Adenovirale Immuntherapie solider Tumore am HCC-Modell der Ratte

(Rattus norvegicus, Berkenhout 1769)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Reinhard Wähler

aus Berlin

Hamburg 2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH

Tag der Disputation: 19. September 2003

Hamburg, den 06.September 2003



Professor Dr. A. Frühwald Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Abstract1		
2	Einlei	itung	3
	2.1 Äti	ologie des HCC	3
	2.1.1		3
	2.1.2	Pathogenese	4
	2.1.3	Das HCC-Tumormodell MH-7777A	6
	2.1.4	Therapie des HCC	6
	2.2 Üb	erwachung von Tumorzellen durch das Immunsystem	8
	2.2.1	Gibt es eine Überwachung von Tumorzellen durch das Immunsystem	n?9
	2.2.2	Ablauf der Tumoreliminierung durch das Immunsystem	10
	2.2.3	Wie entkommt der Tumor dem Immunsystem?	11
	2.3 Imr	munstimulatorische Gene	16
	2.3.1	Interleukin-12	16
	2.3.2	4-1BBL	22
	2.3.3	Interleukin-2	26
	2.4 Tu	morgentherapie	29
	2.4.1	Gentransfer	32
	2.5 Ad	enoviren	33
	2.5.1	Adenoviren als Vektoren	34
	2.5.2	Adenoviren in der immunstimulatorischen Tumortherapie	36
	2.6 Inte	erne ribosomale Eintrittsstellen (IRES)	38
	2.7 Zie	lsetzung	40
3	Erget	onisse	41
	3.1 Ko	nstruktion der adenoviralen Vektoren	41
	3.1.1	Die Konstrukte Ad-1, Ad-2 und Ad-3	41
	3.1.2	Klonierung und Aufzucht der Vektoren	42
	3.2 <i>In</i>	vitro-Charakterisierung der Vektoren	44
	3.2.1	Titration	44
	3.2.2	Normalisierung der Vektoren auf IL12 Expression	46
	3.2.3	4-1BBL Expression der Vektoren	50
	3.2.4	IL2-Expression und relative Expressionslevel von IL12 : IL2	52
	3.3 <i>in</i> (<i>vivo</i> Charakterisierung der Vektoren (Tierstudien)	54
	3.3.1	Dosiseskalation mit Ad-3	54
	3.3.2	Dosiseskalation mit Ad-1	60

3.3.3	2-Wochen Tierstudie mit 5 x 10 ⁷ n.i.u. Vektor	62
3.3.4	Histologische Analyse des Tumorinfiltrats	65
3.3.5	Langzeit-Rattenstudie mit 5 x 10 ⁷ n.i.u. Vektor	67
3.3.6	De-Eskalation mit Ad-1 und Ad-3	75
3.3.7	Langzeit-Rattenstudie mit 5 x 10 ⁶ n.i.u. Vektor	77
3.3.8	Vergleich der beiden Langzeitstudien	82
4 Disk	ussion	86
4.1 Ko	onstruktion der adenoviralen Vektoren	
4.2 In	vitro - Charakterisierung der Vektoren	
4.2.1	Vektor-Titration und Normalisierung auf IL12	
4.2.2	Expression von 4-1BBL	
4.2.3	Relative Expressionslevel von IL12 zu IL2	
4.3 In	vivo Charakterisierung der Vektoren (Tierstudien)	91
4.3.1	Dosiseskalation und 2-Wochen Tierstudie mit Ad-3/Ad-1	91
4.3.2	Durchflußzytometrische Analyse des Milzgewebes	92
4.3.3	Serumanalytik und Toxizitätsbetrachtungen	92
4.3.4	Langzeittierstudien und De-Eskalation	94
4.3.5	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	97
4.3.6	Mechanismus der Immunantwort gegen den Tumor	100
5 Mate	rial und Methoden	102
5 Mate	rial und Methoden	102
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1	rial und Methoden Ienovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3.	102 102 102
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2	rial und Methoden Ienovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails	102 102 102 102
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren	102 102 102 102 106
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren	102 102 102 102 106 106
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA	102 102 102 102 106 106 106 112
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6	rial und Methoden. lenovirale Vektoren. Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren	102 102102102106106106112113
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren	102 102102102106106106112113114
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.8	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren	102 102 102 102 106 106 106 112 113 114 115
 5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression	102 102102102106106106112113114115115115
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 5.2.1	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression	102 102 102 102 106 106 106 112 113 114 115 115
5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2.1 5.2.1 5.2.1	rial und Methoden Ienovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression ELISA für IL12, IL2 und IFNγ Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL	102 102 102 102 102 106 106 106 112 113 114 115 115 115 115 117
 5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 5.2.1 5.2.2 5.3 Ar 	rial und Methoden Ienovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression ELISA für IL12, IL2 und IFNγ Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL	102 102 102 102 102 106 106 106 112 113 113 115 115 117 118
 5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 5.2.1 5.2.2 5.3 Ar 5.3.1 	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression ELISA für IL12, IL2 und IFNγ Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL alyse von Lymphozyten Lymphozyten aus der Milz	102 102 102 102 102 106 106 106 112 113 114 115 115 115 117 118
 5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 5.2.1 5.2.2 5.3 Ar 5.3.1 5.3.2 	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression ELISA für IL12, IL2 und IFNγ Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL Lymphozyten aus der Milz Lymphozyten im Tumorinfiltrat	102 102 102 102 102 106 106 106 112 113 114 115 115 115 117 118 118 119
 5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 5.2.1 5.2.2 5.3 Ar 5.3.1 5.3.2 5.4 Ze 	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren ELISA für IL12, IL2 und IFNy Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL halyse von Lymphozyten Lymphozyten aus der Milz Lymphozyten im Tumorinfiltrat Ilkultur	102 102 102 102 102 106 106 112 113 113 114 115 115 115 115 117 118 118 119 120
 5 Mate 5.1 Ac 5.1.1 5.1.2 5.1.3 5.1.4 5.1.5 5.1.6 5.1.7 5.1.6 5.1.7 5.1.8 5.2 Ar 5.2.1 5.2.2 5.3 Ar 5.3.1 5.3.2 5.4.1 	rial und Methoden lenovirale Vektoren Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3. Klonierungsdetails Adenovirale Kontrollvektoren Herstellung adenoviraler Vektoren Hirt-Extraktion von viraler DNA Titration von Adenoviren Infektion <i>in vitro</i> mit Adenoviren Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren alyse der Vektor-Transgenexpression ELISA für IL12, IL2 und IFNγ Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL alyse von Lymphozyten Lymphozyten aus der Milz Lymphozyten im Tumorinfiltrat QBI 293 und 911 Zellen	102 102 102 102 102 106 106 106 112 113 113 115 115 115 115 117 118 118 118 119 121

5.4	1.3	Einfrieren von eukaryotischen Zellen	121
5.5	Мо	lekularbiologische Techniken	122
5.5	5.1	Präparation von Plasmid-DNA (durch alkalische Lyse)	122
5.5	5.2	Restriktionsverdau von DNA	123
5.5	5.3	PCR	123
5.5	5.4	DNA-modifizierende Enzyme	124
5.5	5.5	Sequenzierung	125
5.5	5.6	Gelelektrophorese von DNA	126
5.5	5.7	Gelextraktion von Plasmid-DNA	127
5.5	5.8	Transformation (Hitzeschock)	128
5.6	Tie	rexperimentelle Arbeiten	129
5.6	6.1	Tumor-Inokulation	129
5.6	6.2	Injektion des adenoviralen Vektors	131
5.6	6.3	Darstellung des Tumors mittels Magnetresonanztomographie (MR	T).131
5.6	6.4	Narkose der Ratten	132
5.6	6.5	Tötungskriterien für die Ratten	132
5.7	Sta	tistische Berechnungen	133
6 Lit	era	tur	135
7 An	hai	ng	160
7.1	Pla	smidkarten	160
7.2	Abl	kürzunasverzeichnis	165
7.3	Glo	ossarium	167
7.4	Leb	penslauf	
7.5	Ver	öffentlichungen	170
7.6	Dar	۔ nksagung	171

1 Zusammenfassung / Abstract

Zusammenfassung

Die Erzeugung einer Antitumorimmunität mittels adenoviralen Transfers immunstimulatorischer Genen ist eines der vielversprechendsten Konzepte in der Krebsgentherapie. Interleukine und T-Zell-Kostimulatoren haben ihre Effizienz für Krebs in verschiedenen Tiermodellen bewiesen. Der Ansatz der vorliegenden Arbeit ist es, (i) maximale Immunstimulation durch die kombinierte Expression von einkettigem IL12 (scIL12), 4-1BBL und IL2 von einem Vektor und (ii) minimale systemische Nebenwirkungen durch intratumorale Verabreichung einer niedrigen Virusdosis zu erreichen. Um alle drei Gene in einem einzigen Vektor unterzubringen, wurde eine tricistronische Expressionskassette konstruiert, die die drei cDNAs durch zwei interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) verbindet. Dieser adenovirale Vektor wird als Ad-3 bezeichnet (Ad-3: [PhCMV] scIL12 [IRES] 4-1BBL [IRES] IL2). Ad-3 exprimiert unter der Kontrolle des hCMV-Promoters drei unabhängige Proteine von einer mRNA. Um die Beiträge von 4-1BBL und IL2 zu kontrollieren, wurden Ad-1 ([PhCMV] scIL12) und Ad-2 ([PhCMV] scIL12 [IRES] 4-1BBL) konstruiert. Die Genexpression wurde in vitro mittels ELISA für IL12 und IL2 und mittels Durchflußzytometrie für 4-1BBL überprüft. Für die in vivo Anwendungen wurden die Dosen von Ad-1, Ad-2 und Ad-3 so eingestellt, daß sie gleiche IL12 Expression in Zellkultur zeigten. Die Vektoren wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Tumore in einem syngenen Rattenmodell für das hepatozelluläre Karzinom zu eliminieren. Eine effektive Vektordosis wurde durch die Injektion von 1 x 10^7 , 1 x 10^8 und 1 x 10^9 infektiösen Einheiten von Ad-3 in transplantierte Lebertumore bestimmt. Durch Magnetresonanztomographie (MRT) konnte eine dosisabhängige Tumorreduktion gezeigt werden. Langfristigen Antitumoreffekte aller drei Vektoren wurden mit 5 x 10^6 und 5 x 10^7 infektiösen Einheiten pro Tier bestimmt. Zwei Tumorknoten wurden in der Leber gesetzt. Nur einer von beiden wurde behandelt, um lokale und distale Effekte zu verfolgen. Tumorvolumina wurden mittels MRT 0, 3, 7 und 13 Wochen nach Vektorinjektion bestimmt. Während kein Tier aus der Kontrollgruppe länger als bis zur 7. Woche überlebte, waren 75-100% der Tiere in den therapeutisch behandelten Gruppen in der 13. Woche frei von detektierbaren Tumoren. Tumorfreie Tiere, die mit 5 x 10^7 infektiösen Einheiten behandelt wurden, wurden erneut mit Tumorzellen injiziert; alle eliminierten diese Tumorzellen und zeigten damit eine anhaltende Antitumorimmunität. Die Dosis von 5 x 10⁶ infektiösen Einheiten ist etwa 1000 mal niedriger als die in einem nahezu identischen Tiermodell verwendete, in der die adenovirale IL12 Therapie zu 60% langzeitüberlebenden Tieren führte (Barajas 2001). Die Ergebnisse zeigen die hohe Effizienz der neu konstruierten Vektoren bei Dosen die als sicher angenommen werden können, selbst wenn man sie für Menschen extrapoliert.

Abstract

Generation of antitumor immunity by adenoviral gene transfer employing immunostimulatory genes is one of the most promising concepts in cancer gene therapy. Interleukins and T-cell costimulators have proven effective in various animal tumor models. The approach in this study is to provide (i) maximum immunostimulation by combined expression of single chain IL12 (scIL12), 4-1BBL and IL2 in one vector and (ii) minimal systemic side effects by intratumoral administration of a low viral dose. To accommodate all three genes in a single vector, a tricistronic expression cassette was constructed, linking the three cDNAs by two internal ribosomal entry sites (IRES). This adenoviral vector is termed Ad-3 (Ad-3: [PhCMV] scIL12 [IRES] 4-1BBL [IRES] IL2). Ad-3 expresses three independent proteins from one mRNA utilizing one hCMV-promoter. To control the effects contributed by 4-1BBL and IL2, Ad-1 ([PhCMV] scIL12) and Ad-2 ([PhCMV] scIL12 [IRES] 4-1BBL) were constructed. Gene expression was verified *in vitro* using ELISA for IL12 and IL2 and flow cytometry analysis for 4-1BBL. For *in vivo* application doses of Ad-1, Ad-2 and Ad-3 were adjusted to yield equal IL12 expression in cell culture.

Vectors were tested for their ability to eliminate tumor lesions in a syngeneic rat model of hepatocellular carcinoma. An effective vector dose was determined by injecting 1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9 infectious units of Ad-3 in transplanted hepatic tumors. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed dose-dependent tumor reduction. Long term antitumor effects of all vectors were determined at 5×10^6 and 5×10^7 infectious units per animal. Two tumor nodules were inoculated into the liver. Only one of those was treated to score for local and distal effects. Tumor volumes were measured by MRI 0, 3, 7 and 13 weeks after vector injection. Whereas none of the animals in the control group survived beyond week 7, 75-100% of animals in the treatment groups had no detectable tumors by week 13. Tumor-free animals that were treated with 5×10^7 infectious units were rechallenged with tumor cells and all of them eliminated the newly injected tumor cells, showing persistent antitumor immunity.

The dose of 5 x 10^6 infectious units is approximately 1000 times lower than the one used in an almost identical animal model for adenoviral IL12 therapy where 60% of the animals showed long term survival (Barajas 2001).

The results show the high efficacy of the newly constructed vectors at doses which may be considered as safe even when translated to men.

2 Einleitung

2.1 Ätiologie des HCC

Bei Lebertumoren kann es sich um benigne oder maligne Läsionen handeln. Letztere sind primär hepatisch oder sekundär metastatisch. Metastasen in der Leber können ganz unterschiedlichen Ursprungs sein. Beispiele sind Kolorektale Karzinome als ein häufiger Ursprung für sekundäre Metastasen (Penna 2002), Magenkrebs (Ohno 2003) oder auch Brustkrebs (Selzner 2000). In Asien und Teilen Afrikas überwiegen die primären Läsionen, während in den westlichen Ländern meist ein metastatisches Geschehen vorliegt. Primäre Lebertumore können epithelialen Ursprungs sein und von Hepatozyten bzw. Gallengangsepithelzellen ausgehen oder sie sind mesenchymalen, selten auch gemischtzelligen Ursprungs (Moradpour 2002). Das Hepatozelluläre Karzinom ist ein maligner Tumor, der rasch fortschreitet und bei dem es nur sehr limitierte Therapiemöglichkeiten gibt.

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) wurde in dieser Arbeit als Modell für einen soliden Tumor verwendet.

2.1.1 Epidemiologie

Am HCC erkranken weltweit mehr als eine Millionen Menschen pro Jahr. In Afrika und Südostasien treten mit 50-150 HCC/100.000 Einwohnern deutlich mehr Fälle auf als in Nordamerika und Europa mit 1-3 HCC/100.000 Einwohnern (Bosch 1999). In den letzten Jahren konnte eine Zunahme der HCC-Fälle und -Mortalität jedoch in den westlichen Ländern festgestellt werden (El-Serag 1999), die wahrscheinlich in Zusammenhang mit der zunehmenden Verbreitung von Hepatitis C steht (Deuffic 1998). Das Risiko einer HCC-Entstehung ist primär von folgenden Faktoren abhängig (Blum 1995):

- Krankheitsursache: Höchstes Risiko bei chronischer HBV/HCV Infektion.
- Aktivität und Dauer der chronischen Lebererkrankung
- Existenz von Kofaktoren, z. B. HBV/HCV plus Alkoholmißbrauch oder Aflatoxinexposition.
- Das HCC entwickelt sich bei 60-90% aller Patienten nach Leberzirrhose, womit diese zu einem eigenständigen HCC-Risiko wird.

<u>Klinik</u>

Es gibt keine typische Symptomatik für das HCC. Neben weitgehend asymptomatischen Verläufen treten bei Patienten Schmerzen, Druckgefühl im Oberbauch, Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Abgeschlagenheit und leicht erhöhte Temperatur auf. Oft finden die Symptome sich erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Krankheit (Moradpour 2002).

2.1.2 Pathogenese

HCC sind genetisch sehr heterogen und weisen oft starke chromosomale Veränderungen wie Polyploidie, Allelverlust, Amplifikation und Translokation auf (Ozturk 1999). Die maligne Transformation stellt die Folge einer chronischen Leberschädigung dar, was in Abb. 2.1 dargestellt wird. Der im Rahmen einer chronischen Leberschädigung und Regeneration erhöhte Hepatozytenturnover, verbunden mit oxidativen DNA-Schäden, kann zu genetischen Veränderungen wie chromosomalen Rearrangements, Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, möglicherweise in Kooperation mit defekten DNA-Reperaturmechanismen und Telomeraseaktivierung, führen. Chronische Virushepatiden, Alkohol und Stoffwechselerkrankungen (Hämochromatose, α_1 -Antitrypsinmangel) führen so zum HCC. HBV und evtl. auch HCV können auch über direkte onkogene Mechanismen an der HCC-Entwicklung beteiligt sein. Aflatoxin B1 induziert spezifische Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen (Moradpour 2002).



Abb. 2.1 Entstehung des HCC. Verändert nach (Moradpour 2002), S. 209

Ein HCC entwickelt sich im Lauf vieler Jahre aufgrund einer chronischen Hepatitis mit zirrhotischem Umbau der Leber. In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, daß eine chronische immunvermittelte Leberschädigung HCC auslösen kann. Virale Transaktivierung, Insertionsmutagenese und genotoxische Chemikalien sind hierfür nicht erforderlich. Die Immunantwort auf HBV (DNA-Virus) ist notwendig und ausreichend, um während einer chronischen HBV-Infektion Leberkrebs auszulösen (Nakamoto 1998). Integrationen von HBV-DNA in das Wirtsgenom ist ein häufiger, aber ungerichteter Prozeß. Er bringt lediglich zufällige Mutationen hervor, die sekundär zu erhöhter genomischer Instabilität beitragen (Matsubara 1990). Die

chromosomale Integration von Virus-DNA ist nicht Teil des viralen Lebenszyklus, sondern ein Epiphänomen. Das HBV-Oberflächenantigen HBsAg, das Hepatitis B x Antigen HBxAg und das trunkierte Oberfächenantigen preS/S scheinen transaktivierende Eigenschaften zu haben, die zur Tumorprogression beitragen können, wenn sie integriert haben (Feitelson 1999).

Die genauen Mechanismen der HBV-assoziierten Karzinogenese sind noch nicht bekannt. Noch weniger weiß man über die HCV-assoziierte Karzinogenese. Bei HCV handelt es sich um ein RNA-Virus. Das HCV "core protein" besitzt regulatorische Aktivität, die Apoptose verstärken oder unterdrücken, Genexpression verändern und Signaltransduktion modulieren kann. Vermutlich trägt es auf diesem Weg auch zur Entstehung des HCC bei (Bergsland 2001).



Abb. 2.2 Verlauf der Hepatitis B und C. Nur ein Bruchteil der HBV/HCV infizierten Patienten entwickelt auch ein HCC. Verändert nach (Moradpour 2002) S. 209 und nach http://www.who.int/emc-documents /hepatitis/docs/whocdscsrlyo20022/disease/hepatocellular_carcinoma.html. Bild der gesunden und zirrhotischen Leber: www.region-online.de/bildung/ars/webbg/alkohol/leber.htm aus (Hagens 1997), S. 81 und 84. Bild des HCC: www.hkbic.bch.cuhk.edu.hk/liverdb/HCC.html. [Aktualität der WWW-Adressen: 01/2003]

Mutationen von Onkogenen wie *ras* oder *myc* werden beim HCC nur selten beobachtet (Tada 1990), wenngleich diese Faktoren gelegentlich überexprimiert werden (Zhang 1990); Cyclin D scheint bei 10-20% der humanen HCC amplifiziert zu sein (Nishida 1994; Zhang 1993). Bei den Tumorsuppressorgenen findet sich in 30% der Fälle eine Mutation in p53, in 10-20% bei p16 und am Retinoblastomgenlokus (Ozturk 1999).

Telomerase ist ein Enzym, das die Verkürzung der Chromosomenenden bei der Zellteilung verhindert. Es ist im überwiegenden Teil der untersuchten HCC-Fälle sehr deutlich aktiviert (Kojima 1999; Tahara 1995).

Die Überexpression von Wachstumsfaktoren oder von Komponenten ihrer Signalkaskaden spielt beim HCC, wie auch bei anderen Tumoren, eine große Rolle. Beim HCC wurde das für IGFII (Cariani 1991), TGF-α (Tabor 1994) und Insulinrezeptorsubstrat 1 (Nishiyama 1992) nachgewiesen. Der HGF (hepatocyte growth factor) hingegen scheint die HCC-Entwicklung zu hemmen (Santoni-Rugiu 1996). In welcher Weise die diversen Wachstumsfaktoren an der HCC-Entwicklung beteiligt sind, ist noch unklar. Die Überexpression eines der wichtigsten angiogenetischen Faktoren, des VEGF, wurde beim HCC gezeigt (Torimura 1998); auch Angiopoetin-2 ist involviert (Tanaka 1999).

