca. 20g

Balb/c-Mäuse: weiblich, ca.70 Tage alt, ca. 20g

Das Futter für die Mäuse stammte von der Firma ssniff, Spezialdiäten GmbH (V1536/000)

## 3.2. Methoden *in vitro*

### 3.2.1. Sterilisationstechniken

Sterilisationen von hitzestabilen Materialien und Lösungen wurden in einem Autoklaven für 15 bis 20 Minuten bei 121°C und 2,05 bar in Wasserdampf durchgeführt. Hitzesensitive Lösungen wurden entweder mit einem sterilen Spritzenvorsatzfilter oder mit dem Stericup Vakuumfilter steril filtriert.

### 3.2.2. Bakterienkultur

Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte durch Kultivierung von *E.coli*-Bakterien, die entsprechend transformiert waren (in dieser Arbeit mit pAd.3r.msclL-12). Ca. 5 µl einer kryokonservierten Stammkultur wurden in 200 ml LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium übertragen und über Nacht in einem Schüttler bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Das LB<sub>Amp</sub> Medium bestand aus 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt in Aqua dest., dem nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 40°C 1 ml Ampicillin-Lösung (10% Ampicillin in 10 mM Tris (pH 8,0), steril filtriert) hinzugegeben wurde.

### 3.2.3. Isolierung von Plasmiden aus Bakterien

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde eine alkalische Lyse der Bakterien durchgeführt. Eine anschließende Ansäuerung führte zum Ausfällen von Proteinen, Membranen und der chromosomalen DNA der Bakterien. Die im Überstand gelösten Plasmide wurden in einer Silicagelsäule gebunden, gewaschen und anschließend durch Alkohol ausgefällt. Für dieses Verfahren wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit mit den dazugehörigen Puffern und Säulen verwendet.

Zunächst wurden die zuvor kultivierten Bakterien 5 Minuten bei 4°C und 8000 rpm zentrifugiert und in 6 ml Puffer 1 resuspendiert. Für eine Lyse der Bakterienmembran wurde dieser Suspension der alkalische Puffer 2 hinzugegeben, woraufhin eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte. Zum Ausfällen der nicht benötigten Bakterienbestandteile wurde dem Lysat Puffer 3 zugegeben. Alle drei Puffer wurden in gleichen Mengenverhältnissen eingesetzt. Das Lysat wurde nach Zugabe des dritten Puffers 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die nicht benötigten Bakterienbestandteile 15 Minuten bei 4°C und 8000 rpm abzentrifugiert werden konnten. Die Reinigung der Plasmide aus dem Überstand erfolgte über eine kommerziell erhältliche Säule („QIAGEN-tip 100“ vom verwendeten Kit), welche zuvor mit QBT-Puffer equilibriert wurde. Die in der Säule gebundenen Plasmide wurden zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen und mit 7 ml 50°C-warmen QF-Puffer aus der Säule eluiert. Die Plasmide wurden anschließend durch Zugabe von 5 ml Isopropanol ausgefällt, mittels einer Zentrifugation von 45 Minuten bei

4°C und 10.000 rpm sedimentiert, mit 3 ml eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Zuletzt wurden die Plasmide in 70 µl Aqua dest. aufgenommen und zur Konzentrationsbestimmung einer photometrischen Messung unterzogen.

#### **3.2.4. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Absorption (optische Dichte, OD) einer Verdünnung der DNA-Lösung wurde mit Hilfe eines Photometers in einer Quarzküvette gegen Aqua dest. bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Gelöste doppelsträngige DNA weist bei 260 nm in einem linearen Verhältnis pro 100 ng/µl eine Absorption von 2 auf. Die Absorption bei 280 nm ist ein Hinweis auf Proteinverunreinigungen. Der Quotient von 260 nm und 280 nm sollte über 1,8 liegen. Durch die Messung der Absorption bei 320 nm werden partikuläre Verunreinigungen detektiert.

#### **3.2.5. Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese**

Doppelsträngige DNA (z.B. Plasmide) kann mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Sequenzen geschnitten werden. Die so entstandenen DNA-Fragmente können in einem Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden und zeigen ein dem Plasmid entsprechendes charakteristisches Bandenmuster.

##### Restriktionsverdau

Für den Verdau von Plasmiden wurden Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer von New England Biolabs (NEB) gemäß der empfohlenen Beschreibung verwendet.

Es wurden ca. 8 µg Plasmid-DNA (pAd.3r.mscIL-12) mit 2,5 µl 10x Puffer (NEBuffer 2) und 10 Einheiten Restriktionsenzym (Xho I, 10 U/µl) in einem 25 µl-Ansatz vereinigt.

Der Ansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

##### Agarosegelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Gelgießstand, Elektrophoresekammer und Netzgerät von der Firma Bio-Rad verwendet.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau fand in einem 1%igen Agarosegel statt (1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer (10,8% (w/v) Tris, 5,5% (w/v) Borsäure, 4% EDTA (pH 8,0) in Aqua dest.), autoklaviert). Vor dem Polymerisieren der Agarose wurde für den optischen Nachweis der Fragmente 500 ng/ml Ethidiumbromidlösung hinzugegeben, welches sich in die DNA einlagert und nach Anregung mit UV-Licht sichtbares Licht emittiert.

Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE verwendet. Die Proben wurden mit ca. 20% Auftragspuffer versetzt (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol und 15% (w/v) Ficoll 400, in Aqua dest.). Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards (MWM VII). Als Kontrolle wurde das unverdaute Plasmid verwendet.

An das Gel wurde ein elektrisches Feld von 80 bis 110 V angelegt. Nach der Fragmentauftrennung wurde das Gel fotodokumentarisch erfasst.

### 3.2.6. DNA-Sequenzierung

In dieser Arbeit wurde das mscIL-12-Gen sequenziert. Das mL-18-Gen und die Sequenz des Tet-OFF-Systems wurden bereits von anderen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe sequenziert.

Die Sequenzierung erfolgte durch eine Modifikation der Methode von Sanger und Mitarbeitern (1977) nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens. Dabei wurden die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (Primern) und einer Taq-Polymerase einer linearen Amplifikation unterzogen. Die vier benötigten Basen wurden als Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) hinzugegeben. Außer den normalen dNTPs wurden noch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet, welche sich anstelle der dNTPs in die wachsende Polynukleotidkette einbauen konnten. Dies führte dann zum Abbruch der Replikation. So entstanden unterschiedlich lange DNA-Einzelstränge, welche nach einer Entsalzung durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden. Da für jedes dNTP ein spezifisch markiertes ddNTP verwendet wurde, konnte die DNA-Sequenz durch die fluoreszenzmarkierten Enden über ein optisches System erfasst werden. Die erhaltene Sequenz konnte mit der im Internet verfügbaren Sequenz (NCBI a; NCBI b) für das mL-12 verglichen werden.

Zur Durchführung der Amplifikation wurde ein Thermozykler verwendet, welcher folgendermaßen programmiert wurde: 25 Zyklen:

96°C	10 Sekunden
50°C	5 Sekunden
60°C	4 Minuten

Die Ansätze bestanden jeweils aus einem Volumen von insgesamt 20 µl und enthielten ca. 2,4 µg des Plasmids pAd.3r.mscIL-12, 15 pMol des jeweiligen spezifischen Primers (Sense- bzw. Antisenseprimer), 6 µl eines 2,5x-Puffers und 2 µl des BigDye-Reactionmixes. Im Puffer bzw. Reactionmix waren die notwendigen dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs und die Polymerase enthalten.

Das Plasmid wird bei 96°C in zwei Einzelstränge gespalten. Bei 50°C lagern sich die verwendeten Primer komplementär an die zu sequenzierende DNA an. Bei 60°C kann nun die thermostabile Taq-Polymerase die Primer solange verlängern, bis der Abbruch durch Anlagerung eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs erfolgt.

Nach dieser Amplifikation wurden die Ansätze in neue Reaktionsgefäße überführt. Zur Reinigung der Amplifikate wurden 80 µl 0,3 M Natriumacetatlösung und 300 µl Ethanol (96%) hinzugegeben.

Es erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Ansätze bei 13.000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets luftgetrocknet. Die Sequenzierung erfolgte im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Fluoreszenzspektroskopie mit dem ABI Sequenator 377.

### 3.2.7. Zellkultur

#### Kultivierung der Zelllinien

**293-Zellen** leiten sich von humanen embryonalen Nieren-Karzinomzellen ab. Sie sind mit 11% des Ad5-Genoms stabil transfiziert. Da dieses Teilstück die für die Virusreplikation wichtige E1a-Region enthält, ist diese Zelllinie für die Vermehrung von rekombinanten replikationsdefizienten Erstgenerationsadenoviren geeignet.

Das Kulturmedium für diese Zellen enthält folgende Komponenten:

HGDMEM,  
10% FBS,  
1% L-Glutamin 200 mM,  
1% Penicillin/Streptomycin.

**HT-29-Zellen** entstammen einem humanen kolorektalen Karzinom. Sie wurden für später beschriebene Analysen der Expression des therapeutischen Gens verwendet.

Das geeignete Zellkulturmedium ist:

McCoy's 5A Medium,  
10% FBS (alternativ tetracyclinfrei),  
1% L-Glutamin 200 mM,  
1% Penicillin/Streptomycin.

**MCA-26-Zellen** sind Kolonkarzinomzellen aus dem Balb/c-Mausstamm.

Sie sind gering differenziert und zeigen eine niedrige Immunogenität.

Das Medium für diese Zellen setzt sich wie folgt zusammen:

Gemisch aus HGDMEM und HAM F12 zu gleichen Teilen,

10% FBS (alternativ tetracyclinfrei),

1% L-Glutamin 200 mM,

1% Penicillin/Streptomycin,

1% Hepes 1M.

#### Allgemeine Arbeitsmethoden mit eukaryonten Zellen

Alle Tätigkeiten, die der Kultivierung und Bearbeitung der Zellen dienen, wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Vermehrung fand in 144 mm-Gewebekulturschalen in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit (rLF) statt.

Zum *Splitten* der oben genannten adhärent wachsenden Zelllinien wurden die Zellen mit 5 ml PBS w/o Ca Mg gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA für 3 Minuten (293-Zellen, MCA-26-Zellen) bzw. 5-10 Minuten (HT-29-Zellen) bei Raumtemperatur. Die Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml-Falcontube mit der dreifachen Menge Kompletmedium überführt, um das Trypsin durch das Serum im Kompletmedium zu inhibieren. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und 1300 rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 5 ml Kompletmedium resuspendiert und dann in neue, mit 20 ml Kompletmedium beschickte, 144 mm-Schalen verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit (rLF) kultiviert. Wenn in einem Verhältnis von 1:5 gesplittet wurde, konnten die Zellen nach 3-4 Tagen weiterverwendet werden, da der Zellrasen nach dieser Zeit eine Dichte von 80-90% erreicht hatte.

Für die *Kryokonservierung* der Zellen, wurden die Zellen einer 144 mm-Kulturschale nach dem Waschen mit PBS, Lösen mit Trypsin und einer Zentrifugation in 4 ml gekühltem Einfriermedium (Kompletmedium mit 5% DMSO) resuspendiert. Die Suspension wurde auf vorgekühlte Kryotubes verteilt, so dass 1 ml-Aliquots entstanden. Um die Abkühlung schonend durchzuführen, wurden die Tubes in einen -20°C kalten Isopropanol-tank überführt und in einer -80°C-Truhe um 1°C pro Minute abgekühlt. Anschließend wurden sie bei -80°C gelagert.

Eingefrorene Zellen konnten nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wieder in Kultur gebracht werden. Hierzu wurde der Inhalt eines Tubes auf eine mit 20 ml Komplettmedium beschickte 144 mm-Schale überführt. Die Schale wurde anschließend in den Inkubator gestellt. Nach Zelladhärenz wurde das für die Zellen toxische DMSO-haltige Medium durch 20 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Zur *Zellzahlbestimmung* wurden 90 µl einer gründlich gemischten Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine Zählkammer mit dieser Mischung beschickt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Jede Zählkammer ist in vier Großquadrate unterteilt, welche jeweils 16 Kleinquadrate enthalten. Es wurden insgesamt 16 Kleinquadrate ausgezählt, wobei nur die nicht gefärbten vitalen Zellen in die Zählung eingingen. Die erhaltene Zellzahl wurde durch 0,9 geteilt und dann mit dem Faktor 10.000 multipliziert. So erhielt man die Zellzahl/ml der eingesetzten Zellsuspension.

### **3.2.8. Synthese rekombinanter Adenoviren**

Zur Herstellung von E1-/E3-deletierten Adenoviren mit Fremd-Gen-Insertion wurde in der vorliegenden Arbeit das Prinzip der Kotransfektion nach Bett und Mitarbeitern (1994) angewandt. Das Plasmid pBHG10, das alle essenziellen adenoviralen Gene außer die Verpackungssequenz enthält, wird nach einer Calciumphosphatpräzipitation in 293-Zellen eingeschleust (Graham und van der Eb, 1973). Für die Entstehung infektiöser Partikel muss dieses Plasmid mit einem zweiten Plasmid, das an Stelle der E1-Region heterologe DNA enthält, kopräzipitiert werden. Diese heterologe DNA ist von den adenoviralen Sequenzen umgeben, welche normalerweise die E1-Region flankieren. Durch Rekombination homologer Bereiche beider Plasmide kommt es zur Entstehung eines infektiösen E1-/E3-deletierten, replikationsdefizienten Adenovirus, welcher in seinem Genom therapeutische DNA trägt.

In dieser Arbeit wurde Ad.3r.mIL-18 generiert. Die anderen verwendeten Adenoviren wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

#### Kotransfektion von 293-Zellen

Für die Aufnahme der verwendeten Plasmide in 293-Zellen wurde eine Calciumphosphatpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 1,5 ml HEPES Buffered Saline-Lösung (5 g HEPES, 8 g NaCl, 0,37 g KCl, 0,125 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 1 g Glucose ad 1 Liter Aqua dest. (pH 7,1), autoklaviert) in 20 Polystyrentubes pipettiert. Nach Zugabe von je 20 µg der Plasmide (pAd.3r.mIL-18 und pBHG10) wurden unter ständigem Mischen

tropfenweise 75 µl einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzu pipettiert. Zur Kontrolle wurde ein vergleichbarer Ansatz mit dem einzelnen Plasmid pRC.CMV.β-Gal hergestellt.

Während einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich Präzipitate aus Plasmiden und Ca<sup>2+</sup>-Ionen, welche als feiner Niederschlag erkennbar wurden. Anschließend wurden diese Lösungen in das Medium jeweils einer 90-95%-konfluenten 293-Zellkultur in 96 mm-Kulturschalen übertragen und durch Schwenken vermischt. Die Kulturen wurden für 4,5 Stunden bei 37°C, 100% rLF und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Overlay

Die zuvor entstandenen Präzipitate dienten der Initiierung der endozytotischen Aufnahme der Plasmide.

Um das Ausbreiten entstehender Virusklone auf der gesamten Kulturschale und damit das Vermischen verschiedener Klone zu verhindern, wurden die Kulturen nach der Inkubation mit 20 ml eines 37°C warmen Agaroseoverlays (250 ml 2xMEM, 2% Penicillin/Streptomycin, 2% L-Glutamin 200 mM, 2% Hefeextrakt (5%), 1% HEPES Pufferlösung 1M, 10% hitzeinaktiviertes Horse Serum + 250 ml autoklavierte Sea Plaque-Agaroselösung 1% (w/v)) überschichtet. Hierfür wurde zuvor das Kulturmedium gründlich abgesaugt, um dann den Agaroseoverlay vorsichtig in die Kanten der schräggehaltenen Schalen zu pipettieren, um zu verhindern, dass die Zellen durch entstehende Scherkräfte von der Schale abgelöst werden. Nach dem Erstarren der Agarose wurde weiter inkubiert. Alle 5 Tage wurden die Kulturen mit weiteren 8 ml Agaroseoverlay beschichtet. Diesmal wurde der Overlay auf die Mitte der Schalen pipettiert, um zu verhindern, dass die flüssige Agarose den ersten Overlay ablöst.

Bei der β-Gal-Kontrolle wurde statt des Agaroseoverlays das Medium durch 10 ml frisches 293-Medium ersetzt.

### β-Galaktosidase-Färbung

Die β-Gal-Kontrolle wurde nach 24 Stunden einer Färbung unterzogen.

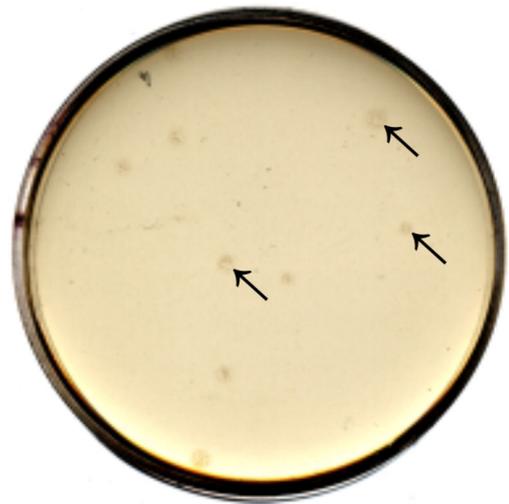
Die Kulturen wurden hierfür zweimal mit je 5 ml kaltem PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde die Kultur mit 5 ml eiskalter Glutaraldehydlösung 0,5% für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Hiernach wurden 4 ml einer Färbelösung (1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM NaCl, 3 mM Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat, 3 mM Kaliumhexacyanoferrat(III), 2,5% X-Gal-Lösung (20 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galacto-Pyranosid in 1 ml N,N-Dimethylformamid), 44 mM HEPES pH 7,3) auf die Kultur gegeben und diese für 24 Stunden in den Inkubator gestellt.

Aufgrund einer Spaltung der glykosidischen Bindung in X-Gal durch die  $\beta$ -Galactosidase kam es zu einer Blaufärbung in den durch pRC.CMV- $\beta$ -Gal transfizierten Zellen.

So konnte die Transfektionseffizienz anhand der Anzahl der blaugefärbten Zellen unter dem Mikroskop eingeschätzt werden.

#### Abnahme und Aufbereitung entstandener Plaques

Nach 12-20 Tagen sind durch Rekombinationsvorgänge E1- und E3-deletierte Adenoviren entstanden, was durch lokal begrenzte zytopathische Effekte erkennbar wurde. Die Viren konnten aufgrund der erstarrten Agarose nur angrenzende Nachbarzellen infizieren, was zu weißlichen Arealen, den Plaques, führte. Diese wurden mit Hilfe von an der Spitze abgeschnittenen 1000  $\mu$ l-Pipettenspitzen aus der Agarose gestanzt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit je 1 ml 293-Kulturmedium überführt. Als Negativkontrolle wurde plaquelose Agarose entnommen. Die Proben wurden dreimal in einem Trockeneis-Ethanolbad im Wechsel mit einem 37°C-Wasserbad schockgefroren und wieder aufgetaut, um die Viren aus den Zellen und der Agarose freizusetzen. Anschließend wurden die Proben 2 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert.



**Abbildung 9: Virusplaques nach einer Kopräzipitation**

#### CPE-Assay

Um herauszufinden, ob die ausgestanzten Plaques Viren enthielten, wurde ein CPE-Assay durchgeführt. 500  $\mu$ l der Überstände wurden in je ein Well einer 24-Well-Platte, welche  $2 \times 10^5$  293-Zellen/Well enthielten, pipettiert. Zuvor wurde das Kulturmedium aus den Wells gesaugt. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF. Nach der Inkubation wurden pro Well 500  $\mu$ l frisches 293-Kulturmedium hinzugegeben, und es erfolgte eine weitere Inkubation für 48 Stunden unter gleichen Bedingungen.

Nach dieser Zeit konnte bei Virusreplikation ein zytopathischer Effekt, also ein Vorhandensein apoptotischer Zellen, detektiert werden. Die Überstände der Wells mit einem zytopathischen Effekt wurden für weitere Versuche bzw. bis zu einer Vermehrung der Viren bei -80°C eingefroren.

### 3.2.9. Identifizierung generierter Viren

Für die Identifizierung generierter Viren (in dieser Arbeit Ad.3r.mIL-18) wurden die Überstände vom zuvor durchgeführten CPE-Assay mit Hilfe eines entsprechenden ELISAs qualitativ auf eine Transgenexpression hin untersucht. Die Durchführung des mIL-18-ELISAs geschah nach Angaben der Firma Medical & Biological Laboratories (MBL) (Beschreibung siehe 3.2.15.). Nur die Proben mit einem positiven Zytokinnachweis wurden für weitere Versuche verwendet.

### 3.2.10. Vermehrung und Reinigung von Adenoviren

#### Vermehrung von Adenoviren

Die Vermehrung von Adenoviren erfolgte in 144 mm-Zellkulturschalen mit Hilfe von 80% bis 90% konfluenten 293-Kulturen. Eine Schale wurde entweder mit 750 µl Überstand des CPE-Assays oder mit 20 µl einer bereits aufgereinigt vorliegenden Viruslösung infiziert. In dieser Arbeit wurden schrittweise, nach Infektion einer Schale, sieben und zuletzt 50 144 mm-Schalen mit der Ernte der vorhergehenden Schale/n infiziert. Es wurde doxycyclinhaltiges Medium benutzt (1 µg/ml), um die Zellen nicht zusätzlich durch die synthetisierten Zytokine zu belasten.

Nach jeder Virusinfektion wurden die Zellen 48 Stunden inkubiert, so dass sie anschließend größtenteils lytisch waren. Für die Ernte der ersten Schale wurden die Zellen in ein 50 ml-Falcontube überführt und bei 4°C und 2500 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 3 ml in ein neues Falcontube übertragen. Das Pellet wurde in den verbliebenen 3 ml Überstand resuspendiert und anschließend dreimal in einem Trockeneis-Ethanolbad im Wechsel mit einem 37°C-Wasserbad schockgefroren und aufgetaut. Hierdurch wurde eine Freisetzung der in den Zellen verbliebenen Viren erreicht. Nach einer Zentrifugation dieser Suspension bei 4°C und 2500 rpm für 10 Minuten, wurde der entstandene Überstand mit dem zuvor abgenommenen Überstand vereinigt, das Falcontube zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie umwickelt und bei -80°C eingefroren.

Weitere sieben 144 mm-Zellkulturschalen mit 80% bis 90% konfluenten 293-Zellen wurden mit dem Überstand der ersten Schale infiziert. Nach der Inkubation wurde für die Virusernte und das Einfrieren genauso vorgegangen wie bei der ersten infizierten Schale. Zum Schluss wurden 50 Schalen entsprechend infiziert.

Nach 48 Stunden wurde das Medium mit den lytischen 293-Zellen von den 50 144 mm-Schalen in vier 50 ml-Falcontubes übertragen und bei 5°C und 2000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Falcontubes mit den Zellpellets

erneut beschickt, bis die Zellen aller 50 Schalen geerntet waren. Die Überstände von zwei Falcontubes wurden für weitere Virusvermehrungen, mit Aluminiumfolie umwickelt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die in den vier Falcontubes enthaltenen Zellpellets wurden in je 2 ml PBS w/o Ca und Mg resuspendiert und in zwei Falcontubes vereinigt. Diese wurden einem dreifachen Trockeneis-Ethanol- bzw.  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad-Zyklus unterworfen, um die Zellen aufzuschließen. Jedes Tube wurde auf 18 ml mit PBS aufgefüllt und bei  $10^{\circ}\text{C}$  und 2500 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein Falcontube übertragen und noch einmal wie zuvor zentrifugiert.

Der so entstandene Überstand konnte jetzt einer Reinigung der enthaltenen Adenoviren unterzogen werden.

#### Reinigung von Adenoviren

Um die Viren von Verunreinigungen wie inkompletten Viren oder Bestandteilen von 293-Zellen zu befreien, wurden zwei Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugationen durchgeführt.

Die erste Zentrifugation führte zu einer groben Reinigung der intakten, DNA enthaltenden Viruspartikel. Eine weitere Reinigung erfolgte bei der zweiten Zentrifugation. Mit der anschließend erfolgenden Dialyse wurde das zytotoxische Cäsiumchlorid (CsCl) entfernt.

Für die Ultrazentrifugationen mussten drei Cäsiumchloridlösungen unterschiedlicher Dichte angesetzt werden.

*Lösung A* enthielt 30 g CsCl, welches mit PBS gelöst und auf ein endgültiges Volumen von 42,5 ml aufgefüllt wurde. Anschließend erfolgte eine Einstellung mit PBS auf eine Dichte von 1,5 g/ml. Das für die Einstellung benötigte Volumen wurde nach folgender Formel berechnet (Die maximale Toleranz betrug  $\pm 0,005$  g/ml):

$$\frac{\text{Ist-Volumen} \times (\text{vorhandene Dichte} - \text{Zieldichte})}{\text{Zieldichte} - \text{PBS-Dichte}} = \text{PBS-Volumen}$$

*Lösung B* enthielt 35 ml steril filtrierter *Lösung A* und 14 ml PBS. Eine anschließende Dichteeinstellung erfolgte mit PBS auf 1,35 g/ml.

*Lösung C* bestand aus 11 ml *Lösung A* und 9 ml PBS. Hier fand eine Einstellung mit PBS auf eine Dichte von 1,25 g/ml statt.

Für die erste Zentrifugation benötigte man einen Stufengradienten.

Sechs Beckmann-Zentrifugenröhrchen wurden mit den drei CsCl-Lösungen befüllt. Jeweils 0,5 ml der *Lösung A* wurden mit 3 ml der *Lösung B* und 3 ml der *Lösung C*

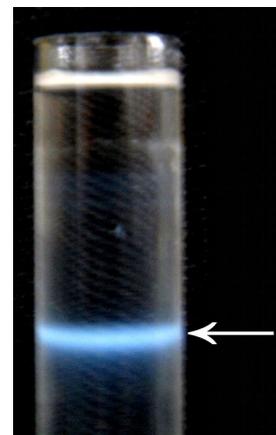
überschichtet. Wichtig war ein langsames und vorsichtiges Pipettieren, um die unterschiedlichen Lösungen nicht zu vermischen. Nur so war eine saubere Reinigung der Adenoviren möglich.

Auf Lösung C wurden, ebenfalls vorsichtig, jeweils 6 ml der vorher gewonnenen Viruslösung pipettiert. Die Röhren wurden anschließend mit PBS bis ca. 3 mm unter die Oberkante aufgefüllt und gegeneinander austariert. Der maximal tolerierbare Gewichtsunterschied betrug +/- 0,5 g.

Jetzt wurden alle sechs Röhren in die Zentrifugen-Buckets eingesetzt und diese in den Rotor der Ultrazentrifuge eingehängt.

Es wurde bei 10°C und 34.000 rpm 1 Stunde im Vakuum zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation konnte man die Viren als milchig-blaue Bande zwischen der 1,25 g/ml- und 1,35 g/ml-Lösung sehen. Über dieser Bande lag eine schmalere weiße Bande, welche die leeren Viruskapside enthielt. Zur Gewinnung der Viren wurde mit einer Spritze und einer 20 G-Kanüle ca. 5 mm unterhalb der Bande in das Röhren eingestochen und die Viren vorsichtig in die Spritze gesogen, ohne Material aus der darüberliegenden Bande einzusaugen. Dann wurden die Viren in ein Falcontube überführt. Zum Schluss enthielt das Falcontube die Viren aller sechs Zentrifugenröhren, welche nun für die zweite Zentrifugation vorbereitet wurden.



**Abbildung 10: Virusbande nach der ersten Ultrazentrifugation**  
Das Beispiel zeigt eine bläuliche Bande (siehe Pfeil) zwischen der 1,25 g/ml- und der 1,35 g/ml-CsCl-Schicht.

Um die zweite Zentrifugation durchführen zu können, wurde die zuvor abgenommene Viruslösung mit der CsCl-Lösung B auf 24 ml aufgefüllt, auf zwei Beckmann-Zentrifugenröhren verteilt und mit Lösung B austariert. Weitere vier Röhren wurden mit PBS gefüllt und ebenfalls gegeneinander austariert. Nun folgte eine Zentrifugation für 24 Stunden bei 10°C und 34.000 rpm, während der sich ein kontinuierlicher Gradient in den Röhren ausbildete.