2.1.3 Das HCC-Tumormodell MH-7777A

Das Morris Hepatom 7777 ist ein chemisch induzierter Tumor. Die Chemikalie N-2fluorenylphthalamic acid (2-FPA) wurde Ratten über die Nahrung zugeführt und führte zu Lebertumoren mit Ursprung im Leberparenchym. Die Menge an 2-FPA betrug 1,27 mM/kg. Die Linie 7777 wurde 52-60 mal von einer Ratte auf die nächste transplantiert, wobei zwischen Tumorinokulation und Transfer auf die nächste Ratte immer etwa ein Monat lag. Es handelt sich um einen wenig differenzierten, sehr schnell wachsenden Tumor mit ausgeprägter Metastasenneigung. Der Tumor exprimiert viel Hexokinase und hat die Fähigkeit viel Glucose zu nutzen, die glykolytische Aktivität ist somit hoch. Dieser Phänotyp ist typisch für de-differentierte Tumorzellen im Spätstadium. Die Chromosomenzahl beträgt 73 (Morris 1974).

Von diesem Tumor ausgehend wurden zwei Zellinien etabliert: McA-RH7777 und MH-7777A. In wie weit und ob überhaupt diese beiden Linien sich unterscheiden ist unklar. McA-RH7777 wurde bereits im Tumormodell für adenovirale IL12- und CD40L-Therapie eingesetzt (Barajas 2001; Schmitz 2001). McA-RH7777 produziert das α-Fetoprotein (AFP) und Albumin in einem Verhältnis von 600:1. AFP findet sich in hohen Konzentrationen beim Fötus und Neugeborenen, aber nur in Spuren beim Erwachsenen. Darüberhinaus findet man es bei Schwangeren, bei Leberegeneration und beim Hepatom (=Adenom oder Karzinom der Leber). Das Morris Hepatom 7777 produziert 8000 µg/ml Serum *in vivo* (Becker J. E. 1976). Die Tumorsuppressoren p16ink4a und p19ARF sind in McA-RH7777 Zellen vorhanden (Laes 2000).

MH-7777A ist bislang hauptsächlich in Zellkulturexperimenten verwendet worden (Fritsch 1995; Neumeier 1984). Für ein Tumormodell wurde diese Linie in Hamburg erstmalig eingesetzt und hinsichtlich ihrer MRT-Detektierbarkeit und ihrer Tumorbildungsrate in Buffalo Ratten charakterisiert (Krupski 2001).

Es handelt sich bei dem hier verwendeten Tumormodell um ein syngenes HCC-Modell in der Ratte. Die Tiere verfügen über ein voll funktionstüchtiges Immunsystem.

2.1.4 Therapie des HCC

Obgleich das HCC langsam wächst, ist die Prognose schlecht (Colombo 1993). Die mittlere Überlebenszeit von Patienten ohne spezifische Therapie liegt je nach Stadium der Erkrankung bei 1-9 Monaten (Okuda 1985). Tumore, die nur an einem Ort liegen und weniger als 5 cm Durchmesser haben, gelten als operabel. Leberteilresektionen und Transplantationen konkurrieren hier (Ameis 2000). Für einen chirurgischen Eingriff kommen jedoch weniger als 20% der Patienten in Frage. Bei einer japanischen Multizentrenanalyse mit 2236 HCC-Patienten lag die 3-Jahres-Überlebensrate aller Patienten bei 46% (Tobe 1992). Rezidive bzw. Zweitkarzinome in der Restleber sind häufig. Ist der Tumor multilokulär, größer als 5 cm oder sind extrahepatische Metastasen vorhanden, so kann in den Tumor Ethanol oder Essigsäure durch die Haut injiziert werden. Dies führt zu Tumornekrose. Die Überlebensrate bei Tumoren von weniger als 3-5 cm entspricht der nach Tumorresektion (Castells 1993). Rezidive oder Tumorneubildungen treten jedoch bei 15-20% der Patienten auf.

Chemotherapie zeigt minimale bis keine Effekte (Moradpour 2002). Aufgrund der besonders schlechten Prognose beim HCC stellt die Entwicklung neuer Therapieverfahren eine wichtige Aufgabe dar (vergl. 2.4 und 2.5.2).

2.2 Überwachung von Tumorzellen durch das Immunsystem

Das Grundproblem

Tumorzellen lassen sich aus Sicht des Immunsystems in gewisser Weise mit Virusinfizierten Zellen vergleichen. In beiden Fällen wird das genetische Programm einer somatischen Zelle verändert. Allerdings stimuliert eine Tumorzelle anders als eine virusinfizierte Zelle nicht das Immunsystem. Es handelt sich bei Tumorzellen schließlich um körpereigene Zellen, mit körpereigener genetischer Information. Diese Zellen können zwar Mutationen, Chromosomen-Rearrangements und Aneuploidie aufweisen, unterscheiden sich aber abgesehen von tumor-assoziierten Antigenen (TAA), die sie evtl. präsentieren, nicht sehr von anderen Körperzellen. Im Gegensatz zu einer Virusinfektion kommt es bei der Entstehung von Tumorzellen häufig nicht zu einer für die Immunerkennung ausreichend starken Entzündungsreaktion. Das angeborene Immunsystem (vor allem Makrophagen und NK-Zellen) wird dann nicht ausreichend aktiviert. Das wäre aber eine notwendige Vorraussetzung, um den adaptiven Arm des Immunsystems, insbesondere CD8 und CD4 T-Zellen, aber auch B-Zellen zu aktivieren. Naive T-Zellen treten normalerweise nicht von der Blutbahn ins Gewebe über, wenn sie nicht durch das angeborene Immunsystem dazu angeregt werden. Die wenigen naiven T-Zellen, die es trotzdem tun, können dann auf Tumorzellen treffen. Den Tumorzellen fehlt aber wie den meisten Gewebszellen ein Kostimulator (wie z. B. B7), der normalerweise von APCs exprimiert wird und für eine T-Zell Aktivierung unabläßlich ist. Daher gehen die T-Zellen, die sporadisch ins Gewebe gelangen und dort auch noch zufällig auf ihr passendes Antigen treffen, in Anergie (zustand der Inaktivität) oder Apoptose über, weil ihnen die Kostimulation fehlt. Man mag sich jetzt fragen, warum es von der Natur nicht so eingerichtet wurde, daß naive T-Zellen die Gewebe nach Tumorzellen durchstreifen und alle Zellen einen Kostimulator exprimieren, so daß eine Tumorzelle sofort erkannt und effizient ausgeräumt werden kann. Für das Überleben eines Organismuses ist es jedoch wichtiger, daß das Immunsystem gegenüber dem Körper tolerant bleibt. Das Risiko einer Autoimmunreaktion wäre zu groß, wenn naive T-Zellen im Gewebe wären und dort permanent überall auf Zellen mit Kostimulatoren treffen würden. Tumore entstehen meist erst spät im Leben, so daß sie aus evolutionärer Sicht ein deutlich geringeres Problem als Autoimmunreaktionen darstellen. NK-Zellen haben in der Immunüberwachung das Potential, Tumore zu finden und zu vernichten und eine Entzündungsreaktion auszulösen. Z. B. sind NK-Zellen darauf spezialisiert, MHC-negative Zellen zu töten. (Sompayrac 1999).

2.2.1 Gibt es eine Überwachung von Tumorzellen durch das Immunsystem?

Lewis Thomas und Sir Macfarlan Burnet waren die ersten, die die Hypothese einer Immunüberwachung zur Kontrolle von entstehenden Tumorzellen vorschlugen (Burnet 1957). Mehrere Versuche an Nacktmäusen zeigten aber, daß diese weder spontan (Rygaard 1974) noch nach chemischer Induktion (Stutman 1974) mehr Tumore bildeten als ihre immunkompetenten Verwandten, was diese Hypothese fragwürdig machte. Wie sich später herausstellte, waren diese Beobachtungen aber mit Mängeln behaftet. Auch Nacktmäuse haben noch funktionelle T-Zellen, wenngleich sehr wenige (Maleckar 1987). Der 1974 benutzte Mausstamm war vermutlich besonders sensitiv für eine chemisch induzierte Karzinogenese durch Methylcolanthren, das bei diesen Studien benutzt wurde (Kouri 1977). Die hier induzierte chemische Karzinogenese erfolgte vielleicht so schnell, daß die Immunabwehrmechanismen der Maus nicht reagieren konnten. Die Beobachtunszeiträume für spontan entstehende Tumore waren mit 3-7 Monaten zu kurz (Dunn 2002).

Erst später wurde deutlich, daß endogen produziertes IFNγ gegen das Wachstum von transplantierten, chemisch induzierten und spontanen Tumoren schützt (Dighe 1994; Kaplan 1998). Darüberhinaus wurde gezeigt, daß Perforin-knockout Mäuse nach chemischer Karzinogenese oder Tumorzelltransplantation stärker zur Tumorbildung neigen als ihre Wildtypverwandten (van den Broek 1996). Spontan entstehen vor allem vermehrt Lymphome, wenn Perforin ausgeschaltet ist (Smyth 2000). Über Perforin können NK-Zellen und CTLs ihre Zytotoxizität gegenüber anderen Zellen vermitteln. Perforin ist ein Protein, das Löcher in der Zielzelle entstehen läßt, die alleine zu nekrotischem Zelltod führen können oder in Verbindung mit ebenfalls von NK-Zellen und CTLs ausgeschütteten Granzymen zur Apoptose der Zielzelle führen (Roitt 1998).

Das dritte und deutlichste Argument für die Krebs-Immunüberwachung kam von *knockout*-Mäusen, die kein Rekombination Aktivierendes Gen 1 oder 2 (RAG-1, Rag-2) mehr haben. Diese Mäuse verfügen nicht mehr über Antigenrezeptoren und haben daher keine NKT-, T- und B-Zellen, alle nicht-lymphoiden Zellen sind aber normal (Alt 1992). Anhand dieses Modells konnte gezeigt werden, daß Lymphozyten in der Maus nicht nur gegen chemisch induzierte Sarkome schützen, sondern auch gegen spontane epitheliale Tumore (Shankaran 2001). Sowohl IFN γ als auch Lymphozyten sind hierfür wichtig (Street 2001). Weitere Studien haben gezeigt, daß eine Reihe von Immunzellen und Zytokinen für die Immunüberwachung von Tumoren wichtig sind: NKT, $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen, IFN γ und IL12 sind alle involviert (Dunn 2002).

Nach diesen Ergebnissen in Mäusen stellt sich die Frage, ob Immunüberwachung auch beim Menschen in ähnlicher Form existiert. Studien an immunsupprimierten oder an Immunschwäche leidenden Menschen haben gezeigt, daß vor allem Krebsarten mit viraler Ätiologie auftreten (Boshoff 2002; Penn 1999). Das häufige Auftreten von virusassoziierten Krebsarten (Lymphoma → Eppstein-Barr Virus, Gebärmutterhalskrebs → humaner Papilloma Virus, Leberkrebs → Hepatitis B Virus, Kaposi Sarkoma → humaner Herpesvirus 8) kann hierbei das Auffinden spontaner Tumore von nicht virusassoziiertem Ursprung leicht überdecken. Eine Reihe von Studien konnte allerdings den Zusammenhang zwischen solchen Tumoren und Immunsuppression aufdecken: Etwa viermal häufiger tritt das maligne Melanom nach Organtransplantation auf (Sheil 1986), in pädiatrischen Patientengruppen sogar zehnmal häufiger (Penn 1996) als in der Normalbevölkerung. Lungentumore treten nach Herztransplantation signifikant häufiger auf, ebenso Hauttumore (Pham 1995). Auch für viele andere Karzinome konnte nach Transplantation eine signifikant erhöhte Tumorrate festgestellt werden (Birkeland 1995).

Es ist jedoch unklar, in wie weit die erhöhte Krebsrate bei Gabe von Immunsuppressiva (wie Cyclosporin A oder FK506) durch Effekte hervorgerufen wird, die nicht in Verbindung mit dem Immunsystem stehen. So konnte kürzlich im Mausmodell gezeigt werden, daß Cyclosporin-A p53-abhängige DNA-Reparatur und Apoptose nach UV-B Bestrahlung supprimiert (Sugie 2002).

2.2.2 Ablauf der Tumoreliminierung durch das Immunsystem

Wenn ein solider Tumor eine gewisse Größe erreicht hat und invasiv zu wachsen beginnt, kann das eine Störung oder Beschädigung des umgebenden Gewebes auslösen. Darüberhinaus kann der Tumor auch eine Streßreaktion auslösen, wenn seine Sauerstoff- und Nahrungszufuhr aufgrund seiner Größe knapp wird (Khong 2002). Diese Prozesse können zu einem pH-Ungleichgewicht führen, das durch eine metabolische Störung, die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (OH⁻, H₂O₂), Hochregulierung von Streßschutzfaktoren (Hitzeschockproteinen) und Tod durch Nekrose oder Apoptose verursacht wird. Wenn ein Tumor wächst, kommt es zu genetischen und epigenetischen Veränderungen, die in der Expression von Neoantigenen resultieren. Eine Studie schätzt, daß eine durchschnittliche maligne Zelle mehr als 10.000 Mutationen hat (Stoler 1999). Alle diese Faktoren können Alarmsignale sein und lokale Zellen des angeborenen Immunsystems (NKT, NK, $\gamma \delta$ T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und DCs) aktivieren. Letzteres aktiviert dann wiederum T-Zellen und damit eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor (Khong 2002). Der weitere Ablauf ist in Abb. 2.3 zusammengefaßt.



Abb. 2.3 Modell der Tumorzelleliminierung durch das Immunsystem. a) Beginn der Immunantwort. Lymphozyten (NKT, NK und vo T-Zellen) der unspezifischen Immunabwehr haben die Tumorzellen bemerkt und sekretieren IFNy. b) Durch IFNy wird eine Kaskade der unspezifischen Immunantwort gestartet. Diese beinhaltet: (i) die Induktion von Chemokinen (CXCL10 (IP10), CXCL9 (MIG) und CXCL11 (I-TAC)), die die Neovaskularisierung im Tumor blockieren und die NK-Zellen, DCs, Makrophagen und andere Immunzellen anlocken; (ii) die proliferationshemmende Wirkung auf den sich entwickelnden Tumor und (iii) die Aktivierung der zellzerstörenden Aktivität von Makrophagen und NK-Zellen, die in das Tumorgewebe eindringen. Diese Ereignisse führen zum Tod von Tumorzellen. Tote Tumorzellen oder Teile von ihnen (kleine blaue Quadrate) werden von DCs aufgenommen und zu Lymphknoten gebracht. c) Das Tumorwachstum wird durch die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und der aktivierten Makrophagen unter Kontrolle gehalten. Währenddessen vermehren sich CD4 und CD8 T-Zellen, die spezifisch für Tumorantigene sind, im Lymphknoten. d) Tumorspezifische CD4 und CD8 Zellen wandern entlang eines Chemokingradienten in den Tumor. Dort erkennen und zerstören sie Tumorzellen, die tumorspezifische Antigen exprimieren. a)-d) Symbole: Tumorzelle (blau), nichttransformierte Zelle (grau), tote Tumorzelle (weiß-grauer Übergang, gestrichelter Rand); Lymphozyten, Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen (Mac) sind markiert und farbig. (Dunn 2002)

2.2.3 Wie entkommt der Tumor dem Immunsystem?

Würde die Immunabwehr gegen Tumore immer so funktionieren wie oben beschrieben, gäbe es keinen Krebs. Abb. 2.4 zeigt, wie die genetische Instabilität des Tumors dazu führen kann, daß unter dem Selektionsdruck des Immunsystems nur die Tumorzellvarianten übrig bleiben, die zufällig über Mechanismen verfügen, die es ermöglichen dem Immunsystem zu entkommen.



Abb. 2.4 Verlust der Immunsystemkontrolle über Tumorzellen (Modell). a) Die Eliminierung von Tumorzellen entspricht der in Abb. 2.3 dargestellten Immunüberwachung. Allerdings sind hier einige Tumorzellvarianten (rot) vorhanden. b) Hier wird das Gleichgewicht zwischen Tumorzelleliminierung und verstärktem Wachstum von Tumorzellvarianten illustriert. Der Selektionsdruck des Immunsystems führt dazu, daß nur Tumorzellvarianten überleben können, die zufällig Abwehrmechanismen gegen das Immunsystem entwickelt haben. Ursächlich für das Entstehen solcher Varianten ist die hohe genetische Instabilität von Tumorzellen. c) Mehrere Tumorzellvarianten gegen die das Immunsystem machtlos ist, haben sich entwickelt. Das Tumorwachstum ist nicht mehr kontrollierbar. a)-c) Symbole: Tumorzelle (blau), nichttransformierte Zelle (grau), tote Tumorzelle (weiß-grauer Übergang, gestrichelter Rand), Tumorzellvarianten (rot und orange); die kleinen orangen Kreise sind Zytokine und die weißen Blitze symbolisieren zytotoxische Aktivität der Lymphozyten gegenüber Tumorzellen; Lymphozyten sind markiert und farbig. (Dunn 2002)

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, die es dem Tumor ermöglichen können, dem Immunsystem zu entkommen. Die wichtigsten werden im folgenden diskutiert.

Verlust der Antigenpräsentation

Einer dieser Mechanismen ist der Verlust oder die Herunterregulation der Antigenpräsentation via MHC-I. Der Mechanismus, der zum kompletten Verlust von MHC-I führt, beinhaltet Mutationen in einer Kopie des β_2 -Mikroglobulin Gens zusammen mit dem Verlust des zweiten Allels (Hicklin 1998). Der Verlust von β_2 -Mikroglobulin wurde auch in Patienten beobachtet, die nach T-Zell-basierter Immuntherapie einen unvollständigen Tumorrückgang hatten (Restifo 1996).

In der Zelle werden Proteine für die Antigenpräsentation im Proteasom verdaut und dann von Peptidtransporten (Tap) ins rER gebracht, um dort den MHC-I zu beladen. Eine Herunterregulierung der Untereinheiten LMP-2 und LMP-7 des Proteosomenkomplexes und der Peptidtransporter TAP-1 und TAP-2 wurde bei humanen Tumorhistologien und Zellinien von Lungenkarzinomen (Korkolopoulou 1996), Prostatakarzinom (Sanda 1995) und beim Nierenzellkarzinom (Seliger 1997) gefunden. In diesen Fällen läßt sich die MHC-I Expression oft durch IFNγ Behandlung wieder heraufregulieren.

Wie NK-Zellen trotz MHC-I - Mangel wirkungslos bleiben

Eine Folge des partiellen oder vollständigen Verlustes der MHC-I Expression macht die Tumorzelle verstärkt zum Ziel von NK-Zellen, die auf die Tötung MHC-I – schwacher oder negativer Zellen spezialisiert sind. NK-Zellen exprimieren aktivierende Rezeptoren wie NKG2D, die an streßinduzierte Liganden wie MICA oder MICB (MIC = MHC-I Chain related) von Zielzellen binden können. MICA oder MICB führen zu einer Aktivierung der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen und sie können sogar die inhibitorischen Signale von MHC-I Rezeptoren überstimmen (Bauer 1999; Groh 1999). Eine hypothetische Strategie, um NK-Zellen zu entkommen wäre die Herunterregulation von MICA oder MICB (Garrido 2001).

Eine alternative Erklärung dafür, daß MHC-I-negative Tumore nicht von NK-Zellen zerstört werden, könnte sein, daß der nötige Aktivierungsstimulus für NK-Zellen fehlt. NK-Zellen werden in der Gegenwart stimulierender Faktoren wie IL12, IL2, IL15 oder IFNα/IFNβ bei einer mikrobiellen Entzündung sehr schnell aktiviert. In einer "sterilen" Umgebung wie bei einem Tumor stehen solche Faktoren evtl. nicht zur Verfügung und die Wechselwirkung zwischen DCs und NK-Zellen, die NK-Zellaktivierung induziert, findet nicht statt (Gerosa 2002). Darüberhinaus könnte ein Mangel an kostimulatorischen Molekülen wie B7-1 (Galea-Lauri 1999), CD40 (Carbone 1997) oder CD70 (Takeda 2000) auf der Tumorzelle eine optimale Aktivierung der NK-Zelle über ihre Rezeptoren (CD28, CD40L, CD27) verhindern.

Es ist auch möglich, daß Tumore Zytokine wie TGF-β oder MIF produzieren, die direkt NK-Zell-Aktivierung und -Funktion inhibieren können (Apte 1997).

Defekte Todesrezeptor-Signalwege

Fas Ligand (FasL) und TRAIL sind zwei Todesrezeptorliganden, die eine Rolle in der Immunüberwachung von Tumoren spielen (Straus 2001; Takeda 2002). Defekte in deren Signalwegen könnten zum Überleben und Wachstum von Tumorzellen beitragen. Apoptotische Signale werden vom Liganden an den Rezeptor und von dort an die Caspase-Kaskade weitergegeben. Z. B. aktiviert FAS Caspase-8, die dann wiederum auf Caspase-3, -6 und -7 wirkt (Salvesen 1999). Der Caspase-8 Inhibitor cFLIP wird von verschiedenen Tumoren exprimiert und eine erhöhte Expression von cFLIP kann zur Immunresistenz gegenüber T-Zellen *in vivo* führen (Medema 1999).

Herunterregulation oder Verlust von Fas im Tumor kann auch zu dessen Apoptoseresistenz beitragen. Mutationen und Verlust des Fas-Gens wurden beim Multiplen Myelom (Landowski 1997), Non-Hodgkin's Lymphom (Gronbaek 1998) und Melanom (Shin 1999) gefunden.

Alternativ zum Fas-Weg können NK-Zellen und CTLs auch mittels Perforin Tumorzellen töten. Tumore können diesen Weg durch Überexpression eines Serin-Protease Inhibitors (PI-9/SPI-6), der Granzym B inaktiviert, blockieren (Medema 2001). TRAIL vermittelter Apoptose kann die Tumorzelle auf mehreren Wegen entgehen: Chromosomaler Verlust des TRAIL-Rezeptors oder der Caspase-8, Mutationen an verschiedenen Stellen im Signalweg und Verringerung der Rezeptorexpression durch posttranskriptionelle Regulation (Hersey 2001).

Mangel an Kostimulation

Die meisten Tumore wachsen in einer nichtinnflammatorischen Umgebung, die nicht hilfreich für eine Immunaktivierung ist. Während der frühen Wachstumsphase koexistieren Tumore friedlich mit umgebendem Normalgewebe, ohne immunaktivierende Signale abzugeben. Unter diesen Umständen werden DCs nicht aktiviert. Der Mangel an kostimulatorischen Molekülen auf der Tumorzelle kann darüber hinaus zu Anergie bei T-Zellen führen (Schwartz 1990) und zur suboptimalen Aktivierung von NK-Zellen.

Immunsupprimierende Zytokine

Die Aktivierung oder Inhibierung von T-Zellen hängt von Zytokinen in der unmittelbaren Umgebung ab. Tumorzellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen, die die Reifung und Funktion von Immunzellen negativ beeinflussen. VEGF ist ein Zytokin, das von den meisten Tumoren sekretiert wird (Toi 1996). *In vitro* wurde gezeigt, daß VEGF Differenzierung und Reifung von DCs inhibiert indem er NF-kB in hämatopoetischen Stammzellen supprimiert (Oyama 1998). Beim Magenkarzinom konnte eine vermehrte VEGF-Expression mit gerringerer Dichte an DCs und schlechter Prognose korreliert werden (Saito 1998). Bei Patienten mit Lungen-, Brust- sowie Kopf- und Nackenkrebs war eine Verringerung der Funktion und Anzahl reifer DCs mit erhöhten Plasmakonzentrationen von VEGF assoziiert (Almand 2000).

IL10, das von Th2-Zellen produziert wird, findet sich häufig im Serum von Krebspatienten. Dieses Zytokin kann inhibitorisch auf die Differenzierung von Stammzellvorläufern zu DCs wirken (Girolomoni 1997). IL10 inhibiert darüberhinaus die Antigenpräsentation, die IL12 Produktion und die Induktion von Th1-Antworten *in vivo* (Sharma 1999). IL10 erhöht spontane DC-Apoptose (Ludewig 1995) und autologe NK-Zellyse (Carbone 1999). IL10 kann Tumorzellen vor CTLs schützen indem es für die Herunterregulation von MHC-I/II und ICAM-1 sorgt (Yue 1997). Der Verlust der MHC-I Expression kann auch auf die IL10-vermittelte Herunterregulation der TAP-Proteine in der Tumorzelle zurückzuführen sein (Salazar-Onfray 1997).

Der proinflammatorische Faktor Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist ein weiteres Zytokin, das von Tumorzellen exprimiert wird. Ursächlich hierfür ist die verstärkte Expression des Enzyms Cyclooxygenase 2, das das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für die PGE₂-Synthese ist (Sano 1995; Wolff 1998). PGE₂ erhöht die Produktion von IL10 durch Lymphozyten und Makrophagen und inhibiert die IL12-Produktion der Makrophagen (Huang 1998).

Große Mengen von TGF- β werden ebenfalls häufig in Krebspatienten gefunden. Sie werden mit fortgeschrittener Erkrankung und schlechter Reaktion auf Immuntherapie assoziiert (Doran 1997; Gorsch 1992). Zusätzlich zu der möglichen Produktion durch einige Tumorzellinien wird TGF- β auch von apoptotisch sterbenden T-Zellen freigesetzt und steuert so zu einem immunsuppresiven Milieu bei (Chen 2001). TGF- β inhibiert die Aktivierung, Proliferation und Aktivität von Lymphozyten *in vivo* (Fontana 1989).

Die möglichen immunsupprimierenden Funktionen aller diese Zytokine können aber möglicherweise auch nur Nebenwirkungen der angiogenetischen und wachstumsfördernden Funktionen sein.

Tabelle 2.1 zählt die Wege auf, auf denen der Tumor dem Immunsystem entkommen kann. Einige wurden oben diskutiert. Es scheint, daß Tumorzellen für jede Stufe der Immunantwort eine Trick gefunden haben, dieser zu entgehen. Allerdings ist davon auszugehen, daß keine Tumorzelle über alle Tricks verfügt.

Strategie	Mechnismus
Ignoranz	Mangel an Gefahrensignalen
	Mangel an Tumorantigenen in lymphatischen Organen
	Wachstum in immunpriviligierten Stellen (Hirn, Testis)
	Mangel an Adhäsionsmolekülen
	Physikalische Barriere durch das Stroma
Beeinträchtigung der Antigen-	Mutation oder Herunterregulation von Tumorantigenen
präsentation	Mutation oder Herunterregulation von MHC Genen
	Defekte der Antigenprozessierung (z. B. TAP, LMP)
Expression immunsupprimierender	Zytokine (TGFβ, IL10, VEGF)
Faktoren	Prostaglandine
	RCAS1
Toleranzinduktion	Induktion von Anergie (Mangel an Kostimulatoren)
	Abweichungen des Immunsystems
	Regulatorische T-Zellen
	T-Zell – Zerstörung
Apoptoseresistenz	Expression anti-apoptotische Moleküle
	Herunterregulation und Mutation pro-apoptotischer Mole-
	küle
Gegenwehr (?)	CD95L Expression
	Expression von Todesrezeptor-Liganden (FasL, TRAIL)
	zur Apoptoseinduktion in Lymphozyten

Tabelle 2.1 Mechanismen des Immunentkommens von Tumoren. Verändert nach (Igney 2002).

2.3 Immunstimulatorische Gene

Verschiedene Kombinationen von Zytokinen und Kostimulatoren stellen ein großes Potential für die Immuntherapie maligner Erkrankungen dar. Für diese Arbeit wurden drei solche Faktoren ausgewählt: IL12, 4-1BBL und IL2.

IL12 ist ein Aktivator des angeborenen/unspezifischen Immunsystems (Makrophagen, NK-Zellen) und des spezifischen Immunsystems (zelluläre Immunantwort, CTL, Th1).

4-1BBL ist ein wichtiger Kostimulator für T-Zellen.

IL2 ist der Wachstumsfaktor für Lymphozyten.

Es gibt eine Vielzahl von immunstimulatorischen Zytokinen und Chemokinen, die in experimentellen Tumormodellen untersucht wurden (Musiani 1997). Bei einer direkt vergleichenden Studie von IL2, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IFNα, IFNγ, TNFα und IL12 stellte sich IL12 als effizientester Faktor in der Tumorabwehr heraus (Cavallo 1997). Für eine effiziente Immunantwort gegen einen Tumor ist ein T-Zellkostimulator von großem Vorteil und synergistischer Wirkung. Dafür wurde meist B7 verwendet. Es gibt Hinweise, daß ein anderer Kostimulator, 4-1BBL, evtl. effektiver für die direkte Antigenpräsentation durch die Tumorzelle ist (Mogi 2000).

2.3.1 Interleukin-12

Seine Gene und sein Rezeptor

Interleukin-12 (IL12) ist ein heterodimeres Zytokin. Es besteht aus aus zwei Untereinheiten: einer großen von 40 kD und einer kleinen von 35 kD. Der ursprüngliche Name für IL-12 ist "natural killer cell stimulatory factor" und als solcher wurde es erstmals aus einer EBV transformierten humanen B-Zellinie isoliert (Kobayashi 1989). Die beiden Gene der Untereinheiten sind separat und nicht verwandt. Sie sind über Disulfid-Bindungen kovalent verbunden und bilden ein p70 Heterodimer (Trinchieri 1998b). Ein schematisiertes Bild von IL12 findet sich in Abb. 2.5. Die p40 Untereinheit bildet auch Homodimere, die die biologische Funktion von IL12 p70 spezifisch inhibieren (Mattner 1993). Allerdings gilt das bei physiologischen Mengen wahrscheinlich nur in der Maus und nicht im Menschen (Ling 1995). Die p35 und p40 Untereinheiten sind zu 60 bzw. 70% identisch zwischen Mensch und Maus. Humanes IL12 ist allerdings auf murinen Zellen nicht aktiv (Schoenhaut 1992).



Abb. 2.5 Molekularstruktur von Interleukin-12. Verändert nach (Kumagai 1997)

Der Rezeptor für IL12 besteht aus 2 Ketten: IL12R β_1 und IL12R β_2 . Beide Ketten zusammen bilden eine Bindungsstelle hoher und eine niedriger Affinität (Presky 1996). IL12R β_1 assoziiert mit der Tyk2 Kinase der Janus Familie und IL12R β_2 mit Jak2 (Zou 1997). Bindet IL12 den gesamten Rezeptor, so wird dadurch die Aktivierung beider Kinasen und der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT4 induziert (Jacobson 1995). Die Aktivierung von STAT4 ist besonders wichtig, da sie relativ spezifisch für IL12 ist. Anhand von Zellen, die aus STAT4 Knockout-Mäusen isoliert wurden, konnte die Notwendigkeit dieses Faktors für eine IL12 Antwort in vitro gezeigt werden (Thierfelder 1996).

Von ruhenden NK- oder T-Zellen wird der IL12 Rezeptor nicht oder nur in minimalen Mengen exprimiert, nach Aktivierung wird er allerdings sehr schnell heraufreguliert (Wu 1996). Ruhende NK- und T-Zellen reagieren schnell auf IL12, indem sie IFNγ produzieren und ihre zytotoxische Funktionen zunehmen (Chan 1991). Proliferations-fördernd wirkt IL12 aber nur auf vor-aktivierte T- und NK-Zellen (Gately 1991).

Zellen, die IL12 produzieren und die Wirkung von IL12

Geringe Mengen der p35 Untereinheit werden von nahezu allen Zellinien transkribiert, die p40 Untereinheit findet sich hingegen nur in Zellen, die auch biologisch aktives IL12 produzieren. Zudem ist das p40 Gen stark reguliert. Der Hauptproduzent von IL12 sind phagozytische Zellen (Trinchieri 1994). Periphäre mononukleäre Blutzellen (PBMC) oder aufgereinigte Monozyten produzieren viel IL12 (p70 und p40), wenn sie von Bakterien oder bakteriellen Produkten z. B. Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert werden. Die Produktion beginnt wenige Stunden nach Infektion durch Bakterien oder intrazelluläre Parasiten. IL12 wirkt als ein proinflammatorisches Zytokin, das NK-Zellen und via IFNγ phagozytische Zellen aktiviert, wodurch letztere vermehrt bakteriozid werden (D'Andrea 1992). IFNγ verstärkt die IL12 Produktion von phagozytischen Zellen im entzündeten Gewebe (Kubin 1994a). Diese Eigenschaft von IFNγ ist besonders wichtig, weil IL12 die IFNγ-Produktion von T- und NK-Zellen sehr stark induziert (Chan 1991). Somit entsteht eine positive Rückkopplung bei einer Entzündung (Abb. 2.6). Im Ergebnis werden die NK-Zellen stärker zytotoxisch und Makrophagen stärker phagozytisch. Erst diese Aktivierung ermöglicht die Abwehr eines Eindringlings.

Darüber hinaus ist IL12 das hauptverantwortliche Zytokin für die Differenzierung von Th0 zu Th1-Zellen, wodurch eine Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort eingeleitet wird. Th1-Zellen wiederum produzieren viel IFNγ (Manetti 1993).



Abb. 2.6: Positive Rückkopplung (durchgezogene Pfeile) zwischen Makrophagen und Th- oder NK-Zellen: Makrophagen sezernieren nach bakterieller Aktivierung IL12. IL12 regt Th1- und NK-Zellen an, IFNγ zu produzieren. IFNγ wiederum stimuliert die IL12 Produktion der Makrophagen. Zudem bewirkt IL12 eine Differenzierung von Th0- zu Th1- Zellen. Th2-Zytokine wie IL4 und IL10 haben eine entgegengesetzte Wirkung (gestrichelte Pfeile). IL10 hemmt das Wachstum von Th1-Zellen und verringert zusammen mit anderen Th2-Zytokinen die IL12-Produktion. Umgekehrt hemmt IFNγ Th2-Zellen. IL2 bzw. IL4 wirken bei Th-Zellen als autokrine (bei NK-Zellen als parakrine) Wachstumsfaktoren (gepunktete Pfeile). Verändert nach (Sompayrac 1999), S. 25, 26 und 59.

Diese positive Rückkopplung der IL12 Produktion birgt natürlich die Gefahr einer unkontrollierten Zytokinproduktion (Trinchieri 1998a). Die meisten der in diese Rückkopplung involvierten Rezeptoren werden schnell internalisiert. Das System neigt somit dazu in den Zustand vor der Stimulation zurückzukehren und die Rückkopplung wird durchbrochen, sobald der externe Stimulus (hier durch bakterielles LPS) wegfällt (persönliche Kommunikation mit Prof. Lauren Sompayrac).

Es gibt aber auch Mechanismen, die die IL12 Produktion und die Fähigkeit von NKund T-Zellen, auf IL12 zu reagieren, drosseln. Das Th2-Zytokin IL10 kann die IL12-Produktion, die Expression von Kostimulatoren (z. B. B7) sowie von Zytokinen wie TNFα in den APCs inhibieren. Darüberhinaus kann IL10 auch die Produktion von IFNy und anderen Th1-Zytokinen unterdrücken (D'Andrea 1993). Ein anderer starker IL12-Inhibitor ist TGFβ. IL4 und IL13 können die IL12-Produktion auch teilweise inhibieren (D'Andrea 1995).

Dendritische Zellen (DC) können als Reaktion auf bakterielle und andere Erreger ebenfalls IL12 produzieren (Heufler 1996) und damit einen wesentlichen Beitrag zur Stimulation von Th1 Zellen leisten. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 2.7 dargestellt.



Abb. 2.7 Wechselwirkung zwischen Dendritischer Zelle und CD4 T-Helfer Zelle (Th1). Dieses Modell illustriert die Bedeutung der DC für die Stimulation der Th1 Zelle bei der Immunantwort auf eine z. B. bakterielle Infektion. Die DC wird durch IL12, IFNγ und einen bakteriellen Stimulus (z. B. LPS) angeregt und kann dann nicht nur Antigen präsentieren, sondern auch eine Th1-getriebene zelluläre Immunantwort stimulieren. Sie versorgt die T-Zelle mit IL12 und den erforderlichen Kostimulatoren wie IL15, IL18 und Liganden für CD2, CD28. (Gollob 2001)

Zusätzlich zu dieser IL12-Induktion, die als Reaktion auf ein infektiöses Agenz stattfindet, gibt es noch einen weiteren Mechanismus, quasi in umgekehrter Richtung: Aktivierte T-Zellen können die IL12-Produktion von Makrophagen und DCs stimulieren (Macatonia 1995). Dies geschieht unabhängig von der Anwesenheit eines Erregers. Der Mechanismus dieser T-Zell-induzierten IL12-Produktion basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem CD40 Liganden auf der T-Zelle und CD40 auf der APC (Shu 1995). Während einer Infektion werden wahrscheinlich beide Wege der APC-Aktivierung beschritten: Zunächst erfolgt die T-Zell unabhängige Aktivierung während der Entzündungsphase (Reaktion des angeborenen Immunsystems). Makrophagen und NK-Zellen werden aktiviert, den Eindringling vermehrt anzugreifen. Diese aktivierten Makrophagen und NK-Zellen tragen durch das von ihnen sezernierte IL12 und IFNγ auch zur Induktion einer Th1-Antwort bei, wie in Abb. 2.7 dargestellt ist. Die Kaskade führt gewissermaßen zur T-Zelle hin. Anschließend erfolgt die T-Zell abhängige APC-Aktivierung während der adaptiven Immunantwort (die Kaskade führt von der T-Zelle zurück zu den Effektorzellen der unspezifischen Immunität). Der Erreger initiiert die Th1-Antwort und die T-Zell abhängige APC-Aktivierung sorgt für den Erhalt dieser Th1-Antwort über den primären Entzündungsprozeß hinaus. Somit wird durch IL12 eine zellvermittelte Immunantwort generiert (Trinchieri 1999).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß antigenpräsentierende Zellen, vor allem phagozytische Zellen (Monozyten, Makrophagen, Neutrophile), Dendritische Zellen und aktivierte B-Zellen IL12 produzieren können. IL12 stimuliert NK- und T-Zellen zur IFNγ-Produktion, verstärkt ihre lytische Aktivität und (nach Aktivierung oder zusammen mit IL2) ihre Proliferation (Gately 1991).

IL12 wirkt nicht nur wie oben beschrieben auf NK- und Th-Zellen, sondern auch auf zytotoxische T-Zellen (CTLs) und lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAKs). Es verstärkt die Bildung und die zytotoxische Aktivität dieser Zellen (Chehimi 1993).

IL12 und Kostimulatoren

IL12 hat einen direkten proliferativen Effekt auf voraktivierte T- und NK-Zellen. Eine Kostimultion dieser Zellen über ihren CD28 Rezeptor durch den B7 Liganden hat einen stark synergistischen Effekt mit IL12 auf die Vermehrung von T-Zellen (Kubin 1994b). B7 ist ein Oberflächenmolekül von APCs. (Vergl. Kapitel 2.3.2)

IL12 in der Tumortherapie

IL12 induziert eine Antitumorantwort des Immunsystems über mehrere Wege. Die wesentlichen Mechanismen sind in Abb. 2.8 zusammengefaßt. Seine Effizienz für die Tumortherapie wurde in zahlreichen Tiermodellen belegt (Colombo 2002).

Unter bestimmten experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, daß IL12 eine bestehende Toleranz oder Anergie rückgängig machen kann. Das alleine schon macht es zu einem überaus interessanten Zytokin für dir Tumortherapie (Trinchieri 1999).

IL12 hat bei systemischer oder lokaler Gabe des rekombinanten Proteins Anti-Tumoreffekte. Allerdings finden diese sich bei nicht-toxischen Dosen nur bei sehr wenigen Patienten und sind nicht von Dauer. Eine komplette und permanente Tumorregression konnte auf diesem Weg beim Menschen bislang nicht erreicht werden (Gollob 2001). Die Zukunft der IL12-Therapie liegt somit in anderen Applikationswegen als der direkten, systemischen Gabe des rekombinanten Proteins.



Abb. 2.8 Mechanismen der durch IL12 vermittelten Antitumor-Immunreaktion. IL12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das auch immunregulatorisch wirkt indem es eine Th1 Antwort und CTLs anregt. Somit stellt IL12 eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Die wichtige Rolle von IL12 bei der Abwehr von Infektionen, speziell bei intrazellulären Parasiten, reflektiert sowohl seine Aktivität als proinflammatorisches Zytokin (reguliert IFNy-Produktion, aktiviert phagozytische Zellen, induziert die Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten und verstärkt bakterizide Mechanismen) wie auch seine immunregulatorische Funktion (induziert Th1-Zellen, CTLs und die Produktion opsonierender Antikörper). Vergleichbar seiner Funktion bei Infektionen beruht die Antitumoraktivität von IL12 auch auf Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität. IL12 induziert die IFNy- und TNF-Produktion von NK, NKT und T-Zellen, was einen zytotoxischen oder zytostatischen Effekt auf Tumorzellen hat. IL12-aktivierte NK-Zellen verfügen über eine verstärkte zytotoxische Aktivität, die zum Tod der Tumorzelle führen und die Integrität des vaskulären Tumorendothels beeinträchtigen kann. IFNy, TNF und andere von IL12 induzierte Zytokine fördern auch die Produktion von CXCR3 Liganden wie IP-10 und MIG Chemokinen. CXCR3 Liganden sind kraftvolle Inhibitoren der Tumorangiogenese. Sie beeinträchtigen die Differenzierung neugeformter Gefäße und ziehen NKund T-Zellen an, die das Endothel beschädigen können. Via IFNy und anderer Zytokine induziert IL12 auch die Produktion von Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten, die auf manche Tumore toxisch wirken. Auf der Seite der antigenspezifischen Immunaktivität kann IL12 eine proinflammatorische Th1-Antwort verstärken, CTLs aktivieren und die Produktion von Antikörperklassen (IgG2a/b, IgG3) anregen, die die Komplementkaskade aktivieren. Das "Einhüllen" von Tumorzellen mit Antikörpern (Opsonierung) lenkt die zytotoxische Aktivität von phagozytischen und NK-Zellen auf den Tumor. Bei hohen Dosen kann IL12 die induzierbare NO – Synthetase (iNOS) und damit die Stickstoffoxidproduktion aktivieren. Das kann zu einer vorübergehenden, aber erheblichen Immunsuppression führen, was insbesondere bei Vakzinierungsstrategie, wo IL12 als Adjuvans verwendet wird, von Bedeutung sein kann. Verändert nach (Colombo 2002) und persönlicher Kommunikation mit M. P. Colombo.