Nach der Zentrifugation sah man wieder Virusbanden, welche nach oben beschriebenem Prinzip abgenommen wurden. Um eine Präzipitation der Viruskapside während einer anschließenden Dialyse zu vermeiden, wurden die abgenommenen Viren mit vorher autoklaviertem Dialysepuffer verdünnt, so dass ein Gesamtvolumen von 5-6 ml vorlag. Der Dialysepuffer bestand aus 10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 10% Glycerin in Aqua dest.

Nun wurde ein Dialyserahmen mit Dialysepuffer gut benetzt und anschließend mit der Viruslösung befüllt.

Ein autoklaviertes Becherglas wurde mit 1,3 l des sterilen Dialysepuffers und mit dem Dialyserahmen befüllt. Es folgte eine 24-stündige Dialyse der Viruslösung im Becherglas auf einem Magnetrührer bei 4°C und Dunkelheit. Der Dialysepuffer wurde dabei alle 8 Stunden gewechselt.

Nach 24 Stunden wurde die Lösung in ein Falcontube überführt. Die Lösung wurde auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt, so dass Aliquots mit 25, 50, 100, 150 und 200 µl entstanden.

Die befüllten Reaktionsgefäße wurden bei -80°C gelagert.

### **3.2.11. Titerung von Adenoviren mittels Plaque-Assay**

Um die Konzentration der aufgereinigt vorliegenden infektiösen Viren zu bestimmen, wurde ein Plaque-Assay durchgeführt.

#### Vorbereitung

Einen Tag vor Beginn des Assays wurden zwei 293-Kulturen von 90% konfluenten 144 mm-Zellkulturschalen auf 20 60 mm-Schalen gesplittet. Es wurde doxycyclinhaltiges Medium verwendet, damit die später durch die Zellen synthetisierten, viral kodierten Zytokine keine toxischen Konzentrationen erreichten.

Zusätzlich wurde ein 37°C warmer Agaroseoverlay (85 ml 2xMEM, 2% Penicillin/Streptomycin, 2% L-Glutamin 200 mM, 2% Hefeextrakt (5%), 1% HEPES-Pufferlösung 1 M, 10% hitzeinaktiviertes Horse-Serum + 85 ml autoklavierte Sea Plaque-Agaroselösung 1% (w/v)) vorbereitet, welchem kurz vor Gebrauch 8,5 µl Doxycyclin (1µg/ml) hinzugegeben wurde.

#### Durchführung

In 13 Polystyrentubes wurde mit den gereinigten Viren und FBS-freiem 293-Kulturmedium eine serielle Verdünnungsreihe in 12 logarithmischen Schritten erstellt. Eines der Tubes blieb als Negativkontrolle virusfrei.

Jetzt wurden die Zellen der 60 mm-Schalen nacheinander mit PBS (37°C) gewaschen und anschließend mit einer Viruslösung infiziert, wobei immer drei Schalen jeweils 500 µl der gleichen Virusverdünnung erhielten. Es wurden nur die Verdünnungen von 1:10<sup>7</sup> bis 1:10<sup>12</sup> verwendet. Zwei Schalen wurden mit 500 µl der Negativkontrolle beschickt. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert, wobei durch vorsichtiges Schwenken der Schalen alle 15 Minuten eine Umschichtung der Viruslösung bewirkt wurde.

Nach 1 Stunde wurde das virushaltige Medium durch je 8 ml des Agaroseoverlays (85 ml 1%ige Agaroselösung + 85 ml 2xMEM mit Zusätzen + 8,5 µl Doxycyclin) ersetzt. Die Lösung wurde vorsichtig in die Schalen pipettiert (siehe 3.2.8.). Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF. Nach 7 Tagen wurden zur Versorgung der Zellen jeder Schale erneut 5 ml Agaroselösung hinzugefügt.

Ab dem 10. Tag nach der Infektion der 293-Zellen durch die Viren zeigten sich die ersten Plaques. Diese wurden bis einschließlich zum 14. Tag gezählt.

Zur Berechnung des Virustiters fanden nur die Schalen mit 30 bis 300 Plaques Berücksichtigung. Der Mittelwert der Plaqueanzahl wurde ermittelt und der Titer dann mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Durchschnitt der Plaques pro Schale} \times \text{Verdünnung}}{0,5 \text{ (= Menge der Viruslösung pro Schale)}} = \frac{\text{plaque forming units (p.f.u.)}}{\text{ml}}$$

Bei der viralen Infektion einer Zellkultur stellt die „multiplicity of infection (m.o.i.)“ einen Multiplikator dar, der angibt, wieviele infektiöse Partikel pro Zelle verwendet werden.

### 3.2.12. Infektion von MCA-26-Zellen und Ermittlung der Genexpression

Hierzu erfolgte eine Infektion von MCA-26-Zellen mit verschiedenen m.o.i. des entsprechenden Virus. Es wurde je nach Bedarf doxycyclinhaltiges Medium verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Überstände entnommen und mit einem ELISA charakterisiert.

Zur Vorbereitung wurden die MCA-26-Zellen über mehrere Passagen in tetracyclinfreiem MCA-26-Medium kultiviert. Die Zellen von drei 144 mm-Schalen wurden nach einer Zellzahlbestimmung auf sieben 6-Well-Platten verteilt, wobei jedes Well 1x10<sup>6</sup> Zellen in 3 ml Medium erhielt. Die Hälfte der Wells jeder Platte enthielt doxycyclinhaltiges Medium (2 µg/ml). Die Kulturen wurden 6 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF inkubiert, so dass die Zellen adhärent werden konnten.

Kurz vor Ende der Inkubation wurden die Virusverdünnungen vorbereitet. Die jeweiligen Virusstocklösungen wurden so mit FBS-freiem MCA-26-Medium verdünnt, dass Ansätze mit einer Verdünnung von 2x10<sup>7</sup> p.f.u./ml, 6x10<sup>7</sup> p.f.u./ml, 2x10<sup>8</sup> p.f.u./ml, 6x10<sup>8</sup> p.f.u./ml und 2x10<sup>9</sup> p.f.u./ml (Ad.3r.msclL-12) bzw. nur 2x10<sup>9</sup> p.f.u./ml (Ad.3r.mIL-18) vorlagen. Diese Ansätze dienten einer entsprechenden Infektion mit 10, 30, 100, 300 bzw. 1000 m.o.i. Als Negativkontrolle (0 m.o.i.) diente FBS-freies Medium.

Nach der Inkubation wurde das Medium der Wells durch je 500 µl der entsprechenden Virusverdünnung bzw. der Negativkontrolle ersetzt. Die Platten wurden für 1 Stunde bei

37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF inkubiert und währenddessen alle 15 Minuten zum Verteilen der Viren geschwenkt.

Nach dieser Stunde wurden die Viruslösungen bzw. die Negativkontrolle durch je 3 ml des entsprechenden Zellkulturmediums ersetzt. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF.

Nach der Inkubation wurden die Überstände möglichst zellfrei in 96-Well-Platten übertragen und diese Proben für eine spätere ELISA-Messung (siehe 3.2.15.) bei -80°C gelagert.

### **3.2.13. Gewinnung von Zytokinen von adenoviral infizierten HT-29-Zellen**

Für die Gewinnung von Zytokinen wurden gut zu transfizierende HT-29-Zellen mit Adenoviren (Ad.3r.mscIL-12 bzw. Ad.3r.mIL-18) infiziert. Hierzu wurden zwei 144 mm-Zellkulturschalen, welche HT-29-Zellen enthielten, auf zwei 96 mm-Schalen gesplittet. Jede 96 mm-Schale erhielt  $7 \times 10^6$  Zellen, welche in tetracyclinfreiem HT-29-Medium kultiviert wurden. Es folgte eine sechsstündige Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF. Kurz vor Ende der Inkubation wurden die Viren mit FBS-freiem HT-29-Medium so verdünnt, dass Ansätze mit einer Konzentration von  $1,2 \times 10^9$  p.f.u./ml entstanden. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium der beiden Schalen durch 3,5 ml der entsprechenden Virusverdünnung ersetzt, so dass sich eine m.o.i. von 600 ergab. Während der nachfolgenden einstündigen Inkubation wurden die beiden Platten alle 15 Minuten zur Virusverteilung geschwenkt. Anschließend wurden die Viruslösungen durch tetracyclinfreies HT-29-Medium ersetzt.

Die Hälfte der Überstände wurde nach einer Inkubation von 24 Stunden und die andere Hälfte nach 45 Stunden in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert. Nun konnten die Zytokinkonzentrationen mittels ELISA (siehe 3.2.15.) bestimmt werden. Die Überstände mit den höchsten Zytokinkonzentrationen fanden dann als Ausgangslösung im Bioassay (siehe 3.2.14.) Verwendung. Die statistische Auswertung der Signifikanz erfolgte, wie auch bei den folgenden Experimenten, mit einem ungepaarten Student-t-Test. Hierfür wurde die Software GraphPad InStat der Firma GraphPad verwendet.

### **3.2.14. Bioassay**

Die Fähigkeit von Interleukin-12 und Interleukin-18, T-Lymphozyten und N-Killerzellen zur Interferon  $\gamma$ -Produktion (IFN- $\gamma$ ) anzuregen, wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Bioaktivität von Kombinationen beider Zytokine genutzt. Das Verfahren wurde vom Protokoll der Firma R&D Systems „Mouse and Rat IL-18 Assay on mouse splenic T cells“ übernommen. Der im Protokoll beschriebene Stimulationsschritt mit IL-12 wurde weggelassen.

Vorbereitung

*Beschichtung einer Kulturflasche mit Antikörpern:* Hierfür wurden 500 µg Anti-mouse-CD3-Antikörper nach Angaben des Herstellers mit PBS so verdünnt, dass eine 5 ml-Lösung mit der Konzentration von 10 µg/ml entstand. Eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde mit dieser Antikörperlösung so beschickt, dass der ganze Flaschenboden benetzt war. Die Antikörperlösung diente einer Voraktivierung von T-Lymphozyten.

Nun folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.

*Gewinnung von Lymphozyten:* Zur Lymphozytengewinnung wurde einer 6-12 Wochen alten weiblichen, unbehandelten Balb/c-Maus, die durch zervikale Dislokation terminiert wurde, die Milz entnommen. Die Milz wurde zweimal mit PBS gewaschen, in eine sterile Nytextasche gelegt und anschließend in einer mit 10 ml Lymphozytenmedium (RPMI 1640 mit 10% FBS, 1% L-Glutamin 200 mM, 1% Penicillin/Streptomycin und 50 µM 2-Mercaptoethanol) befüllten 96 mm-Kulturschale mit einer spitzen Pinzette durch die Netztasche hindurch beidseitig mehrfach perforiert und gegen das Netz ausgestrichen, bis nur noch die glasige Kapsel im Netz lag. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcontube überführt, welches mit Lymphozytenmedium auf 15 ml aufgefüllt wurde.

*Erythrozytenlyse:* Für die Lyse der in der Milzzellsuspension ebenfalls enthaltenen Erythrozyten wurden 10 ml eines Lysepuffers (Gey's Lysepuffer) angesetzt, welcher steril filtriert wurde. Dieser setzte sich aus folgenden Teilen zusammen:

2 ml Lösung A:    17,5 g    NH<sub>4</sub>Cl  
                           0,925 g    KCL  
                           0,75 g    Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O  
                           0,595 g    KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                           2,5 g    Glucose  
                           0,025 g    Phenol Rot (Histo)  
 ad 500ml    Aqua dest.

0,5 ml Lösung B:    0,42 g    MgCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O  
                           0,14 g    MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O  
                           0,34 g    CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O  
 ad 100 ml    Aqua dest.

0,5 ml Lösung C:    2,25 g    NaHCO<sub>3</sub>  
 ad 100 ml    Aqua dest.

7 ml Aqua dest.

Nach einer zehnmütigen Zentrifugation der Milzzellsuspension bei 1000 rpm, wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, mit 10 ml 1x Gey's Lösung aufgefüllt und anschließend bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm für 6 Minuten. Das Pellet wurde wieder mit PBS resuspendiert, mit weiteren 10 ml PBS verdünnt und nach einer erneuten Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm für 6 Minuten in 0,2 ml Lymphozytenmedium resuspendiert und mit weiteren 14,8 ml Medium verdünnt.

*Kultivierung der Lymphozyten:* Nach einer Zellzahlbestimmung bei der Ausgangslösung wurde eine 20 ml-Zellsuspension mit  $0,8 \times 10^6$  Zellen/ml in Lymphozytenmedium angesetzt. Nun wurde die Lösung aus der mit CD3-Antikörpern beschichteten Kulturflasche abgenommen und die Flasche zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen.

Anschließend wurde die Kulturflasche mit der zuvor angesetzten Zellsuspension und mit 500 µl in PBS verdünnten anti-human CD28-Antikörpern (200 µg/ml) befüllt, so dass sich eine Antikörperkonzentration von 5 µg/ml ergab. Die Zelllösung wurde 3 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF inkubiert.

#### Bioassay-Durchführung

Nachdem die Zytokinkonzentrationen (mIL-12 bzw. mIL-18) der Überstände von adenoviral infizierten HT-29-Zellen (siehe 3.2.13.) im ELISA (siehe 3.2.15.) gemessen wurden, wurden diese mit HT-29-Zellmedium auf eine Konzentration von 25 ng/ml eingestellt..

Hiermit wurde in halblogarithmischen Schritten eine Reihe mit folgenden Verhältnissen zwischen Interleukin-12 und Interleukin-18 erstellt: 0:1; 1:1000; 1:333; 1:100; 1:33; 1:10; 1:3,3; 1:1; 3,3:1; 10:1; 33:1; 100:1; 333:1; 1000:1; 1:0.

Die 3 Tage inkubierte Lymphozytenkultur wurde in ein 50 ml Falcontube überführt und 6 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,2 ml PBS resuspendiert, mit weiteren 5 ml PBS verdünnt und erneut wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 1,5 ml Lymphozytenmedium resuspendiert und nach einer Zellzahlbestimmung auf eine Konzentration von  $0,8 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Jedes benötigte Well einer 96-Well-Platte wurde mit 50 µl Lymphozytenmedium, 25 µl der verdünnten Proben (mIL-12+mIL-18+Medium) und 50 µl der vorbereiteten Lymphozytenlösung beschickt, so dass jedes Well 40.000 Lymphozyten enthielt. Eine Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% rLF.

Nach der Inkubation wurden in eine 96-Well-Platte 50 µl PBS pro Well gefüllt. 50 µl der Proben wurden vorsichtig und zellfrei in die mit PBS befüllte Platte überführt. Die Lösun-

gen wurden gut vermischt und je 30 µl in zwei weitere 96-Well-Platten pipettiert. Die so gewonnenen Proben wurden dann bei -80°C eingefroren.

Um den Interferon- $\gamma$ -Gehalt der Proben bestimmen zu können, wurde ein entsprechender ELISA (siehe 3.2.15.) durchgeführt.

### **3.2.15. Nachweis und Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA**

In dieser Arbeit wurden zum Nachweis (siehe 3.2.9.) und zur Konzentrationsbestimmung (siehe 3.2.12., 3.2.13. und 3.2.14.) von mL-18, mL-12 und von Interferon- $\gamma$  die entsprechenden OptEIA<sup>TM</sup>-Kits der Firmen Pharmingen (Mouse IL-12, p70) und BD Biosciences (Mouse IFN- $\gamma$ ) und das mouse IL-18 ELISA Kit der Firma MBL verwendet.

Das Prinzip beruht auf der Sandwich-Methode. Hierbei werden spezifische monoklonale Antikörper (Capture Antibody) an eine feste Phase (z.B. 96-Well-Platte) gebunden. Die zu untersuchenden Proben mit den entsprechenden Antigenen werden hinzugegeben und von den Antikörpern gebunden. Schließlich kommen enzymmarkierte spezifische zweite monoklonale Antikörper (Working Detector bzw. Conjugate Solution) und Substrat hinzu. Die markierten Antikörper binden sich ebenfalls an die gefragten Antigene. Das an die sekundären Antikörper gebundene Enzym (Peroxidase) ist in der Lage, das zugefügte Substrat zu spalten, wobei blaufärbte Produkte entstehen. Diese Reaktion wird anschließend durch Zugabe einer Säure (Stop Solution) beendet, was zu einem Farbumschlag ins Gelbe führt. Die Intensität der Gelbfärbung kann in einem ELISA-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Durch parallel gemessene Standardreihen kann eine Eichkurve ermittelt werden. Mit ihr können die Probenkonzentrationen ausgerechnet werden.

Für die Durchführung des IL-12- und IFN- $\gamma$ -ELISAs wurden alle benötigten Wells einer 96-Well-Platte mit 100 µl des ersten Antikörpers (Capture Antibody) beschichtet. Dieser wurde vorher nach der lotspezifischen Vorschrift des Herstellers in Coating Buffer (*IL-12*: 11,8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 16,1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1 Liter Aqua dest., pH 6,5; *IFN- $\gamma$* : 8,4 g NaHCO<sub>3</sub>, 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ad 1 Liter Aqua dest., pH 9,5) verdünnt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper konnten sich in dieser Zeit an die Wandungen der Wells anlagern.

Am folgenden Tag wurden die Wells nach Angaben des Herstellers drei- bis fünfmal mit Waschpuffer (0,05% Tween-20 in PBS) gewaschen und anschließend zum Blocken mit je 200 µl Assay-Diluent beschickt und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Anschließend

wurden die Wells erneut drei- bis fünfmal gewaschen und mit je 100 µl der Proben bzw. der Standardreihe beschickt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einem fünfmaligen Waschprozeß und einem Befüllen der Wells mit je 100 µl des Working Detectors (Detection Antibody + Enzyme Reagent) folgte eine erneute einstündige Inkubation.

Nach einem sieben- bis zehnmöglichen Waschvorgang wurden je 100 µl eines 1:1-Gemisches der Substrat-Reagenzien A und B in die verwendeten Wells gegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur.

Die Zugabe von 50 µl Stop Solution (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in die Wells beendete die Enzym-Substrat-Reaktion und die Proben färbten sich gelb. Jetzt folgte die Messung im ELISA-Spektralphotometer.

Für den IL-18-ELISA wurde ein mL-18 Kit verwendet, welcher bereits eine mit Capture-Antibody beschichtete 96-Well-Platte und alle weiteren verwendeten Reagenzien enthielt. Der mL-18-Standard wurde nach Angaben des Herstellers mit Assay-Diluent verdünnt. Alle benötigten Wells der Platte wurden mit je 100 µl der vorbereiteten Proben bzw. des Standards beschickt. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, in der sich das mL-18 an die Antikörper binden konnte.

Nach der Inkubationszeit wurden die Wells viermal mit Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl der Conjugate Solution, welche aus einer 1:101-Verdünnung von Conjugate Concentrate (sekundärer monoklonaler Antikörper + Peroxydase) mit Conjugate Diluent bestand, beschickt. Nach einer erneuten 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, in der sich die in der Conjugate Solution enthaltenen Enzym-markierten Antikörper ebenfalls an das mL-18 banden, erfolgte ein vierfacher Waschvorgang.

Nun wurden 100 µl Substrat Reagent in die Wells gegeben und die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit fand eine Enzym-Substrat-Reaktion statt, bei der sich die Proben blau färbten. Durch Zugabe von je 100 µl Stop Solution/Well wurde diese Reaktion beendet, was zu einem Farbumschlag ins Gelbe führte.

Es folgte eine Messung der Proben im ELISA-Spektralphotometer.

### 3.3. Methoden *in vivo*

#### 3.3.1. Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen und Versuchstierhaltung

Die Durchführung von Versuchen an Mäusen wurde nach einer ausführlichen Antragsstellung mit Versuchsbeschreibung von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lagerstraße 36, 20357 Hamburg, unter der Nummer 32/02 (siehe 9.3.) am 26.04.2002 genehmigt. Leiter des Versuchsvorhabens war Dr. med. A. Block, wissenschaftlicher Mitarbeiter der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Die Mäuse wurden unter S2-Sicherheitsbedingungen in dafür vorgesehenen Räumen im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gehalten.

Zugang zu Futter und Wasser war unbegrenzt und das Verhalten wurde regelmäßig kontrolliert.

#### 3.3.2. Doxycyclinbestimmung im Mäusefutter

Zur Doxycyclinbestimmung in der Tiernahrung wurde *in vitro* der Einfluss des Futters auf die Transgenexpression von HT-29-Zellen, die mit dem Vektor Ad.3r.luc infiziert wurden, gemessen. Dieser Vektor enthält das Reporter-gen für Luciferase, welche in Anwesenheit von ATP, Mg<sup>2+</sup> und O<sub>2</sub> unter Lichtemission (560 nm) die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin und CO<sub>2</sub> katalysiert (Luehrsen und Walbot, 1993). Dieses Gen stammt vom Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (De Wet *et al.*, 1985).

Mit Ad.3r.luc transfizierte Zellen produzieren, abhängig vom Doxycyclingehalt des Mediums, bestimmte Mengen von Luciferase, welche unter Zugabe von Luciferin in einem Luminometer gemessen werden können. Die im Luminometer bestimmten Werte (relative light units, r.l.u.) sind proportional zur Luciferasemenge der Proben. Mit Hilfe einer mit rekombinanter Luciferase ermittelten Standardkurve wurde die Formel  $y = 0,0017x^{1,0022}$  ermittelt, mit der aus den r.l.u.-Werten die Luciferasekonzentration ermittelt wurde.

Für die Durchführung wurden zuerst 10 bis 20 zerkleinerte Futterpellets in zwei Falcon-tubes überführt, welche mit NaCl-Lösung (0,9%) aufgefüllt und dann einer 10-minütigen Zentrifugation bei 5000 rpm unterzogen wurden. Die Überstände wurden durch einen Kaffeefilter gegeben und dann steril filtriert.

In neun Wells von zwei 6-Well-Platten wurden je  $1 \times 10^6$  HT-29-Zellen/Well ausplattiert. Drei Wells erhielten als Negativkontrolle je 3 ml tetracyclinfreies HT-29-Medium. Drei weitere Wells erhielten je 3 ml tetracyclinfreies Medium und je 300 µl der sterilen Futterlösung. Die letzten drei Wells erhielten als Positivkontrolle je 3 ml HT-29-Medium

mit Doxycyclin (2 µg/ml) und je 300 µl Futterlösung. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37°C, 100% rLF und 5% CO<sub>2</sub>.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen. Um die Zellen mit 10 m.o.i. Ad.3r.luc zu infizieren, wurde dieses Virus mit FBS-freiem HT-29-Medium auf  $2 \times 10^7$  p.f.u./ml verdünnt. 500 µl dieser Viruslösung wurden in jedes Well gegeben. Nun folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C, 100% rLF und 5% CO<sub>2</sub>, woraufhin die Lösung in den Wells durch die jeweils zuvor verwendeten Medien ersetzt wurde. Die Kulturen wurden weitere 24 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Kulturüberstände möglichst zellfrei in Reaktionsgefäße übertragen und für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in weitere Reaktionsgefäße übertragen und einer Luciferasemessung unterzogen.

Zur Ermittlung der Luciferaseaktivität am Luminometer wurden die Überstände in Duplikaten aus je 20 µl in Kunststoffröhrchen, ergänzt mit je 100 µl Luciferinlösung, in einem automatisierten Verfahren gemessen. Der Mittelwert der Duplikate wurde automatisch berechnet.

### 3.3.3. Ermittlung der adenoviralen Genexpression im Mausmodell

Zur Charakterisierung der *In-vivo*-Transgenexpression wurden sechs Balb/c-Mäusen gewichtsadaptiert Adenoviren über die Schwanzvene injiziert. Um die benötigte Viruslösung von  $6,67 \times 10^8$  p.f.u./ml zu erhalten, wurde die Virusstocklösung mit Dialysepuffer (siehe 3.2.10.) verdünnt. Für die Schwanzveneninjektion wurden die Mäuse in eine Zwangsröhre überführt und der Schwanz solange in 42-45°C warmes Wasser gehalten, bis die Venen ausreichend dilatiert waren. Dann wurde den Mäusen pro 20 g Körpergewicht  $1 \times 10^8$  p.f.u. der hergestellten Viruslösung in 150 µl injiziert. Drei Mäusen wurde 3 Tage vor der Injektion 2,5% Sucrose und 300 µg/ml Doxycyclin und den anderen drei Mäusen ausschließlich 2,5% Sucrose (Haberman *et al.*, 1998) ins Trinkwasser gegeben. Am 7. Tag nach der Virusinjektion wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> und zusätzlicher zervikaler Dislokation terminiert. Den Mäusen wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Leber entnommen. Die Lebern wurden gewogen und in je ein eisgekühltes Falcontube überführt. Es wurde das dreifache Volumen Cell Culture Lysis Reagent (1:5 verdünnt) bezogen auf das Lebergewicht hinzupipetiert, und die Lebern wurden homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm. Die Überstände wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipetiert. Nun erfolgte eine erneute Zentrifugation, diesmal für 25 Minuten unter sonst gleichen Bedingungen. Aus den entstandenen Überständen wurden im Luminometer die r.l.u. bestimmt und mit Hilfe einer Standardfunktion die Luciferasekonzentrationen in den einzelnen Proben ermittelt (siehe 3.3.2.).

### 3.3.4. Ermittlung der systemischen Wirkung von Ad.3r.msclL-12

Zur Charakterisierung der systemischen Wirkung von Ad.3r.msclL-12 wurden die Viren in die Schwanzvenen von ca. 20 g schweren, für IL-12 sehr sensitiven C57BL/6-Mäusen eingebracht (Mazzolini *et al.*, 2001). Es wurden mehrere Gruppen von je fünf bis sechs Mäusen mit verschiedenen Viruskonzentrationen behandelt. Die Mäuse wurden bezogen auf 20 g KG mit folgenden Mengen Virus infiziert:  $1 \times 10^7$  p.f.u.,  $1 \times 10^8$  p.f.u.,  $3 \times 10^8$  p.f.u.,  $1 \times 10^9$  p.f.u. bzw.  $3 \times 10^9$  p.f.u. Die in Dialysepuffer (siehe 3.2.10.) verdünnten adenoviralen Vektoren wurden in einem Volumen von 150  $\mu$ l pro 20 g KG über die Schwanzvene verabreicht. Um den Einfluss von Doxycyclin auf die Wirkung zu untersuchen, wurde je fünf bis sechs Tieren, welche mit  $1 \times 10^9$  bzw.  $3 \times 10^9$  p.f.u. behandelt werden sollten, 3 Tage vor der Schwanzveneninjektion Doxycyclin (2,5% Sucrose, 300  $\mu$ g/ml Doxycyclin) in das Trinkwasser gegeben. Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Maus. Das Trinkwasser wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die Tiere wurden regelmäßig gewogen und das Überleben der Mäuse wurde beobachtet.

### 3.3.5. Histologische Untersuchung der Organe viral infizierter Mäuse

6 Tage nach intravenöser Virusinjektion wurde C57BL/6-Mäusen die Leber und die Lunge entnommen und mit Formalin (aus dem Institut für Pathologie, UKE) fixiert. Es wurden folgende Mengen von Ad.3r.msclL-12 bzw. Ad.DL312 (ein E1-/E3-deletiertes Adenovirus ohne integrierte Fremd-DNA) bezogen auf 20 g KG in je ein bis zwei Mäuse injiziert:  $3 \times 10^9$  p.f.u.;  $3 \times 10^8$  p.f.u.;  $3 \times 10^7$  p.f.u.;  $3 \times 10^6$  p.f.u. (Ad.3r.msclL-12) bzw.  $3 \times 10^9$  p.f.u. (Ad.DL312). Die in Dialysepuffer verdünnten Viren wurden in einem Volumen von je 150  $\mu$ l über die Schwanzvene in die Mäuse eingebracht. Die Hälfte der Tiere, welche mit Ad.3r.msclL-12 behandelt wurden, bekam 3 Tage vor der Virusinjektion Doxycyclin (300  $\mu$ g/ml) in das Trinkwasser. Zusätzlich wurde eine Maus ohne Virusinjektion mit Doxycyclin im Trinkwasser gehalten. Die Mäuse wurden täglich gewogen und nach 6 Tagen durch zervikale Dislokation terminiert. Den Mäusen wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Organe wurden entnommen und diese in Formalin gefüllte Falcontubes überführt. Die Falcontubes wurden unter Kühlung in das Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Eppendorf transportiert und nach Färbung von Herrn Prof. Dr. med. H. Schäfer histologisch untersucht.