IL12 Toxizität

Murines IL12 (mIL12) zeigt als Therapeutikum in vielen Mausmodellen seine Effizienz in antimikrobieller, antimykotischer und antiparasitischer Aktivität. Darüberhinaus ist es sehr effizient in der Tumortherapie und kann allergische Reaktionen verbessern. Präklinische Studien an Mäusen, Affen und anderen Tieren zeigten aber auch eine Reihe von Nebenwirkungen, die sich mit denen im Menschen überlappen. Starke Toxizität wurde bei einer Phase II Studie zur Behandlung des Nierenkarzinoms festgestellt. Die Patienten erhielten intravenös 500 ng/kg/Tag von rekombinanten, humanen IL12 (entspricht ca. 6 ng IL12 / ml Blut; Blutvolumen eines 70 kg Menschen mit 5,6 I angenommen) an bis zu 5 aufeinanderfolgenden Tagen; zwei Patienten verstarben und 12 von insgesamt 17 Patienten mußten ins Krankenhaus in Folge der Therapie. Dieses Ausmaß an Nebenwirkungen läßt sich vermeiden, indem die Patienten nach der ersten IL12-Dosis erst 2 Wochen später weiteres IL12 verabreicht bekommen. Dann werden auch Zyklen von 5 aufeinanderfolgenden Tagen toleriert. Diese erste Gabe hat eine deutliche Verringerung der IL12 induzierten IFNγ Produktion und Toxizität zur Folge (Leonard 1997). Allerdings haben Mausstudien gezeigt, daß so eine "Vor"-Dosierung (Einmalgabe zwei Wochen vor intensiveren Zyklen) auch die Antitumor-Effizienz verringern kann (Coughlin 1997).

Die häufigsten Nebenwirkungen in den Phase I/II Studien bei Behandlung von Krebs und Hepatitis mit IL12 sind grippeähnliche Symptome, rapide transiente Leukopenie (Verminderung der Leukozytenzahl im peripheren Blut auf <4000/µl), erhöhte Lebertransaminasen, gastrointestinale Toxizität und Leber-Dysfunktion.

In Mäusen liegt die höchste in einigen Mausstämmen allerdings schon lethale Dosis bei 0,5 - 1,0 µg/Tag (Blutvolumen der Maus: ca. 2 ml). Damit vertragen Mäuse eine etwa hundertfach höhere IL12-Konzentration im Blut als Menschen.

In IL12 behandelten Menschen, Affen und Mäusen steigen die IFNγ-Spiegel stark an, was auf NK- und T-Zellaktivierung zurückzuführen ist. Die in Abb. 2.6 beschriebene Rückkopplung erklärt, wie sich IL12 und IFNγ gegenseitig hochschaukeln können. Das Toxizitätsspektrum von IL12 und IFNγ ist entsprechend auch weitgehend überlappend. Experimente mit IFNγ-Rezeptor *knockout*-Mäusen und IFNγ neutralisierenden Antikörpern bestätigen, daß die akuten Toxizität von IL12 überwiegend IFNγ-abhängig ist (Car 1999). Verursacht wird die Toxizität bei simultaner Gabe von IL2 und IL12 in erster Linier von NK-Zellen aber auch von Makrophagen, die einen schockähnlichen Zustand herbeiführen (Carson 1999). Eine systemische Entzündungsreaktion ist für die Nebenwirkungen verantwortlich.

Die Halbwertszeit von IL12 nach intravenöser Gabe liegt bei 5,3-9,6 h (Atkins 1997), was verglichen mit 7 min bei IL2 (Lotze 1985) recht lang ist.

2.3.2 4-1BBL

Der 4-1BB Ligand (4-1BBL, CD137L) ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor Genfamilie, zu der u. a. auch NGF, TNF, CD40L, FasL und TRAIL gehören. Diese Genfamilie spielt für die Regulation von Zellwachstum, Differentierung und Apoptose eine wichtige Rolle. Der zugehörige Rezeptor heißt 4-1BB.

Das 4-1BB/4-1BBL - System

Der 4-1BB Rezeptor (CD137/ILA) ist ein 30 kD Typ I Membran-Glykoprotein, das sich als 55 kD Homodimer an der Zelloberfläche findet. Das Gen für humanes 4-1BB liegt auf Chromosom 1p36, in einem Cluster verwandter Gene, assoziiert mit Mutationen in verschiedenen malignen Erkrankungen (Vinay 1998). Der Rezeptor wird von aktivierten CD4 und CD8 T-Zellen, aktivierten NK- und NKT-Zellen und Eosinophilen exprimiert. Der Ligand (4-1BBL) für 4-1BB ist ein 34 kD Typ II Glykoprotein aus 256 Aminosäuren mit C-teminaler (cytosolisch gelegener) Homologie zu anderen Genen der TNF-Familie (Goodwin 1993). 4-1BBL liegt in einem Cluster verwandter Gene der TNF Ligandenfamilie (wie CD27L und CD40L) in der Region 19p13 (Gruss 1995). 4-1BBL findet sich vor allem auf der Oberfläche von APCs wie aktivierten Makrophagen, Monozyten, reifen dendritischen Zellen und aktivierten oder reifen B Zellen (Vinay 1998).

Funktion von 4-1BBL

Eine T-Zelle braucht für die Induktion ihres Wachstums und ihrer Differenzierung zwei Dinge: 1. Eine Wechselwirkung zwischen dem T-Zellrezeptor und einem MHCpräsentierten Peptid und 2. ein kostimulatorisches Signal.



Cytokines (IL-2, IL-12, IL-18)

Abb. 2.9: T-Zellaktivierung. Im einfachsten Fall braucht eine T-Zelle (rechts) zur vollständigen Aktivierung zwei Signale: Signal 1 über den T-Zell-Rezeptor via MHC präsentiertem Peptid und Signal 2 zur Kostimulation. Beide Signalgeber sind mit einer APC (links) verbunden. Man unterscheidet 3 Familien von Kostimulatoren: 1. Die B7-Familie (im Bild über dem TCR), die sowohl aktivierende wie auch inhibierende Wirkung haben kann. 2. Die TNF-Familie, die an TNF-Rezeptoren bindet, die auf der T-Zelle exprimierte werden. Die meisten dieser TNF-Rezeptoren werden erst nach Aktivierung der T-Zelle an der Zelloberfläche exprimiert. 3. Die Zytokine (wie IL12) sind für die T-Zell Differenzierung zu Th1 bzw. Th2 Zellen wichtig. (Pardoll 2002)

Letzteres wird durch Moleküle vermittelt, die an Kostimulatorrezeptoren der T-Zelle binden (Abb. 2.9).

CD28 Expression auf der T-Zelle ist essentiell für die Induktion von 4-1BB, das seine eigene Expression in positiver Rückkopplung stimuliert. 4-1BB kann aktivierungsinduzierten Zelltod verhindern (Hurtado 1997) und eine erfolgende Immunantwort retten und verlängern, auch in Abwesenheit von CD28 (Kim 1998). Die Interaktion von 4-1BBL mit seinem Rezeptor stimuliert T-Zell Proliferation (DeBenedette 1995) und Produktion von IFNγ, IL2 und IL4 durch CD4 T-Zellen. Für IL2 und IL4 gilt das allerdings nur im murinen System (Abb. 2.10).

CD28 (Rezeptor für B7) ist wichtiger für die Induktion einer Immunantwort während 4-1BB wichtiger für den Fortbestand dieser Antwort ist (Kwon 2000).



Abb. 2.10: Aktivierung und Konsequenzen des 4-1BB Signals. Naive T-Zellen exprimieren kein 4-1BB. Nach Aktivierung wird 4-1BB permanent exprimiert. Stimulation über den TCR zusammen mit Kostimulation durch 4-1BBL aktiviert CD8 T-Zellen stärker als CD4 T-Zellen. In Folge dieser Aktivierung kommt es zu Zytokinausschüttung und den aufgelisteten Effekten. Es findet primär eine Th1-Antwort statt. Verändert nach (Vinay 1998).

Ist 4-1BBL an seinen Rezeptor gebunden, signalisiert es auch zurück in Zelle, die den Liganden exprimiert. So ein reverses Signal hat man bei B-Zellen und Makrophagen gefunden (Abb. 2.11); es führt zu einer Aktivierung und Proliferationsstimulation, allerdings auch zu einer erhöhten Apoptoserate zumindest bei Monozyten, vergleichbar dem aktivierungsinduzierten Zelltod bei Lymphozyten. So lange wie die Proliferation die Apoptose überwiegt, wächst die Zellpopulation (Salih 2002). Bei B- Zellen ist für diese Aktivierung die zusätzlich Stimulation mit anti-IgM Antikörpern erforderlich (Pollok 1994).



Abb. 2.11: Von der Interaktion zwischen 4-1BB und 4-1BBL profitieren sowohl T-Zelle als auch APC (B-Zelle oder Makrophage). B-Zellen erfahren eine Kostimulation, die zur Proliferation führen kann. Makrophagen werden zur verstärkten Expression von IL6, IL8, ICAM, M-CSF und TNFα angeregt und auch zur Proliferation. Verändert nach (Vinay 1998).

4-1BBL in Tumorzellen

Verschiedene humane Tumorzellinien exprimieren 4-1BBL in unterschiedlichem Ausmaß. Der reverse Signalweg aktiviert die IL8-Produktion der Tumorzellen (Salih 2000). Dieses Zytokin ist ein starkes Chemoattraktand für Neutrophile, T-Zellen und Basophile und somit Verstärker einer Immunreaktion. Aktivierung von T-Zellen durch Antigen über den T-Zellrezeptor führt zur Expression von 4-1BB. Abhängig von der 4-1BBL - Expressionshöhe auf der Tumorzelle können dann T-Zellen kostimuliert werden, was zur IFNγ- und IL2-Ausschüttung durch die T-Zellen führt. Es ist unklar, warum Tumorzellen 4-1BBL exprimieren und auch ob es ihnen irgendeinen Vorteil bietet. Einige Tumore - vor allem bei Leukämien - schütten auch eine im Vergleich zu normalen Zellen erhöhte Menge einer sekretierten Form von 4-1BBL (s4-1BBL) aus. Dadurch schützt der Tumor sich eventuell vor der Überwachung durch das Immunsystem, indem er die Kostimulation der Lymphozyten limitiert oder indem apoptotische Signale zurück in die Tumorzelle reduziert werden (Salih 2001).

Gentransfer von 4-1BBL alleine oder zusammen mit synergistisch wirkendem B7.1 läßt sich einsetzen, um eine Antitumorreaktion bei transplantierten Tumoren zu provozieren (Melero 1998).

2.3.3 Interleukin-2

IL2: Gen und Rezeptor

Humanes IL2 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 15-18 kD. Die verschiedenen Molekulargewichte erklären sich durch ein unterschiedliches Maß an Glykosylierung (Taniguchi 1983). IL2 hat eine Länge von 153 Aminosäuren, wovon die ersten 20 ein Signalpeptid darstellen, das abgespalten wird (Smith 1984). Das Gen liegt auf Chromosom 4q26-28 (Seigel 1984).

Das humane IL2 ist mit dem murinen zu 63% identisch (Kashima 1985) und auch auf murinen Zellen aktiv.

Biologische Aktivität von IL2

Interleukin 2 (IL2) ist ein Lymphokin, das primär von aktivierten Th-Zellen exprimiert wird. Die Aktivierung kann durch bestimmte Mitogene oder durch Antigen/MHC - Komplexe auf der Oberfläche von APCs ausgelöst werden. Die Th-Zelle reagiert auf die Aktivierung durch Expression von IL2 und dem Rezeptor für IL2 und in der Konsequenz mit klonaler Expansion der antigen-spezifischen T-Zelle (Smith 1988). IL2 kann aber nicht nur als autokriner Faktor wirken, sondern auch parakrin auf B-Zellen (Zubler 1984) und NK-Zellen (Biron 1990). Die sogenannten lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAKs) entwickeln sich unter dem Einfluß von IL2 aus NK-Zellen (Grimm 1982). DCs können IL-2 in der Frühphase einer bakeriellen Infektion produzieren und damit zur Proliferation von NK-Zellen beitragen, aber auch T-Zellen (CD8 und CD4) zu diesem frühen Zeitpunkt aktivieren und zur Proliferation stimulieren (Granucci 2001). Die Aktivitäten von IL2 sind in Abb. 2.12 zusammengefaßt.

IL2 wirkt in erster Linie als Wachstumsfaktor. Eine vereinfachte, aber hilfreiche Betrachtungsweise ist, daß Lymphozyten sich unter dem Einfluß von IL2 vermehren und durch andere Zytokine ihre funktionelle Differenzierung bewirken (Mosmann 1989). In wie weit IL2 selbst auch ein Differenzierungsfaktor ist, ist noch unklar.

Andere Zellen, die möglicherweise von IL2 beeinflußt werden, sind Neutrophile (Djeu 1993), Monozyten (Espinoza-Delgado 1995) und γ - δ T-Zellen (Nistico 1991). Diese Zellen zeigen entweder Aktivierung, erhöhte Funktionalität oder verlängertes Überleben, wenn sie IL2 ausgesetzt werden. IL2 ist zusammen mit anderen Zytokinen auch ein Neuromodulator (Hanisch 1993).



Abb. 2.12 Biologische Effekte von IL2. IL2 wird von Th-Zellen und auch von DCs produziert. Zusätzlich zu seiner essentiellen Rolle für die T-Zellteilung und die Ausschüttung von Zytokinen wie IFNγ und IL2 verstärkt es auch das Wachstum von B- und NK-Zellen. Die Aktivierung von Monozyten ist ebenfalls wichtig für die Verstärkung der Immunantwort. Hohe Dosen von IL2 können *in vitro* aus NK-Zellen LAK- (lymphokin-aktivierte Killer-) Zellen machen, die in der Krebstherapie von Bedeutung sind. Veränder nach (Roitt 1998) S.148.

IL2 in der Tumortherapie

IL2 ist als Präparat unter dem Namen Proleukin erhältlich. Es handelt sich um eine in *E. Coli* produzierte, nicht glykolysierte Variante des humanen IL2 (18 x 10^6 IU Proleukin = 1,1 mg; T_{1/2} = 13 min. Herstellerangaben: www.chiron.com).

Mehrere klinische Studien mit intravenöser Gabe von 600.000 – 720.000 IU/kg IL2 wurden durchgeführt (Hochdosistherapie). Diese Dosis wurde dem Patienten an den Tagen 1-5 alle 8 h verabreicht und erneut an Tagen 15-19. Patienten, die auf die Therapie ansprachen, bekamen weitere Dosen in 8-12 Wochen Intervallen. Eine komplette Tumorregression zeigte sich in 6% der Patienten, eine teilweise Regression in 10%. Die Studien wurden an Patienten mit metastatischen Nierenzellkarzinom und Melanom durchgeführt. Da diese Therapieform allerdings erhebliche Toxizität mit sich bringt, ist sie nur für ausgewählte Patienten und in wenigen Zentren möglich. Klinischen Studien mit niedrigeren IL2 Dosen konnten die Toxizität zwar verringern, zeigten allerdings keine Antitumoreffekte (Atkins 2002). IL2 in Kombination mit IFNα alleine oder zusätzlicher Chemotherapie hat zu Tumorregressionsraten von bis zu 60% bei Melanompatienten geführt, allerdings nicht zu einer besseren Langzeitüberlebensrate (Dillman 1999).

Neben seiner Wirkung als Wachstumsfaktor ist IL2 auch durch seine Fähigkeit, Anergie rückgängig zu machen, für die Tumortherapie interessant (Fasler 1995).

IL2 Toxizität

Toxizität bei Hochdosis IL2-Therapie zeigt sich in Hypotonie, dem "vascular leak syndrome" (Gefäßauslaufsyndrom), Herzrythmusstörungen, Leberfehlfunktion, Fieber, Übelkeit, katheter-bezogener Blutvergiftung und führte in einigen Fällen zum Tod. Der Mechanismus für die Lebertoxizität wurde teilweise geklärt: IL2 aktiviert Kupferzellen, die dann Monokine wie TNF ausschütten. Letztere aktivieren zirkulierende Leukozyten und hepatische sinusoidale Endothelzellen und induzieren in diesen die Expression von Adhäsionsmolekülen. Die daraus resultierende Leukozyten-adhäsion an das Endothel kann dann physikalisch die sinusoidale Mikrozirkulation verhindern. Das kann dann zu mikroskopischen Bereichen von Leber-Ischämie führen (Nakagawa 1996).

Dosislimitierende Toxizität wurde mit IL2 bei ca. 0,25 mg/kg bei i.v. Bolus-Gabe erreicht (Lotze 1985). Nimmt man einen Patienten mit 70 kg und 5,6 l Blutvolumen an, so entspricht das einer Blutkonzentration von 3,1 µg/ml.

2.4 Tumorgentherapie

Seit über 10 Jahren versucht man, Gene therapeutisch in der Klinik einzusetzen (Blaese 1995). Ziel dieser Therapien sind vor allem Krebs und monogenetische Erkrankungen. Abb. 2.13 spiegelt wieder, wie viele Patienten bis 2002 gentherapeutisch behandelt wurden, aufgespaltet nach Krankheitsbildern. Krebs stellt mit Abstand die zahlenmäßig bedeutendste Erkrankung für gentherapeutische Ansätze dar.



Abb. 2.13 Patienten, die gentherapeutisch behandelt wurden.

Für die Tumorgentherapie werden vier verschiedene Ansätze verfolgt (Moradpour 2002):

- genetische Veränderung der Tumorzelle selbst
- Veränderung der Tumorumgebung
- Immuntherapie
- Zerstörung des Tumors durch zelllysierende Viren

Methodisch kommen dabei die folgenden Verfahren zum Einsatz:

- Überexpression vorhandener Gene oder fremder (zytotoxischer) Gene
- Gensubstitution mutierter durch native Gene
- Gensuppression auf DNA-, RNA- oder Proteinebene
- Infektion mit onkolytischen Viren

Überexpression von Genen

Ein sehr häufig verwendeter Ansatz ist das Einbringen von Suizidgenen in die Tumorzelle. Das populärste System, die Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus (HSV-Tk) ist ein Konvertierungsenzym (Martin 1997). Es wandelt die nur wenig toxische Vorläufersubstanz ("prodrug") Ganciclovir in das zytostatisch wirkende Nukleosidanalogon Ganciclovirtriphosphat um. Tumorzellen, in die die HSV-Tk eingebracht wurde, werden nach systemischer Gabe des Ganciclovir getötet. Der toxische Effekt dieser Form von Chemotherapie bleibt somit lokal. Ein anderes Konvertierungsenzym ist die Cytosindeaminase (CD). Sie katalysiert die Umwandlung der Vorläufersubstanz 5-Fluorocytosin (5-FC) in das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) (Ohwada 1996). Beide Ansätze wurden in Mausmodellen erfolgreich eingesetzt (Kanai 1997; Kuriyama 1999). Diese durch Suizidgene erzeugten Zytostatika führen nicht nur in der genetisch veränderten Zelle zur Nekrose, sondern wirken aufgrund von Diffusion auch auf die Nachbarzellen toxisch (Moradpour 2002). Dieser "bystander effect" kann vorteilhaft sein, weil dadurch auch Tumorzellen erreicht werden, die zuvor nicht genetisch verändert wurden. Er kann aber auch zur Beschädigung des gesunden Nachbargewebes führen. Der Vorteil gegenüber Genen, die selbst direkt zytotoxisch sind, ist, daß Dauer und Intensität der Therapie wenigstens teilweise über die Dosierung der Vorläufersubstanz kontrolliert werden können. Das Problem bei dem Therapieansatz ist, daß er einen äußerst effizienten Transfer der Suizidgene in alle Tumorherde voraussetzt.

Gensubstitution

Ein in der Vergangenheit sehr populärer Ansatz war das Einbringen von Tumorsuppressorgenen wie p53, das in mehr als 50% aller Tumore mutiert ist (Greenblatt 1994). Auch Kombinationen von p53 mit anderen Tumorsuppressorn wie p16 wurden erfolgreich in Mausmodellen getestet (Sandig 1997). Die Tumorzelle soll durch eine Überexpression eines Tumorsuppressors, der im Tumor mutiert oder deletiert ist, in die Apoptose getrieben werden. Vorteilhaft bei diesem Ansatz ist, daß er nicht toxisch ist. Getroffenes gesundes Gewebe wird nicht oder kaum geschädigt. Auch wenn p53 einen gewissen "bystander effect" auch in klinischen Studien gezeigt hat (Fujiwara 2000), so ist diesem Ansatz doch ein Problem mit den "prodrug"-Ansätzen gemein: Jeder Tumorherd und nahezu alle Zellen in einem Tumorherd müssen genetisch verändert werden, damit es zu einem dauerhaften Therapieerfolg kommt. Dies ist technisch bislang nicht möglich, was in den klinischen Studien zu entmutigenden Ergebnissen geführt hat (Zwacka 1998).

Gensuppression

Neben Genmutation und -inaktivierung wird auch die Überexpression von Onkogenen, Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren für Tumorentstehung und Tumorwachstum verantwortlich gemacht (Moradpour 2002). Gentherapeutisch lassen sich solche Gene auf mRNA-Ebene mit Antisense-RNA (Im 1999), siRNA (Yu 2002) oder Ribozymen (Lewin 2001) hemmen. Auf posttranslationaler Ebene können intrazelluläre Antikörper (Bilbao 2002) oder dominant-negative Faktoren zum Einsatz kommen. Die Spezifität des Gentransfers ist hier wie bei der Gensubstitution weniger relevant. Limitierend ist aber wie bei den zuvor beschriebenen Ansätzen das ungelöste Problem eines effizienten Gentransfers in möglichst alle Zielzellen.

Gentherapie der Tumorumgebung

Am häufigsten kommen hier antiangiogenetische Ansätze zum Tragen. Expression von Angiostatin oder Endostatin kann im Mausmodell die Neubildung von Gefäßen verhindern (Chen 1999).

In der Hochdosischemotherapie kann man Nebenwirkungen auf hämatopoetische Stammzellen verringern, indem man sie zuvor z. B. mit dem Multi-drug-resistence-Protein 1 ausstattet (Moscow 1999).

Immuntherapie

Ziel dieser Therapie ist es, das Immunsystem des Patienten derart zu stimulieren, daß dieses die Tumorzellen elminieren kann. Hierbei können verschiedene Zytokine und T-Zell Kostimulatoren zum Einsatz kommen (vergleiche Kapitel 2.3 und 2.5.2).

Sehr häufig kommen auch DNA-Vakzinierungsstrategien zum Einsatz, die gegen verschiedene Pathogene (Donnelly 1997), aber auch gegen Tumore verwendet werden können, wenn man tumorspezifische Antigene benutzt (Vollmer 1999). Ein grundsätzliches Problem bei diesen Ansätzen ist, daß die Antigenexpression des Tumors sehr heterogen sein kann und die Tumorzellen dann meist weiterwachsen, die das Antigen nicht präsentieren (Lee 1998). Dies hat dazu geführt, daß in den meisten klinischen Studien nur ein sehr begrenzter therapeutischer Effekt erzielt werden konnte (Mitchell 2002). Ein weiterer zum Teil erfolgversprechender Weg ist die genetische Manipulation von DCs. Hierbei ist insbesondere die Fusion von Tumorzellen mit DCs interessant (Bubenik 2001).

Onkolytische Viren

Die klinisch am weitesten fortgeschrittene Testung hat ein Adenovirus mit Namen Onyx-015 hinter sich. In einer gesunden Zelle schaltet das wildtyp Adenovirus das p53 dieser Zelle durch sein E1B-55K Protein aus und ermöglicht so seine Vermehrung. Bei Onyx-015 wurde E1B-55K deletiert. Dem Modell zufolge kann sich nun dieses Virus nur noch in Zellen vermehren, die einen Defekt im p53 Signalweg haben, was auf die meisten Tumorzellen zutrifft (Ries 2002). Alternative Ansätze ersetzen bei einem Wildtypvirus den Promoter eines für die Virusvermehrung essentiellen Gens gegen einen tumorspezifischen Promoter (z. B. AFP) (Hallenbeck 1999). Die Tumorzelle wird durch virale Lyse zerstört. Antitumorale Effekte können auch durch zytotoxische virale Proteine oder durch die Induktion von antitumoraler Immunität hervorgerufen werden (Mullen 2002). Am häufigsten kommen Adenoviren und Herpes Simplex Viren zum Einsatz.
Ein Problem dieses Ansatzes ist, daß prinzipiell jeder Tumorherd infiziert werden muß, häufig sogar mehrfach. Ob eine antitumorale Immunität so wirkungsvoll erzeugt werden kann, daß Metastasen nur vom Immunsystem alleine ausgeräumt werden können, ist äußerst fraglich.

2.4.1 Gentransfer

Um ein Gen in eine Zielzelle einzuschleusen, muß es verpackt werden. Dafür kommen verschiedene Genvektoren zum Einsatz (Moradpour 2002): Liposomen, Proteinkonjugate und Viren. Wegen ihrer überlegenen Stabilität und Effizienz kommen in der Tumortherapie nur virale Vektoren zum Tragen. Hierfür wird das therapeutische Gen in einen i. d. R. replikationsdefekten Virus eingesetzt, der dann in Zellkultur vermehrt wird (He 1998). Ein großes Problem stellt der mangelhafte Gentransfer bei größeren Tumorknoten dar (Qian 1997). Selbst bei intratumoraler Gabe finden sich infizierte Zellen meist nur entlang des Stichkanals. Ein Ausweg aus diesem Dilemma können Viren mit tumorspezifischer Replikationskompetenz darstellen oder immunstimulatorische Ansätze, bei denen es reicht, einige wenige Zellen zu treffen.

Die am häufigsten verwendeten Vektoren in der Tumortherapie sind Retroviren und Adenoviren. Die wesentlichen Nachteile der Retroviren sind, daß sie sich nicht annähernd zu so hohen Titern wie Adenoviren vermehren lassen und daß sie vor allem sich teilende Zellen infizieren. Die Charakteristika verschiedener Gentransferansätze sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

Charakteristika	adenoviral	AAV	retroviral	lentiviral	HSV	nicht-viral
Wirtszellspektrum	breit	breit	eingeschränkt	breit*	eingeschränkt	breit
Transduktionseffizienz	sehr hoch	hoch/mittel	niedrig	niedrig	mittel	sehr niedrig
chromosomale Integration	nein	ja/nein	ja	ja	nein	nein
Dauer der Expression	Wochen - Monate	langfristig	langfristig	langfristig	Tage	Tage
Vektorkonstruktion	einfach	etabliert	etabliert	schwierig	schwierig	unterschiedlich
Transgengröße	5 - 36 kb	4 - 5 kb	4 - 5 kb	8 - 9 kb	groß	unbegrenzt
erreichbare Titer pro ml	hoch (>10 ¹¹ -10 ¹²)	niedrig (<10 ⁹)	niedrig (<10 ⁷)	niedrig (<10 ⁶)	hoch (<10 ¹⁰)	hoch
Wirtszellproliferation	nicht erforderlich	nicht erforderlich	erforderlich	nicht erforderlich	nicht erforderlich	nicht erforderlich
regulierte Expression	vorhanden	vorhanden	möglich	möglich	schwierig	vorhanden
Immunantwort	hoch/niedrig**	niedrig/selten	selten	selten	hoch	niedrig

Tabelle 2.2 Charakteristika von gebräuchlichen Gentransfervektoren (Breyer 2001)

Anmerkungen: *VSV-G pseudotypische HIV Vektoren / **verringerte Immunantwort gegen Minimaladenoviren

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich nun mit einem der wichtigsten Gentherapie-Vektoren, den Adenoviren.

2.5 Adenoviren

Adenoviren wurden seit ihrer ersten Beschreibung in den 1950ern (Hillemann 1954; Rowe 1953) ausführlich untersucht und charakterisiert. Rowe und Mitarbeiter isolierten Adenoviren aus Tonsillen (Mandeln) und adenoidem, drüsenählichem, insbesondere von Wucherungen der Rachenmandel stammendem, Gewebe und vermehrten sie. Inzwischen sind mehr als 40 verschiedene humanpathogene Adenovirustypen bekannt. Sie verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, infizieren aber auch den Gastrointestinalbereich und die Bindehaut des Auges (Modrow 1997).

Es handelt sich um hüllenlose DNA-Viren, deren Protein-Capsid aus Pentonen (Pentonbasisprotein und Fiberprotein) und Hexonproteinen besteht (Shenk 1996). Abb. 2.14 zeigt das Bild eines aufgeschnittenen Adenovirus. Das Genom der am häufigsten verwendeten Adenoviren - Typ 2 und Typ 5 - besteht aus einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül von 36 kb (Typ 2: 35.937 bp; Typ 5: 35.953 bp) (Chroboczek 1992).



Abb. 2.14 Adenovirus schematisch. Sein Durchmesser liegt bei 80-110 nm. (Modrow 1997) S. 393

Beide Stränge werden transkribiert und nahezu alle Transkripte werden mehrfach gespleißt. Die viralen Transkriptionseinheiten werden in frühe (E1, E2, E3 und E4) und späte Gene (II - XII) unterteilt, abhängig vom Zeitpunkt ihrer Expression relativ zur viralen DNA-Replikation (Shenk 1996). Die frühen Genprodukte sind in die adenovirale Transkription, virale DNA-Replikation, Immunsuppression der Wirtszelle und Verhinderung der Apoptose der Wirtszelle involviert. Die späten Genprodukte sind für den Zusammenbau des Virus erforderlich. Bei den frühen Genen wird E1A als erstes exprimiert; es ist der wichtigste Transkriptionsaktivator für die folgende adenovirale Genexpression. Darüberhinaus ist E1A in die virale Replikation involviert indem es den G1 - S Übergang der Wirtszelle induziert (Flint 1997).

Die adenovirale Infektion (Abb. 2.15) beginnt mit der hochaffinen Bindung des Fiberproteinknopfes ("fiber knob") an den Zelloberflächenrezeptor CAR (Coxsackievirus und Adenovirus Rezeptor) (Bergelson 1997). Die physiologische Funktion des CAR besteht in der Vermittlung von Zell-Zell Kontakten (Walters 2002). Alternativ kann die MHC class I a2 Domäne als Rezeptor dienen (Hong 1997). Auf die Bindung des Fiberproteinknopfes folgt die Wechselwirkung zwischen Pentonbasisprotein und Integrinen der Zielzelle. Der Adenovirus wird dann durch die rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen, entkommt dem Endosom und gelangt über das Cytosol an den Kern, wo die virale DNA ohne das Capsid in das Nukleoplasma gelangt. Dort beginnt die virale Transkription und Replikation. Der Vorgang der viralen Internalisierung gefolgt von der Freigabe ans Cytosol benötigt etwa 15 min; Transgenexpression ist innerhalb von 18 h nach Infektion detektierbar und erreicht ihr Maximum nach 48-72 Stunden (Greber 1993). Wie gut ein Adenovirus eine Zelle infizieren kann, hängt maßgeblich von deren Rezeptorstatus ab (Walters 1999). Der Abschluß des viralen Zyklus löst eine Zellyse und damit die Freisetzung der vermehrten Viren aus. Die Zellyse wird durch das "adenovirus death protein" E3-11.6K ausgelöst (Doronin 2003; Tollefson 1996).



Abb. 2.15 Ein Adenovirus infiziert eine Zelle. Der primäre Rezeptor für den Adenovirus ist der CAR. Integrine fungieren als Korezeptoren. Die Rezeptorvermittelte Endocytose bringt das Virus über ein Endosom, wo es durch das saure Milieu teilweise aufgelöst wird, zum Kern. Dort vermehrt es sich. Aus einer Zelle können bis zu 100.000 Adenoviren kommen, was 10-100 mal mehr ist als bei den meisten anderen Virusarten. (Sompayrac 2002) S. 41

2.5.1 Adenoviren als Vektoren

Rekombinante adenovirale Vektoren wurden erstmals vor knapp 20 Jahren eingesetzt (Yamada 1985). Bei diesen Vektoren ist i. d. R. mindestens die E1 Region deletiert, wodurch sie sich in somatischen Zellen nicht mehr autonom replizieren können. Ihre Aufzucht erfolgt daher in Zellinien, die die E1 Region *in trans* zur Verfügung stellen. Hierfür stehen verschiedene Zellinien zur Auswahl: Die älteste ist die HEK 293 Linie (Graham 1977). Lange wurde angenommen, daß es sich hierbei um eine embryonale Nierenzellinie handele (HEK = human embryonic kidney). Neuere Ergebnisse weisen aber auf einen neuronalen Ursprung hin (Shaw 2002). Andere Verpackungslinien, die mit E1 transformiert wurden, sind:

911-Zellen: HER-Zellen ("Human Embryonic retina") (Fallaux 1996),

PER.C6 : HER-Zellen (Fallaux 1998),

GH329-Zellen: HeLa-Zellinie (Gao 2000) und

N52.E6: humane Amniocyten-Zellen (Schiedner 2000).

Die letzten drei Linien haben den wichtigen Vorteil, daß die zur Transformation verwendete E1 Region keine Überlappung mit Sequenzen im adenoviralen Vektor zeigt. Dies ist von großer Bedeutung, da sonst bei hochtitrigen Präparationen immer wieder auch große Mengen von replikationskompetenten Adenoviren (RCA) entstehen (Hehir 1996; Zhu 1999). Vektormengen von 10¹¹-10¹³ pfu/ml können aus den beschriebenen Verpackungslinien routinemäßig isoliert und anschließend über CsCl-Gradienten - Ultrazentrifugation aufgereinigt werden. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die derzeit verwendeten adenoviralen Vektoren. Sie zeigen jeweils unterschiedliche Deletionen im Adenovirusgenom. In die adenovirale Hülle kann ein Genom von bis zu 108,3% der Wildtypgröße verpackt werden. Dieses ist aber instabil. Die Obergrenze für stabile Genome liegt bei ca. 105% (37,750 kb) der Wildtypgröße (Bett 1993).

Ad Vektor	deletierte Gene	Verpackunglinie	Klonierungska- pazität	biologische Sicherheit
ΔE1	E1	exprimiert E1	3 - 5 kb	virale Restgenexpression
ΔΕ1 ΔΕ3	E1 & E3	exprimiert E1	7,7 kb	virale Restgenexpression
ΔΕ1 ΔΕ4	E1, E3 & E4	exprimiert E1/E4	10 kb	reduzierte virale Restgenexpression
ΔΕ1 ΔΕ2	E1, E2a/E2b & E3	exprimiert E1/E2	bis zu 9 kb	reduzierte virale Restgenexpression
hdAd	alle viralen Gene	exprimiert E1; Helfervirus	28 - 37 kb	Verunreinigungen mit Helfervirus

Tabelle 2.3 Charakteristika von adenoviralen Vektoren. Verändert nach (Breyer 2001).

Der verbreiteste Vektor ist der Ad ΔE1ΔE3. Er stellt noch den Standard für Labor und Klinik dar. Verschiedene weitere Deletionen im Vektorgenom haben zu Verbesserungen hinsichtlich verringerter viraler Genexpression und Klonierungskapazität geführt. Die helferabhängigen Adenoviren (hdAd) sind hierbei die zukunftsträchtigste Vektorgruppe. Sie verfügen über keine viralen Gene mehr und haben nur noch die für die Verpackungs- und Replikationsmaschinerie notwendigen DNA-Sequenzen (Parks 1996). Dieser Vektor zeigt eine erheblich verringerte Immunantwort des Wirts, minimale Toxizität und erreicht eine langanhaltene Genexpression (Morsy 1998; Schiedner 1998). Sein herrausstechendstes Merkmal aus Sicht eines Tumortherapeuten ist aber seine Klonierungskapazität von gut 28 kb bis zu einem theoretischen Limit von 37 kb. Für die immunstimulatorische Tumortherapie haben die klassischen, nur in E1 und E3 deletierten Vektoren aber einen Vorteil: von ihnen geht ein Zusatzeffekt in der Stimulation des Immunsystems aus (Geutskens 2000). Die Anwendung von hdAd relativ zu Ad Δ E1 Δ E3 wird mit einer reduzierten Entzündungsreaktion und einer geringeren zellulären Infiltration des behandelten Bereichs assoziiert. Dies läßt sich vermutlich auf das Fehlen der viralen Restgenexpression zurückführen, die höchstwahrscheinlich zu einer klassischen CTL-Antwort beiträgt und damit zum Tod der infizierten Zelle führt (Amalfitano 2002).

Unter Sicherheitsaspekten könnte sich hdAd relativ zu Ad Δ E1 Δ E3 als nachteilig für die Tumortherapie erweisen, weil bei Ad Δ E1 Δ E3 die Transgenexpression i.d.R. auf einen Zeitraum von i.d.R. vier Wochen bis maximal drei Monate begrenzt ist (Barr 1995; DeMatteo 1996). Für eine immunstimulatorische Tumortherapie ist dieser Zeitraum ausreichend und eine länger andauernde Transgenexpression hinsichtlich der Vermeidung eventueller Autoimmunreaktionen gegenüber infiziertem Normalgewebe nicht wünschenswert.

Bei systemischer Gabe von adenoviralen Vektoren wird eine nicht tolerierbare, unter Umständen lethale Toxizität bei 6 x 10¹¹ Partikeln/kg erreicht. Die Toxizität ist auf die adenovirale Hülle zurückzuführen (NIH 2002; Raper 2002).

2.5.2 Adenoviren in der immunstimulatorischen Tumortherapie

Adenovirale Vektoren wurden für den Transfer nahezu aller in der Tumortherapie erdenklichen Gene eingesetzt. Die wesentlichen Ansätze sind in Kapitel 2.4 benannt. Die Möglichkeiten, Cytokine für die Immuntherapie von Tumoren einzusetzen, wird seit langem erprobt. Die Toxizität von Zytokinen bei systemischer Gabe hat zur Erforschung alternativer Applikationswege geführt. Hierbei haben sich adenovirale Vektoren als besonders wirkungsvolle Gentransfervehikel hervorgetan.

Der entscheidende Vorteil bei der Immunstimulation gegenüber allen anderen Ansätzen ist die Möglichkeit, Metastasen zu eliminieren. Der Vektor zerstört nicht selbst den Tumor, sondern lenkt das Immunsystem so auf den Tumor, daß es im Idealfall den behandelten Tumor und auch alle nicht behandelbaren Metastasen vollständig ausräumt. Ziel des Ansatzes ist gewissermaßen ein Training des Immunsystems an den Tumorzellen. Hat der Vektor die gewünschte Wirkung gezeigt, wurde quasi nur "Hilfe zur Selbsthilfe" geleistet. Dadurch reichen auch viel geringere Vektordosen als man sie beispielsweise bei onkolytischen oder Tumorsuppressor-Ansätzen benötigt.

Tabelle 2.4 auf der folgenden Seite faßt einige Tierstudien zusammen, bei denen adenovirale Vektoren mit immunstimulatorischen Genen für die Tumortherapie getestet wurden. In allen Tiermodellen erfolgte die Vektorapplikation intratumoral und bei

den Modellen mit zwei Tumoren wurde stets nur einer behandelt. Bei den Kontrollen wurde entweder PBS, adenoviraler Vektor ohne Transgen oder mit Reportergen injiziert. Unterschiede zwischen diesen Kontrollen wurden nicht beobachtet.

Studie	Konstrukt(e)	Tumormodell	Tumorgröße Tumorzellen (Tage zum wachsen)	Virusdosis	Lanzeitüberlebende, Beobachtungszeit	
(Barajas 2001)	Ad CMV IL12	HCC, Ratte McA-RH7777-Zellinie Leber	8-10 mm je 5x10 ⁵ (10d) 2 Tumore	5x10 ⁹ pfu (in einen Tumor)	60% (>1 Jahr) Kontrolle: < 40 Tage	
		HCC, chem. induziert Ratte, Leber	0.5-5 mm 12 Wochen mehrere Tumore	5x10 ⁹ pfu (in einen Tumor)	0% (<130 Tage) Kontrollen: < 70-100 Tage	
(Mazzolini 1999)	Ad CMV IL12	CC, Maus CT-26 Zellinie subkutan	5 mm 5x10 ⁵ (10d) 1 Tumor	1x10 ⁸ pfu	76%, > 200 Tage	
	Ad CMV IL12			2,5x10 ⁷ pfu	0% < 70 Tage Kontrollen: < 24 Tage	
	Ad CMV B7.1			2,5x10 ⁷ pfu	0% < 42 Tage	
(Puetzer 1997)	Ad CMV IL12	Bruskrebs, Maus	sichtbar (2-6 mm?) 1x10 ⁶ (21d) 1 Tumor	2,5x10 ⁷ pfu (je 1,25x10 ⁷)	30 % > 140 Tage	
	+ Ad CMV B7.1	PyMidT Modell subkutan				
	Ad IL12-B7.1			1x10 ⁷ pfu	0% < 70 Tage	
				2,5x10 ⁷ pfu	70% > 140 Tage	
				1x10 ⁸ pfu	90% > 140 Tage	
	Ad CMV IL2			5x10 ⁸ pfu (in einen Tumor)	18% (16% Sterblichkeit aufgrund IL2)	
(Addison 1998)	Ad CMV IL12	Bruskrebs, Maus PyMidT Modell subkutan	sichtbar (2-6 mm?) je 1x10 ⁶ (ca. 21d) 2 Tumore	5x10 ⁸ pfu (in einen Tumor)	22% (0% Sterblichkeit)	
	Ad CMV IL2 + Ad CMV IL12			5x10 ⁸ pfu (je 2,5x10 ⁸) (in einen Tumor)	63% (17% Sterblichkeit aufgrund IL2)	
(Martinet 2002)	Ad RSV IL12	Lebermetastase, Maus	5 mm	1x10 ⁸ pfu	22% > 150 Tage Kontrollen: < 80-90 Tage	
	Ad RSV 4-1BBL	JC-Zellinie (Brustkrebs) Leber	1x10 ⁵ (10d) 1 Tumor	1x10 ⁹ pfu	0% < 80-90	
	Ad RSV IL12 + Ad RSV 4-1BBL			1x10 ⁸ pfu + 1x10 ⁹ pfu	78% > 150 Tage	

Tabelle 2.4 Einige präklinische Studien zur immunstimulatorischen adenoviralen Genther
--

Interleukin-12 alleine oder zusammen mit anderen Zytokinen hat sich als äußerst wirkungsvoll erwiesen (Melero 2001). Allerdings wurden auch andere Zytokine alleine oder in Kombination mit anderen Genen getestet (Chen 1995; Emtage 1998; Ju 2000; Qiu 2001). Es gibt zur Zeit kein geeignetes Vergleichssystem, um die wir-

kungsvollsten Genkombinationen evaluieren zu können und die Anzahl der möglichen Genkombinationen scheint nahezu unerschöpflich.