### 3.3.6. Subkutanes Tumormodell in der Maus

Um die antitumorale Effizienz von Ad.3r.msclL-12 zu überprüfen, mussten subkutane Tumoren in immunkompetenten Balb/c-Mäusen generiert werden, welche in einem weiteren Arbeitsschritt (siehe 3.3.7.) mit dem Virus behandelt werden sollten.

Zur Gewinnung der Tumorzellen wurden einige Tage vor der Injektion die für Balb/c-Mäuse syngenen MCA-26-Zellen in Kultur gebracht und ein- bis zweimal passagiert, so dass genügend Zellen für die Zellinjektion zu erwarten waren. Für jede Maus wurden  $1 \times 10^5$  Zellen benötigt. Am Tag der Injektion wurden die Zellen von vier 144 mm-Zellkulturschalen wie zuvor beschrieben gewaschen und mit Trypsin von der Schale gelöst und in MCA-26-Kulturmedium aufgenommen. Danach erfolgte eine achtminütige Zentrifugation bei 4°C und 1300 rpm. Das Zellpellet wurde in 30 ml PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Das entstehende Zellpellet wurde diesmal in FBS-freiem MCA-26-Medium (3-5 ml/Schale) resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen wurden mit FBS-freiem MCA-26-Medium verdünnt, so dass eine Suspension mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml entstand. Die Suspension wurde auf Eis gelagert.

Für die Zellinjektion wurden 25 Mäuse durch intraperitoneale Gabe von 10 µl/g KG Ketazol (4,8 ml Ketanest (25mg/ml) + 0,8 ml Rompun (20 mg/ml) + 6,8 ml NaCl (0,9%)) narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose, wurden die Mäuse auf ihrer linken Flanke rasiert und zur Identifizierung mit einem dafür vorgesehenen Locher aus der UKE-Tierhaltung an den Ohren markiert. Die rasierte Flanke wurde mit 70%iger Ethanollösung desinfiziert. Anschließend wurden 100 µl der Zelllösung ( $1 \times 10^5$  Zellen/100 µl) mit Hilfe von 100 µl-Hamilton-Glasspritzen langsam subkutan injiziert. Die Kanüle wurde nach der Injektion noch einige Sekunden in der Hautfalte belassen, um zu verhindern, dass die Zelllösung wieder austrat. Ca. 20 Minuten nach der Injektion erwachten die Mäuse aus der Narkose.

Ab dem 4. Tag nach der Zellinjektion wurden die sich entwickelnden Tumoren täglich mit einer Schublehre gemessen. Der Tumor wurde in seiner Länge und Breite gemessen. Das Tumolvolumen wurde nach Janik und Mitarbeitern (1975) mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumen}_{\text{Tumor}} = 0,5263 \times \text{Länge} \times \text{Breite}^2$$

Die subkutane Applikation der murinen Kolonkarzinomzellen führte in 7-11 Tagen zu Tumoren, die einen Durchmesser von ca. 5 mm hatten, so dass die intratumorale Virusapplikation vorgenommen werden konnte.

### 3.3.7. Intratumorale Virusapplikation

Bei einem subkutanen Tumolvolumen von ca. 65 mm<sup>3</sup> konnte eine intratumorale Virusinjektion vorgenommen werden. Auch für die Negativkontrollmäuse galt der Zeitpunkt, bei dem die Tumoren 65 mm<sup>3</sup> groß waren, als Versuchsstart.

Die Stocklösungen der Viren (Ad.DL312 und Ad.3r.msclL-12) wurden mit Dialysepuffer so verdünnt, dass Konzentrationen von  $2 \times 10^{10}$  p.f.u./ml vorlagen. Die vorbereiteten Viruslösungen wurden bis zur Injektion auf Eis gelagert.

Für die intratumoralen Injektionen wurden die Mäuse erneut intraperitoneal mit 10 µl/g KG Ketazol narkotisiert (siehe 3.3.6.).

50 µl der Viruslösung ( $1 \times 10^9$  p.f.u./50 µl) wurden mit Hilfe von Hamilton-Spritzen vorsichtig intratumoral injiziert. Den Mäusen, die zusätzlich Doxycyclin erhalten sollten, wurden 200 µl Doxycyclin (ursprüngliche Konzentration von 20 mg/ml wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) intraperitoneal verabreicht. Zusätzlich wurde diesen Mäusen für 25 Tage Doxycyclin (300 µg/ml Doxycyclin, 2,5% Sucrose) ins Trinkwasser gegeben.

Die Mäuse erwachten nach ca. 20 Minuten aus der Narkose.

Täglich wurde die Größe der Tumoren gemessen und zusammen mit gegebenenfalls stattgefundenen Todesfällen protokolliert. Die unterschiedlich behandelten Gruppen wurden miteinander verglichen.

Einer zusätzlichen Maus, welche einen Tumor von ca. 65 mm<sup>3</sup> hatte und mit  $1 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.msclL-12 in 50 µl behandelt wurde, wurde am 6. Tag nach der Virusinjektion nach zervikaler Dislokation der Tumor entnommen und in Formalin fixiert. Für einen Vergleich wurden zwei weitere Mäuse mit Ad.DL312 ( $1 \times 10^9$  p.f.u. /50 µl) bzw. ohne Virus behandelt und die Tumoren entsprechend entnommen und fixiert.

Die Tumoren wurden im Institut für Pathologie von Herrn Prof. med. H. Schäfer histologisch untersucht.

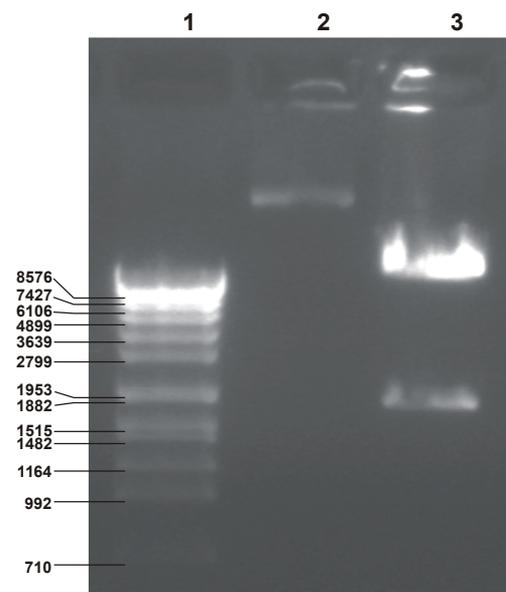
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse *in vitro*

#### 4.1.1. Amplifikation von pAd.3r.mscIL-12

Um ausreichende Mengen von pAd.3r.mscIL-12 für eine Sequenzierung der therapeutischen Expressionskassette zu erhalten, wurde eine 200 ml-Kultur von *E. coli*-Bakterien, die dieses Plasmid trugen, aufgezogen. Die Plasmide wurden mittels einer alkalischen Lyse und einer Säulenreinigung gewonnen (siehe 3.2.3.). Die Konzentration der erhaltenen Plasmidlösung wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.2.4.). Die Messung zeigte eine DNA-Konzentration von 230,3 µg/ml.

Zur Charakterisierung wurde das vorliegende Plasmid einem Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym Xho I unterzogen (siehe 3.2.5.). Die entsprechenden Schnittstellen flankieren das mscIL-12-Gen. Die entstandenen Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 11 zeigt das erhaltene Gelfoto. Spur 1 enthält den DNA-Standard MWM VII (die Fragmentgrößen sind in Basenpaaren am Rand angegeben). Spur 2 enthält das unverdaute zirkuläre Plasmid. Spur 3 enthält die durch den Xho I-Verdau entstandenen Fragmente. Die Laufhöhe der Banden entspricht den beiden erwarteten Fragmenten von 1750 bp (mscIL-12-Gen) und 9710 bp Länge.



**Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung eines Verdauens von pAd.3r.mscIL-12**  
Spur 3 zeigt das charakteristische Bandenmuster eines Xho I-Verdauens von pAd.3r.mscIL-12.

#### 4.1.2. Sequenz des murinen single-chain-Interleukin-12 von pAd.3r.mscIL-12

Das therapeutische Gen in pAd.3r.mscIL-12 wurde nach der Methode von Sanger sequenziert (siehe 3.2.6.) und mit publizierten Sequenzen der Gene der p40- (NM\_008352.1; NCBI b) und p35- (NM\_008351.1; NCBI a) Untereinheiten verglichen. Auf diese Weise wurde die Sequenz auf Mutationen hin überprüft.

Abbildung 12 stellt das für die Sequenzierung verwendete Plasmid mit den wichtigsten Genen dar. Die Nukleotidfolge des sequenzierten Abschnittes mit dem mscIL-12-Gen ist in Abbildung 13 zu sehen. Das hier verwendete murine single-chain-Interleukin-12-Gen enthält den Genabschnitt für die Signalsequenz der p40-Untereinheit zur Sezernierung des Genproduktes, den Abschnitt für die p40-Untereinheit, ein 45 bp langes Verbindungsglied (Linker) und den Genabschnitt für die p35-Untereinheit ohne Signalsequenz.

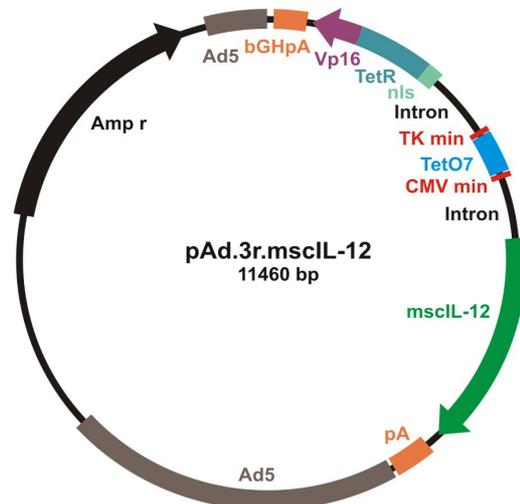


Abbildung 12: Darstellung des Plasmides pAd.3r.mscIL-12

Bei der Klonierung des Plasmides innerhalb der Arbeitsgruppe sind ein Startcodon und ein Alanin kodierendes Triplet vor das natürliche Startcodon der p40-Untereinheit integriert worden (in Abbildung 13 rot unterstrichen). Dies führt zu einer Veränderung der Signalsequenz des Genproduktes.

Abweichend von den publizierten Sequenzen wurden fünf Punktmutationen entdeckt. Die abweichenden Basen sind rot und die dadurch beeinflussten Tripletts durch Rahmen dargestellt. Die ersten beiden Mutationen (bp 10, 481; T→G, T→C) führen zu einem Aminosäureaustausch im Genprodukt. Im ersten Fall (erster Rahmen) wird in der Signalsequenz Cystein durch Glycin ersetzt (C4G). Der zweite Basenaustausch (zweiter Rahmen) ersetzt in der p40-Untereinheit ein Serin durch ein Prolin (S161P). Die drei übrigen Mutationen (bp 486, 972, 1152; T→C, G→A, A→G) beeinflussen die Aminosäuresequenz nicht (stumme Mutationen).

Intron	AGCCTTGCCAG	AAGTTGGTCCG	TGAGGCACTG	GGCAGGTAAG	TATCAAGGTT	ACAAGACAGG	60
	TTTAAGGAGA	CCAATAGAAA	CTGGGCTTGT	CGAGACAGAG	AAGACTCTTG	CGTTTCTGAT	120
	AGGCACCTAT	TGGTCTTACT	GACATCCACT	TTGCCTTTCT	CTCCACAGGT	GTCCACTCCC	180
	AGTTCAATTA	CAGCTCTTAA	GGCTFAGAGTA	TTAATAACGA	CTCACTATAG	GCTAGCCTCG	240
Start	AGAAATTCGAA	<u>TGGCCATGG</u>	<u>GGT</u>	<u>CCTCAGAAG</u>	<u>CTAACCATCT</u>	<u>CCTGGTTTGC</u>	300
Signal-	<u>CTGGTGTCTC</u>	<u>CACTCATGGC</u>	<u>CATGTGGGAG</u>	<u>CTGGAGAAAAG</u>	<u>ACGTTTATGT</u>	<u>TGTAGAGGTG</u>	360
sequenz	GACTGGACTC	CCGATGCCCC	TGGAGAAAACA	GTGAACCTCA	CCTGTGACAC	GCCTGAAGAA	420
	GATGACATCA	CCTGGACCTC	AGACCAGAGA	CATGGAGTCA	TAGGCTCTGG	AAAGACCCTG	480
	ACCATCACTG	TCAAAGAGTT	TCTAGATGCT	GGCCAGTACA	CCTGCCACAA	AGGAGGCGAG	540
	ACTCTGAGCC	ACTCACATCT	GCTGCTCCAC	AAGAAGGAAA	ATGGAATTTG	GTCCACTGAA	600
	ATTTTAAAAA	ATTTCAAAAA	CAAGACTTTC	CTGAAGTGTG	AAGCACCAAA	TTACTCCGGA	660
mIL-12	CGGTTACAGT	GCTCATGGCT	GGTGCAAAGA	AACATGGACT	TGAAGTTCAA	CATCAAGAGC	720
(P40)	AGTAGCAGT	<u>CCC</u>	<u>CCG</u>	GACTC	TCGGGCAGTG	ACATGTGGAA	780
	AAGGTCACAC	TGGACCAAAG	GGACTATGAG	AAGTATTGAG	TGCTCTGCCA	GGAGGATGTC	840
	ACCTGCCCAA	CTGCCGAGGA	GACCCTGCC	ATTGAAGTGG	CGTTGGAAGC	ACGCAGCAG	900
	AATAAATATG	AGAAGTACAG	CACCAGCTTC	TTTATCAGGG	ACATCATCAA	ACCAGACCCG	960
	CCCAAGAACT	TGCAGATGAA	GCCTTTGAAG	AACTCACAGG	TGGAGGTGAC	CTGGGAGTAC	1020
	CCTGATCCT	GGAGCACTCC	CCATTCCTAC	TTCCTCCCTCA	AGTTCTTTGT	TCGAATCCGA	1080
	CGCAAGAAAG	AAAAGATGAA	GGAGACAGAG	GATGGGTTGTA	ACCAGAAAAG	TGCGTTCCCTC	1140
	GTAGAGAAGA	CATCTACCGA	AGTCCAATGC	AAAGGCGGGA	ATGTCTGCGT	GCAAGCTCAG	1200
	GATCGCTATT	ACAATTCC	<u>TC</u>	<u>A</u>	TGCAGCAAG	TGGGCATGTG	1260
Linker	<u>GGTGGCGGTG</u>	<u>GCTCGGGCGG</u>	<u>TGGTGGGTCG</u>	<u>GGTGGCGGCG</u>	<u>GATCTAGGGT</u>	<u>CATTCCAGTC</u>	1320
	TCTGGACCTG	CCAGGTGTCT	TAGCCAGTCC	CGAAACCTGC	TGAAGACCAC	AGATGACATG	1380
	GTGAAGACGG	CCAGAGAAA	<u>AA</u>	<u>G</u>	CTGAAACAT	TATTCCTGCA	1440
	GAAGACATCA	CACGGGACCA	AACCAGCACA	TTGAAGACCT	GTTTACCCT	GGAAGTACAC	1500
	AAGAACGAGA	GTTGCCTGGC	TACTFAGAGAG	ACTTCTTCCA	CAACAAGAGG	GAGCTGCCTG	1560
mIL-12	CCCCACAGA	AGACGTCTTT	GATGATGACC	C'TGTGCCTTG	G'TAGCATCTA	TGAGGACTTG	1620
(P35)	AAGATGTACC	AGACAGAGTT	CCAGGCCATC	AACGCAGCAC	TTCAGAATCA	CAACCATCAG	1680
	CAGATCATTC	TAGACAAGGG	CATGCTGGTG	GCCATCGATG	AGCTGATGCA	GTCTCTGAAT	1740
	CATAATGGCG	AGACTCTGCG	CCAGAAAACCT	CCTGTGGGAG	AAGCAGACCC	TTACAGAGTG	1800
	AAAATGAAGC	TCTGCATCCT	GCTTCACGCG	TTCAGCACCC	GCGTCGTGAC	CATCAACAGG	1860
Stop	GTGATGGGCT	ATCTGAGCTC	CGCC	<u>TGAGAA</u>	TTGATCCGGA	TTAGTCCAAT	1920
	CAGGATGGGC	CCTATATATG	GATCCCCCGG	GCTGCAGGAA	TTCGATATCC	ATCACACTGG	1980
	CGGCCGCTCG	AGCATGCATC	TAGAGGGCCC	TATTCTATAG	TGTCACCTAA	ATGCTAGAGC	2040
	TCGCTGATCA	GCCTCGACTG	TGCCTTCTAG	TTGCCAGCCA	TCTGTTGTTT	GCCCCTCCCC	2100
bGHpA	CGTGCCCTCC	TTGACCCTGG	AAGGTGCCAC	TCCCCTGTC	CTTTCCTAAT	AAAATGAGGA	2160
	AATTGCATCG	CATTGTCTGA	GTAGGTGTCA	TTCTATTCTG	GGGGGTGGGG	TGGGGCAGGA	2220

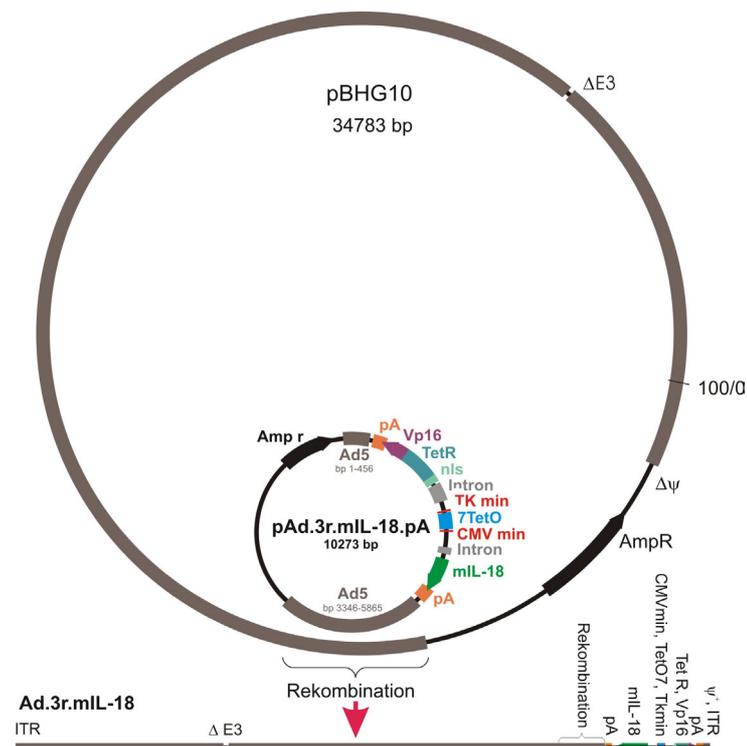
**Abbildung 13: Darstellung des sequenzierten Abschnittes von pAd.3r.msclL-12**

In der abgebildeten Sequenz sind Mutationen durch rote Buchstaben und die betroffenen Triplets durch Rahmen hervorgehoben. Bei der Klonierung entstandene Veränderungen vor dem natürlichen Startcodon wurden rot unterstrichen.

#### 4.1.3. Synthese und Identifizierung von Ad.3r.mIL-18

Bei der Generierung des Ad.3r.mIL-18 wurden in einer Calcium-Phosphat-Kopräzipitation die Plasmide pAd.3r.mIL-18 und pBHG10 verwendet (siehe 3.2.8.). Es entstanden insgesamt sieben Plaques. Diese und eine Negativkontrolle wurden in einem CPE-Assay untersucht, wobei zwei Überstände des CPE-Assays einen zytopathischen Effekt zeigten. Die Überstände dieser positiven CPE-Kulturen und eine Negativkontrolle wurden in einem mIL-18-ELISA auf die Synthese des entsprechenden Zytokins hin untersucht, wobei nur eines der positiven CPE-Überstände eine deutliche Interleukin-18-Synthese aufzeigte. Dieser Überstand wurde dann für die Virusvermehrung eingesetzt.

Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der für die Virussynthese verwendeten Plasmide. Diese werden nach der Kopräzipitation von den 293-Zellen aufgenommen und durch zelleigene Enzyme an homologen adenoviralen Gensequenzen zu einem linearen, vollständigen adenoviralen Genom rekombiniert.



**Abbildung 14: Darstellung der bei der Kopräzitation verwendeten Plasmide pAd.3r.mIL-18 und pBHG10**

Die abgebildeten Plasmide werden in 293-Zellen an homologen Sequenzen rekombiniert, so dass ein E1- und E3-deletiertes adenovirales Genom entsteht.

Die Adenoviren Ad.3r.msclL-12 und Ad.3r.luc wurden im Rahmen anderer Projekte der Arbeitsgruppe generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.4. Virustiter nach der Virusreinigung

Nach Vermehrung und Reinigung der Viren (siehe 3.2.10.) erfolgte die Titerung im Plaque-Assay durch Infektion von 293-Zellen mit einer logarithmischen Virusreihenverdünnung und anschließender Plaquezählung nach 14 Tagen (siehe 3.2.11.).

##### Ad.3r.mIL-18

Der nach Vermehrung und Reinigung durch einen Plaque-Assay bestimmte Titer betrug  $1,53 \times 10^{10}$  p.f.u./ml in einem Gesamtvolumen von 7 ml.

##### Ad.3r.msclL-12

Das Virus Ad.3r.msclL-12 lag bereits aufgereinigt vor und wurde in dieser Arbeit zuerst nur getitert. Der Titer betrug  $7,93 \times 10^9$  p.f.u./ml. Um sicherzustellen, dass für die folgenden *In-vivo*-Versuche ausreichende Virusmengen zur Verfügung standen, wurde das Ad.3r.msclL-12 nochmals in 293-Zellen bis zu 50 144 mm-Zellkulturschalen vermehrt, aufgereinigt und getitert. Der Titer betrug  $1,72 \times 10^{11}$  p.f.u./ml in einem Gesamtvolumen von 6 ml.

Ad.3r.luc

Das Virus Ad.3r.luc wurde von der Arbeitsgruppe generiert, vermehrt, aufgereinigt und getitert. Der Titer betrug  $1 \times 10^{10}$  p.f.u./ml.

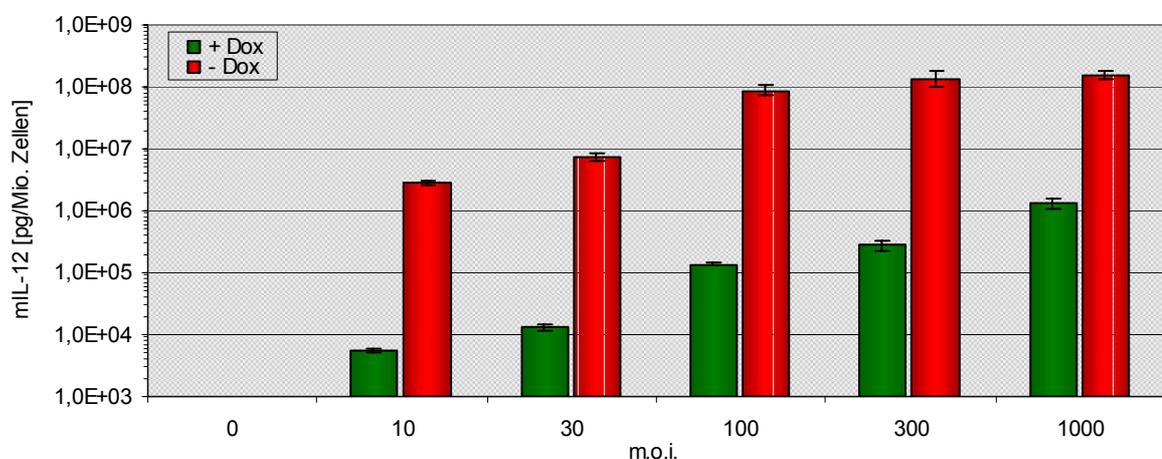
Ad.DL312

Das von Perricaudet (Institut Gustave Roussy) zur Verfügung gestellte Virus Ad.DL312 wurde von der Arbeitsgruppe vermehrt, aufgereinigt und getitert. Der Titer betrug  $3,2 \times 10^{10}$  p.f.u./ml.

**4.1.5. Regulierbare Expression in MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.msclL-12**

Um die Regulationskapazität des Tet-OFF-Systems in murinen Kolonkarzinomzellen und deren Transfizierbarkeit zu untersuchen, wurden MCA-26-Zellen mit 0, 10, 30, 100, 300 bzw. 1000 m.o.i. des Ad.3r.msclL-12 infiziert. Je drei Kulturen pro m.o.i. enthielten doxycyclinhaltiges (2  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. -freies Medium (siehe 3.2.12.). Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die IL-12-Konzentrationen in den Überständen mittels mIL-12 p70-ELISA bestimmt und auf  $1 \times 10^6$  Zellen bezogen.

Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der produzierten IL-12-Mengen von jeweils gleich behandelten Kulturen. Man sieht einen Anstieg der IL-12-Synthese bei einer Erhöhung der eingesetzten infektiösen Partikel (m.o.i.). Außerdem fällt auf, dass die IL-12-Mengen in Abwesenheit von Doxycyclin bei 300 m.o.i. und 1000 m.o.i. relativ gleich blieben, dass also eine höhere Menge von infektiösen Partikeln die IL-12-Synthese nicht viel weiter erhöhte. Die Zugabe von Doxycyclin führte zu einer deutlich erkennbaren Suppression. Bei 100 m.o.i. bewirkte Doxycyclin eine maximale, 639fache Suppression der IL-12-Genexpression. Bei einer m.o.i. von 1000 war die Supprimierbarkeit mit 117fach am niedrigsten. Die Regulationskapazität stieg mit der Erhöhung der infektiösen Partikel erst an, um dann nach dem Optimum bei 100 m.o.i. wieder abzusinken.

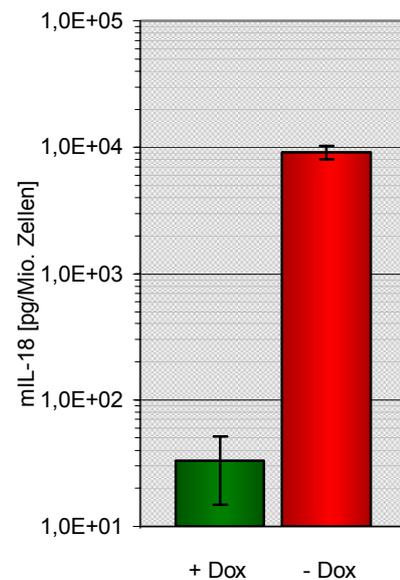


**Abbildung 15: Darstellung der mIL-12-Synthese von MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.msclL-12 in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin**

#### 4.1.6. Regulierbare Expression in MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.mIL-18

Um die Transfektionseffizienz und Regulierbarkeit des Ad.3r.mIL-18 zu testen, wurden analog zu 4.1.5. MCA-26-Zellen mit 1000 m.o.i. Ad.3r.mIL-18 infiziert. Auch hier erhielten je drei Kulturen doxycyclinhaltiges (2 µg/ml) bzw. -freies Medium (siehe 3.2.12.). Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde die IL-18-Konzentration aus den Überständen mittels mIL-18-ELISA bestimmt. In Abbildung 16 sieht man die Mittelwerte und die Standardabweichungen der gebildeten IL-18-Mengen nach 24 Stunden von jeweils drei gleich behandelten Kulturen.

Durch die Gabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml ließ sich die von Ad.3r.mIL-18 produzierte IL-18-Menge bei einer m.o.i. von 1000 um den Faktor 276,3 supprimieren.