Aus der obigen Tabelle werden aber einige wichtige Prinzipien ersichtlich, die für die Weiterentwicklung der immunstimulatorischen Gentherapie wichtig sind:

- IL12 zeigt in allen getesteten Modellen einen deutlichen Antitumoreffekt.
- Dieser Effekt läßt sich durch Kombination mit anderen Zytokinen oder Kostimulatoren steigern.
- Es ist effizienter, zwei Gene vom selben Vektor als von zwei verschiedenen exprimieren zu lassen (Puetzer 1997).

Daher wurde von mir ein adenoviraler Vektor konstruiert, der die Zytokine IL12 und IL2 sowie den Kostimulator 4-1BBL von einem Vektormolekül exprimiert. Bei dem hierbei verwendeten IL12 handelt es sich um ein "single chain" IL12 (scIL12). Bei diesem sind die Untereinheiten des IL12 fusioniert. Dadurch konnte eine erhebliche Steigerung der biologischen Wirksamkeit erreicht werden (Lieschke 1997).

Die Höhe der Transgenexpression vom Vektor nimmt in der Reihenfolge IL12, 4-1BBL, IL2 ab. IL2 wurde hierbei bewußt an die letzte Stelle gesetzt, da in der Studie von Addison et al. die Gabe eines IL2 exprimierenden Vektors sich als toxischer als die eines IL12 exprimierenden Vektors erwiesen hatte (siehe Tabelle 2.4).

Vektoren, die nur scIL12 bzw. scIL12 und 4-1BBL exprimieren, wurden ebenfalls konstruiert. Im hier verwendeten HCC-Modell der Ratte haben alle Vektoren eine sehr hohe Antitumoraktivität gezeigt.

2.6 Interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES)

Um die drei Gene IL12, 4-1BBL und IL2 auf einem Vektor unterzubringen (vergl. 2.5.2), war es nicht möglich, für jedes Gen eine einzelne Expressionskassette zu konstruieren. Die maximale Genomgröße eines adenoviralen Vektors hat dies nicht erlaubt. Für die Konstruktion der Vektoren in dieser Arbeit wurden zwei interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) verwendet, um individuelle Promoter- und Polyadenylierungssequenzen einzusparen. Durch diese IRES wurden alle drei Transgene verbunden. Damit reichte ein Promoter und eine Polyadenylierungssequenz für die Expression von drei Genen, was zu einer optimalen Ausnutzung der eingeschränkten Transgenkapazität in adenoviralen Vektoren führte (vergl. 2.5.1).

IRES sind *cis*-Elemente, die die kleinen ribosomalen Untereinheiten zu einem internen Initiator-Codon innerhalb einer mRNA rekrutieren (Martinez-Salas 1999). Bei dieser Cap-unabhängigen Rekrutierung sind mehrere zelluläre Co-Faktoren wichtig (Stewart 1997). Ursprünglich wurden IRES im Picornavirus RNA entdeckt (Jackson 1995), später fand man sie aber auch in anderen viralen und zellulären, eukaryotischen mRNAs (Huez 1998; Lopez-Lastra 1997; Nanbru 1997). IRES-Elemente sind von sehr unterschiedlicher Länge (meist 130-460 Nt., kürzestes: 9 Nt.) und haben unterschiedliche Sekundärstrukturen, meist aber Y-förmig (Chappell 2000; Le 1997). Bei nahezu allen IRES ist die Sekundärstruktur essentiell für die interne Translationsinitiation (Hoffman 1996; Martinez-Salas 1996). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten picornaviralen Elementen aus dem Poliovirus (PV) und dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV), sind beide trotz ihrer geringen Sequenzhomologie in ihrer Sekundärstruktur hoch konserviert (Belsham 1996). Die evolutionäre Bedeutung für IRES als 5'-nichttranslatierte Regionen wird am Beispiel der mRNA des Picornavirus deutlich: Picornaviren kodieren eine Protease, die den Cap-bindenden Translationsinitiationsfaktor eIF4G spaltet. Dadurch wird die Cap-abhängige Translation inhibiert, IRES-getriebene Translation ist aber unverändert möglich (Rueckert 1996).

IRES sind für die unterschiedlichsten Zwecke von Zellkultur über Gentherapie bis hin zu transgenen Tieren meist mit Erfolg eingesetzt worden (Mountford 1995). Wann immer die Koexpression von zwei Genen erforderlich ist, sind diese Elemente von großer Hilfe. Einige Punkte gilt es jedoch bei der Klonierung der Transgene im Zusammenhang mit IRES-Elementen zu beachten. Die optimale Distanz zwischen dem ersten Cistron (der ersten cDNA) und dem IRES liegt bei 29-80 Nt. (Attal 1999; Houdebine 1999). Beim EMCV IRES ist das 11. AUG des IRES das Startcodon. Dieses Codon muß unmittelbar hinter dem IRES positioniert sein, um effiziente Translation zu gewährleisten. In einigen Fällen kann auch ein AUG Codon unmittelbar nach dem 11. benutzt werden (Ghattas 1991). Beim PV hingegen kann jedes AUG hinter dem IRES effizient für die Tranlationsinitiation genutzt werden, wenn es von einer Kozak-Konsensus Sequenz umgeben ist (Houdebine 1999). Darüberhinaus gilt es zu beachten, daß verschiedene IRES sehr unterschiedliche Aktivitäten in verschiedenen Zellen haben (Borman 1997). Die Expressionshöhe des zweiten Cistrons beim EMCV-IRES liegt meist bei 20-50% verglichen mit dem ersten Cistron (Mizuguchi 2000). Bei der Konstruktion adenoviraler Vektoren gilt es den Einsatz homologer Sequenzen zu vermeiden, da durch Rekombination innerhalb des Vektors die Sequenz zwischen den homologen Bereichen verloren gehen kann (Sandig 2000). Die hohe homologe Rekombinationsrate bei Adenoviren ist direkt mit der Replikation verbunden (Young 1984) und läßt sich durch die Persistenz von Einzelstrang Molekülen erklären, die wieder zusammenkommen und Heteroduplizes formen (Ahern 1991). Um eine solche homologe Rekombination zu vermeiden, wurden zwei verschiedene IRES-Elemente verwendet.

2.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines gentherapeutischen Verfahrens zur Tumortherapie. Das Therapieverfahren sollte idealer Weise nicht toxisch und möglichst frei von Nebenwirkungen sein. Zudem sollte die Behandlung es ermöglichen, daß auch Metastasen ausgeräumt werden, da diese beim klinischen Geschehen besonders kritisch sind. Diese Ziele wurden mit einem immunstimulatorischen Ansatz angegangen. Eine einmalige Behandlung sollte möglichst dafür sorgen, daß das Immunsystem lernt, den Tumor zu erkennen und dann selbstständig auszuräumen. Dabei sollten auch Metastasen distal vom Behandlungsort erkannt und ausgeräumt werden. Es handelt sich quasi um "Hilfe zur Selbsthilfe". Das Immunsystem sollte am Tumor trainiert werde.

Zur Erreichung dieser Ziele wurden drei Gene ausgewählt: Interleukin-12, der T-Zell Kostimulator 4-1BBL und Interleukin-2. Alle stimulieren das Immunsystem und haben einzeln oder in Zweierkombinationen Antitumoreffekte. Hier sollten erstmals alle drei kombiniert werden, wobei eine bislang kaum erprobte Variante des Interleukin-12 Anwendung finden sollte. Dadurch sollte die Dosis der Einzelfaktoren reduziert werden, um Nebenwirkungen zu minimieren. Um die Beiträge von 4-1BBL und IL2 ermitteln zu können, sollten auch IL12 alleine und IL12 in Kombination mit 4-1BBL getestet werden.

Die potentiell toxische Wirkung der Interleukine bei systemischer Gabe, macht eine lokale Applikation am Ort des Tumors sinnvoll. Daher sollte ein adenoviraler Vektor gewählt werden und dessen Dosis und die mit ihm verbundenen Nebenwirkungen durch die Genkombination minimiert werden.

Ein so konstruierter therapeutischer Vektor sollte *in vitro* und im Tiermodell getestet werden.

3 Ergebnisse

Es wurde ein adenovirale Vektor konstruiert, der die simultane Expression des "single chain" IL12, des T-Zell-Kostimulators 4-1BBL und des IL2 erlaubt. Zusätzlich wurden zwei Vektoren hergestellt, die nur IL12 und 4-1BBL bzw. nur IL12 exprimieren. Alle Vektoren wurden zunächst *in vitro* charakterisiert und anschließend *in vivo* auf ihre immunstimulatorische Wirkung bei der Bekämpfung hepatischer Tumore untersucht.

3.1 Konstruktion der adenoviralen Vektoren

3.1.1 Die Konstrukte Ad-1, Ad-2 und Ad-3

Abb. 3.1 gibt den Aufbau der drei in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren schematisch wieder. Alle Konstrukte bauen auf einem in E1 und E3 deletierten Adenovirus auf.



Abb. 3.1 Die adenoviralen Vektoren Ad-1, Ad-2 und Ad-3 in schematischer Darstellung. Die Größe der gesamten Transgenkassette (inkl. CMV und pA) ist für jeden Vektor rechts angegeben. ITR: Inverted Terminal Repeat; Ψ: eine als Verpackungssignal bezeichnete DNA-Sequenz des Adenovirus; CMV: Promoter aus dem humanen Cytomegolovirus; SV40 pA: Polyadenylierungssequenz aus dem Simian Virus 40; IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle; PV: Poliovirus; EMCV: Encephalomyocarditis Virus; IL12: murines, einkettiges Interleukin-12 (scIL12); 4-1BBL: ein muriner T-Zell-Kostimulator aus der TNF-Familie; IL2: murines Interleukin-2.

Es sei an dieser Stelle betont, daß in der vorliegenden Arbeit ausschließlich murine Gene als therapeutische Faktoren zum Einsatz kamen. Diese sind auch in der Ratte aktiv. Mit IL12 ist immer das Einketten-IL12 (scIL12) gemeint.

3.1.2 Klonierung und Aufzucht der Vektoren

Die Details der Klonierung sind unter Material und Methoden ausführlich dargelegt und die Plasmidkarten sind im Anhang zusammengestellt. Die wesentlichen Schritte waren:

- Sukzessive Klonierung der therapeutischen Gene "single chain" IL12 (scIL12), 4-1BBL und IL2 in das Plasmid pT3 hinein: pT3 stellt als Klonierungsplasmid die IRES-Elemente zur Verfügung. Auf diese Weise wurden die Gene über IRES-Elemente verknüpft. IRES steht für "interne Ribosomen-Eintritts-Stelle" und ist eine DNA-Sequenz, die es ermöglicht, von einer mRNA mehrere separate Proteine zu translatieren. Die vordere IRES stammt aus dem Picornavirus, die zweite aus dem Encephalomyocarditis-Virus.
- 2) Herstellung der adenoviralen Plasmide: Die über IRES verbundenen therapeutischen Gene wurden im Verbund aus pT3 herausgeschnitten und in pShuttle-CMV hineinkloniert, was pShuttle-3 ergab. Dieses Plasmid enthält den humanen CMV-Promoter und einen SV40 polyA. Aus ihm wurden durch 2 verschiedene Deletionen pShuttle-2 (scIL12 + 4-1BBL) und pShuttle-1 (scIL12) generiert.

Durch homologe Rekombination in *E. coli* wurden die Expressionskassetten in pAdEasy-1 überführt (vergl. Abb. 3.2 a/b). Dieses Plasmid enthält außer E1 und E3 alle adenoviralen Gene. Dadurch entstanden pAd-1, pAd-2 und pAd-3.

3) Transfektion der adenoviralen Plasmids in 293 Zellen: pAd-1/2/3 wurden nach Linearisierung in 293 Zellen transfiziert, einzelne Virus-Plaques wurden isoliert und per Hirt-Extraktion analysiert (vergl. Abb. 3.2 c). Drei Plaques von jedem Virustyp wurden vermehrt (insgesamt 9 Präparationen, 8 davon wurden ausführlich charakterisiert).

Abb. 3.2 zeigt die entscheidenden Schritte (a) der homologen Rekombination, (b) der Retransformation bzw. Restriktionsanalyse der Retransformanten und (c) die Restriktionsanalyse der Vektor-DNA (nach Hirt-Extraktion) beispielhaft für Ad-3. Die Restriktionsanalysen der Vektor-DNA zeigen die virale DNA wie sie in den 293-Zellen entstanden ist.

Ein Nachteil der homologen Rekombination in *E. coli* war ihre geringe Effizienz. Es wurden zwischen 1 und 4 korrekten Klonen aus 20 Kolonien identifiziert. Allerdings sind aus diesem Klon im Anschluß ausschließlich korrekte adenovirale Vektoren entstanden, wie der Hirt-Extrakt und auch spätere Expressionsexperimente zeigen konnten.



Homologe Rekombination (Ad-3):

Nach der homologen Rekombination wurden die unverdauten Plasmidpräparationen analysiert. Erfolgreiche Rekombinante sind größer als erfolglose Rekombinationsprodukte. Spalten: (1 & 12) DNA-Standard B, (2-11 & 13-22) Rekombinationsprodukte. (5&8) mögliche erfolgreiche Rekombinanten, (3&10) überprüfenswerte Rekombinationsprodukte (?); die restlichen Bahnen zeigen erfolglose Rekombinante, die keine oder höchstens eine unvollständige Transgenkassette enthalten.



Retransformation (Ad-3):

Die Rekombinanten von 3a, 5a, 8a und 10a (vergl. oben) wurden retransformiert und dann als *Bam*HI-Verdau und unverdaut analysiert. Von jedem Retransformanten (R.) wurden zwei Klone untersucht. Bei erfolgreicher Rekombination sollten Fragmente von 20774, 11731, 3823 und 1918 bp erkennbar sein. Spalte: (1&12) DNA-Standard B, (2&13) DNA-Standard A, (3-4) R. 3a *Bam*HI, (5-6) R. 3a unverdaut, (7-8) R. 5a *Bam*HI, (9-10) R. 5a unverdaut, (14-15) R. 8 *Bam*HI, (16-17) R. 8 unverdaut, (18-19) R. 10 *Bam*HI, (20-21) R. 10 unverdaut. Alle Retransformante zeigen des erwartete Muster und sind korrekt. R. 3 wurde zur Vektorproduktion verwendet.



Restriktionsanalyse der Vektor-DNA (Ad-3):

Aus 8 Plaques wurde nach Infektion einer T25-Zellkulturflasche mittels Hirt-Extraktion die Vektor-DNA isoliert und mit *Bam*HI verdaut. Dabei enstehen Fragmente von 19662, 11731, 2883, 1913 und 945 bp. Bis auf das kleinste Fragment waren bei allen analysierten Plaques alle Fragmente, abhängig von der eingestellten Helligkeit, erkennbar. Die Spalten: (1) DNA Standard B, (2) DNA-Standard A, (3-10) Hirt-Extraktionen *Bam*HI, (11) pAd-3 *Bam*HI. Bei (4) und (11) ist die Bahn mit DNA überladen. Bei allen anderen analysierten Hirt-Extrakte zeigt sich das erwartete Bandenmuster. Aus 3 Plaques (Bahn 3, 4 & 9) wurden Vektoren hochgezogen. Mit dem Vektor von Bahn 3 wurden die weiteren Experimente gemacht.

Abb. 3.2 Wesentliche Schritte für die Herstellung eines Adenovirus (Ad-3).

3.2 In vitro-Charakterisierung der Vektoren

3.2.1 Titration

Die Titration bzw. Konzentrationsbestimmung der infektiösen Viruspartikel erfolgte mit Hilfe einer Endpunkttitration und mittels eines Spot-Assay (zum traditionellen Plaque-Assay analoge Technik). Bei der Endpunkttitration werden 293- oder 911- Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des Virus infiziert und dann wird aus der letzten Verdünnung, die noch Anzeichen einer Virusinfektion zeigt, der Titer bestimmt. Beim Spot-Assay wird in den 293-Zellen 48 h nach Infektion das adenovirale Hexonprotein angefärbt. Die meisten Titrationen wurden mehrfach durchgeführt. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Dabei ist der versuchshistorische, zeitliche Ablauf wiedergegeben, da dieser in weiteren Versuchen wichtig war. In der obersten Reihe in der Tabelle ist die Zellinie angegeben, in der die Titration stattgefunden hat. Bis auf die Spot-Assay-Spalte wurde immer eine Endpunkttitration durchgeführt. Nach Angaben von Qbiogene (siehe auch Titration unter Material und Methoden) liegen die Titer, die man durch einen Plaque-Assay erhält niedriger als die bei einer Endpunkttitration. Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten wurde für die Normalisierung der Viren auf IL12 (siehe nächstes Kapitel) der Ad-3 (#1) Titer von 4,8 x 10¹⁰ infektiösen Einheiten (i.u.) als Ausgangsbasis genommen. Der Plague-Assay ist immer noch die in der Literatur am häufigsten zu findende Titrationsmethode.

Die durchschnittliche relative Standardabweichung der Titer betrug 54%. Die maximale Abweichung von zwei Titer-Werten eines Virus lag bei einem Faktor von 6,3; i. d. R. lagen die Abweichungen bei einem Faktor zwischen 1 und 5. Die Endpunkttitrationen mit 911-Zellen erschienen zuverlässiger, weil die Kontroll-Zellen auch nach 14 Tagen noch weitgehend konfluent waren während 293-Zellen zu diesem Zeitpunkt schon deutliche Löcher im Zellrasen aufwiesen, die die Auswertung erschwerten. Daher wurden die Endpunkttitrationen hauptsächlich mit 911-Zellen durchgeführt. Bei der Spot-Assay Methode ist dieser Punkt irrelevant, da der Titer zwei Tage nach Infektion der Zellen bestimmt wird.

Ad-GFP ist der Kontrollvektor in den *in vitro* und *in vivo* Studien. Er ist abgesehen vom Transgen mit den anderen Konstrukten identisch. GFP steht für das "Green Fluorescent Protein". Dieses Transgen stellt einen nicht-therapeutischen Marker dar.

Tabelle 3.1 Titer verschiedener Viruspräparationen.