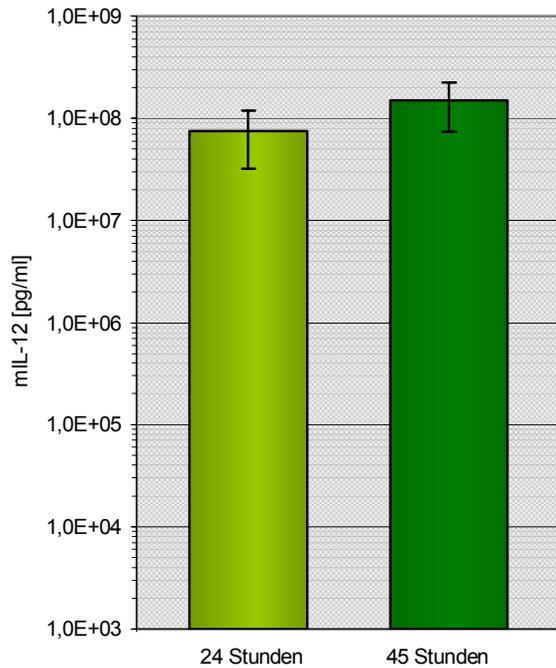
**Abbildung 16:** Darstellung der mIL-18-Synthese von MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.mIL-18 in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin

#### 4.1.7. Zytokinsynthese in HT-29-Zellen für einen Bioassay

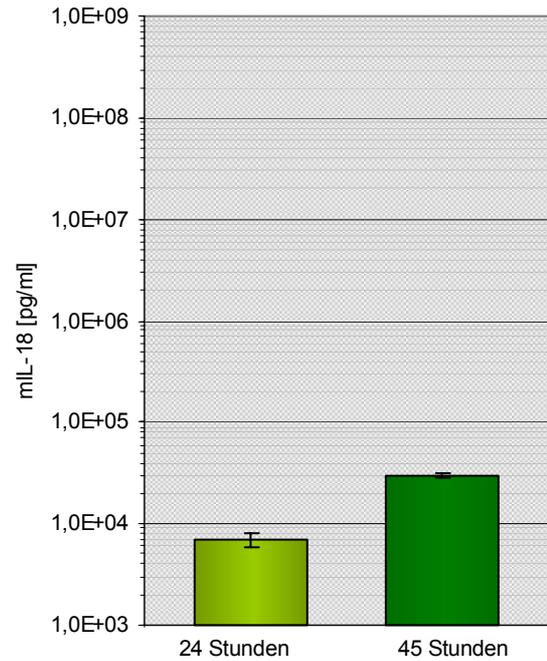
Um die von infizierten HT-29-Zellen gebildeten Zytokinkonzentrationen zu ermitteln, wurden HT-29-Zellen in tetracyclinfreiem Medium kultiviert. Nach einer Infektion mit 600 m.o.i. Ad.3r.msclL-12 bzw. Ad.3r.mIL-18 erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden und für 45 Stunden (siehe 3.2.13.). Mittels ELISA wurden dann die jeweiligen Zytokinkonzentrationen aus den Überständen ermittelt. Die Überstände mit den höchsten Zytokinkonzentrationen fanden dann als Ausgangslösung im Bioassay (siehe 3.2.14.) Verwendung.

Abbildung 17 zeigt die IL-12-Konzentrationen in den mit Ad.3r.msclL-12 infizierten HT-29-Überständen nach 24 bzw. nach 45 Stunden. Die Konzentration war mit ca.  $1,5 \times 10^8$  pg/ml nach 45 Stunden zweifach höher als die Konzentration nach 24 Stunden ( $p = 0,0084$ ). Abbildung 18 stellt die IL-18-Konzentrationen aus den Überständen von HT-29-Zellen dar, welche vor 24 bzw. 45 Stunden mit Ad.3r.mIL-18 inkubiert wurden. Auch hier war die Konzentration nach 45 Stunden mit ca.  $3 \times 10^4$  pg/ml signifikant höher als die nach 24 Stunden ( $p < 0,0001$ ). Hier bestand ein vierfacher Konzentrationsunterschied. Somit wurden in beiden Fällen die Überstände nach 45 Stunden für den Bioassay weiterverwendet.

Der Vergleich beider Abbildungen macht einen großen Konzentrationsunterschied beider Zytokine im Überstand deutlich. Hierbei weist nach 45 Stunden IL-12 eine 4973,4fach höhere Konzentration als IL-18 auf.



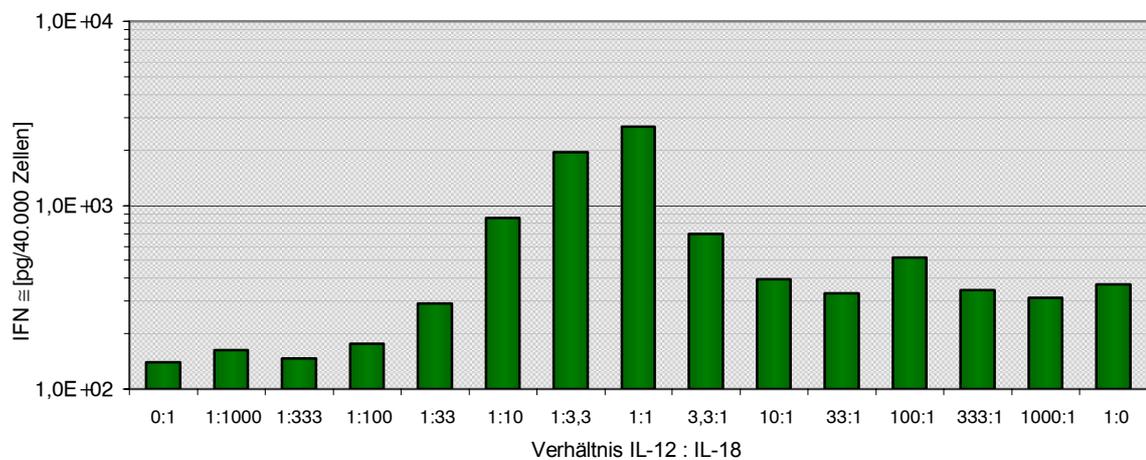
**Abbildung 17: Darstellung der mL-12-Synthese von HT-29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.msclL-12**



**Abbildung 18: Darstellung der mL-18-Synthese von HT-29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.mIL-18**

#### 4.1.8. IFN- $\gamma$ -Synthese in murinen Lymphozyten nach Inkubation mit IL-18- und IL-12-haltigen HT-29-Kulturüberständen.

Um den potenziellen Effekt der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine (mIL-12 und mL-18), Mauslymphozyten zur IFN- $\gamma$ -Produktion anzuregen, zu ermitteln, und um zu eruieren, in welchem Verhältnis die beiden Zytokine die höchste IFN- $\gamma$ -Produktion erzielen, wurden Mauslymphozyten-Kulturen mit verschiedenen IL-12:IL-18-Verhältnissen für 24 Stunden inkubiert (siehe 3.2.14.). Die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung wurde mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.



**Abbildung 19: Darstellung der IFN- $\gamma$ -Synthese von Mauslymphozyten nach Infektion mit IL-12- und IL-18-Überständen in verschiedenen Verhältnissen**

Nach einer 24-stündigen Inkubation von Mauslymphozyten mit Zytokinüberständen aus HT-29-Zellen ergab sich die höchste IFN- $\gamma$ -Synthese bei einem Verhältnis IL-12:IL-18 von 1:1. Der Wert betrug  $2,7 \times 10^3$  pg IFN- $\gamma$ /4x10<sup>4</sup> Zellen.

Abbildung 19 zeigt die IFN- $\gamma$ -Synthese der mit Zytokinüberständen inkubierten Mauslymphozyten nach 24 Stunden. Es ist deutlich, dass sowohl das viral kodierte IL-12 als auch das viral kodierte IL-18 in der Lage waren, Mauslymphozyten zur IFN- $\gamma$ -Produktion anzuregen. Folglich zeigten beide Zytokine eine Bioaktivität. Ist nur IL-18 eingesetzt worden, wurde mit  $140 \text{ pg}/4 \times 10^4$  Zellen die niedrigste IFN- $\gamma$ -Synthese erreicht. Wurde jedoch ausschließlich IL-12 beigefügt, konnte mit  $372 \text{ pg}/4 \times 10^4$  Zellen eine 2,7fach höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration gemessen werden. Das Zytokinverhältnis IL-12:IL-18 von 1:1 war in der Lage, Lymphozyten mit  $2,7 \times 10^3 \text{ pg}/4 \times 10^4$  Zellen zur höchsten IFN- $\gamma$ -Synthese anzuregen. Obwohl diese Daten zeigen, dass ein 1:1-Verhältnis zwischen IL-12 und IL-18 eine signifikant höhere Bioaktivität aufwies als die jeweiligen Zytokine allein ( $p < 0,05$ ), wurde aufgrund einer potenziell höheren Nebenwirkungsrate bei der Verwendung einer Kombination von IL-12 und IL-18 (Kaneda *et al.*, 2003) beschlossen, die anschließenden Tierversuche ausschließlich mit IL-12-kodierenden Adenoviren durchzuführen. Außerdem basierte die Entscheidung für IL-12-kodierende Adenoviren auf der Tatsache, dass sich IL-12 in mehreren Studien als sehr wirksam in der Tumorthherapie erwies (Brunda *et al.*, 1993; Fallarino *et al.*, 1996; Noguchi *et al.*, 1996; Rook *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2000) (siehe 5.1.)

## 4.2. Ergebnisse *in vivo*

### 4.2.1. Doxycyclingehalt des Mäusefutters

Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten Doxycyclin-sensiblen Viren wurde das während der Tierversuche verwendete Futter auf eine eventuelle Doxycyclinbelastung untersucht.

Hierzu wurden neun HT-29-Kulturen in tetracyclinfreiem HT-29-Medium angesetzt. Drei Kulturen wurde 10% Futterlösung zugegeben, drei weiteren Kulturen wurde als Positivkontrolle 10% Futterlösung und Doxycyclin ( $2 \text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugefügt. Die übrigen drei Kulturen blieben als Negativkontrolle zusatzfrei.

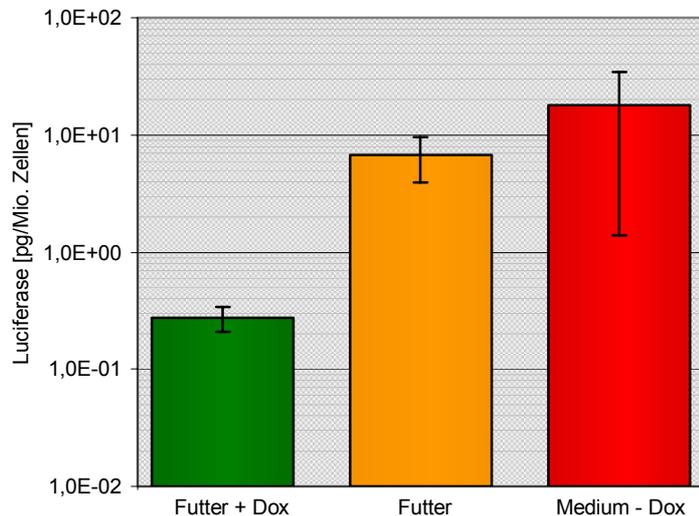
Nach der Infektion mit Ad.3r.luc wurden die Kulturen 24 Stunden in den oben beschriebenen Medien inkubiert (siehe 3.3.2.). Anschließend wurde die Luciferasemenge in den verschiedenen Kulturüberständen ermittelt.

Abbildung 20 zeigt die Darstellung der Mittelwerte mit den Standardabweichungen der Luciferasemengen der Überstände von jeweils drei gleich behandelten Kulturen nach 24 Stunden. Die Luciferasekonzentrationen der Überstände mit Futterlösung inkubierter Kulturen lagen nicht signifikant ( $p = 0,3997$ ) unterhalb der Luciferasekonzentrationen der Negativkontrolle (Medium - Dox). Außerdem lagen die Luciferasekonzentrationen der

Futterlösung deutlich (24,9fach) über der Konzentration der Positivkontrolle (Futter + Dox) und wiesen folglich eine signifikant schwächere Supprimierbarkeit als die Positivkontrolle auf ( $p = 0,0314$ ). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das verwendete Mäusefutter keine ausreichenden Mengen Doxycyclin enthält, um eine Transgenexpression durch das Tet-OFF-System signifikant zu supprimieren.

**Abbildung 20: Darstellung der Luciferasesynthese von HT-29-Zellen in unterschiedlichen Medien nach Infektion mit Ad.3r.luc**

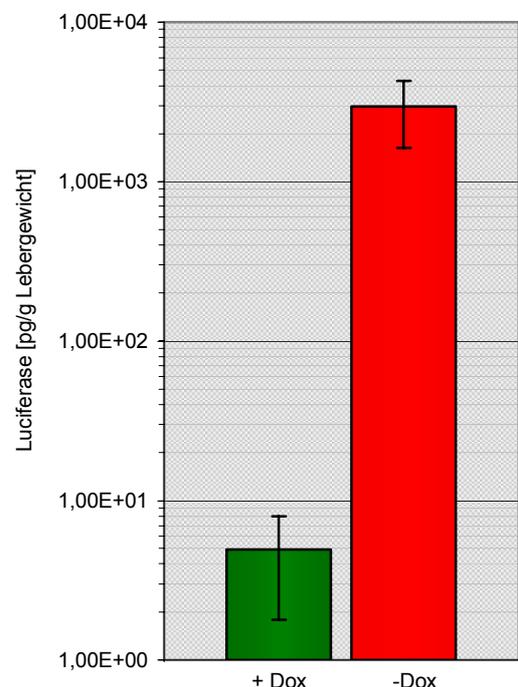
Die Luciferasesynthese der Zellen, welche mit Futterlösung ohne zusätzliche Doxycyclingabe inkubiert wurden (Futter), unterschied sich nicht signifikant von der Luciferasesynthese der Negativkontrolle (Medium - Dox). Die Positivkontrolle (Futter + Dox) zeigte eine signifikant stärkere ( $p = 0,0314$ ) Suppression der Transgenexpression als die zu untersuchende Probe (Futter).



**4.2.2. Regulierbare Luciferasegenexpression in Mäusen nach Infektion mit Ad.3r.luc**

Um das Tet-OFF-System *in vivo* zu testen, wurden sechs Mäuse intravenös mit Ad.3r.luc infiziert. Die Hälfte dieser Mäuse bekam Trinkwasser, welchem Doxycyclin (300 µg/ml) zugesetzt wurde. 7 Tage nach der Infektion wurde der Luciferasegehalt in den Leberhomogenisaten bestimmt (siehe 3.3.3.).

Abbildung 21 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Luciferasekonzentrationen aus den Leberhomogenisaten von jeweils gleich behandelten Mäusen dar. Die Mittelwerte lassen eine Doxycyclin-abhängige signifikante Suppression um den Faktor 605 erkennen ( $p = 0,0344$ ). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass das Tet-OFF-System auch *in vivo* stark durch Doxycyclin regulierbar ist.



**Abbildung 21: Doxycyclin-Abhängigkeit der Luciferasegenexpression in Mäuselebern nach Infektion mit Ad.3r.luc**

#### 4.2.3. Toxizität von Ad.3r.msclL-12

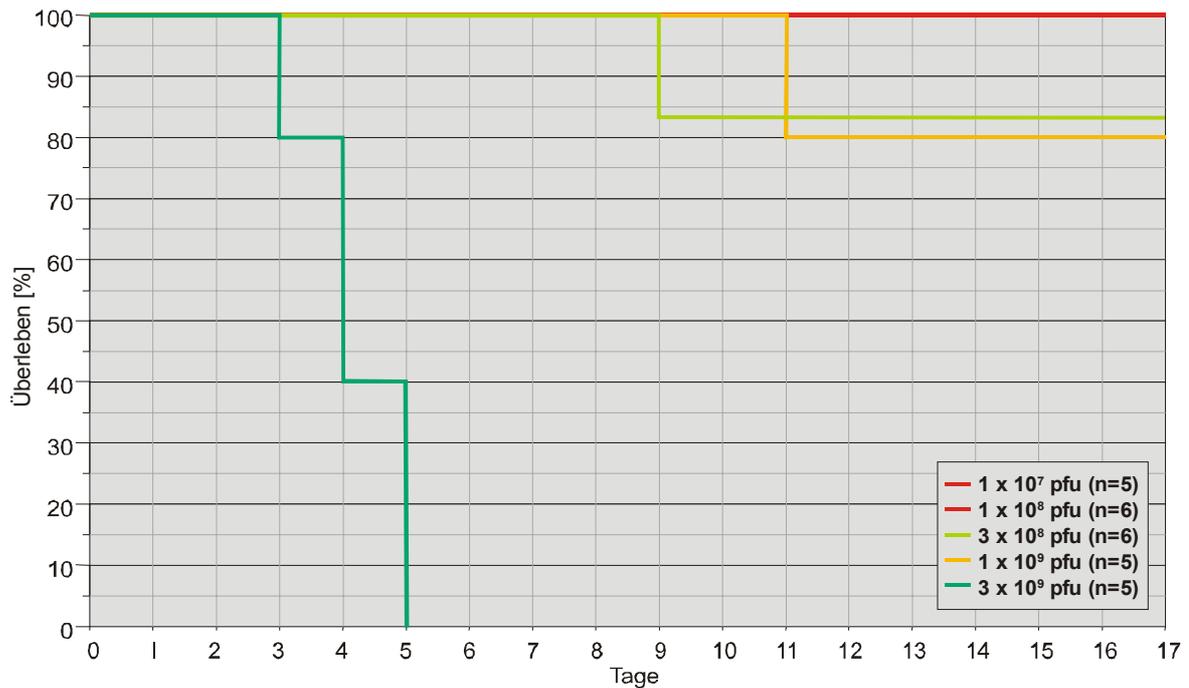
Aufgrund der Möglichkeit, dass bei einer intratumoralen Therapie mit Ad.3r.msclL-12 akzidentiell etwas in die Blutbahn gelangt, wurden die adenoviralen Vektoren in verschiedenen Konzentrationen gewichtsadaptiert über die Schwanzvenen in C57BL/6-Mäuse eingebracht, um ihre systemische Toxizität zu untersuchen und die maximal tolerable Dosis zu eruieren. Zur Überprüfung der Doxycyclin-Abhängigkeit der Toxizität bekam ein Teil der Mäuse Doxycyclin (300 µg/ml) in das Trinkwasser. Als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Maus (siehe 3.3.4.). Die Quantifizierung der Toxizität geschah durch Gewichtsverhalten und Überleben der Mäuse.

Abbildung 22 stellt das Überleben der Mäuse nach Virusinjektion in Prozent dar. Erkennbar ist, dass nach einer Virusinjektion von  $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG nach 17 Tagen noch 100% der Mäuse am Leben waren. Nach einer Virusinjektion von  $3 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG starb 1 von 6 Tieren am 9. Tag nach Injektion. Nach Injektion von  $1 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.msclL-12/20 g KG starb 1 von 5 Mäusen am 11. Tag. Die restlichen 80% lebten weiter. Am 14. Tag fielen bei 3 der verbliebenen 4 Mäuse neurologische Ausfälle in Form einer Hemiparese auf. Über den Zeitraum von 17 Tagen wurden die überlebenden Tiere aller Behandlungsgruppen noch für ca. 4 Monate beobachtet, wobei keine neuen Sterbefälle auftraten (nicht abgebildet). Nach einer Virusinjektion von  $3 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG starben alle behandelten Tiere, wobei die erste am 3. Tag nach Injektion starb. Von den verbleibenden 4 Mäusen starben 2 am 4. Tag und die übrigen 2 am 5. Tag nach Injektion. Tabelle 5 fasst die eingetretenen Ereignisse nach Virusinjektion zusammen.

Viruskonzentration [p.f.u./20 g KG] n=Mausanzahl	1.Ereignis	2.Ereignis	3.Ereignis	überlebende Mäuse
$1 \times 10^7$ n=5	–	–	–	5 (100%)
$1 \times 10^8$ n=6	–	–	–	6 (100%)
$3 \times 10^8$ n=6	Tag 9: 1 Maus tot	–	–	5 (83%)
$1 \times 10^9$ n=5	Tag 11: 1 Maus tot	Tag 14: 3 Mäuse zeigen neurolog. Ausfälle*	–	4 (80%)
$3 \times 10^9$ n=5	Tag 3: 1 Maus tot	Tag 4: 2 Mäuse tot	Tag 5: 2 Mäuse tot	0 (0%)

**Tabelle 5: Darstellung eintretender toxischer Wirkungen nach intravenöser Ad.3r.msclL-12-Injektion in C57BL/6-Mäuse.**

\*Neurologische Ausfälle = Hemiparese



**Abbildung 22: Darstellung der Überlebensraten von C57BL/6-Mäusen nach intravenöser Applikation von Ad.3r.mscIL-12 in verschiedenen Konzentrationen**

Nach einer Injektion von  $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG blieben alle Tiere am Leben. Bei einer Injektion von  $3 \times 10^8$  bzw.  $1 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG starb jeweils eine Maus. Nach Gabe von  $3 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.mscIL-12/20 g KG starben alle Mäuse.

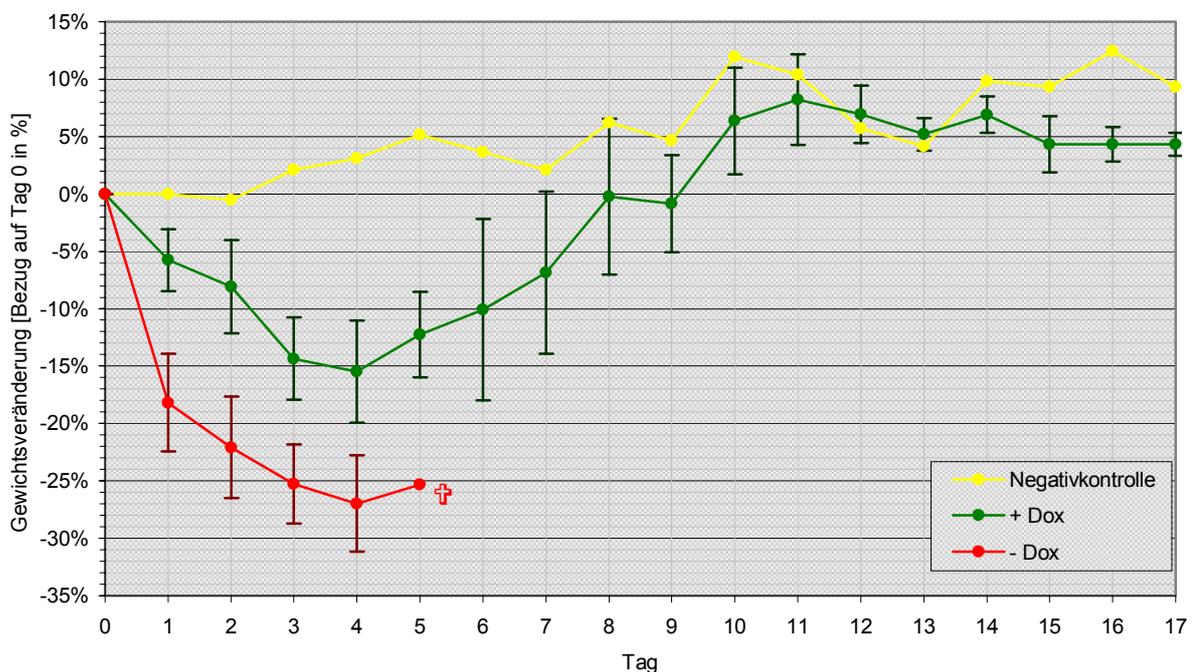
Anhand der Darstellung der Ereignisse und Überlebensraten nach Injektion von Ad.3r.mscIL-12 in die Mäuse ist erkennbar, dass bei einer intravenösen Injektion die Konzentration  $1 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG die wahrscheinlich subletale Dosis darstellt. Da in der Tumorthherapie die für IL-12 weniger sensiblen Balb/c-Mäuse verwendet werden sollten und die Virusinjektion intratumoral und nicht intravenös erfolgen sollte, erfolgte eine Erhöhung der Dosis auf  $1 \times 10^9$  p.f.u.

Zur Untersuchung des Einflusses von Doxycyclin auf die IL-12-Toxizität, wurde je fünf bis sechs Mäusen, welche eine Virusinjektion von  $1 \times 10^9$  bzw.  $3 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG erhielten, Doxycyclin (300 µg/ml) in das Trinkwasser gegeben. Die Überlebensraten betragen für beide Gruppen 100%. Somit bewirkt eine Doxycyclingabe bei hohen, für C57BL/6-Mäuse letalen, Viruskonzentrationen wie  $3 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG eine signifikante Toxizitätsreduktion ( $p = 0,0079$ ) und somit eine komplette Protektion.

Das gemittelte Gewichtsverhalten der Mäuse, welche mit  $3 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.mscIL-12 /20 g KG in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin behandelt wurden, ist zum Vergleich in Abbildung 23 neben dem Gewichtsverhalten einer unbehandelten Maus dargestellt. Die Gewichtsveränderungen sind in Prozent in Bezug auf den Tag der Injektion (Tag 0) angegeben. Deutlich zu erkennen ist die starke Gewichtsabnahme (-25%) der Gruppe von Mäusen, welche kein Doxycyclin im Trinkwasser enthielten. Bei einem Startgewicht

von ca. 20 g betrug das gemittelte Gewicht am 3. Tag nach Virusinjektion nur noch ca. 15 g bei den Mäusen, die kein Doxycyclin erhalten haben. Mäuse, die zusätzlich Doxycyclin erhielten, hatten bei einem gleichen Startgewicht 3 Tage nach Virusinjektion mit 17,5 g ein signifikant höheres Gewicht ( $P = 0,0053$ ). Da am 5. Tag nach der Injektion keine der doxycyclinfreien Mäuse mehr am Leben war, konnte deren Gewicht nicht weiterverfolgt werden. Die maximale Gewichtsabnahme der Mäuse, welche mit Doxycyclin behandelt wurden, lag bei ca. -15,5% am 4. Tag nach der Injektion. Danach stieg das Gewicht wieder an und glich am 8. Tag wieder dem Anfangsgewicht. Diese Beobachtungen lassen auf einen schützenden Effekt von Doxycyclin schließen.

Bei der unbehandelten Maus sah man keine Gewichtsabnahme in Bezug zum Tag 0.



**Abbildung 23: Darstellung der durchschnittlichen Gewichtsveränderung von C57BL/6-Mäusen nach intravenöser Injektion von Ad.3r.msclL-12 ( $3 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG)**

Die Gewichtsveränderungen sind in Prozent in Bezug auf den Tag der Injektion (Tag 0) angegeben. Deutlich erkennbar ist die Gewichtsabnahme der mit Virus behandelten Mäuse, wobei die Mäuse, welche zusätzlich mit Doxycyclin behandelt wurden, ab dem 4. Tag wieder an Gewicht zunahmten. Von den Mäusen ohne Doxycyclin starben die letzten am 5. Tag nach der Injektion (†). Die unbehandelte Maus (Negativkontrolle) zeigt eine leichte Gewichtszunahme während der Versuchszeit.

#### 4.2.4. Histologische Analyse von Leber und Lunge nach Virusinjektion

Um die Organtoxizität von Ad.3r.msclL-12 und den darauf wirkenden Einfluss von Doxycyclin zu verdeutlichen, wurden je 2 Mäuse bezogen auf je 20 g KG mit Ad.3r.msclL-12 ( $3 \times 10^9$  p.f.u./150  $\mu$ l;  $3 \times 10^8$  p.f.u./150  $\mu$ l;  $3 \times 10^7$  p.f.u./150  $\mu$ l;  $3 \times 10^6$  p.f.u./150  $\mu$ l) infiziert. Je einer Maus jeder Gruppe wurde Doxycyclin (300  $\mu$ g/ml) in das Trinkwasser gegeben. Als Negativkontrolle wurde einer Maus bezogen auf 20 g KG Ad.DL312 ( $3 \times 10^9$  p.f.u./150  $\mu$ l) appliziert und einer weiteren Maus, die nicht viral behandelt wurde, Doxycyclin in das Trinkwasser gegeben.

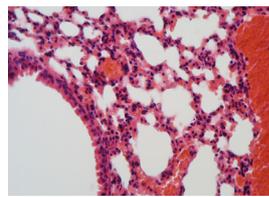
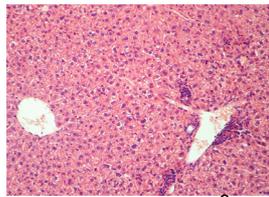
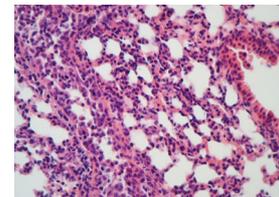
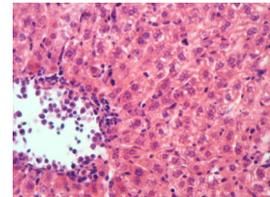
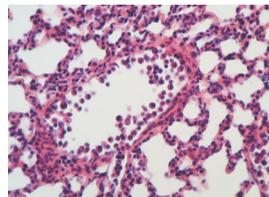
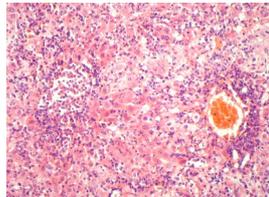
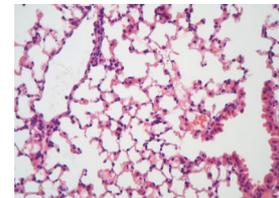
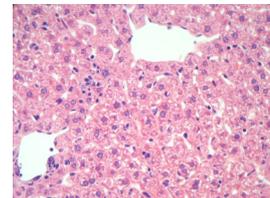
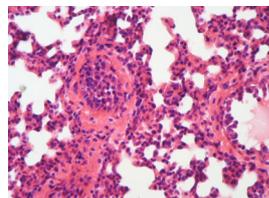
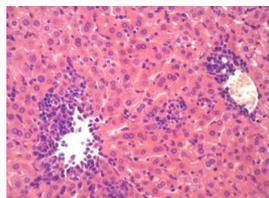
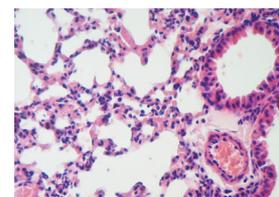
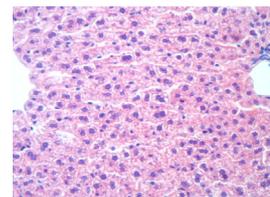
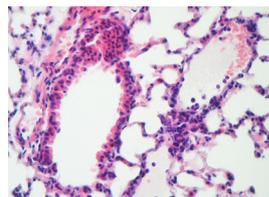
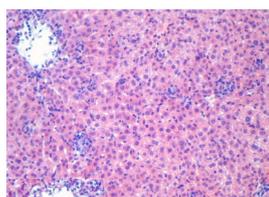
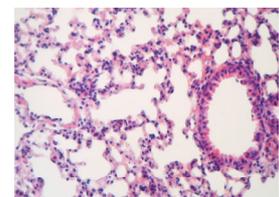
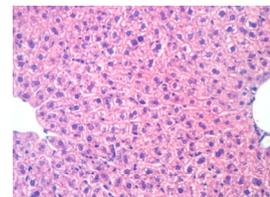
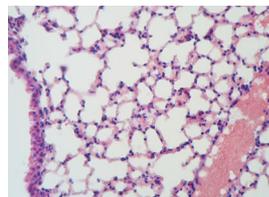
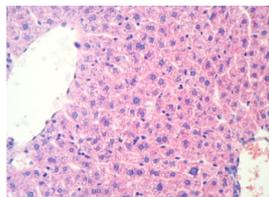
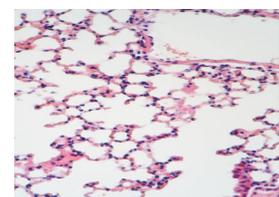
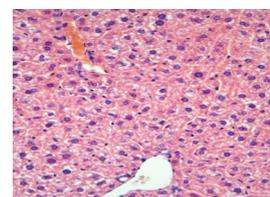
6 Tage nach der Virusinjektion wurden die Mäuse terminiert und ihnen wurden die Leber und die Lungen entnommen, fixiert und histologisch untersucht (siehe 3.3.5.).

Abbildung 24 zeigt die histologische Darstellung der Lebern und Lungen von C57BL/6-Mäusen nach Virusbehandlung. Zu erkennen ist, dass sich in Abwesenheit von Doxycyclin nach einer Virusinjektion von  $3 \times 10^9$  p.f.u. ausgeprägte hepatozelluläre Nekrosen sowie intravasale Entzündungen vor allem der Zentralvenen der Leber ausbildeten. Auch führte die selbe Viruskonzentration bei der Lunge zu ausgeprägten intravasalen Entzündungen. Durch die Zugabe von Doxycyclin in das Trinkwasser kam es zu einer deutlich geringeren Entzündungsreaktion.

Im Gegensatz zur Infektion mit Ad.3r.msclL-12 führte die Infektion mit  $3 \times 10^9$  p.f.u. Ad.DL312 nur zu marginalen hepatozellulären Einzelzellnekrosen.

Die Entzündungsreaktion nahm nach Infektion mit geringeren Ad.3r.msclL-12-Konzentrationen entsprechend ab. Bei einer Viruskonzentration von  $3 \times 10^6$  p.f.u./ 20 g KG bildete sich in Abwesenheit von Doxycyclin keine Entzündungsreaktion mehr aus. Diese fehlte in Anwesenheit von Doxycyclin schon bei einer Viruskonzentration von  $3 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG.

Durch die alleinige Zugabe von Doxycyclin in das Trinkwasser (300  $\mu$ g/ml) von virusfreien Mäusen kam es zu keiner histomorphologischen Veränderung der Organe.

**Ohne Doxycyclin****Leber****Lunge**Ad.DL312  $3 \times 10^9$  p.f.u.**Mit Doxycyclin (300 µg/ml) p.o.****Leber****Lunge**Ad.3r.msclL-12  $3 \times 10^9$  p.f.u.Ad.3r.msclL-12  $3 \times 10^8$  p.f.u.Ad.3r.msclL-12  $3 \times 10^7$  p.f.u.Ad.3r.msclL-12  $3 \times 10^6$  p.f.u.

Ohne Virus

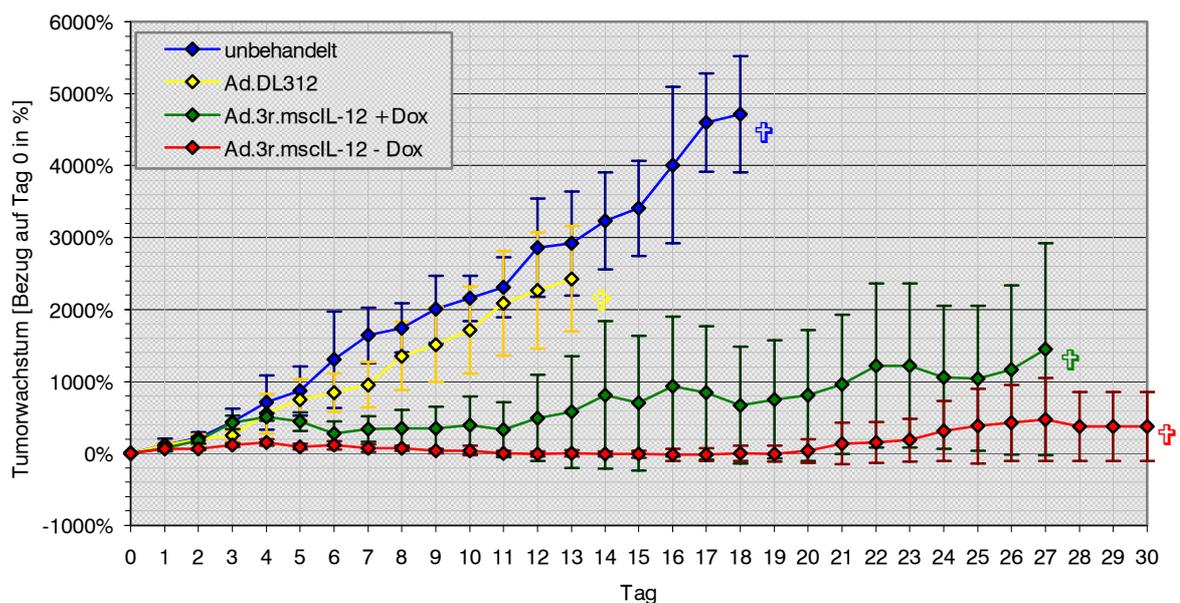
**Abbildung 24: Histologische Darstellung von Leber und Lunge von C57BL/6-Mäusen nach intravenöser Injektion von Ad.3r.msclL-12 in unterschiedlichen Konzentrationen (HE-Färbung)**

Den hier gewählten Ausschnitten liegen Fotos von 50- bzw. 100facher Vergrößerung zugrunde.

Die Injektion von  $3 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.msclL-12 führte in Abwesenheit von Doxycyclin zu ausgeprägten hepatozellulären Nekrosen und intravasalen Entzündungen in Leber und Lunge. Die Entzündungsreaktion ist als Anhäufung zytoplasmaarmer Zellen mit blauen Kernen erkennbar. Durch die Zugabe von Doxycyclin ließ sich diese Entzündungsreaktion deutlich minimieren. Die Infektion mit  $3 \times 10^9$  p.f.u. Ad.DL312 führte nur zu marginalen hepatozellulären Einzelzellnekrosen. Die alleinige Zugabe von Doxycyclin in das Trinkwasser führte zu keiner histomorphologischen Veränderung.

#### 4.2.5. Genterapie subkutaner Tumoren mit Ad.3r.msclL-12

Für die Überprüfung der Effizienz von Ad.3r.msclL-12 wurden mit Hilfe von MCA-26-Zellen subkutane Tumoren in Balb/c-Mäusen generiert. Die subkutane Injektion von  $1 \times 10^5$  Tumorzellen pro Balb/c-Maus führte nach 7-11 Tagen zu einem Tumolvolumen von ca.  $65 \text{ mm}^3$ . Jetzt wurde die intratumorale Virusinjektion vorgenommen (siehe 3.3.6. und 3.3.7.). Es gingen insgesamt 15 Mäuse in diesen Versuch ein. Acht Mäuse wurden mit Ad.3r.msclL-12 behandelt, wobei vier davon Doxycyclin ins Trinkwasser zugesetzt bekamen. Vier Mäuse wurden mit dem Kontrollvektor Ad.DL312 behandelt und drei Mäuse blieben virusfrei. Die Effizienz von Ad.3r.msclL-12 wurde durch tägliches Messen der Tumoren sowie durch das Langzeitüberleben untersucht und mit den anderen Gruppen verglichen. Zusätzlich wurde zur Darstellung der IL-12-Wirkung auf den Tumor je eine Maus, welche einen ca.  $65 \text{ mm}^3$  großen Tumor hatte, intratumoral mit  $1 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.msclL-12/50  $\mu\text{l}$  bzw. zum Vergleich mit  $1 \times 10^9$  p.f.u. Ad.DL312/50  $\mu\text{l}$  behandelt. Eine dritte Maus blieb unbehandelt. Nach 6 Tagen wurde diesen Mäusen der Tumor entnommen und histologisch untersucht.



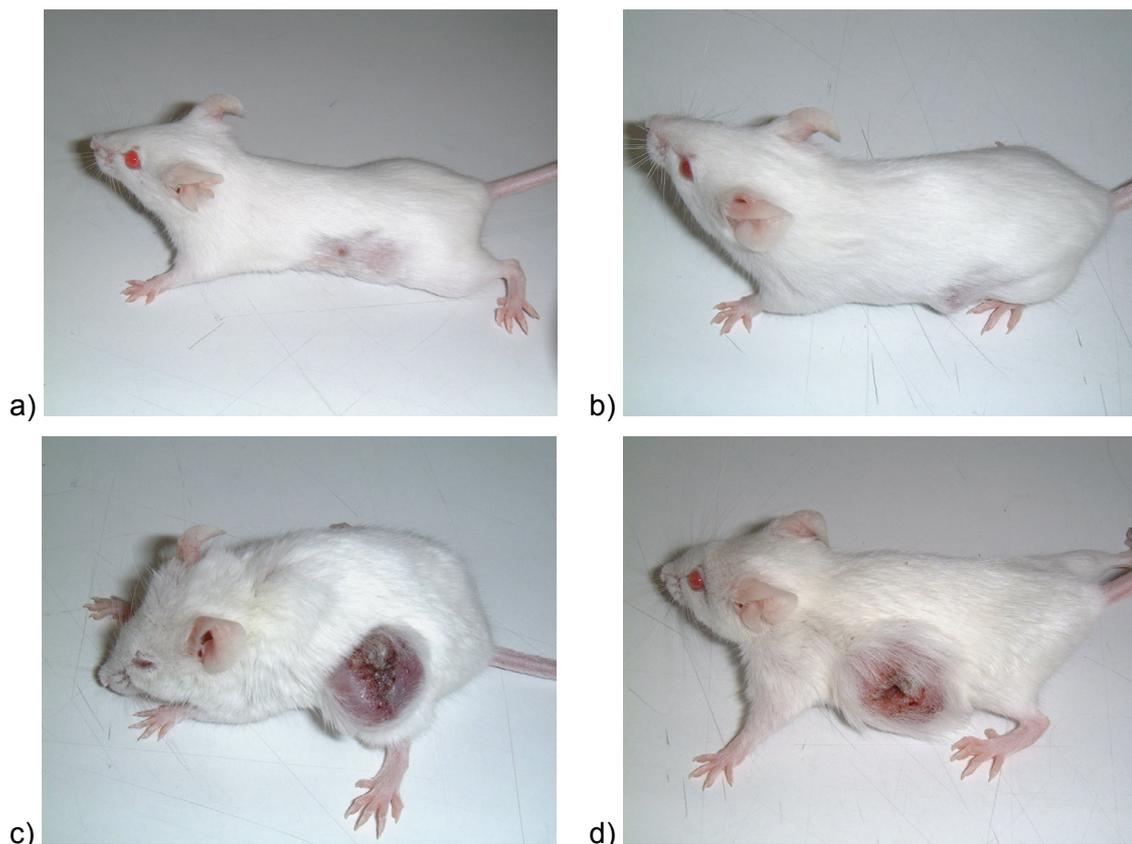
**Abbildung 25: Darstellung des durchschnittlichen Tumorstadiums bei Balb/c-Mäusen**

Tumorstadium bei unbehandelten Mäusen (blau), bei einer Behandlung mit Ad.DL312 (gelb) und bei Mäusen, die mit IL-12-kodierenden Adenoviren mit (grün) bzw. ohne (rot) Doxycyclin behandelt wurden. †: Erster Todesfall.

Abbildung 25 stellt das durchschnittliche Tumorstadium der Behandlungsgruppen in Prozent bezogen auf den Tag der Virusinjektion (Tag 0, Tumoren ca.  $65 \text{ mm}^3$ ) dar. Diese Wachstumskinetik schließt die Tumorstadien aller Gruppen bis zum Eintritt des jeweils ersten Todesfalles innerhalb einer Gruppe ein. Deutlich ist, dass es in unbehandelten Tieren wie auch in mit dem Kontrollvektor (Ad.DL312) behandelten Tieren zu einem starken Tumorstadium kam. Dieses Wachstum betrug bei den unbehandelten Mäusen bis zum ersten Todesfall am 18. Tag 4709,9% und beim Kontrollvektor bis zum 13. Tag 2428,6%. Während die Behandlung mit Ad.3r.msclL-12 und Doxycyclin ebenfalls zu

einem sichtbaren Tumorwachstum führte (1449,2% am 27. Tag), führte die alleinige Behandlung mit Ad.3r.msclL-12 nach geringfügiger Größenzunahme der Tumoren bis zum 4. Tag zu einer deutlichen Tumorregression. Am 13. Tag hatten diese Mäuse signifikant kleinere Tumoren im Vergleich zu unbehandelten ( $p < 0,001$ ) bzw. mit Ad.DL312 behandelten Mäusen ( $p < 0,001$ ). Allerdings kam es ab Tag 18 bei einem Teil der Mäuse, die nur mit Ad.3r.msclL-12 behandelt wurden, zu Residualtumoren, so dass das durchschnittliche Tumorwachstum am 30. Tag 378,8% betrug.

Das Tumolvolumen betrug bei 50% der Mäuse aus der therapeutischen Gruppe (Ad.3r.msclL-12 ohne Doxycyclin) am 18. Tag nur noch zwischen  $0,53 \text{ mm}^3$  (Abbildung 26 a) und  $14,2 \text{ mm}^3$  (nicht abgebildet). Ab dem 19. bzw. 21. Tag waren diese Tiere tumorfrei. Beim restlichen Teil der gleichen Gruppe kam es zu Residualtumoren von  $67,4 \text{ mm}^3$  (Abbildung 26 b) bzw. von  $170,5 \text{ mm}^3$  (nicht abgebildet). Bei den Mäusen, die mit dem Kontrollvektor behandelt wurden, betrug das Tumolvolumen am 18. Tag ca.  $2,7 \times 10^3 \text{ mm}^3$  (Abbildung 26 c) und bei den unbehandelten Mäusen ca.  $3,2 \times 10^3 \text{ mm}^3$  (Abbildung 26 d).



**Abbildung 26: Fotografien von Balb/c-Mäusen 18 Tage nach Beginn der Tumorthherapie**

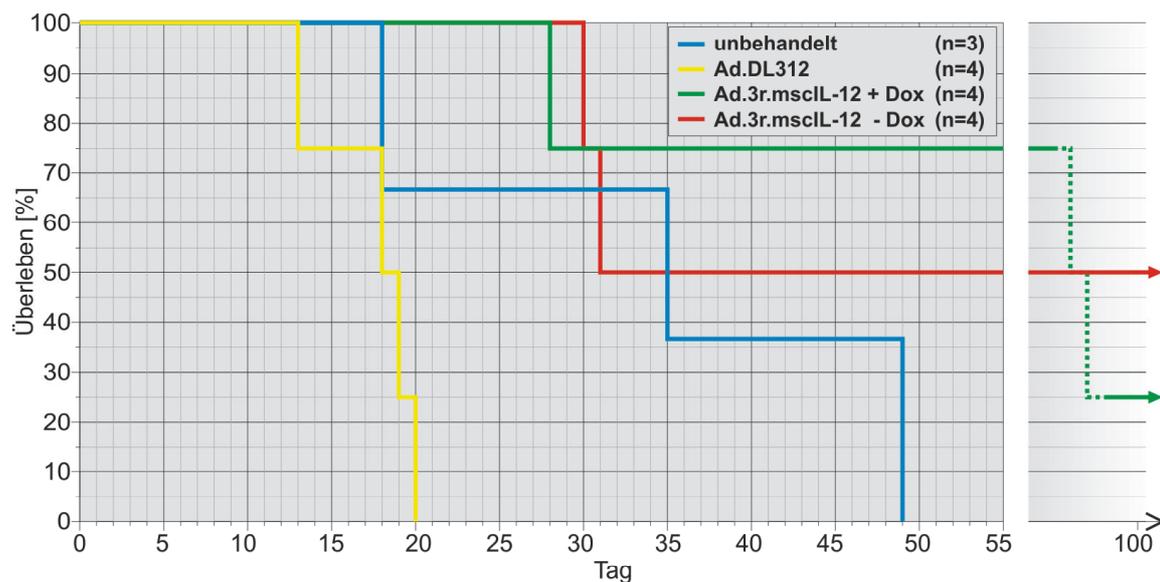
Abbildung a): Maus aus der Ad.3r.msclL-12-Gruppe mit einem Tumolvolumen von  $0,53 \text{ mm}^3$ .

Abbildung b): Maus aus der Ad.3r.msclL-12-Gruppe mit einem Residualtumolvolumen von  $67,4 \text{ mm}^3$ .

Abbildung c): Maus aus der Kontrollgruppe (Ad.DL312) mit einem Tumolvolumen von ca.  $2,7 \times 10^3 \text{ mm}^3$ .

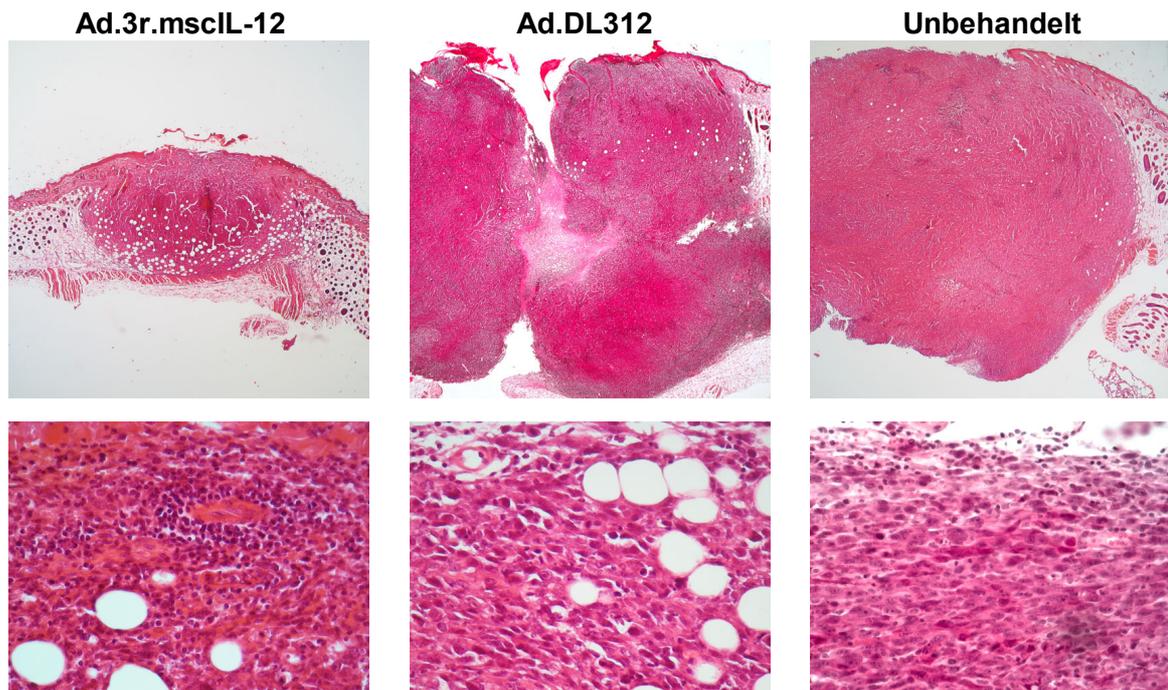
Abbildung d): unbehandelte Maus mit einem Tumolvolumen von ca.  $3,2 \times 10^3 \text{ mm}^3$ .

Die mit dem Kontrollvektor behandelten Tiere verstarben zwischen dem 13. und 20. Tag, die unbehandelten Tiere zwischen dem 18. und 49. Tag (siehe Abbildung 27). Die Tiere der therapeutischen Gruppe (Ad.3r.msclL-12), welche einen Residualtumor hatten, verstarben am 30. bzw. 31. Tag, während die tumorfreien Tiere dieser Gruppe ein Langzeitüberleben über 100 Tage hinaus zeigten (50%, siehe Abbildung 27). Für diesen Vektor resultierte demnach ein Überlebensvorteil im Vergleich zu den Negativkontrollen. Die Behandlung mit Ad.3r.msclL-12 und Doxycyclin führte bei einer Maus ab dem 20. Tag zur kompletten Tumorregression, während eine andere am 28. Tag starb, so dass 75% am Leben waren (siehe Abbildung 27). 2 der restlichen 3 Mäuse verstarben noch nach dem Dokumentationszeitraum zwischen dem 60. und 80. Tag, so dass für diese Gruppe ein Überleben von 25% resultierte. Dieses Ergebnis lässt auf einen Interleukin-12-supprimierenden Effekt von Doxycyclin und so auf eine geringere Therapiewirkung schließen.



**Abbildung 27: Darstellung des Überlebens von Balb/c-Mäusen nach intratumoraler Virusbehandlung**  
 Alle unbehandelten (blau) bzw. mit DL312 behandelten (gelb) Tiere verstarben bis zum 49. Tag. Insgesamt 3 der 8 Mäuse, die mit IL-12-kodierenden Adenoviren behandelt wurden (grün, rot) überlebten, wobei von den Mäusen, die mit Ad.3r.msclL-12 und Doxycyclin (grün) behandelt wurden, 25% und von den Mäusen, die nur mit Ad.3r.msclL-12 (rot) behandelt wurden, 50% ein Langzeitüberleben zeigten.

Abbildung 28 zeigt die histologische Darstellung der subkutanen Tumoren am 6. Tag nach Behandlungsbeginn. Die unteren Abbildungen sind die jeweiligen Ausschnittsvergrößerungen. Deutlich zu erkennen ist der Größenunterschied zwischen dem mit Ad.3r.msclL-12 behandelten Tumor, welcher deutlich kleiner ist, und den mit Ad.DL312 behandelten bzw. den unbehandelten Tumoren. Auch fehlt bei den Letzteren die signifikante lymphozytäre Infiltration des Tumors, welche bei dem mit Ad.3r.msclL-12 behandelten Tumor gut zu sehen ist.



**Abbildung 28: Histologische Darstellung der subkutanen Tumoren (HE-Färbung)**

Die Bilder der oberen Reihe weisen eine 6,25fache, die der unteren Reihe eine 100fache Vergrößerung auf. Der mit Ad.3r.mscIL-12 behandelte Tumor ist im Vergleich zu den anderen beiden Tumoren deutlich kleiner und weist eine signifikante lymphozytäre Infiltration auf.

## 5. Diskussion

### 5.1. Adenovirale Tetracyclin-supprimierbare Zytokingenexpression für die Gentherapie kolorektaler Karzinome

Die Gentherapie stellt zu den etablierten Verfahren eine alternative Therapieoption für das kolorektale Karzinom dar. Hierbei ist eine zeitlich begrenzte Expression therapeutischer Gene erwünscht, da es hier nur auf eine Fremdgenexpression bis zur Aktivierung einer antitumoralen Immunität ankommt.

Zytokine werden aufgrund ihrer Fähigkeit, das körpereigene Immunsystem zu regulieren, erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzt. Ein wesentlicher Vorteil der Therapie mit Zytokinen ist, dass die lokale intratumorale Gabe ausreicht, um eine systemische antitumorale Wirkung zu erreichen (Block *et al.*, 1998). Durch diese intratumorale Therapie wird die Zytokinproduktion lokal begrenzt und somit systemischen Nebenwirkungen durch die Expression potenziell toxischer Zytokingene entgegengewirkt. Trotz der höheren Sicherheit bei einer intratumoralen Therapie, besteht die Möglichkeit einer versehentlichen systemischen Applikation von Zytokinen durch eine Injektion in Tumorgefäße. Außerdem besteht die Gefahr einer Diffusion von Zytokinen aus dem Tumor heraus mit systemischen Nebenwirkungen. Aus diesen Gründen stellt eine regulierbare Genexpression gegenüber einer konstitutiven Expression einen Vorteil dar. Erwünscht wird ein regulierbares An- und Abschalten der Expression, wobei es im aktivierten Zustand zu hohen und im supprimierten Zustand zu niedrigen Transgenexpressionen kommen soll. Das für diese Arbeit verwendete Tet-OFF-System zeigt im angeschalteten Zustand eine ca. 4254fach höhere Reportergenexpression im Vergleich zur Expression unter der Kontrolle des häufig verwendeten CMV-Promotors. Außerdem lässt sich die Zytokingenexpression *in vitro* unter geringer Doxycyclingabe bis zu 6000fach supprimieren, was einen wichtigen Sicherheitsfaktor in der Gentherapie darstellt (Block *et al.*, 2003).