Zellinie	QBI 293	Endpunkttitration QBI 293 293c 911 QBI 293 911 QBI 293					Spot- Assay QBI 293	En 911	dpunkttitrat 9 [.]	ion 11	Mittel- wert	Standard- abwei-	relative Standardabwei- chung
Mo- nat/Jahr		10/01		12/01	01/02	02/02	03/0	2	12	/02		chung	in %
Ad-1 (#4)						3,3x10 ¹⁰	1,5x10 ¹⁰	7,9x10 ¹⁰	2,0x10 ¹⁰ 2,5x10 ¹⁰	2,5x10 ¹⁰ 4,0x10 ¹⁰	3,4x10 ¹⁰	2,2x10 ¹⁰	64
Ad-1 (#4B)							3,0x10 ¹⁰	3,2x10 ¹⁰ 6,3x10 ¹⁰			4,2x10 ¹⁰	1,9x10 ¹⁰	44
Ad-2 (#1)					1,0x10 ¹¹	5,0x10 ¹¹	1,9x10 ¹¹	4x10 ¹¹			3,0x10 ¹¹	1,8x10 ¹¹	62
Ad-2 (#2)					7,9x10 ¹⁰	5,0x10 ¹¹	1,1x10 ¹¹	3,2x10 ¹¹			2,5x10 ¹¹	2,0x10 ¹¹	78
Ad-2 (#3)					3,2x10 ¹¹	1,3x10 ¹¹		2,0x10 ¹¹			2,2x10 ¹¹	9,6x10 ¹⁰	44
Ad-3 (#1)	4,0x10 ¹⁰	6,3x10 ¹⁰	1,0x10 ¹¹			1,0x10 ¹¹	<u>4,8x10¹⁰</u>	2,5x10 ¹¹			1,0x10 ¹¹	7,8x10 ¹⁰	78
Ad-3 (#2)	3,2x10 ¹⁰			5,0x10 ¹⁰		1,0x10 ¹¹	4,6x10 ¹⁰	6,3x10 ¹⁰			5,8x10 ¹⁰	2,6x10 ¹⁰	44
Ad-3 (#7)	4,0x10 ¹⁰							7,9x10 ¹⁰			6,0x10 ¹⁰	2,8x10 ¹⁰	46
Ad-GFP						3,2x10 ¹¹	2,2x10 ¹¹	4,0x10 ¹¹			3,1x10 ¹¹	9,0x10 ¹⁰	29

Die Titer in der Tabelle sind in infektiösen Einheiten pro ml (i.u./ml) angegeben. Die Nummern in Klammern beziehen sich auf die gepickten Plaques und sind versuchshistorisch begründet. Es handelt sich um Klone desselben Vektors. Die Endpunkttitrationen wurden auf verschiedenen Zellinien durchgeführt. Fettdruck hebt die Vektor-Klone hervor, die in den Tierstudien eingesetzt wurden. Der Ad-3 (#1) Titer von 4,8 x 10¹⁰ i.u./ml diente als Ausgangsbasis für die spätere funktionelle Normalisierung der Vektoren. Die relative Standardabweichung lag im Durchschnitt bei 54%. Bei QBI 293 und 293c handelt es sich um die gleiche Zellinie, aber um unterschiedliche Subklone aus verschiedenen Quellen. Die im Tierexperiment verwendeten Vektoren sind durch Fettdruck hervorgehoben. i.u.="infectious units" bzw. "infektiöse Einheiten".

3.2.2 Normalisierung der Vektoren auf IL12 Expression

Abb. 3.3 zeigt den zuerst erfolgten Vergleich zwischen der IL12 Expression verschiedener Ad-2 Präparationen. Die Infektion der MH-7777A-Zellen erfolgte stets mit einer MOI von 10 (MOI=multiplicity of infection). Diesem Vergleich lag zunächst eine Endpunkttitration mit QBI 293 Zellen zugrunde (Tabelle 3.1; 01/02). Deutlich ist zu sehen, daß trotz gleicher MOI die IL12 Expression stark variiert, bis zu einem Faktor >5 (jeweils der linke Balken in Abb. 3.3). Eigentlich wurde erwartet, daß bei verschiedenen Präparationen desselben Vektors alle Präparationen gleiche IL12 Expressionslevel zeigen, wenn die Titration stimmt und keiner der Vektoren fehlerhaft ist. Es wurde für das gleiche Experiment dann eine spätere Titration, die auf einer Endpunkttitration mit 911 Zellen basierte, zugrunde gelegt (Tabelle 3.1; 02/02). Wieder wurde mit einer MOI von 10 infiziert. Bei diesem Versuch wichen die Expressionsraten zwar etwas weniger als zuvor voneinander ab, die Unterschiede waren aber immer noch erheblich. Offensichtlich gab keine der Titrationen den tatsächlichen Virustiter korrekt wieder. Abb. 3.4 zeigt, daß die IL12-Expressionslevel aus Abb. 3.3 sehr gut mit den zur Infektion eingesetzten Vektorvolumina korrespondieren. Das deutet darauf hin, daß alle drei Präparationen etwa denselben Titer haben, wie sich später bestätigte (Tabelle 3.1 Mittelwerte). Die Infektion der Tumorzellen mit einem Kontrollvektor, der kein IL12 exprimiert, führte bei keinem der hier und im folgenden gezeigten Versuche jemals zu meßbaren IL12 im Überstand. Auch war eine Expression unmittelbar nach erfolgter Infektion nie nachweisbar.



Abb. 3.3 IL12 Expression verschiedener Ad-2 Präparationen (#1, #2 und #3) 48 h nach Infektion. MH-7777A-Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Hierfür wurde zuerst eine Endpunkttitration auf 293- (linker Balken) und dann eine auf 911-Zellen (rechter Balken) zugrunde gelegt. Für jeden dargestellten Wert wurden 3 Zellkulturflaschen infiziert und aus dem Überstand jeder Flasche aus 3 Meßwerten die IL12-Konzentration per ELISA ermittelt. Insgesamt liegen jedem Balken somit 9 Meßwerte zugrunde.



Abb. 3.4 Volumina der Vektorpräparationen, die zu den in Abb. 3.3 zu sehenden IL12-Expressionsleveln führten.

Weitere Experimente bestätigten, daß sich durch Virus-Titrationen alleine keine vergleichbaren Vektormengen einstellen ließen. Abb. 3.5 zeigt dies anhand von jeweils zwei Vektorpräparationen von Ad-1, Ad-2 und Ad-3.



Abb. 3.5 IL12 Expression verschiedener Vektoren 2 bzw. 4 Tage nach Infektion. MH-7777A-Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Hierfür wurde eine Endpunkttitration (03/02) auf 911-Zellen zugrunde gelegt. Für jeden dargestellten Wert wurden pro Vektorpräparation 2 Zellkulturflaschen infiziert und aus dem Überstand jeder Flasche aus 3 Meßwerten die IL12-Konzentration per ELISA ermittelt. Insgesamt liegen jedem Balken somit 6 Meßwerte zugrunde. Nach Infektion mit einem Kontrollvektor, der keine IL12-Expressionskassette enthielt, ließ sich kein IL12 im Zellkulturüberstand finden; ebenso war wenige Minuten nach vollendeter Infektion kein IL12 meßbar (Daten nicht gezeigt).

Auch hier wurden die Tumorzellen wie zuvor mit einer MOI von 10 infiziert. Grundlage der Berechnung für die MOI war diesmal die Titration auf 911-Zellen aus dem März 2002 (Tabelle 3.1). Da dies eine neue komplette Titration war, gab es die Hoffnung, daß diese zu vergleichbaren Ergebnissen der Vektoren führen könnte. Allerdings bestätigt die Messung nur, was sich eigentlich auch schon zuvor zeigte: Die Titrationsmethode für adenovirale Vektoren ist stark schwankungsbehaftet.

Um einen Vergleich der drei Vektoren im Tierexperiment zu ermöglichen, blieb nur die Möglichkeit, die drei unterschiedlichen Vektoren funktionell über ihre IL12-Expression zu titrieren. Es galt also bei jedem Vektor die Menge zu bestimmen, die zu gleichhoher IL12-Expression führte. Dafür wurde zunächst überprüft, ob die Vektormenge im Untersuchungsbereich in einem linearen Verhältnis zur Expressionshöhe steht. Der Untersuchungsbereich sollte hierfür Expressionshöhen zwischen 1,5 und 50 µg/10⁶ Zellen abdecken. Zu diesem Zweck wurden die Tumorzellen mit MOI von 2,5 bis 40 mit Ad1 (#4) wie zuvor infiziert. Dabei diente der 911-Titer von 7,9 x 10¹⁰ i.u./ml als Ausgangsbasis (03/02). Abb. 3.6 zeigt die IL12 Expression von Ad-1 mit zunehmender MOI zwei bzw. vier Tage nach Infektion. Die beiden Abbildungen darunter zeigen, daß im Untersuchungsintervall sowohl für Tag 2 als auch für Tag 4 nach Virusinfektion ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen MOI und IL12-Expression besteht. Dies ermöglichte eine relativ einfache Anpassung der verschiedenen Vektoren. Als Bezugsgröße für die funktionelle Titration wurde Ad-3 (#1) mit einem Titer von 4,8 x 10¹⁰ gewählt. Für Ad-2 (#1) und Ad-1 (#4) wurden dann verschiedene Titer angenommen und wieder Tumorzellen mit einer MOI von 10 infiziert. 0, 1, 2 und 3 Tage nach Infektion wurden 150 µl Aliquots des Zellkulturüberstandes genommen und die IL12 Konzentration bestimmt.



Abb. 3.6 IL12 Expression von Ad-1 (#4) nach Infektion von MH-7777A-Zellen mit aufsteigenden MOI. Für jeden dargestellten Wert wurden 2 Zellkulturflaschen infiziert und aus dem Überstand jeder Flasche aus 3 Meßwerten die IL12-Konzentration durch ELISA ermittelt. Jeder Balken wurde somit aus 6 Meßwerten gemittelt. Weitere Details sind im Text.



Abb. 3.7 Darstellung wie in Abb. 3.6, wobei nur die Datenpunkte für Tag 2 abgebildet sind. R² ist der Korrelationskoeffizient und ein Maß für einen linearen Zusammenhang an. Er liegt maximal bei 1.



Abb. 3.8 Darstellung wie in Abb. 3.7 nur für Tag 4.

An Tag 4 wurde auf eine Probennahme verzichtet, weil die Zellen begannen sich abzulösen, nachdem sie zuvor Konfluenz erreicht hatten. Dieses Problem trat bei den zuvor beschriebenen Experimenten nicht auf, da hier eine höhere Passage (>30) von den MH-7777A Tumorzellen verwendet wurde, die sich nach erreichter Konfluenz nicht so leicht ablöste (vergl. Abb. 3.6).

Abb. 3.9 gibt das Endergebnis der funktionellen Titration wieder. Für Tag 2 liegen alle drei Vektoren gleich auf und für die beiden anderen Tage liegen sie sehr dicht beieinander. Ein exakterer Abgleich war mit der verwendeten Methodik nicht möglich. Die nach diesem Abgleich bzw. dieser Normalisierung ermittelten Titer waren:

Ad-1: 8,0 x 10^{10} n.i.u. Ad-2: 1,0 x 10^{11} n.i.u. Ad-3: 4,8 x 10^{10} n.i.u. (Ausgangswert für die Normalisierung) Um die aus der Virustitration (Tabelle 3.1) erhaltenen Titer deutlich von den aus der funktionellen Normalisierung auf IL12 erhaltenen Titern abzusetzen, werden letztere im Folgenden als normalisierte infektiöse Einheiten (n.i.u.) bezeichnet.



Abb. 3.9 IL12 Expressionslevel von Ad-1 (#4), Ad-2 (#1) und Ad-3 (#1) nach der Normalisierung. Um für gleiche IL12 Expressionslevel in der Tierstudie zu sorgen, wurden die Vektoren funktionell auf IL12 abgeglichen. Dadurch wird die Vergleichbarkeit aller drei Vektoren gewährleistet. Die relativ zum Ad-3 Titer von 4,8 x 10^{10} i.u. normalisierten Titer waren: Ad-1: 8 x 10^{10} n.i.u. und Ad-2: 1 x 10^{11} n.i.u. Für jeden abgebildeten Wert wurden 3 Zellkulturflaschen infiziert und der Überstand aus jeder Flasche 6x per ELISA bestimmt (4x für Tag 3). Ein Balken stellt somit jeweils den Mittelwert aus 18 Meßpunkten (12 für Tag 3) dar. n.i.u. = normalisierte infektiöse Einheit.

3.2.3 4-1BBL Expression der Vektoren

Die 4-1BBL Expression der Vektoren wurde durchflußzytometrisch analysiert. Es erfolgte dabei nur eine qualitative Aussage, das heißt, daß nur die Anzahl der 4-1BBL positiven Zellen bestimmt wurde. Über die Expressionshöhe in einer Zelle, insbesondere relativ zu IL12 oder IL2 konnte mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden. Abb. 3.10 zeigt die 4-1BBL Expression der drei Vektoren. Ad-1 diente hierbei als Negativkontrolle. MH-7777A Tumorzellen wurden mit einer MOI von 10 oder 50 infiziert und nach 24 h geerntet. 39% der mit Ad-2 oder Ad-3 infizierten Zellen waren bei einer MOI von 10 positiv für 4-1BBL, 0% bei Ad-1 infizierten. Der Prozentsatz der positiven Zellen wurde aus der Differenz der positiven Zellen (oberer linker Quadrant in den FL1/FL2 Histogrammen) abzüglich der positiven Zellen bei einer Färbung ohne primären Antikörper ermittelt (nicht gezeigt). Daraus ergab sich:

Ad-2, MOI 10: 39,4% positive Zellen (Mittelwert aus 2 Infektionsansätzen) Ad-2, MOI 50: 66,9% positive Zellen (Mittelwert aus 3 Infektionsansätzen; Standardabweichung: 2,5%) Ad-3, MOI 10: 39,1% positive Zellen (Mittelwert aus 3 Infektionsansätzen; Standardabweichung: 4,5%)

Somit konnte klar gezeigt werden, daß die Vektoren Ad-2 und Ad-3 den Kostimulator 4-1BBL exprimieren, während Ad-1 dies nicht tut.



Abb. 3.10 Durchflußzytometrische Analyse der 4-1BBL Expression. MH-7777A Tumorzellen wurden mit MOI 10 bzw. 50 infiziert und 24 Stunden später auf 4-1BBL Expression gefärbt. Ad-2 und Ad-3 exprimieren 4-1BBL, während Ad-1 das nicht tut. Dargestellt sind zwei verschiedene Auftragsweisen für die Fluoreszenz. FL2 ist der Kanal, in dem der sekundäre Antikörper fluoresziert (PE) und in dem die Messung erfolgte. Im Kanal FL1 wird normalerweise der Farbstoff FITC oder EGFP detektiert. Hier wurde dieser Kanal nur verwendet, um eine übersichtliche Auftragung der PE-Fluoreszenz zu ermöglichen. Die roten "dot plots" ermöglichen dem Auge einen besseren Überblick. Die blauen Histogramme führen zur selben Aussage, kommen aber ohne einen zweiten Kanal in der Auftragung aus. M1 markiert den Bereich, in dem weniger als 1% der Zellen in der Negativkontrolle (Ad-1) enthalten sind. Die Prozentzahlen geben den Mittelwert der 4-1BBL positiven Zellen aus drei Infektionen wieder, bei Ad-2 MOI 10 von zwei Infektionen.

3.2.4 IL2-Expression und relative Expressionslevel von IL12 : IL2

Die IL2-Expression wurde wie auch die IL12-Expression mittels ELISA bestimmt. Ad-1 und Ad-2 zeigten erwartungsgemäß keine IL2-Expression. Die in Abb. 3.11 gezeigte IL2-Expression von Ad-3 wurde aus demselben Zellkulturüberstand bestimmt wie auch die in Abb. 3.9 gezeigte IL12-Expression.



Abb. 3.11 IL2-Expression von Ad-3 nach Infektion von MH-7777A Zellen mit MOI 10. Der zugrunde liegende Ad-3 Titer war 4,8 x 10^{10} n.i.u./ml. IL2 wurde aus demselben Zellkulturüberstand wie bei Abb. 3.9 das IL12 bestimmt. Zu beachten ist, daß IL2 hier in ng / 10^6 Zellen angegeben ist, während es bei IL12 µg sind.

Diese Messung erlaubt somit einen direkten Vergleich zwischen der IL12 und IL2 Expressionshöhe. IL12 (544 Aminosäuren) ist 3,2x länger als IL2 (170 Aminosäuren). Vernachlässigt man die Glykolysierung (für scIL12 nicht bekannt) läßt sich leicht das molare Expressionsverhältnis dieser beiden Zytokine errechnen.

Das molare Verhältnis von IL12 zu IL2 war:

Tag 1: 1233 : 1 Tag 2: 1039 : 1 Tag 3: 419 : 1

Das Verhältnis von IL12 zu IL2 wurde auch aus einem früheren Experiment bestimmt. Hierbei wurden MH-7777A Zellen einer höheren Passage (>30) verwendet. Mit diesen hohen Passagen war auch eine Beobachtung über 5 Tage möglich. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert, wobei ein Titer von 6,8 x 10¹⁰ i.u./ml zugrunde gelegt wurde. Umgerechnet auf den Titer von 4,8 x 10¹⁰ n.i.u./ml fand die Infektion mit einer MOI von 7,1 statt. Die Messungen für IL12 und IL2 hatten auch hier denselben Zellkulturüberstand als Ausgangsmaterial.



Abb. 3.12 IL12-Expression von Ad-3 (#1) 1-5 Tage nach Infektion. MH-7777A Zellen wurden mit Ad-3 infiziert. Bei einem Ad-3 Titer von $4,8 \times 10^{10}$ n.i.u./ml lag die MOI bei 7,1.



Abb. 3.13 IL2-Expression von Ad-3 (#1) 1-5 Tage nach Infektion. MH-7777A Zellen wurden mit Ad-3 infiziert. Bei einem Ad-3 Titer von 4,8 x 10¹⁰ n.i.u./ml lag die MOI bei 7,1. Es wurden dieselben Zellkulturüberstände wie für Abb. 3.12 verwendet.

Die molaren Verhältnisse von IL12 zu IL2 waren bei diesem Experiment:

Tag 1: 1988 : 1 Tag 2: 2272 : 1 Tag 3: 1028 : 1 Tag 4: 524 : 1 Tag 5: 539 : 1

Damit lagen sie ähnlich wie bei dem Vergleich über drei Tage. Nimmt man den Mittelwert der Verhältnisse vom 1. Tag nach Infektion aus beiden Experimenten, so erhält man ein molares IL12 : IL2 Verhältnis von 1611 : 1.

3.3 in vivo Charakterisierung der Vektoren (Tierstudien)

Die *in vivo* Charakterisierung erfolgte in einem syngenen, immunkompetenten Rattenmodell für das HCC. Zellen einer HCC-Zellinie wurden in die Leber der Tiere injiziert. Nach Anwachsen des Tumors erfolgte eine einmalige, direkte Injektion eines adenoviralen Vektors in den Tumor. Abb. 3.14 veranschaulicht den prinzipiellen Versuchsablauf.



Injektion des Vektors

Abb. 3.14 Grundsätzlicher Versuchsablauf der Tierstudien. Im Bild der Woche -2 ist die Leber einer Ratte zu sehen. Die Pfeile markieren die Histoacrylplomben, die zum Verschließen der Injektionsstelle verwendet wurden. In Woche 0 wurde der Tumor des linken Leberlappens (gelber Pfeil bei Woche -2) einmalig mit Vektor injiziert. Der Tumor selbst ist bei der OP weißlich durchschimmernd unter der Leberkapsel gut sichtbar, was auf dem Foto aber nicht mehr erkennbar ist. Bei einigen Studien wurde nur rechts ein Tumor implantiert und der Vektor dann auch in diesen injiziert. Kurz vor Vektorgabe und mehrfach danach wurde die Tumorgröße mittels MRT (Magnet-Resonanz-Tomographie) ermittelt. Dies ist auf dem rechten Bild zu erkennen, wo eine Ratte in einer Kopfspule und unter einer Handspule liegt.

3.3.1 Dosiseskalation mit Ad-3

Um eine für die Tumorbehandlung effiziente Vektordosis abschätzen zu können, wurde zunächst eine Dosiseskalation mit Ad-3 durchgeführt. Hiefür wurden 1 x 10⁶ MH-7777A Tumorzellen in den rechten Leberlappen der Ratte injiziert. Nach zwei Wochen war ein Tumor von ca. 1 cm Durchmesser gewachsen, der dann mit verschiedenen Dosen von Ad-3 bzw. mit dem Kontrollvektor Ad-GFP injiziert wurde.

Tumorvolumina

Zunächst erfolgte eine Evaluierung des Tumorwachstums nach Tumorzellimplantation. Abb. 3.15 zeigt das Tumorwachstum vor der Behandlung. Die Tumore wuchsen sehr schnell, so daß eine Vektorinjektion 2 Wochen nach Tumorzellimplantation sinnvoll erschien. Die Tumorgröße wurde hier und im folgenden stets mittels MRT bestimmt.



Abb. 3.15 Tumorwachstum nach Implantation von 1 x 10^{6} MH-7777A Tumorzellen im rechten Leberlappen. Auch an Tag 4 waren schon Tumore meßbar, allerdings lag das Durchschnittsvolumen bei 0,004 cm³. An Tag 14 wurden verschiedene Vektoren injiziert. Der Wert von Tag 18 ist zum Vergleich hier trotzdem wiedergegeben. Die Tumorvolumina wurden mittels MRT bestimmt. Tierzahl: n=5.

Abb. 3.16 gibt das Zeitschema für die Dosiseskalation wieder. Drei bzw. vier Tage nach der Virusinjektion erfolgte das erste MRT und an Tag 12 bzw. 13 das zweite. Die MRT-Scans lagen somit jeweils 9 Tage auseinander. 2 Wochen nach Vektorinjektion wurden die Tiere zur Organentnahme getötet.



Abb. 3.16 Zeitschema der Dosiseskalation.



Abb. 3.17 Dosiseskalation mit Ad-3. Zunehmende Vektormengen von Ad-3 führen zu einem vermehrten Tumorrückgang innerhalb von 9 Tagen nach Vektorapplikation. Es wurden nur die intrahepatischen Tumore berücksichtigt. Die Mengen der Ad-3 Vektoren sind in n.i.u. angegeben, bei Ad-GFP in i.u. Für jede Ad-3 Gruppe gilt n=3, für die Kontrollgruppe (Ad-GFP) n=2.