Die Vorteile der Tetracyclin-regulierbaren Systeme bestehen in der hohen Regulierbarkeit und in der Verwendung von dem in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik gut bekannten Tetracyclin als Suppressor bzw. Induktor. Tetracyclin besitzt eine hohe Affinität zum tetR, so dass es zu geringeren Nebenwirkungen kommt als bei Progesteron- und Rapamycin-Aktivatoren (A-Mohammadi und Lotze, 2000). Außerdem kann Tetracyclin durch seine Derivate ersetzt werden. Die Entscheidung für das in dieser Arbeit verwendete Doxycyclin basiert auf der Tatsache, dass Doxycyclin vorteilhaftere pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften besitzt. Es hat eine effiziente orale Absorptionsrate, eine sehr gute Gewebepenetration, eine gute hepatische Ausscheidungsrate, eine lange Halbwertszeit (14-22 Stunden) und auch den längsten regulierenden Effekt (A-Mohammadi *et al.*, 1997), was bei der Regulation von potenziell toxi-

schen Transgenen wie IL-12 und IL-18 eine sinnvolle Eigenschaft darstellt. Außerdem kann eine starke Suppression der Transgenexpression schon mit sehr niedrigen nicht-toxischen Doxycyclinkonzentrationen unter 2 µg/ml erreicht werden (Block *et al.*, 2003).

Der Vorteil des Tet-OFF-Systems gegenüber dem Tet-ON-System ist eine höhere Regulationskapazität in humanen Kolonkarzinomzellen (Puls, 2004), was durch die Restaffinität des rTA zum Operator im abgeschalteten Zustand des Tet-ON-Systems erklärbar ist (Urlinger *et al.*, 2000). Außerdem hat das Tet-OFF-System gegenüber dem Tet-ON-System in der antitumoralen Gentherapie einige Vorteile. Da bei Verwendung des Tet-OFF-Systems Doxycyclin nur bei Auftreten von starken Nebenwirkungen verabreicht wird, braucht ein durch Tumor belasteter Patient nicht zusätzlich langfristig durch Doxycyclin beeinträchtigt werden. Überdies reagiert das Tet-OFF-System aufgrund der langen Halbwertszeit von Doxycyclin (14-22 Stunden) wesentlich schneller auf die Gabe von Doxycyclin mit einer Genexpressionsabnahme als das Tet-ON-System nach dem Absetzen von Doxycyclin.

Das in dieser Arbeit verwendete p40/p35-Fusionsprotein des IL-12 zeigt einige Vorteile gegenüber dem heterodimeren IL-12. Einerseits besitzt es eine höhere Bioaktivität (Block *et al.*, 2003) und andererseits eine höhere Sezernierungsrate (zusammenfassend in Carra *et al.*, 2000). Außerdem wird durch das Fusionsprotein das Problem der ungleichen Sekretion der IL-12-Untereinheiten und somit das Problem der Bildung inhibitorischer p40-Homodimere umgangen (siehe 2.4.3.).

Obwohl bei der zytokingestützten adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen die Zytokine IL-12 und IL-18 als besonders potent gelten, und obwohl die Untersuchung der Bioaktivität der unterschiedlichen Zytokinverhältnisse die stärkste IFN- $\gamma$ -Induktion bei einem IL-12-/IL-18-Verhältnis von 1:1 ergab (siehe 4.1.8.), wurde in dieser Arbeit auf die Verwendung von IL-18 in der Tumorthherapie von Mäusen verzichtet. Diese Entscheidung basierte auf mehreren Begebenheiten:

Die kombinierte Gabe von IL-12 und IL-18 führt zu stärkeren Nebenwirkungen als die alleinige Gabe eines dieser Zytokine. Die kombinierte intraperitoneale Gabe von IL-12 und IL-18 führte im Vergleich zur Einzelgabe in Mäusen zu einer fettigen Leberdegeneration mit Transaminasenanstieg, zum Anstieg der Fibrinogenkonzentration im Serum, zur Reduktion der Thrombozytenzahl und zur Reduktion der ATP-Konzentration in der Leber und der Parenchymdurchblutung. Außerdem kam es zum Gewichtsverlust (Kaneda *et al.*, 2003).

Der Grund für die Entscheidung für Ad.3r.mscIL-12 und gegen Ad.3r.mIL-18 lag in der Tatsache, dass sich IL-12 in mehreren Studien sehr wirksam in der Tumorthherapie erwies (Brunda *et al.*, 1993; Fallarino *et al.*, 1996; Noguchi *et al.*, 1996; Rook *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2000). IL-12 ist teilweise sogar potenter in der Tumor-

therapie als IL-18. IL-12-Gen-exprimierende Mammakarzinomzellen zeigten eine stärkere antitumorale Effizienz in Mäusen als IL-18-Gen-exprimierende Mammakarzinomzellen (Coughlin *et al.*, 1998). Ebenfalls zeigte der in dieser Arbeit durchgeführte Bioassay, dass bei einer alleinigen Inkubation von Lymphozyten mit IL-12-Überständen höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen produziert wurden als bei einer alleinigen Inkubation mit IL-18-Überständen (siehe 4.1.8.).

## 5.2. Die Sequenz des mscIL-12-Gens: Bewertung der Mutationen

Für die Überprüfung der Sequenz des mscIL-12-Gens von pAd.3r.mscIL-12 wurde dieses Gen nach der Methode von Sanger und Mitarbeitern (1977) sequenziert. Verglichen mit den publizierten Sequenzen (NCBI a; NCBI b) wurden fünf abweichende Punktmutationen gefunden (siehe 4.1.2.).

Die erste Mutation liegt im Genabschnitt der Signalsequenz der p40-Untereinheit (bp 10; T→G). Hieraus ergibt sich ein Austausch der vierten Aminosäure im Genprodukt, was zu der amphiphilen Aminosäure Glycin anstelle des ebenfalls amphiphilen Cysteins führt (C4G).

Eine weitere Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch führt, wurde in dem Genabschnitt für die p40-Untereinheit nachgewiesen (bp 481; T→C). Im Genprodukt befindet sich dadurch an Position 160 die hydrophobe Aminosäure Prolin anstelle des amphiphilen Serins (S160P).

Zwei weitere Mutationen des p40-Gens sowie eine Mutation im p35-Gen (bp 486, 972, 1152; T→C, G→A, A→G) haben keinen verändernden Einfluss auf die Aminosäuresequenz von mscIL-12.

Ein weiterer Unterschied zu der publizierten Sequenz ist ein zusätzliches Startcodon und ein Alanin kodierendes Triplet vor dem natürlichen Startcodon im Genabschnitt der p40-Untereinheit (siehe 4.1.2.), was vermutlich ein Klonierungsartefakt darstellt.

Die Entscheidung, mit diesem Transgen zu arbeiten, basiert auf Expressionstests und einem Bioassay mit diesem murinen single-chain-IL-12, welche zeigten, dass die oben beschriebenen Veränderungen zu einem Genprodukt führen, welches sowohl aus infizierten Zellen ausgeschleust wird als auch Lymphozyten zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion veranlasst. Diese IFN- $\gamma$ -Produktion war sogar stärker als die vom adenoviral exprimierten heterodimeren IL-12 (Block *et al.*, 2003).

Im nachhinein zeigten auch die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionstests mit MCA-26-Zellen (siehe 4.1.5.) und HT-29-Zellen (siehe 4.1.7.) und der Bioassay (siehe 4.1.8.), dass trotz der oben beschriebenen Veränderungen eine Ausschleusung und Bioaktivität des murinen single-chain-IL-12 vorhanden waren.

### 5.3. Charakterisierung Zytokin-kodierender Vektoren

#### 5.3.1. Die Regulationskapazität von Ad.3r.mscIL-12 in MCA-26-Zellen

Aufgrund der potenziell toxischen und sogar letalen Nebenwirkungen von IL-12 ergibt sich aus der Regulierbarkeit der Genexpression von Ad.3r.mscIL-12 ein Sicherheitsgewinn bei der Verwendung in der Gentherapie maligner Erkrankungen. Vor der Anwendung dieser Vektoren in der Tumorthherapie von Mäusen ist es wichtig, zu wissen, ob sich Tumorzellen mit Ad.3r.mscIL-12 transfizieren lassen und ob die Regulierbarkeit bei hohen Virusgaben noch erhalten bleibt. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit murine Kolonkarzinomzellen (MCA-26-Zellen) mit verschiedenen Ad.3r.mscIL-12-Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zytokinkonzentrationen aus den Überständen mittels ELISA bestimmt (siehe 4.1.5.). Bei einer m.o.i. von 100 zeigte sich eine Regulationskapazität von bis zu 639fach, die auf den Faktor 117 bei einer m.o.i. von 1000 absank. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Genexpression von Ad.3r.mscIL-12 sogar bei höheren Mengen an infektiösen Partikeln regulieren lässt. Eine hohe Regulationskapazität ist wichtig, um *in vivo* auf Nebenwirkungen reagieren zu können.

#### 5.3.2. Die Regulationskapazität von Ad.3r.mIL-18 in MCA-26-Zellen

Wie Interleukin-12 hat auch Interleukin-18 toxische Nebenwirkungen, was bei der Anwendung von IL-18 in der Gentherapie maligner Erkrankungen einen limitierenden Faktor darstellt. Somit erweist sich auch hier die Verwendung der regulierbaren Genexpression als vorteilhaft. Die Regulationskapazität ist besonders bei hohen Zytokinkonzentrationen wichtig, da hier *in vivo* Nebenwirkungen erwartet werden müssen. Somit wurde in dieser Arbeit die Regulierbarkeit des Ad.3r.mIL-18 nach Infektion von MCA-26-Zellen bei einer m.o.i. von 1000 untersucht (siehe 4.1.6.). Es zeigte sich nach einer 24-stündigen Inkubation eine 276,3fache Supprimierbarkeit, was die Sicherheit dieses Tet-OFF-Systems bestätigte.

Aufgrund der Tatsache, dass während der Durchführung dieser Arbeit entschieden wurde, die Wirkung von Ad.3r.mIL-18 nur *in vitro* zu testen (siehe 5.1.), wurde auf eine genauere Charakterisierung mit verschiedenen m.o.i. verzichtet. Hier war die Aussage, dass sich die Zellen transfizieren lassen und dass die Regulierbarkeit bei 1000 m.o.i. vorhanden ist, ausreichend.

### 5.3.3. Die geringe Ausbeute von synthetisiertem IL-18 in HT-29-Zellen im Hinblick auf dessen Ausschleusungsverhalten

Für die in dieser Arbeit durchzuführende Bioaktivitätsmessung von IL-12-/IL-18-Verhältnissen wurden zytokinhaltige Überstände gewonnen. Hierfür wurden mehrere Kulturen von gut transfizierbaren HT-29-Zellen mit 600 m.o.i. Ad.3r.msclL-12 bzw. Ad.3r.mIL-18 infiziert. Nach 24 und nach 45 Stunden wurden die Zytokinkonzentrationen aus den Überständen ermittelt (siehe 4.1.7.). Die Überstände mit der höchsten Ausbeute wurden für den Bioassay verwendet.

Obwohl in beiden Fällen nach 45 Stunden eine höhere Zytokinausbeute zu sehen war, fiel auf, dass die IL-12-Konzentration mit  $1,5 \times 10^8$  pg/ml deutlich höher lag als die IL-18-Konzentration, welche nur  $3 \times 10^4$  pg/ml betrug.

Da die Transfektionseffizienz von Ad.3r.msclL-12 und Ad.3r.mIL-18 sehr wahrscheinlich gleich ist, da beide Viren sich bei den hierfür benötigten Faktoren nicht unterscheiden sollten, ist die Erklärung durch einen Ausschleusungsunterschied näherliegender.

Während das msclL-12-Gen eine Signalsequenz enthält, besitzt das IL-18-Gen wie das IL-1-Gen keine Signalsequenz (Hara *et al.*, 2001). Die IL-18-mRNA kodiert für ein Precursorprotein, von dem mit Hilfe des *IL-1B-converting-enzymes* (ICE) eine 35 Aminosäuren lange Peptidsequenz abgespalten wird (Ushio *et al.*, 1996), wonach die Ausschleusung des biologisch aktiven IL-18 erleichtert wird (zusammenfassend in RDI). Die Entstehung von biologisch aktivem IL-18 und die IL-18-Ausschleusung sind demnach vom Vorhandensein eines ICEs abhängig, so dass es bei Zellen, welche kein oder nur wenig ICE produzieren, zu keiner oder nur zu einer geringen IL-18-Ausschleusung kommt. Um die Abhängigkeit von dem Enzym ICE zu umgehen, wurde ein innerhalb der Arbeitsgruppe konstruiertes IL-18-Gen verwendet, welches nur den Teil der IL-18-cDNA für das biologisch aktive Protein mit einem zusätzlich eingeführten Startcodon enthält. Zusätzlich enthält dieses IL-18-Gen vor dem Startcodon eine Kozak-Sequenz zur Erhöhung der Genexpression. Trotz der Verwendung dieser DNA-Fragmente kam es in dieser Arbeit im Vergleich mit IL-12-transfizierten Zellen zu einer niedrigeren Zytokinkonzentration im Überstand von HT-29-Zellen. Für diese Tatsache sind zwei Erklärungen möglich:

Vermutlich wird für die IL-18-Ausschleusung ein Ausschleusungssignal benötigt, das beim natürlichen IL-18-Protein durch die Abspaltung der 35 Aminosäuren langen Peptidsequenz durch das ICE gewährleistet wird. Ist der Vorgang der Abspaltung durch das ICE selbst der Signalgeber für die Ausschleusung, fehlt es bei dem in dieser Arbeit adenoviral kodierten Protein, da hier die Aminosäurenabspaltung umgangen wird (siehe oben). Andererseits ist es vorstellbar, dass durch die Peptidabspaltung an dem verbliebenen nativen reifen IL-18 eine Signalsequenz für die Ausschleusung entsteht.

Durch das Einfügen eines Startcodons bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gen tritt bei dem synthetisierten Protein an dieser Stelle ein Methioninrest auf, wodurch eine hier vorhandene Signalsequenz verändert wird. Durch den zusätzlichen Einbau einer Signalsequenz vor das in dieser Arbeit verwendete IL-18-cDNA-Konstrukt könnte das Problem der erschwerten Proteinausschleusung umgangen werden. Dies bestätigten auch Hara und Mitarbeiter (2001), die ein Gen konstruierten, das aus der Signalsequenz von Interferon- $\beta$  und der reifen IL-18 cDNA bestand. Sie verglichen den IL-18-Überstand von Nierenkarzinomzellen, welche mit nativer IL-18 cDNA bzw. mit der cDNA des neuen IL-18-Konstruktes zur IL-18-Produktion angeregt wurden. Obwohl die mRNA-Konzentration in beiden Fällen fast gleich hoch war, zeigten nur die Zellen, welche mit dem neuen Konstrukt transfiziert wurden, eine nennenswerte IL-18-Konzentration im Überstand.

#### **5.3.4. IFN- $\gamma$ -Synthese nach Stimulation mit einer IL-12/IL-18-Kombination**

Die Bioaktivität der Zytokine wurde durch die IFN- $\gamma$ -Synthese in murinen Lymphozyten nach einer 24-stündigen Inkubation mit IL-18- und IL-12-haltigen HT-29-Kulturüberständen ermittelt. Besonderen Wert wurde in dieser Arbeit auf das Verhältnis beider Zytokine gelegt, bei dem die höchste IFN- $\gamma$ -Produktion erreicht wird (siehe 4.1.8.).

Die höchste IFN- $\gamma$ -Produktion zeigte sich bei einem IL-12/IL-18-Verhältnis von 1:1 und betrug  $2,7 \times 10^3$  pg/ $4 \times 10^4$  Zellen. Auch Micallef und Mitarbeiter (1996) zeigten, dass T-Zellen, welche mit einer Kombination von IL-12 und IL-18 aktiviert wurden, höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen produzierten als IL-12 allein. Nach einer alleinigen Zugabe von IL-12 war die IFN- $\gamma$ -Konzentration in dieser Arbeit mit 372 pg/ $4 \times 10^4$  Zellen höher als nach einer alleinigen Zugabe von IL-18, bei der die IFN- $\gamma$ -Konzentration nur 140 pg/ $4 \times 10^4$  Zellen betrug. Dies lässt auf eine stärkere Bioaktivität von IL-12 schließen, was sich mit dem Ergebnis der stärkeren antitumoralen Wirkung von IL-12 im Vergleich zum IL-18 (Coughlin *et al.*, 1998) deckt.

Trotz der in mehreren Studien beschriebenen Tatsache, dass eine Kombination von IL-12 und IL-18 zu einer stärkeren IFN- $\gamma$ -Produktion führt als eines dieser Zytokine allein (Micallef *et al.*, 1996; Yoshimoto *et al.*, 1998; Fantuzzi *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000), und trotz der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnis, dass die höchste IFN- $\gamma$ -Produktion bei einem IL-12-/IL-18-Verhältnis von 1:1 am höchsten war, wurde bei den in dieser Arbeit folgenden Tierversuchen auf das Interleukin-18 verzichtet (siehe 5.1.).

## 5.4. Diskussion der Versuche mit dem Reporter-gen Luciferase

### 5.4.1. Doxycyclingehalt des Mäusefutters

Aufgrund des hochempfindlichen Tet-OFF-Systems, welches eine ca. 40fach stärkere Sensitivität im Vergleich zu standardisierten *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Verfahren aufweist (Block *et al.*, 2003), dürfen keine relevanten Doxycyclinkonzentrationen vorhanden sein, wenn eine hohe Transgenexpression erwünscht ist. Aus diesem Grunde war es wichtig, das verwendete Mäusefutter auf eine eventuelle Doxycyclinbelastung zu testen. Hierzu wurden mit drei unterschiedlichen Medien (Negativkontrolle, Futterlösung, Positivkontrolle) inkubierte HT-29-Kulturen mit Ad.3r.luc infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Luciferasekonzentrationen in den verschiedenen Kulturüberständen ermittelt. Die produzierten Luciferasekonzentrationen der mit Futterlösung inkubierten Kulturen lagen im Bereich der Luciferasekonzentration der Negativkontrolle (Medium - Dox) und deutlich (24,9fach) über der Konzentration der Positivkontrolle (Futter + Dox) (siehe 4.2.1.). Dies zeigte, dass das Mäusefutter keine ausreichende Doxycyclinkonzentration enthielt, um die Transgenexpression zu supprimieren. Das Ergebnis bestätigte auch die Aussage des Herstellers ssniff, dass das verwendete Futter doxycyclinfrei sei. Das Futter war also für Experimente, bei denen das Tet-OFF-System verwendet werden sollte, tauglich.

### 5.4.2. *In-vivo*-Charakterisierung des Tet-OFF-Systems

Da die Wirksamkeit des Tet-OFF-Systems bisher nur *in vitro* getestet und gezeigt wurde, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob dieses System auch *in vivo* eine sichere Regulationskapazität aufweist. Dazu wurden Mäuse, dessen Trinkwasser doxycyclinhaltig bzw. -frei war, mit  $1 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG Ad.3r.luc infiziert. 7 Tage später wurde der Luciferasegehalt in den Leberhomogenisaten bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante, 605fache Suppression der Luciferasegenexpression durch die Zugabe von Doxycyclin (siehe 4.2.2.). Dieses Ergebnis bestätigte die Wirksamkeit des Tet-OFF-Systems *in vivo*. Eine Transgenexpression kann somit bei einer Gabe von  $1 \times 10^8$  p.f.u. in Mäusen durch Zugabe von Doxycyclin reguliert werden. Eine solche Regulierbarkeit bei hohen Viruskonzentrationen ist bei der Anwendung potenziell toxischer Transgene eine wichtige Voraussetzung für die spätere Anwendung des Tet-OFF-Systems in der Humanmedizin.

## 5.5. Toxizitätsstudie

### 5.5.1. Wahl der Mauslinie C57BL/6

In der Toxizitätsstudie sollte untersucht werden, ob sich die eventuell durch IL-12 auftretenden systemischen Nebenwirkungen in der Tumorthherapie durch eine Doxycyclingabe vermeiden lassen. Außerdem sollte eine subletale IL-12-Dosis herausgefunden werden. Obwohl für die Therapie von murinen Kolonkarzinomen Balb/c-Mäuse verwendet wurden, für die innerhalb dieser Arbeitsgruppe bereits eine syngene Kolonkarzinomzelllinie (MCA-26) vorlag, wurde der vorangehende Toxizitätsversuch mit C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Die Entscheidung für diese Mäuse basiert auf der Tatsache, dass die C57BL/6-Mäuse viel empfindlicher auf IL-12 reagieren als die Balb/c-Mäuse. Mazzolini und Mitarbeiter (2001) zeigten einen signifikanten Unterschied im Überleben dieser beiden Mausstämme nach einer systemischen Gabe IL-12-kodierender Adenoviren. Eine Ad.CMV.mIL-12-Konzentration von  $2,5 \times 10^9$  p.f.u. führte zum Tod aller behandelten C57BL/6-Mäuse während alle Balb/c-Mäuse am Leben blieben. Es wird vermutet, dass diese Abweichung auf einer unterschiedlichen Gentransduktionsrate in Hepatozyten beruht. Es ist sinnvoll, für die Ermittlung der Toxizität und der subletalen Dosis einen auf IL-12 sehr stark reagierenden Mausstamm zu wählen, um den Sicherheitsfaktor in der späteren Therapieanwendung, durch Wahl geringerer IL-12-Dosen, zu verstärken.

Man muss davon ausgehen, dass auch Menschen auf eine IL-12-Gabe unterschiedlich reagieren, so dass es auch hier nicht möglich ist, von der Reaktion eines Behandelten auf die Reaktion eines anderen Behandelten zu schließen. Mazzolini und Mitarbeiter (2001) zeigten eine große Streuung der IFN- $\gamma$ -Konzentration in Überständen IL-12-stimulierter humaner Mononukleärer Blutzellen von unterschiedlichen Personen. Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen reichten von 150 pg/ml bis 13.000 pg/ml. Auch wurden humane Mononukleare Blutzellen, welche von 16 Spendern stammten, mit IL-12-kodierenden Adenoviren infiziert, was ebenfalls zu einem großen Unterschied der IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen führte. Aufgrund dieser Unterschiede in der Reaktion auf eine IL-12-Gabe und der fehlenden Kenntnis der genauen Ursache, muss in späteren klinischen Studien eine intensive Beobachtung erfolgen. Die Möglichkeit schnellen Eingreifens beim Auftreten von Nebenwirkungen sollte gegeben sein.

### 5.5.2. Einschätzung der Ergebnisse der Toxizitätsstudie

Hauptparameter zur Bestimmung der Toxizität und der subletalen Dosis von IL-12 nach intravenöser Injektion von Ad.3r.msclL-12 in C57BL/6-Mäuse waren die Gewichtsabnahme und die Letalität der Tiere. Es fiel auf, dass nach einer Virusinjektion von  $3 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG alle behandelten Tiere starben, wenn sie kein Doxycyclin erhalten hatten. Mäuse, welche mit Doxycyclin versorgt wurden, überlebten diese Dosis. Diese Beobachtung zeigt, dass mit Doxycyclin durch eine Suppression der IL-12-Genexpression ein schützender Effekt erzielt werden kann, welcher auch durch das Gewichtsverhalten dieser beiden Gruppen bestätigt wurde. Während die Mäuse, welche ohne Doxycyclin behandelt wurden, stetig an Gewicht verloren, stieg das Gewicht bei den mit Doxycyclin behandelten Mäusen ab dem 4. Tag nach Virusinjektion wieder an (siehe 4.2.3.).

Im Hinblick auf eine spätere Anwendung am Menschen verdient die Frage nach irreversiblen Folgeschäden eine besondere Aufmerksamkeit. Bei einer Virusdosis von  $1 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG traten diesbezüglich in dieser Arbeit ein Sterbefall und bei 3 von 4 überlebenden Mäusen (75%) neurologische Nebenwirkungen auf, welche mit einer Hemiparese ohne Rekonvaleszenz assoziiert waren. Diese Hemiparese könnte durch entzündungsbedingte Thrombembolien der hirnversorgenden Arterien bedingt sein. Bei einer Virusdosis von  $3 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG starb ebenfalls eine Maus. Die hierbei überlebenden Mäuse zeigten keine Nebenwirkungen. Nach Injektion von  $1 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG traten keine Nebenwirkungen auf, so dass diese Konzentration die maximal tolerable Dosis darstellte.

Die Untersuchung der Organtoxizität von Ad.3r.msclL-12 und deren Doxycyclinabhängigkeit zeigte, dass durch Zugabe von Doxycyclin eine erhebliche Entzündungsreaktion deutlich reduziert werden konnte (siehe 4.2.4.), was die Annahme, dass Doxycyclin einen schützenden Effekt aufweist, bestätigte.

Um eine alleinige toxische Wirkung durch virale Genprodukte und um einen eventuellen organotoxischen Effekt von Doxycyclin ausschließen zu können wurden ebenfalls Mäuse mit einem Adenovirus mit leerer Expressionskassette (Ad.DL312) infiziert bzw. wurde zusätzlich eine virusfreie Maus mit Doxycyclin behandelt (siehe 4.2.4.).

Im Gegensatz zur Infektion mit Ad.3r.msclL-12 führte die Infektion mit  $3 \times 10^9$  p.f.u. Ad.DL312 nur zu marginalen hepatozellulären Einzelzellnekrosen, so dass man davon ausgehen kann, dass die erheblichen Nebenwirkungen bei Mäusen nach Infektion mit hohen Ad.3r.msclL-12-Konzentrationen durch das Interleukin-12 und nicht durch virale Genprodukte verursacht werden. Daraus lässt sich schließen, dass eine potenzielle Kontamination mit replikativen Adenoviren keine wesentliche Rolle bezüglich der Organtoxizität und der systemischen Nebenwirkungen spielt.

Die alleinige Behandlung mit Doxycyclin führte wie erwartet zu keinen histomorphologischen Organveränderungen.

Das Zytokin IL-12 verursacht somit bei intravenöser Anwendung erhebliche Nebenwirkungen, welche allerdings bei Verwendung des Tet-OFF-Systems durch die Zugabe von Doxycyclin deutlich reduziert werden können.

## **5.6. Therapie eines murinen Kolonkarzinommodells**

### **5.6.1. Wahl der Virusdosis für die Tumorthherapie**

Obwohl das Toxizitätsexperiment mit den C57BL/6-Mäusen bei einer intravenösen Gabe von  $1 \times 10^9$  p.f.u./20 g KG Ad.3r.msclL-12 ohne zusätzliche Doxycyclingabe bereits einen Todesfall und bleibende neurologische Ausfälle zeigte, wurde diese Dosis für die Tumorthherapie verwendet. Diese Entscheidung basierte einerseits auf der Tatsache, dass bei der Therapie die für IL-12 weniger sensiblen Balb/c-Mäuse verwendet werden sollten und andererseits darauf, dass die Virusapplikation ausschließlich intratumoral erfolgen sollte, wodurch die IL-12-Synthese weitgehend lokal begrenzt bleibt. Systemische Nebenwirkungen werden durch diese lokale Produktionsbegrenzung minimiert. Dies zeigten auch Bramson JL und Mitarbeiter (1996), welche Mammakarzinom-tragende Mäuse mit intratumoraler Ad.mIL-12.1-Injektion therapierten. Die hierdurch erreichte IL-12-Konzentration stieg intratumoral 24 bis 72 Stunden an und betrug im Maximum 800 ng/ml, während das Maximum im Serum nach 24 Stunden nur 60 ng/ml betrug. Nach 72 Stunden betrug die IL-12-Konzentration im Serum nur noch 10 ng/ml. Eine mit Ad.mIL-12.1 behandelte Maus starb während der Studie, wobei unklar blieb, ob dieser Todesfall zytokinbedingt war.

Sollten selbst bei intratumoraler Therapie zytokinbedingte Nebenwirkungen auftreten, besteht bei dem in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektor eine zusätzliche Sicherheit durch die Option einer postinfektiösen Suppression der Transgenexpression durch das Tet-OFF-System.

### **5.6.2. Analyse der Ergebnisse der Tumorthherapie**

Bei einer intratumoralen Therapie von subkutan wachsenden murinen Kolonkarzinomen mit  $1 \times 10^9$  p.f.u. Ad.3r.msclL-12 sollte die antitumorale Wirkung im nicht supprimierten Zustand maximal vorhanden sein. Dabei wurde bei 50% dieser Mäuse eine vollständige Tumorregression mit einem Langzeitüberleben verzeichnet. Die restlichen Tiere zeigten ein deutlich verlangsamtes Tumorstadium im Vergleich zu unbehandelten und mit Ad.DL312 behandelten Mäusen. Trotz des langsameren Tumorstadiums verstarben die restlichen 50% (siehe 4.2.5.).

Diese Tatsache lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die zelluläre Immunität im Wesentlichen auf zwei Ebenen basiert: Einer unspezifischen Immunantwort durch NK-Zellen und einer spezifischen Immunantwort durch T-Zellen. Die durch IL-12 vermittelte NK-Zell-Immunantwort ist wahrscheinlich für die Verlangsamung des Tumorwachstums verantwortlich. Die Tumorzellen werden von den NK-Zellen direkt angegriffen und somit das Wachstum gestoppt. Eine über die IL-12-Genexpression hinausgehende antitumorale Wirkung wird vermutlich von den T-Zellen vermittelt, was dann zur langfristigen spezifischen und systemischen Immunität und somit zum Langzeitüberleben führt. Allerdings können einzelne Tumorzellen durch weitere Mutationen bzw. Differenzierungen ihre Immunogenität verändern und sich so einer vorher entwickelten spezifischen Immunität entziehen.

Es soll angemerkt werden, dass für die Bekämpfung von Tumorzellen durch das Immunsystem nicht alleine eine Aktivierung des Immunsystems ausreichend ist, sondern auch eine gewisse Immunogenität des Tumors benötigt wird.

Auch wenn nicht alle mit Ad.3r.mscIL-12 behandelten Tiere überlebten, ist eindeutig und entscheidend, dass alle unbehandelten Tiere und alle Tiere, die mit Ad.DL312 behandelt wurden, ein stetiges Tumorwachstum aufzeigten und letztendlich verstarben, während 50% der mit Ad.3r.mscIL-12 behandelten Mäuse ein Langzeitüberleben zeigten. Bei den unbehandelten Mäusen und bei den Mäusen, die durch Viren mit leerer Expressionskassette behandelt wurden, befand sich das Immunsystem somit in einem nicht ausreichend stimulierten Zustand, um gegen die verwendeten Tumoren reagieren zu können. Dies zeigt auch die histologische Darstellung der subkutanen Tumoren (siehe Abbildung 28), bei der eine deutliche Verkleinerung und vermehrte lymphozytäre Besiedlung der mit Ad.3r.mscIL-12-behandelten Tumoren im Vergleich zu den unbehandelten bzw. mit Ad.DL312 behandelten Tumoren zu verzeichnen ist. Dieses Ergebnis bestätigt die Wirksamkeit von Interleukin-12 in der Tumorthherapie.

Wurde den mit Ad.3r.mscIL-12 behandelten Mäusen während der Tumorthherapie längerfristig Doxycyclin verabreicht, was im Hinblick auf eine klinische Anwendung nur bei Auftreten von Nebenwirkungen indiziert ist, wurde durch die supprimierte IL-12-Genexpression die therapeutische Wirkung von IL-12 eingeschränkt. Es kam hier nur zu einer Überlebensrate von 25%. Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoll, zu erforschen, ob eine postinfektiöse, kurzfristige Doxycyclingabe bei Auftreten von relevanten Nebenwirkungen auch zu einer Therapieeinschränkung führen würde. Falls sich dies verneinen lässt und falls relevante IL-12-Nebenwirkungen durch postinfektiöse, kurzfristige Doxycyclingaben behoben werden können, hätte man mit dem neuartigen IL-12-kodierenden Vektor unter der Kontrolle des Tet-OFF-Systems ein hochsicheres und effizientes Tumortherapieverfahren zur Verfügung.

## 5.7. Ausblick

### 5.7.1. Postinfektiöse Kontrolle der Transgenexpression

Die *In-vivo*-Charakterisierung des Tet-OFF-Systems mit Luciferase- bzw. IL-12-kodierenden Adenoviren zeigte eine starke Suppression der Transgenexpression durch eine orale Doxycyclingabe.

Bei der Charakterisierung mit Luciferase-kodierenden Adenoviren äußerte sich die Expressionskontrolle durch eine 605fache Suppression der Transgenexpression bei zusätzlicher Doxycyclingabe in das Trinkwasser von Mäusen, welche intravenös mit Ad.3r.luc infiziert wurden. Bei Mäusen, welche mit Ad.3r.msclL-12 infiziert wurden, zeigte die Expressionskontrolle eine Toxizitätsminderung bei Mäusen, welche zusätzlich Doxycyclin erhielten.

Atkins und Mitarbeiter (1997) beschrieben, dass die Nebenwirkungen von intravenös verabreichtem rekombinanten IL-12 beim Menschen nach 8-12 Stunden einsetzen. Nach einer Infektion durch Adenoviren mit einer Tetracyclin-supprimierbaren IL-12-Genexpression würde das Abklingen der Nebenwirkungen nach einer Doxycyclingabe und einer damit verbundenen Suppression der IL-12-Genexpression vermutlich einige Zeit in Anspruch nehmen. Der Grund hierfür liegt an der hohen, 5-21 Stunden dauernden, Halbwertszeit von humanem IL-12 (Atkins *et al.*, 1997; Bajetta *et al.*, 1998; Motzer *et al.*, 1998; Portielje *et al.*, 1999) und sämtlicher beteiligter Proteine. Es wäre vorstellbar, dass das noch vor der Doxycyclingabe synthetisierte IL-12 den IFN- $\gamma$ -Spiegel und die damit verbundenen Nebenwirkungen auch nach der Gabe von Doxycyclin noch kurzfristig ansteigen lässt.

Über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehend wären Untersuchungen sinnvoll, welche die *In-vivo*-Kinetik und damit den Sicherheitsaspekt des regulierbaren Promotors der verwendeten Adenoviren tiefergehend beschreiben. Von Interesse wäre somit hier die Wirkung einer Doxycyclingabe nach bereits bestehenden toxischen Nebenwirkungen. Besonders wichtig wäre es, die zeitliche Verzögerung vom Einsetzen der Doxycyclingabe bis zum Abklingen der toxischen Nebenwirkungen herauszufinden. Außerdem wäre es zusätzlich sinnvoll, die Verwendung von IL-12- und IFN- $\gamma$ -Antikörpern bei Auftreten von Nebenwirkungen nach Ad.3r.msclL-12-Gabe zu testen. Mit diesen Antikörpern könnte die Wirkung der Zytokine vor ihrem Abbau neutralisiert werden, was ein zusätzlicher Sicherheitsgewinn bei der Anwendung von IL-12-kodierenden Adenoviren in der Tumorthherapie wäre.

### 5.7.2. Weitere Untersuchung der durch die Gentherapie entstandenen Tumorimmunität

Die Therapie der kolorektalen Tumoren mit Ad.3r.msclL-12 ohne Zugabe von Doxycyclin hat bei 50% der behandelten Mäuse zu einer Totalregression der subkutanen Tumoren und zu einem Langzeitüberleben geführt.

Um zu untersuchen, ob die geheilten Tiere nach dem beschriebenen Versuch über eine systemische Immunität verfügen, bietet es sich an, diese Tiere einem Challenge-Versuch durch eine wiederholte Tumorapplikation mit der identischen Zelllinie in die gegenüberliegende Flanke zu unterziehen und zu beobachten, ob sich Tumoren ausbilden.

Bei diesem innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuch wurden die drei Mäuse mit der kompletten Tumorregression aus dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuch (siehe 4.2.5.) und zwei Mäuse mit einer totalen Tumorregression aus einem vergleichbaren Tumortherapieversuch, der von weiteren Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (Daten nicht abgebildet), verwendet. Bei 3 von 5 Mäusen (60%) wurde eine systemische Immunität dadurch bestätigt, dass die neu applizierten Tumorzellen keinen Tumor bildeten.

Mazzolini und Mitarbeiter (1999) konnten nach einer Therapie eines Kolonkarzinoms mit Ad.CMV.iL-12 bei 96,4% der geheilten Mäuse durch einen Challenge-Versuch eine systemische Immunität nachweisen. In einem Challenge-Versuch bei Mäusen mit einem, durch die Therapie mit Ad.mIL-12.1 geheilten, Mammakarzinom kam es ebenfalls zu einer systemischen Immunität (90,9%) (Bramson JL *et al.*, 1996). Allerdings soll darauf hingewiesen werden, dass eine systemische Immunität von Maus- und Zelllinie abhängig ist und somit die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen nur schwer vergleichbar sind.

Desweiteren wäre es sinnvoll, die immunisierten Tiere mit einer syngenen organfremden Tumorzelllinie einem Challenge zu unterziehen, um zu überprüfen, ob diese Immunität für nur einen Tumor spezifisch ist.

Parallel zu dieser Arbeit laufen innerhalb der Arbeitsgruppe Untersuchungen an humanen Kolonkarzinombiopsien mit einem Adenovirus, das für das humane single-chain-iL-12 kodiert. Dieses Virus wurde von Herrn Dr. rer. nat. H. Wulff generiert und *in vitro* charakterisiert (Manuskript in Vorbereitung). Es soll für eine spätere Anwendung in der Therapie humaner kolorektaler Karzinome Verwendung finden.

## 6. Zusammenfassung

Die Therapie kolorektaler Karzinome –einer der häufigsten malignen Erkrankungen der Welt- ist trotz der heute möglichen Radio- und Kombinationschemotherapien nicht zufriedenstellend. Die Gentherapie stellt hierbei eine zu den etablierten Verfahren mögliche Therapieoption dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von adenoviraler Tetracyclin-supprimierbarer Zytokingenexpression die Therapie eines murinen Kolonkarzinommodells getestet. Zuvor wurde der Sicherheitsaspekt des verwendeten Tet-OFF-Systems untersucht. Es wurden die in der Therapie maligner Erkrankungen als potent geltenden Zytokine Interleukin-12 und Interleukin-18 verwendet.

Es wurde ein adenoviraler Vektor für eine Doxycyclin-supprimierbare IL-18-Genexpression generiert, während ein entsprechender IL-12-kodierender Vektor bereits vorlag. Nach der Amplifikation von Ad.3r.msclL-12 und Ad.3r.mIL-18 erfolgte die *In-vitro*-Charakterisierung in murinen Kolonkarzinomzellen (MCA-26-Zellen). Für beide Vektoren zeigte sich eine Transfizierbarkeit. Die maximale Regulationskapazität durch Doxycyclin lag für Ad.3r.msclL-12 bei 100 m.o.i. und betrug 639fach. Bei einer m.o.i. von 1000 lag die Supprimierbarkeit der IL-12-Genexpression bei 117fach und die Supprimierbarkeit der IL-18-Genexpression bei 276,3fach. Die Bioaktivitätsmessung beider Zytokine in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zeigte mit  $2,7 \times 10^3$  pg/ $4 \times 10^4$  Zellen die höchste IFN- $\gamma$ -Synthese in Mauslymphozyten bei einem IL-12/IL-18-Verhältnis von 1:1. Nach einer alleinigen Zugabe von IL-12 war die IFN- $\gamma$ -Konzentration mit 372 pg/ $4 \times 10^4$  Zellen höher als nach einer alleinigen Zugabe von IL-18, bei der die IFN- $\gamma$ -Konzentration nur 140 pg/ $4 \times 10^4$  Zellen betrug.

Nachdem die Untersuchung des Mäusefutters keine relevanten Doxycyclinkonzentrationen zeigte und die *In-vivo*-Charakterisierung des Tet-OFF-Systems mit Ad.3r.luc in Mäusen seine Wirksamkeit (605fache Supprimierbarkeit) bestätigte, wurde der Sicherheitsaspekt von Ad.3r.msclL-12 durch intravenöse Gabe dieses Vektors in C57BL/6-Mäuse getestet. Es wurde eine subletale Dosis von  $1 \times 10^8$  p.f.u./20 g KG detektiert. Durch die Zugabe von Doxycyclin konnten kritische Nebenwirkungen verhindert werden. Die Effizienz von Ad.3r.msclL-12 wurde bei Balb/c-Mäusen in einem subkutanen Tumormodell aus syngenem kolorektalen Karzinomzellen (MCA-26-Zellen) untersucht. Nach intratumoraler Virusapplikation ( $1 \times 10^9$  p.f.u.) zeigte sich bei 50% der Mäuse, die mit Ad.3r.msclL-12 ohne zusätzliche Doxycyclingabe behandelt wurden, im Vergleich zu den anderen Gruppen (Ad.DL312, unbehandelt, Ad.3r.msclL-12 + Dox) ein deutliches Langzeitüberleben. Diese Arbeit macht deutlich, dass mit dem Vektor Ad.3r.msclL-12 ein hochsicheres und effizientes Tumorthapieverfahren zur Verfügung steht.

## 7. Literaturverzeichnis

Ajiki T, Murakami T, Kobayashi Y, Hakamata Y, Wang J, Inoue S, Ohtsuki M, Nakagawa H, Kariya Y, Hoshino Y, Kobayashi E (2003): Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site. *Cancer Gene Ther* 10 (4): 318-329

Alves J: Gentechnische Veränderung von Pro- und Eukaryontenzellen – Viren und ihre Anwendungen in Gentechnologie und Gentherapie.

[http://www.bpc.mh-hannover.de/lehre/alves/Gensich\\_Vorles\\_05.pdf](http://www.bpc.mh-hannover.de/lehre/alves/Gensich_Vorles_05.pdf). S. 1-30

Agha-Mohammadi S, Alvarez-Vallina L, Ashworth LJ, Hawkins RE (1997): Delay in resumption of the activity of tetracycline-regulatable promoter following removal of tetracycline analogues. *Gene Ther* 4 (9): 993-997

Agha-Mohammadi S, Lotze MT (2000): Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J Clin Invest* 105 (9): 1177-1183

Alba R, Bosch A, Chillon M (2005): Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 12 (1): 18-27

Anderson CW, Young ME, Flint SJ (1989): Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology* 172 (2): 506-512

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

Andrews KJ, Ribas A, Butterfield LH, Vollmer CM, Eilber FC, Dissette VB, Nelson SD, Shintaku P, Mekhoubad S, Nakayama T, Taniguchi M, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS (2000): Adenovirus-interleukin-12-mediated tumor regression in a murine hepatocellular carcinoma model is not dependent on CD1-restricted natural killer T cells. *Cancer Res* 60 (22): 6457-6464

Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, DuBois JS, Ritz J, Sandler AB, Edington HD, Garzone PD, Mier JW, Canning CM, Battiato L, Tahara H, Sherman ML (1997): Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3 (3): 409-417

- Bajetta E, Del Vecchio M, Mortarini R, Nadeau R, Rakhit A, Rimassa L, Fowst C, Borri A, Anichini A, Parmiani G (1998): Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 4 (1): 75-85
- Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF (1998): Cutting edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 160 (8): 3642-3647
- Bauer C (2001): Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Klinker R, Silbernagel S (Hrsg): *Lehrbuch der Physiologie*, 3. Auflage. Thieme, Stuttgart New York. S. 189-216
- Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM (1999): Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol* 162 (9): 5049-5052
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275 (5304): 1320-1323
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 (19): 8802-8806
- Block A, Chen SH, Kosai K, Finegold M, Woo SL (1997 a): Adenoviral-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer: regression of hepatic metastasis of pancreatic tumors. *Pancreas* 15 (1): 25-34
- Block A, Windler E, Greten H, Woo SL (1997 b): Adenovirale Gentherapie bei Lebermetastasen gastrointestinaler Tumoren: Entwicklungsstand und Zukunftsperspektiven. *Dtsch. med. Wschr.* 122: 728-732
- Block A, Chen SH, Woo SL, Rich S (1998): *Immunomodulation in Gene Therapeutics*. Marcel Decker Verlag, New York: 421-438
- Block A, Freund CT, Chen SH, Nguyen KP, Finegold M, Windler E, Woo SL (2000): Gene therapy of metastatic colon carcinoma: Regression of multiple hepatic metastases by adenoviral expression of bacterial cytosine deaminase. *Gene Ther* 7 (3): 438-445

- Block A, Puls F, Müller J, Milasinovic D, Igelmann D, Schäfer P, Kupfermann N, Schmoltdt A, Ameis D, Greten H (2003): Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline following adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system. *J Gene Med* 5 (3): 190-200
- Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A (1989): Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol* 134 (10): 3222-3229
- Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, Melani C, Giovarelli M, Rossi I, Nanni P, De Giovanni C, Bouchard P, Wolf S, Modesti A, Musiani P, Lollini PL, Colombo MP, Forni G (1998): Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 188 (3): 589-596
- Boggio K, Di Carlo E, Rovero S, Cavallo F, Quglino E, Lollini PL, Nanni P, Nicoletti G, Wolf S, Musiani P, Forni G (1999): Ability of systemic interleukin-12 to hamper progressive stages of mammary carcinogenesis in Her2/neu transgenic mice. *Cancer Res* 60 (2): 359-364
- Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE (1998): Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 273 (45): 29445-29450
- Bramson J, Hitt M, Gallichan WS, Rosenthal KL, Gauldie J, Graham FL (1996): Construction of a double recombinant adenovirus vector expressing a heterodimeric cytokine: in vitro and in vivo production of biologically active interleukin-12. *Hum Gene Ther* 7 (3): 333-342
- Bramson JL, Hitt M, Addison CL, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL (1996): Direct intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-12 induces regression and long-lasting immunity that is associated with highly localized expression of interleukin-12. *Hum Gene Ther* 7 (16): 1995-2002
- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK (1993): Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 178 (4): 1223-1230
- Carnaghi C, Rimassa L, Garassino I, Zucali PA, Masci G, Fallini M, Morenghi E, Santoro A (2002): Irinotecan and raltitrexed: an active combination in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 13 (9): 1424-1429

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

Carson WE, Dierksheide JE, Jabbour S, Anghelina M, Bouchard P, Ku G, Yu H, Baumann H, Shah MH, Cooper MA, Durbin J, Caligiuri MA (2000): Coadministration of interleukin-18 and interleukin-12 induces a fatal inflammatory response in mice: critical role of natural killer cell interferon-gamma production and STAT-mediated signal transduction. *Blood* 96 (4): 1465-1473

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

Cavallo F, Di Carlo E, Butera M, Verrua R, Colombo MP, Musiani P, Forni G (1999): Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer Res* 59 829: 414-421

Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, Okamura H, Shevach EM (2000): The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 subunit. *Eur J Immunol* 30 (4): 1113-1119

Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL (1994): Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (8): 3054-3057

Chung KY, Saltz LB (2005): Antibody-based therapies for colorectal cancer. *Oncologist* 10 (9): 701-709

Classen M (2005): Highlights der Gastroenterologie in den letzten 30 Jahren. Festvortrag anlässlich des 30. Hamburger Medizinischen Symposiums. XXX. Hamburger Medizinisches Symposium, 3.12.2005. Vorsitz: Greten H, von Schrenck T.

Colombo MP, Trinchieri G (2002): Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth factor Rev* 13 (2): 155-168

Coughlin CM, Wysocka M, Trinchieri G, Lee WM (1997): The effect of Interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer Res* 57 (12): 2460-2467

Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM (1998): Interleukin-12 and Interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 101 (6): 1441-1452

Crystal RG (1999): In vivo and ex vivo gene therapy strategies to treat tumors using adenovirus gene transfer vectors. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 (Supp 1): 90-99

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993): Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178 (3): 1041-1048

de Wet JR, Wood KV, Helinski DR, DeLuca M (1985): Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (23): 7870-7873

Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M (1998): Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 63 (6): 658-664

Dinarello CA (2001): Novel targets for interleukin 18 binding protein. *Ann Rheum Dis* 60 (3): 18-24

Eckert B, Beck CF (1989 a): Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J Bacteriol* 171 (6): 3557-3559

Eckert B, Beck CF (1989 b): Topology of the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein within the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264 (20): 11663-11670

Eggers HJ (2001): Adenoviren. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G (Hrsg): *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage. Urban & Fischer, München Jena. S. 558-562

Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, Wilson JM (1994): Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (13): 6196-6200

Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW, Schoehn G (2005): A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J* 24 (9): 1645-1654

Fallarino F, Uyttenhove C, Boon T, Gajewski TF (1996): Endogenous IL-12 is necessary for rejection of P815 tumor variants in vivo. *J Immunol* 156 (3): 1095-1100

Fantuzzi G, Reed DA, Dinarello CA (1999): IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. *J Clin Invest* 104 (6): 761-767

Forster K, Helbl V, Lederer T, Urlinger S, Wittenburg N, Hillen W (1999): Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 27 (2): 708-710

Fussenegger M, Morris RP, Fux C, Rimann M, von Stockar B, Thompson CJ, Bailey JE (2000): Streptogramin-based gene regulation system for mammalian cells. *Nat Biotechnol* 18 (11): 1203-1208

Gajewski TF, Fallarino F, Ashikari A, Sherman M (2001): Immunization of HLA-A2+ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12. *Clin Cancer Res* 7 (8): 895-901

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

GEKID (2006): Krebs in Deutschland. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken. S. 1-108

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

Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, Presky DH, Stern AS, Gately MK (1995): Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25 (1): 200-206

Gorziglia MI, Kadan MJ, Yei S, Lim J, Lee GM, Luthra R, Trapnell BC (1996): Elimination of both E1 and E2a from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy. *J Virol* 70 (6): 4173-4178

Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (12): 5547-5551

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268 (5218): 1766-1769

Goto T, Nishi T, Tamura T, Dev SB, Takeshima H, Kochi M, Yoshizato K, Kuratsu JI, Sakata T, Hofmann GA, Ushio Y (2000): Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Medical Sciences* 97 (1): 354-359

Goverdhana S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, Curtin JF, Soffer EB, Mondkar S, King GD, Hu J, Sciascia SA, Candolfi M, Greengold DS, Lowenstein PR, Castro MG (2005): Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 12 (2): 189-211

Graham FL, van der Eb AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 (2): 456-467

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

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

Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ (1998): Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Ther* 5 (12): 1604-1611

Hara S, Nagai H, Miyake H, Yamanaka K, Arakawa S, Ichihashi M, Kamidono S, Hara I (2001): Secreted type of modified interleukin-18 gene transduced into mouse renal cell carcinoma cells induces systemic tumor immunity. *J Urol* 165 (6 Pt 1): 2039-2043

- Hartmann JT, Kanz L (2004): Die Therapie des metastasierten Kolon-Rektum-Karzinoms -Neue Entwicklungen und Standards-. In: Meier K-P, Blum HE (wissenschaftliche Leitung): X. Gastroenterologie Seminarwoche Titisee 7.-11. Februar 2004. Falk Foundation e.V. S. 256-261
- Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, Lotze MT, Tahara H (1999): Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol* 163 (2): 583-589
- Hearing P, Samulski RJ, Wishart WL, Shenk T (1987): Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 61 (8): 2555-2558
- Geiss MM, Lamerz R, Lersch C, Schlimok G, Weber B (2001): Tumormunologie und Tumorendokrinologie. Manual Gastrointestinale Tumoren. S. 58-63
- Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, Rojas-Martinez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC, Scardino PT (1999): In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 10 (7): 1239-1249
- Herzyk DJ, Bugelski PJ, Hart TK, Wier PJ (2003): Preclinical safety of recombinant human interleukin-18. *Toxicol Pathol* 31 (5): 554-561
- Hochholzer P, Lipford GB, Wagner H, Pfeffer K, Heeg K (2000): Role of interleukin-18 (IL-18) during lethal shock: decreased lipopolysaccharide sensitivity but normal superantigen reaction in IL-18-deficient mice. *Infection and Immunity* 68 (6): 3502-3508
- Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA (1997): Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I  $\alpha 2$  domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J* 16 (9): 2294-2306
- Hull GW, McCurdy MA, Nasu Y, Bangma CH, Yang G, Shimura S, Lee HM, Wang J, Albani J, Ebara S, Sato T, Timme TL, Thompson TC (2000): Prostate cancer gene therapy: comparison of adenovirus-mediated expression of interleukin 12 with interleukin 12 plus B7-1 for in situ gene therapy and gene-modified, cell-based vaccines. *Clin Cancer Res* 6 (10): 4101-4109

- Hurteau JA, Blessing JA, DeCesare SL, Creasman WT (2001): Evaluation of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 82 (1): 7-10
- Janik P, Briand P, Hartmann NR (1975): The effect of estrone-progesterone treatment on cell proliferation kinetics of hormone-dependent GR mouse mammary tumors. *Cancer Res* 35 (12): 3698-3704
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M (2002): Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52 (1): 23-47
- Jonak ZL, Trulli S, Maier C, McCabe FL, Kirkpatrick R, Johanson K, Ho YS, Elefante L, Chen YJ, Herzyk D, Lotze MT, Johnson RK (2002): High-dose recombinant interleukin-18 induces an effective Th1 immune response to murine MOPC-315 plasmocytoma. *J Immunother* 25 (1): 20-27
- Ju DW, Yang Y, Tao Q, Song WG, He L, Chen G, Gu S, Ting CC, Cao X (2000): Interleukin-18 gene transfer increases antitumor effects of suicide gene therapy through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther* 7 (19): 1672-1679
- Kaneda M, Kashiwamura SI, Ueda H, Sawada K, Sugihara A, Terada N, Kimura-Shimmyo A, Fukuda Y, Shimoyama T, Okamura H (2003): Inflammatory liver steatosis caused by IL-12 and IL-18. *J Interferon Cytokine Res* 23 (3): 155-162
- Kang WK, Park C, Yoon HL, Kim WS, Yoon SS, Lee MH, Park K, Kim K, Jeong HS, Kim JA, Nam SJ, Yang JH, Son YI, Baek CH, Han J, Ree HJ, Lee ES, Kim SH, Kim DW, Ahn YC, Huh SJ, Choe YH, Lee JH, Park MH, Kong GS, Park EY, Kang YK, Bang YJ, Paik NS, Lee SN, Kim SH, Kim S, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT, Park CH (2001): Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 12 (6): 671-684
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989): Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170 (3): 827-845

Koblish HK, Hunter CA, Wysocka M, Trinchieri G, Lee WM (1998): Immune suppression by recombinant interleukin (rIL)-12 involves interferon gamma induction of nitric oxide synthase 2 (iNOS) activity: inhibitors of NO generation reveal the extent of rIL-12 vaccine adjuvant effect. *J Exp Med* 188 (2): 1603-1610

Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M (1997): IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol* 158 (4): 1541-1550

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

Lasarte JJ, Corrales FJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio, Qian C, Xie X, Borrás-Cuesta F, Prieto J (1999): Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide. *J Immunol* 162 (9): 5270-5277

Lee J, Hargest R, Wasan H, Phillips RK (2004): Liposome-mediated adenomatous polyposis coli gene therapy: a novel anti-adenoma strategy in multiple intestinal neoplasia mouse model. *Dis Colon Rectum* 47 (12): 2105-2113

Lee P, Wang F, Kuniyoshi J, Rubio V, Stuges T, Groshen S, Gee C, Lau R, Jeffery G, Margolin K, Marty V, Weber J (2001): Effects of Interleukin-12 on the immune response to a multi-peptide vaccine for resected metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 19 (18): 3836-3847

Leonard GD, Brenner B, Kemeny NE (2005): Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 23 (9): 2038-2048

Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL (1997): Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90 (7): 2541-2548

- Li Q, Carr AL, Donald EJ, Skitzki JJ, Okuyama R, Stoolman LM, Chang AE (2005): Synergistic effects of IL-12 and IL-18 in skewing tumor-reactive T-cell responses towards a type 1 pattern. *Cancer Res* 65 (3): 1063-1070
- Lieschke GJ, Rao PK, Gately MK, Mulligan RC (1997): Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. *Nat Biotechnol* 15 (1): 35-40
- Lode HN, Dreier T, Xiang R, Varki NM, Kang AS, Reisfeld RA (1998): Gene therapy with a single chain interleukin 12 fusion protein induces T cell-dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (5): 2475-2480
- Luehrsen KR, Walbot V (1993): Firefly Luciferase as a reporter for plant gene expression studies. *Promega Notes Magazine* 44: 24-32
- Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourot B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A, Mehtali M (1998): In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* 72 (3): 2022-2032
- Maron DJ, Tada H, Moscioni AD, Tazelaar J, Fraker DL, Wilson JM, Spitz FR (2001): Intra-arterial deliver of a recombinant adenovirus does not increase gene transfer to tumor cells in a rat model of metastatic colorectal carcinoma. *Mol Ther* 4 (1): 29-35
- Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen SH (2000): Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *J Natl Cancer Inst* 92 (11): 931-936
- Mathias P, Galleno M, Nemerow GR (1998): Interactions of soluble recombinant integrin  $\alpha\beta 5$  with human adenoviruses. *J Virol* 72 (11): 8669-8675
- Matthews DA, Russell WC (1995): Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J Gen Virol* 76 (Pt 8): 1959-196
- Mazzolini G, Qian C, Xie X, Sun Y, Lasarte JJ, Drozdik M, Prieto J (1999): Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12. *Cancer Gene Ther* 6 (6): 514-522

- Mazzolini G, Narvaiza I, Perez-Diez A, Rodriguez-Calvillo M, Qian C, Sangro B, Ruiz J, Prieto J, Melero I (2001): Genetic heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of interleukin-12. *Gene Ther* 8 (4): 259-267
- McMurry L, Petrucci RE Jr, Levy SB (1980): Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad USA* 77 (7): 3974-3977
- Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M (1996): Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol* 26 (7): 1647-1651
- Micallef MJ, Yoshida K, Kawai S, Hanaya T, Kohno K, Arai S, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M (1997): In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. *Cancer Immunol Immunother* 43 (6): 361-367
- Moses HL, Pietenpol JA, Munger K, Murphy CS, Yang EY (1991): TGF beta regulation of epithelial cell proliferation role of tumor suppressor genes. *Princess Takamatsu Symp.* 22: 183-195
- Motzer RJ, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, Sandstrom K, Nadeau R, Parmar H, Bukowski R (1998): Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4 (5): 1183-1191
- Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA, Nemunaitis J, Murphy BA, Ellerhorst J, Schwartz LH, Berg WJ, Bukowski RM (2001): Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res* 21 (4): 257-263
- Nakahira M, Ahn HJ, Park WR, Gao P, Tomura M, Park CS, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H (2002): Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. *J Immunol* 168 (3): 1146-1153

Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, Pupa SM, Rossi I, Colombo MP, Ricci C, Astolfi A, Musiani P, Forni G, Lollini PL (2001): Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 194 (9): 1195-1206

Napier MP, Ledermann JA (2000): Novel chemotherapeutic agents in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 26 (6): 605-610

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Bethesda, MD, USA.

NCBI a: Mus musculus interleukin 12 a (IL 12 a), mRNA  
gi | 6680394 | ref | NM\_008351.1 | [6680394]

NCBI b: Mus musculus interleukin 12 b (IL 12 b), mRNA  
gi | 6680396 | ref | NM\_008352.1 | [6680396]

Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ (1996): Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (21): 11798-11801

Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S, Kurimoto M (1995): A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infection and Immunity* 63 (10): 3966-3972

Osaki T, Péron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H (1998): IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* 160 (4): 1742-1749

Osaki T, Hashimoto W, Gambotto A, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H (1999): Potent antitumor effects mediated by local expression of the mature form of the interferon-gamma inducing factor, interleukin-18 (IL-18). *Gene Ther* 6 (5): 808-815

Oshikawa K, Shi F, Rakhmievich AL, Sondel PM, Mahvi DM, Yang NS (1999): Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (23): 13351-13356

Otto HF (2001): Kolon und Rektum. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph U (Hrsg): Pathologie, 2. Auflage. Urban & Fischer, München Jena. S. 677-699

Ozmen L, Pericin M, Hakimi J, Chizzonite RA, Wysocka M, Trinchieri G, Gately M, Garotta G (1994): Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J Exp Med* 180 (3): 907-915

Petrides EP (1998 a): Tumorgewebe. In: Löffler G, Petrides EP (Hrsg): Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York. S. 1089-1113

Petrides EP (1998 b): Gendiagnostik und Gentherapie. In: Löffler G, Petrides EP (Hrsg): Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York. S. 317-355

Portielje JE, Kruit WH, Schuler M, Beck J, Lamers CH, Stoter G, Huber C, de Boer-Dennert M, Rakhit A, Bolhuis RL, Aulitzky WE (1999): Phase I study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 5 (12): 3983-3989

Pützer BM, Hitt M, Muller WJ, Emtage P, Gauldie J, Graham FL (1997): Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (20): 10889-10894

Puls F (2004): Entwicklung adenoviraler Vektoren zur regulierbaren Genexpression. Medizinische Dissertation, Universität Hamburg

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

Rakhit A, Yeon MM, Ferrante J, Fettner S, Nadeau R, Motzer R, Bukowski R, Carvajal DM, Wilkinson VL, Presky DH, Magram J, Gately MK (1999): Down-regulation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic response to interleukin-12 during long-term administration to patients with renal cell carcinoma and evaluation of the mechanism of this "adaptive response" in mice. *Clin Pharmacol Ther* 65 (6): 615-629

RDI Research Diagnostics, INC. RDI division of Fitzgerald Industries Intl: <http://www.researchd.com/cytokines/il18info.htm>

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

Rook AH, Wood GS, Yoo EK, Elenitsas R, Kao DM, Sherman ML, Witmer WK, Rockwell KA, Shane RB, Lessin SR, Vonderheid EC (1999): Interleukin-12 therapy of cutaneous T-cell lymphoma induces lesion regression and cytotoxic T-cell responses. *Blood* 94 (3): 902-908

Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Seipp CA, Einhorn JH, Roberts B, White DE (1998): Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp 100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90 (24): 1894-1900

Russell WC (2000): Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81 (Pt 11): 2573-2604

Sacco S, Heremans H, Echtenacher B, Buurman WA, Amraoui Z, Goldman M, Ghezzi P (1997): Protective effect of a single interleukin-12 (IL-12) predose against the toxicity of subsequent chronic IL-12 in mice: role of cytokines and glucocorticoids. *Blood* 90 (11): 4473-4479

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

Sander DM (1999): Adenoviruses.

<http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Adenoviruses.html>

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

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

Schultz J, Pavlovic J, Strack B, Nawrath M, Moelling K (1999): Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10 (3): 407-417

Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U (2003): Kurzlehrbuch Chirurgie, 6. Auflage. Thieme, Stuttgart New York. S. 529-538

Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG (1995): A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (14): 6522-6526

Shockett PE, Schatz DG (1996): Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (11): 5173-5176

Shokar NK, Vernon SW, Weller SC (2005): Cancer and Colorectal Cancer: Knowledge, Beliefs, and Screening Preferences of a Diverse Patient Population. *Fam Med* 37 (5): 341-347

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI (2000): Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191 (4): 661-668

Strathdee CA, McLeod MR, Hall JR (1999): Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 229 (1-2): 21-29

Stremmel C (2002): Immuntoleranz und aktive Immunsuppression in der Onkologie -Immunologische Grundlagen und therapeutische Optionen-.

<http://www.chirurgie.med.uni-erlangen.de/forschung/tumorimmunologie.html>

Tahara H, Zeh HJ 3<sup>rd</sup>, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, Wolf SF, Robbins PD, Lotze MT (1994): Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 54 (1): 182-189

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

Tan J, Crucian BE, Chang AE, Aruga E, Aruga A, Dovhey SE, Tanigawa K, Yu H (1998): Interferon-gamma-inducing factor elicits antitumor immunity in association with interferon-gamma production. *J Immunother* 21 (1): 48-55

Tanaka F, Hashimoto W, Okamura H, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H (2000): Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells. *Cancer Res* 60 (17): 4838-4844

Tanaka F, Hashimoto W, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H (2002): Therapeutic and specific antitumor immunity induced by co-administration of immature dendritic cells and adenoviral vector expressing biologically active IL-18. *Gene Ther* 9 (21): 1480-1486

Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N (2001): Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61 (20): 7563-7567

Thiagalingam S, Laken S, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001): Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Medical Sciences* 98 (5): 2698-2707

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

Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M (1997): Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem* 272 (41): 25737-25742

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

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

Triozzi PL, Strong TV, Bucy RP, Allen KO, Carlisle RR, Moore SE, Lobuglio AF, Conry RM (2005): Intratumoral administration of a recombinant canarypox virus expressing interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 16 (1): 91-100

- Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT (1997): Interleukin-18 (Interferon-gamma-inducing Factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 185 (6): 1005-1012
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (14): 7963-7968
- Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M (1996): Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 156 (11): 4274-4279
- Van Cutsem E, Findlay M, Osterwalder B, Kocha W, Dalley D, Pazdur R, Cassidy J, Dirix L, Twelves C, Allman D, Seitz JF, Schölmerich J, Burger HU, Verweij J (2000): Capecitabine, an oral fluoropyrimidine carbamate with substantial activity in advanced colorectal cancer: results of a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 18 (6): 1337-1345
- Van Etten B, ten Hagen TL, de Vries MR, Ambagtsheer G, Huet T, Eggermont AM (2002): Prerequisites for effective adenovirus mediated gene therapy of colorectal liver metastases in the rat using an intracellular neutralizing antibody fragment to p21-Ras. *Br J Cancer* 86 (3): 436-442
- Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J (1995): Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 87 (8): 557-559
- Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JK, Brattain MG (1995): Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 270 (37): 22044-22049
- Wang KS, Zorn E, Ritz J (2001): Specific down-regulation of interleukin-12 signaling through induction of phospho-STAT4 protein degradation. *Blood* 97 (12): 3860-3866
- Wang Q, Yu H, Ju DW, He L, Pan JP, Xia DJ, Zhang LH, Cao X (2001): Intratumoral IL-18 gene transfer improves therapeutic efficacy of antibody-targeted superantigen in established murine melanoma. *Gene Ther* 8 (7): 542-550

- Webster A, Russell S, Talbot P, Russell WC, Kemp GD (1989): Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. *J Gen Virol* 70 (Pt 12): 3225-3234
- Woltmann A, Schiedeck T, Bruch H-P (2001): Kolon, Rektum und Anus. In: Berchtold R, Hamelmann H, Peiper H-J, Bruch H-P, Trentz O (Hrsg): *Chirurgie*, 4. Auflage. Urban & Fischer, München Jena. S. 573-601
- Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, McInnes IB, Liew FY (2000): IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol* 30 (11): 3147-3156
- Yamanaka K, Hara I, Nagai H, Miyake H, Gohji K, Micallef MJ, Kurimoto M, Arakawa S, Kamidono S (1999): Synergistic antitumor effects of interleukin-12 gene transfer and systemic administration of interleukin-18 in a mouse bladder cancer model. *Cancer Immunol Immunother* 48 (6): 297-302
- Yamanaka R, Yajima N, Tsuchiya N, Honma J, Tanaka R, Ramsey J, Blaese M, Xanthopoulos KG (2002): Administration of interleukin-12 and -18 enhancing the antitumor immunity of genetically modified dendritic cells that had been pulsed with Semliki Forest virus-mediated tumor complementary DNA. *J Neurosurg* 97 (5): 1184-1190
- Yao L, Pike SE, Setsuda J, Parekh J, Gupta G, Raffeld M, Jaffe ES, Tosato G (2000): Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood* 96 (5): 1900-1905
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura SI, Okamura H, Akira S, Nakanishi K (1998): IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161 (7): 3400-3407
- Younes A, Pro B, Robertson MJ, Flinn IW, Romaguera JE, Hagemester F, Dang NH, Fiumara P, Loyer EM, Cabanillas FF, McLaughlin PW, Rodriguez MA, Samaniego F (2004): Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-hodgkin`s lymphoma and hodgkin`s disease. *Clin Cancer Res* 10 (16): 5432-5438

Zhang B, Wu KF, Lin YM, Ma XT, Rao Q, Zheng GG, Cao ZY, Li G, Song YH (2004): Gene transfer of pro-IL-18 and IL-1 $\beta$  converting enzyme cDNA induces potent antitumor effects in L1210 cells. *Leukemia* 18 (4): 817-825

ZKBS (1997): Stellungnahme der ZKBS zum Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren. <http://194.95.226.234/GENTEC/ZKBS/ALLGSTELL/97/VACCINIA.HTM>

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des adenoviralen Partikels .....	14
<b>Abbildung 2:</b> Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms .....	16
<b>Abbildung 3:</b> Die biologische Wirkung von IL-12 .....	22
<b>Abbildung 4:</b> Die antitumorale Wirkung von IL-12 .....	26
<b>Abbildung 5:</b> Die biologische Wirkung von IL-18.....	30
<b>Abbildung 6:</b> Funktionsweise des Tetracyclin-supprimierbaren Systems (Tet-OFF) ..	36
<b>Abbildung 7:</b> Funktionsweise des Tetracyclin-induzierbaren Systems (Tet-ON) .....	36
<b>Abbildung 8:</b> Funktionsweise des Tetracyclin-abhängigen autoregulativen Tet-OFF- Systems nach Strathdee <i>et al.</i> , 1999 .....	38
<b>Abbildung 9:</b> Virusplaques nach einer Kopräzipitation .....	52
<b>Abbildung 10:</b> Virusbande nach der ersten Ultrazentrifugation .....	55
<b>Abbildung 11:</b> Elektrophoretische Auftrennung eines Verdaues von pAd.3r.msclL-12.	68
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung des Plasmides pAd.3r.scmlL-12 .....	69
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung des sequenzierten Abschnittes von pAd.3r.msclL-12.....	70
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung der bei der Kopräzipitation verwendeten Plasmide pAd.3r.- mIL-18 und pBHG10.....	71
<b>Abbildung 15:</b> Darstellung der mIL-12-Synthese von MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.msclL-12 in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin .....	72
<b>Abbildung 16:</b> Darstellung der mIL-18-Synthese von MCA-26-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.mIL-18 in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin.....	73
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung der mIL-12-Synthese von HT-29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.msclL-12 .....	74
<b>Abbildung 18:</b> Darstellung der mIL-18-Synthese von HT-29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r.mIL-18.....	74
<b>Abbildung 19:</b> Darstellung der IFN- $\gamma$ -Synthese von Mauslymphozyten nach Infektion mit IL-12- und IL-18-Überständen in verschiedenen Verhältnissen.....	74
<b>Abbildung 20:</b> Darstellung der Luciferasesynthese von HT-29-Zellen in unterschied- lichen Medien nach Infektion mit Ad.3r.luc.....	76
<b>Abbildung 21:</b> Doxycyclin-Abhängigkeit der Luciferasegenexpression in Mäuselebern nach Infektion mit Ad.3r.luc.....	76
<b>Abbildung 22:</b> Darstellung der Überlebensraten von C57BL/6-Mäusen nach intravenö- ser Applikation von Ad.3r.msclL-12 in verschiedenen Konzentrationen	78
<b>Abbildung 23:</b> Darstellung der durchschnittlichen Gewichtsveränderung von C57BL/6- Mäusen nach intravenöser Injektion von Ad.3r.msclL-12 ( $3 \times 10^9$ p.f.u./20 g KG).....	79
<b>Abbildung 24:</b> Histologische Darstellung von Leber und Lunge von C57BL/6-Mäusen nach intravenöser Injektion von Ad.3r.msclL-12 in unterschiedlichen Kon- zentrationen.....	81
<b>Abbildung 25:</b> Darstellung des durchschnittlichen Tumorwachstums bei Balb/c-Mäusen .....	82

---

<b>Abbildung 26:</b> Fotografien von Balb/c-Mäusen 18 Tage nach Beginn der Tumorthherapie .....	83
<b>Abbildung 27:</b> Darstellung des Überlebens von Balb/c-Mäusen nach intratumoraler Virusbehandlung.....	84
<b>Abbildung 28:</b> Histologische Darstellung der subkutanen Tumoren.....	85

### **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> TNM-Klassifikation der kolorektalen Karzinome.....	7
<b>Tabelle 2:</b> Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.....	7
<b>Tabelle 3:</b> In dieser Arbeit verwendete Plasmide .....	42
<b>Tabelle 4:</b> In dieser Arbeit verwendete Zelllinien .....	42
<b>Tabelle 5:</b> Darstellung eintretender toxischer Wirkungen nach intravenöser Ad.3r.-mscL-12-Injektion in C57BL/6-Mäuse. ....	77

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis und Erklärung von Fachbegriffen

A	Adenosin
Ad.	Adenovirus
ADA	Adenosindesaminase
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	antigenpräsentierende Zelle, Adenomatosis Polyposis Coli
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
β-Gal	beta-Galaktosidase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
Ca	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid-Dihydrat
CD	Cluster of Differentiation, Cytosindeaminase
cDNA	copy DNA
cm	centimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CPE	zytopathischer Effekt
CsCl	Cäsiumchlorid
dcc	deleted in colorectal carcinomas
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
Dox	Doxycyclin
E	early
E.coli	Escherichia coli (gramnegatives Stäbchenbakterium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (und andere)

---

FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetales Rinderserum)
g	Gramm
G	Gauge, Guanin
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
HCL	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HD	Hodgkin-Disease (Hodgkin-Lymphom)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGDMEM	High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ICE	IL-1B-converting-enzyme
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITR	inverted terminal repeat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LAK	lymphokinaktivierte Killerzelle
LB	Luria-Bertani
luc	Luciferase kodierendes Gen
m	murin
M	Mol
MEM	Modified Eagle Medium
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat

---

MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MHC	major histocompatibility complex
MIG	IFN- $\gamma$ -induzierbares Monokin
min	minimal
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
m.o.i.	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTD	maximal tolerierbare Dosis
mu	map units
MWM	Molecular Weight Marker
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Di-Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- $\kappa$ $\beta$	nuclear factor- $\kappa$ $\beta$ (Transkriptionsfaktor)
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> CL	Ammoniumchlorid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nls	nuclear localisation signal
nm	Nanometer
NO	Stickstoffoxid
nr.	Nummer
p	piko, Plasmid
pA	poly Adenosin
pAd.	adenovirales Plasmid

---

PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p.f.u.	plaque forming units
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
p.o.	per os
q	kurzer Arm eines Chromosoms
R	Rezeptor
3r	Tetracyclin-reprimierbares Expressionssystem
RDI	Research Diagnostics, INC
rLF	relative Luftfeuchtigkeit
r.l.u.	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous-Sarkoma-Virus
rtTA	reverser Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
S.	Seite
S2	Sicherheitsstufe 2
sc	single-chain
Ser	Serin
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV40	Simian-Virus 40
T	Thymin
TBE	Trisbase-Borsäure-Ethyldiamin-Tetraessigsäure
TcR	T-Zellrezeptor
Tet	Tetracyclin
TetA	Tetracyclin-Resistenzprotein
Tet-OFF	Tetracyclin-supprimierbares System mit Verwendung des tTA
Tet-ON	Tetracyclin-induzierbares System mit Verwendung des rtTA
TetR	Tetracyclin-abhängiger Repressor
TGF	Transforming-Growth-Factor
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Terminales Protein, Triphosphat
Tris (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tTA	Tetracyclin-abhängiger Transaktivator

U	unit (Einheit)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	virales Protein
w/o	without (ohne)
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galacto-Pyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZKBS	Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit
#	Artikelnummer

## 9.2. Bezugsquellenverzeichnis

A&D Instruments, Karlsruhe, Deutschland  
American Tissue Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA  
Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
Bayer, Leverkusen, Deutschland  
BD Pharmingen, San Diego, CA, USA über Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland  
BD Clontech, Heidelberg, Deutschland  
BD Falcon, Bedford, MA, USA  
Beckman-Coulter, München, Deutschland  
Bio-Rad, München, Deutschland  
Boehringer-Roche, Mannheim, Deutschland  
Braun Diessel Biotech International, Melsungen, Deutschland  
Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ, USA  
Cenco, Breda, Holland  
Charles River, Wilmington, MA, USA  
Corning, Corning, NY, USA  
EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland  
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland  
Fluka, Ulm, Deutschland  
GFL, Burgwedel, Deutschland  
Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland  
Gilson, Middleton, WI, USA  
Graham F, McMaster University, Hamilton, ON, Canada  
GraphPad, San Diego, CA, USA  
Greiner, Frickenhausen, Deutschland  
Heraeus, Hanau, Deutschland  
Hund, Wetzlar, Deutschland  
Hybaid, Ashford, England  
J. T. Baker, Deventer, Niederlande  
Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz  
Köttermann, Uetze, Deutschland  
Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland  
MBL (Medical & Biological Laboratories), Woburn, MA, USA  
Merck, Darmstadt, Deutschland  
Mettler Toledo, Columbus, OH, USA  
Milipore, Eschborn, Deutschland

MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland  
Nalge Nunc, Wiesbaden-Beibrecht, Deutschland  
New England Biolabs (NEB), Schwalbach, Deutschland  
Perricaudet, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France  
Pfizer, Karlsruhe, Deutschland  
Pierce, Rockford, IL, USA über KMF, St. Augustin, Deutschland  
Promega, Mannheim, Deutschland  
Qualilab, Olivet, Frankreich  
Qiagen, Hilden, Deutschland  
Ratiopharm, Ulm, Deutschland  
R&D Systems, Minneapolis, MN, USA  
Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland  
Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Deutschland  
Ssniff, Soest, Deutschland  
Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland  
USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA  
Wolf, Geislingen, Deutschland  
WTW, Weilheim, Deutschland

### 9.3. Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren



## Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Umwelt und Gesundheit

BUG, Lagerstraße 36, D - 20357 Hamburg

Universität Hamburg  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
z.Hd. Herrn Dr. Block  
Martinistraße 52

20246 Hamburg

Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz  
Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen

Lagerstraße 36  
D - 20357 Hamburg  
Telefon 040-428-41-4025  
Telefax 040-428-41-4040  
Behördennetz 0-428-41-4025

Ansprechpartnerin Frau Dr. Crowell  
Zimmer 216  
E-Mail [Kathleen.Crowell@bug.hamburg.de](mailto:Kathleen.Crowell@bug.hamburg.de)  
X400 c=de,a=dbp,p=fhhnet,o=bug,  
s=Crowell,g=Kathleen

Gz.: G 21132/591-00.33  
Hamburg, den 27.06.2002/vwh

**Nr.: 32/02**

Nachrichtlich: Herrn Dr. Dimigen, Herrn Dr. Haemisch, Herrn Dr. Tiemann  
- Veterinäramt Fleischzentrum (G 21/1)

**Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**  
- Ihr Antrag vom 21.03.2002, hier eingegangen am 26.04.2002

Auf Grund des § 8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1106, 1818), zuletzt geändert durch Verordnung vom 29.10.2001 (BGBl. I S. 2785) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

*Adenovirale Genterapie von Metastasen gastrointestinaler Tumore unter Verwendung Zytokin-exprimierender Vektoren*

Leiter des Versuchsvorhabens: Dr. Block  
Stellvertretender Leiter: PD Dr. Ameis  
Anzahl und Art der Versuchstiere: 293 Mäuse  
Diese Genehmigung gilt bis zum: 31. Juli 2005

Der Wechsel des Leiters des Versuchsvorhabens oder seines Stellvertreters ist unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei der im Briefkopf angegebenen Behörde schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

GEBÜHREN

Diese Genehmigung ist nach der Gebührenordnung für das öffentliche Gesundheitswesen i.d.j.g.F. gebührenpflichtig. Ein Gebührenbescheid wird mit gesonderter Post übersandt.

*Kathleen Crowell*  
Dr. Crowell

## 10. Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse, dass er mir die Durchführung der beschriebenen Arbeit an seiner Klinik ermöglichte. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Andreas de Weerth für seine Bereitschaft, die Funktion des Doktorvaters für diese Arbeit zu übernehmen. Den weiteren Mitgliedern des Prüfungsausschusses möchte ich für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Block aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik des UKE für die interessante Aufgabenstellung und für seine Hilfs- und stete Diskussionsbereitschaft. Ich danke ihm für die vielen Ratschläge und kritischen Anregungen und ganz besonders für seine Motivationsbereitschaft, durch die mir die Durchführung dieser Arbeit erleichtert wurde.

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hansjörg Schäfer und Frau Schmidt aus dem Institut für Pathologie im UKE für die histologischen Untersuchungen sowie bei allen Mitarbeitern der UKE-Tierhaltung für die wertvolle Hilfestellung beim Umgang mit Versuchstieren und für die gute Zusammenarbeit. Bei Herrn Dr. rer. nat. Frank Schnieders möchte ich mich für die Belehrung zum Umgang mit S2-Sicherheitsräumen der Tierhaltung bedanken, ohne die das Arbeiten dort nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Herrn Prof. Dr. Franz Rinninger aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik für die Erlaubnis der Durchführung der Leberhomogenisation in seinem Labor.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe aus dem Labor für Gentherapie und Endokrinologie möchte ich mich für die hilfreiche fachliche und moralische Unterstützung bedanken. Ich danke Dr. Philipp Breuch, Henning Lange, Henning Ortlepp, Verena Pannecke und Dr. Florian Puls. Insbesondere bedanke ich mich bei Doris Pankoke, die immer dafür gesorgt hat, dass diverse Arbeitsmaterialien regelmäßig vorhanden waren, und bei Jürgen Müller für die Einarbeitung in der Anfangsphase meiner Promotionsarbeit.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Holger Wulff erwähnen, dem ein ganz besonders herzlicher Dank gebührt. Er war mir eine großartige Stütze beim Erlernen vieler Arbeitstechniken, bei der Darstellung der Ergebnisse, insbesondere der Abbildungen und beim Korrekturlesen dieser Dissertation. Durch seine ständig gewährte Hilfsbereitschaft, seine kreativen Ideen und durch die vielen Diskussionen mit ihm konnte diese Arbeit in einem überschaubaren Zeitraum durchgeführt werden.

Für die weitere Hilfe beim Korrekturlesen dieser Dissertation möchte ich mich aus ganzem Herzen bei meiner Freundin Anja Schwarz bedanken.

Bei meinen Freundinnen Jennifer Steffan, Elena Usai und Sibylle Weigel und bei meiner Schwester Tuba Çınar bedanke ich mich für deren moralische Unterstützung während der gesamten Promotionsphase.

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, Resmiye und Yasar Çınar, ohne deren Unterstützung der Fortgang dieser Arbeit und des gesamten Studiums so nicht möglich gewesen wäre.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Seda Cinar  
 Geburtsdatum: 11.04.1980  
 Geburtsort: Hamburg  
 Staatsbürgerschaft: deutsch  
 Familienstand: ledig

### Schulbildung

1986-1990: Grundschule Brockdorffstrasse, Hamburg  
 1990-1999: Gymnasium Rahlstedt, Hamburg  
 Juni 1999: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

### Pflegepraktikum

18.10.1999-12.11.1999: Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg  
 03.01.2000-06.02.2000: Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg

### Hochschulausbildung

April 2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität Hamburg  
 März 2002: Ärztliche Vorprüfung  
 15.07.2002-15.08.2002: Famulatur: Pädiatrie, Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg  
 März 2003: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 28.07.2003-26.08.2003: Praxisfamulatur: Innere Medizin/Tropenmedizin, Hamburg  
 01.09.2003-30.09.2003: Famulatur: Gastroenterologie/Gentherapie, I. Medizinische Klinik, UKE, Hamburg  
 09.02.2004-09.03.2004: Famulatur: Innere Medizin, I. Medizinische Abteilung, AK Wandsbek, Hamburg  
 März 2005: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 25.04.2005-26.03.2006: Praktisches Jahr: AK Wandsbek (Chirurgie), AK Wandsbek (Innere Medizin), Universitätsklinikum Eppendorf (Pädiatrie), Hamburg  
 Juni 2006: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Wissenschaftliche Tätigkeiten

2002-2005: Promotionsarbeit: Adenovirale Tetracyclin-supprimierbare Zytokingenexpression für die *In-vivo*-Gentherapie kolorektaler Karzinome. Leitung: Dr. A. Block, Direktor: Prof. Dr. A. W. Lohse. Zentrum für Innere Medizin – I. Medizinische Klinik und Poliklinik, UKE, Hamburg.

Posterpräsentation 2005: Block A, **Cinar S**, Wulff H, Schäfer H-J, Greten H: Hocheffiziente und zugleich sichere adenovirale IL-12-Gentherapie des kolorektalen Karzinoms in der syngenesischen Maus. 111. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2005, Wiesbaden.

Hamburg, 13.11.2006

## **12. Erklärung**

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

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

Hamburg, 13.11.2006