In Abb. 3.17 zeigt sich deutlich ein von der Ad-3 Vektordosis abhängiger Tumorrückgang. Bei den Kontrolltumore hingegen nehmen die Tumore deutlich an Volumen zu. Abb. 3.18 zeigt am Anschnitt den Unterschied zwischen einem mit Ad-3 und Ad-GFP behandelten Tier.

In der Abb. 3.19 sind beispielhafte MRT-Bilder aus jeder therapeutischen Gruppe abgebildet. Die dosisabhängige Tumorreduktion wird auch hier ersichtlich. Bei dem abgebildeten Tier, das 1 x 10^9 n.i.u. Ad-3 erhielt, scheinen sich eventuell nekrotische Bereiche innerhalb des Tumors abzuzeichnen.



Abb. 3.18 Tumore im Anschnitt, 2 Wochen nach Vektorinjektion bei Organentnahme.



Tag 3 nach Injektion

Tag 12 nach Injektion

Abb. 3.19 Änderung der Tumorgröße nach Vektorinjektion von 1×10^7 , 1×10^8 oder 1×10^9 n.i.u. Ad-3 (MRT-Scans, T2). Rechts ist der Prozentsatz der Ausgangsgröße angegeben, auf den sich die Tumorgröße in der jeweiligen Gruppe im Mittel reduzierte. Die abgebildeten Querschnitte stammen in jeder Gruppe von dem Tier, das im Tumorrückgang zwischen den anderen beiden lag. Extrahepatische Metastasen sind bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Der Tumor im rechten unteren Bild hat in sich signalschwache Bereiche, die auf eine Zerstörung des Tumors an diesen Stellen hinweisen.

Abb. 3.20 zeigt die beiden Kontrolltiere. Beiden weisen ein erhebliches Tumorwachstum innerhalb von 9 Tagen auf, wobei in dem zweiten Tier eine Reihe von extrahepatischen Metastasen zu sehen sind.



Tag 3 nach Injektion

Tag 12 nach Injektion

Abb. 3.20 Änderung der Tumorgröße nach Vektorinjektion von 1 x 10⁹ i.u. Ad-GFP (MRT-Scans, T2). Rechts ist der Prozentsatz der Ausgangsgröße angegeben, auf den sich die Tumorgröße im Mittel der beiden Kontrolltiere reduzierte. Extrahepatische Metastasen sind hierbei nicht berücksichtigt. Sehr deutlich sind diese jedoch bei Tier 2, auf beiden Bildern (Tag 12) erkennbar.

Serumanalytik

Den Ratten wurde unmittelbar vor und mehrfach nach Vektorgabe Blut abgenommen. Daraus wurden die Serumkonzentrationen von IL12 und zur Überprüfung der biologischen Wirksamkeit des IL12 auch von IFNγ bestimmt. Bei IL12 wurde das murine IL12 (also das Transgen) per ELISA gemessen, bei IFNγ wurde ein für IFNγ aus der Ratte spezifischer ELISA verwendet. Abb. 3.21 gibt die Serumkonzentrationen an IL12 nach Vektorinjektion wieder. Nicht von allen Tagen war genug Serum vorhanden, um aus mehreren Ratten die Werte zu bestimmen. Daher sind hier zum Teil nur Einzelbestimmungen gezeigt (keine Fehlerbalken). Da sich, wie an den Fehlerbalken zu sehen, erhebliche Schwankungen zwischen den Serumkonzentrationen an IL12 bei verschiedenen Ratten ergaben, läßt sich nur der Bereich der Serumkonzentration angeben.



Abb. 3.21 IL12 im Serum nach intratumoraler Injektion von 1 x 10^9 n.i.u. Ad-3. Alle Werte wurden zwar in Dreifachansätzen gemessen, aber nur an einigen Tagen erfolgte die Bestimmung auch aus verschiedenen Ratten. Die Fehlerbalken spiegeln hier Schwankungen zwischen verschiedenen Tieren wider. Die Tierzahlen für die verschiedenen Tage: n=3 Tage 0, 1, 5, 7; n=2 Tag 14; n=1 Tage 2, 3, 4.



Abb. 3.22 IFN γ im Serum nach intratumoraler Injektion von 1 x 10⁹ n.i.u. Ad-3. Die Tierzahlen für die verschiedenen Tage: n=3 Tage 0, 1, 3, 5, 7; n=2 an Tag 4; n=1 an Tag 2. Für Tag 1 wurde IFN γ aus den Seren von 3 verschiedenen Tieren bestimmt. Hier reflektieren die Fehlerbalken somit die Schwankungen zwischen den 3 Tieren. Für alle anderen Tage erfolgten die Messungen aus vereinten Seren und die Fehlerbalken reflektieren hier nur die Standardabweichung der Dreifachbestimmung im ELISA.

Für eine genauere Bestimmung wäre eine höhere Tierzahl erforderlich. In der ersten Woche liegt die IL12-Serumkonzentration im Bereich von 50-400 ng/ml, wenn 1 x 10⁹ n.i.u. injiziert werden. Nimmt man den Mittelwert der Tage 1-7, so kommt man auf

104 ng/ml, was die Größenordnung der IL12 Serumkonzentration realistisch widerspiegeln dürfte.

IFNγ wurde wie auch IL12 mittels ELISA aus denselben Serumproben bestimmt. Der Mittelwert der Serumkonzentrationen der Tage 1-7 lag bei 1,1 ng/ml.

Die IL12- und IFN γ -Konzentrationen nach Gabe von 1 x 10⁸ bzw. 1 x 10⁷ n.i.u. konnten aufgrund zu weniger Proben und zu geringer Zytokin-Konzentrationen nicht bestimmt werden. IL2 konnte im Serum in keinem Fall nachgewiesen werden.

3.3.2 Dosiseskalation mit Ad-1

Mit Ad-1 wurden in mehreren Experimenten Tiere mit verschiedenen Vektor-Dosen behandelt (vergl. 3.3.3 und 3.3.6). Zusätzlich zu diesen Versuchen wurde nach Abschluß der anderen Studien noch ein Versuch mit 1 x 10⁶ n.i.u. Ad-1 durchgeführt und mit einem adenoviralen Vektor, der kein Transgen trägt (Ad-Null), verglichen. Abb. 3.23 faßt die Ergebnisse dieser und der anderen Studien zu einer Dosiseskalation für Ad-1 zusammen. Sehr deutlich wird, daß eine zunehmende Vektordosis von Ad-1 einen zunehmend stärkeren therapeutischen Effekt hat. Trotz zum Teil sehr unterschiedlicher absoluter Ausgangstumorgrößen (Abb. 3.23 A) korreliert die prozentuale Abnahme eng mit der Ad-1 Vektordosis (Abb. 3.23 B).





Abb. 3.23 Dosiseskalation mit Ad-1. In den Gruppen, die mit 5 x 10^6 und 1 x 10^7 n.i.u. Ad-1 oder mit Kontrollvektor (Ad-Null oder Ad-GFP) behandelt wurden, wurde nur 1 Tumor in der Leber gesetzt. In den Gruppen, die 1 x 10^6 und 5 x 10^7 n.i.u. Ad-1 erhielten wurden zwei Tumore in der Leber gesetzt, aber nur einer behandelt. Die Gesamttumorgrößen wurden mittels MRT bestimmt. Eine dosisabhängige Tumorreduktion ist klar erkennbar. Ad-Null steht für einen adenoviralen Vektor ohne Transgen. Dieser Vektor stellt eine alternative Kontrolle zu Ad-GFP dar. A Absolute Tumorvolumina; B relative Tumorvolumina. n=3 außer bei 5 x 10^7 Ad-1 n=4 und bei 1 x 10^6 Ad-1 n=6.

3.3.3 2-Wochen Tierstudie mit 5 x 10⁷ n.i.u. Vektor

Um das Tumorinfiltrat zu untersuchen, wurde eine Reihe von Tieren 2 Wochen nach Vektorgabe getötet. Es wurden dann histologische Analysen durchgeführt. Zunächst wurde ein Tumor in den linke Leberlappen (1 x 10^6 MH-7777A Zellen) und ein weiterer in den rechten gesetzt (6,5 x 10^6 MH-7777A Zellen). Die Vektorinjektion erfolgte dann einmalig in den linken Tumor. 4 Ratten wurden mit Ad-1 und 3 Ratten mit Ad-3 behandelt.

Der Versuchsablauf unterscheidet sich von dem in der Dosiseskalation durch das Setzen von zwei Tumoren statt einem und durch die Applikation anderer Vektoren mit einer anderen Dosis; die MRT-Scans lagen diesmal 14 Tage auseinander, wobei der erste einen Tag vor Vektorinjektion erfolgte.

Tumorvolumina

Die Änderung im Tumorvolumen wird in Abb. 3.24 illustriert. Bei einem Tier zeigten sich mehrere Bauchraummetastasen. Da diese nicht denselben Bedingungen ausgesetzt sind wie die intrahepatischen Tumore und das Auftreten solcher Metastasen höchstwahrscheinlich nicht in Zusammenhang mit dem therapeutischen Vektor steht, wurden solche Metastasen ignoriert. In beiden Gruppen wurde im Mittel ein deutlicher Tumorrückgang sichtbar.

Abb. 3.25 zeigt die MRT-Scans des Tieres mit dem stärksten Tumorrückgang innerhalb der Beobachtungsphase von zwei Wochen.



Abb. 3.24 Änderung der Gesamttumorgröße nach Injektion von 5 x 10⁷ n.i.u. Ad-1 bzw. Ad-3 in den linken Tumor. Die nach 2 Wochen vor allem in einem Ad-3 Tier zu sehenden extrahepatischen Metastasen wurden ignoriert. Das 1. MRT erfolgte einen Tag vor Vektorapplikation und das 2. MRT 13 Tage nach Vektorapplikation. Im Mittel gingen die Tumore der Ad-1 Gruppe auf 56% und die der Ad-3 Gruppe auf 61% ihrer Ausgangsgröße zurück. Tierzahlen: Ad-1 n=4, Ad-3 n=3.



Abb. 3.25 Änderung der Tumorgröße innerhalb von 2 Wochen nach Vektorgabe von 5 x 10^7 n.i.u. Ad-3. Links sind die Tumore einen Tag vor Vekorinjektion zu sehen (MRT-Scans, T2). Rechts ist die Tumorreduktion des behandelten und des nicht behandelten Tumors 13 Tage nach Vektorinjektion zu sehen. Bei diesem Tier zeigte sich der deutlichste Effekt in der Tumorreduktion. Der Tumor im rechten oberen Bild hat in sich schon signalschwache Bereiche, die auf eine Zerstörung des Tumors an diesen Stellen hinweisen.

Serumanalytik

Den Ratten wurde mehrfach Blut abgenommen und IL12 und IFNγ wurden mittels ELISA aus dem Überstand bestimmt. Abb. 3.26 zeigt die IL12 Serumkonzentrationen nach Vektorinjektion.



Abb. 3.26 IL12 im Serum nach intratumoraler Injektion von 5×10^7 n.i.u. Ad-1 bzw. Ad-3. IL12 wurde aus vereinten Seren mehrerer Ad-1 oder Ad-3 Tiere bestimmt. Die Fehlerbalken spiegeln somit die Fehler in der ELISA-Messung und nicht Schwankungen zwischen verschiedenen Tieren wider. Anzahl der Tiere aus denen die Seren vereinigt wurden: n=4 für Ad-1 an Tagen 0, 1, 3, 5, 7. n=3 für Ad-1 an Tag 14 und für Ad-3 an allen Tagen.



Abb. 3.27 IFN γ im Serum nach intratumoraler Injektion von 5 x 10⁷ n.i.u. Ad-1 bzw. Ad-3. Bei Ad-1 für Tag 1 und 7 wurden Seren von je vier Tieren vereint. Alle anderen Werte wurden gemittelt aus Serumwerten individueller Tiere: n=4 für Ad-1 an Tag 3 und 5, n=3 bei den übrigen.

IL12 konnte hier nur aus vereinigten Seren mehrerer Ratten bestimmt werden. Es lag dicht am Meßlimit (62,5 ng/ml) des ELISAs, da die Bestimmungen mangels ausreichender Serummengen nur aus verdünnten Serumproben gewonnen werden konnten.

Abb. 3.27 zeigt die IFNγ Serumkonzentrationen in denselben Tieren. Ad-1 und Ad-3 zeigen vergleichbare Expressionslevel an IL12 und induzieren auch eine vergleichbare IFNγ Produktion in der Ratte. Die Serumlevel von IL12 und IFNγ verlaufen weitgehend parallel zueinander. Der Mittelwert der Tage 1-7 von Ad-1 und Ad-3 zusammen lag hinsichtlich IL12 bei 649 pg/ml und hinsichtlich IFNγ bei 64 pg/ml.

	Serumleve	l (pg/ml)	Verhältnis (1x10 ⁹ n.i.u. Ad-3 zu 5x10 ⁷ n.i.u. Ad-1/3				
	IL12 IFNy		IL12	IFNγ	Vektordosis		
1x10 ⁹ n.i.u. Ad-3	104209	1121	161	18	20		
5x10 ⁷ n.i.u. Ad-1/3	649	64	1	1	1		

Tabelle 3.2 Vergleich der IL12 und IFN γ Serumdurchschnittslevel (Tage1-7).

Tabelle 3.2 vergleicht die Serummengen von IL12 und IFN γ . Es wurden hiefür jeweils die Durchschnittswerte der Tage 1-7 ermittelt. Die Werte für 1 x 10⁹ n.i.u. Ad-3 stammen aus der Dosiseskalation (Abschnitt 3.3.1). Für die Dosis von 5 x 10⁷ n.i.u. wurde der Durchschnitt der Ad-1 und Ad-3 Werte zusammengenommen. Das Verhältnis der IFNy-Serumlevel spiegelt die unterschiedlichen Vektordosen sehr gut wider, was für IL12 nicht gilt.

3.3.4 Histologische Analyse des Tumorinfiltrats

Um das Tumorinfiltrat qualitativ auf infiltrierende Lymphozyten zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Tumorgewebe wurde zwei Wochen nach Behandlung entnommen. Es zeigte sich eine deutlich höhere Infiltration an Lymphozyten (CD4, CD8 und NK) in Tumoren, die mit Ad-1/2/3 behandelt wurden. Beispielhaft ist das hier für ein mit 5 x 10^7 n.i.u. Ad-1 und ein Ad-GFP Kontrolltier gezeigt.

Die Behandlung mit Ad-1 stimuliert starke Infiltration im Tumorbereich für Zellen, die T-Zellmarker CD4 und CD8 sowie den NK-Zellmarker CD161 tragen. In Geweben aus Tieren, die mit dem Kontrollvektor Ad-GFP behandelt wurden, sind nur sehr vereinzelt Signale für diese Zellen zu finden.



Abb. 3.28 Immunhistologie des Tumorinfiltrats. Lebertumore wurden mit 5 x 10⁷ n.i.u. Ad-1 oder 1 x 10⁹ i.u. Ad-GFP (Kontrolle) behandelt. Zwei Wochen nach Injektion der Vektoren wurde Tumorgewebe präpariert und histologische Färbungen auf CD4-, CD8- und NK-Zellen angefertigt. Die mit Ad-1 behandelten Tumore zeigen eine deutlich höhere Infiltration an allen untersuchten Lymphozytenpopulationen als die mit Kontrollvektor (Ad-GFP) behandelten Tumore. Der "Ring" in der NK-Färbung des Ad-1 Schnitt ist auf ein Gefäß im Anschnitt zurückzuführen. Die Färbung ohne primären Antikörper gibt den Hintergrund der Methode wieder. Vergrößerung: 400fach. (Die immunhistochemischen Präparate und Färbungen wurden von Mareike Geißler angefertigt.)

3.3.5 Langzeit-Rattenstudie mit 5 x 10⁷ n.i.u. Vektor

Um die Effekte der drei Vektoren auf das langfristige Tumorwachstum zu bestimmen, wurde die Versuchsdauer hier nicht auf vier Wochen limitiert.

In jede Ratte wurden zwei Tumore in der Leber implantiert. 1 x 10^{6} MH-7777A Tumorzellen wurden in den linken und 6,5 x 10^{5} in den rechten Leberlappen injiziert. Dieses stellte ein intrahepatisches Metastasenmodell da. Zwei Wochen nach Tumorzellimplantation wurde der linke Tumorherd einmalig mit 5 x 10^{7} n.i.u. des jeweiligen therapeutischen Vektors injiziert.

Vom Kontrollvektor Ad-GFP wurden 5 x 10^8 i.u. injiziert. Diese höhere Dosis wurde gewählt, um trotz Ungenauigkeiten in der Titration auf keinen Fall weniger Kontrollvektor als therapeutischen Vektor zu verwenden.

Eine Ratte hatte zum Zeitpunkt der Vektorinjektion einen großen, aus der Leber herausgebrochenen Tumor, der auch schon einen Teil des Darms umschlossen hatte. Im MRT zeigten sich 1 Tag vor Vektorapplikation multiple intra- und vor allem extrahepatische Metastasen. Intrahepatisch lag das Tumorvolumen bei 0,8 cm³ und extrahepatisch bei 0,7 cm³, wobei sich letzteres aus der Summe von mindestens 6 Einzelmetastasen ergab. Ein solches Tumorgeschehen wurde bei keinem anderen Tier zu diesem Zeitpunkt in vergleichbarer Weise beobachtet. Dieses Tier verstarb trotz Behandlung mit Ad-3 17 Tage nach Vektorinjektion während eines MRT-Scans. Das erste Kontrolltier verstarb erst 7 Tage später. Dieses Ad-3 Tier zeigte eine ungewöhnlich rapide Gewichtsabnahme, weshalb angenommen wird, daß ein Darmverschluß vorlag. Bei diesem Tier herrschten Ausgangsbedingungen, die mit den anderen Tieren nicht vergleichbar waren. Daher wurde es aus der Studie genommen und findet sich auch in den hier gezeigten Grafiken nicht wieder.


Abb. 3.29 Veränderung der Tumorvolumina. Das Tumorvolumen wurde mittels MRT 1 Tag vor Vektorinjektion sowie 3 und 7 Wochen danach ermittelt. Nur eine Ratte in der Ad-1 Gruppe hatte in der 7. Woche einen Tumor und verstarb bald darauf, alle anderen Ad-1 Tiere waren zu diesem Zeitpunkt tumorfrei. Alle Tiere der Kontrollgruppe (Ad-GFP) waren bis zur 7. Woche verstorben bis auf ein Tier das zu diesem Zeitpunkt verstarb. Die angegebenen Tumorvolumina beinhalten sowohl intra- als auch extrahepatische Tumore. Therapie-Gruppen: Ad-1 (n=10), Ad-2 (n=10) und Ad-3 (n=10). Kontrollgruppe: Ad-GFP (n=9). In der 3. Woche sind die Tumore der therapeutisch behandelten Tiere statistisch signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe ($p \le 0,001$, U-Test). In der 7. Woche besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den 3 therapeutischen Gruppen.

Abb. 3.29 zeigt wie sich die Tumorvolumina im Laufe von 7 Wochen nach Vektorinjektion entwickelten. Die Kontrolltiere entwickelten sehr schnell sehr große Tumore in und außerhalb der Leber und verstarben alle innerhalb dieser 7 Wochen. Bei den therapeutisch behandelten Tieren zeigte sich zwischen den drei Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied (Ad-1 zu Ad-2: p=0,56; Ad-1 zu Ad-3: p=0,56; Ad-2 zu Ad-3: p=1; U-Test). Der hohe Wert für Ad-1 in der 7. Woche ist auf ein einzelnes Tier zurückzuführen, das deutlichen Tumorprogreß zeigte. Alle anderen Ad-1 Tiere waren zu diesem Zeitpunkt tumorfrei.

Abb. 3.30 zeigt die Langzeitüberlebensrate für die Tiergruppen. Ein Ad-1 Tier und deutlich später ein Ad-2 Tier starben an ihren Tumorleiden. Hierbei wurde das Ad-1 Tier eingeschläfert. Ebenso wurden im Versuch auch 3 Ad-GFP Tiere eingeschläfert, eines verstarb in Narkose während des MRT; die anderen 5 Ad-GFP Tiere und das eine Ad-2 Tier verstarben ohne Eingriff.



Abb. 3.30 Langzeitüberlebensrate. Es handelt sich um dasselbe Experiment wie in Abb. 3.29. Die Tumore wurden mit 5 x 10^7 n.i.u. des jeweiligen therapeutischen Vektors behandelt. Alle Kontrolltiere (Ad-GFP) starben innerhalb von 47 Tagen nach Vektorinjektion. Ein Ad-1 Tier starb 55 Tage und ein Ad-2 Tier 134 Tage nach Vektorinjektion an seinem Tumorleiden. 92 Tage (13 Wochen) nach Vektorinjektion wurden den 28 tumorfreien Tieren erneut Tumorzellen injiziert (1 x 10^6 MH-7777A in den rechten Leberlappen). Es entwickelten sich keine Tumore. Therapie-Gruppen: Ad-1 (n=10), Ad-2 (n=10) und Ad-3 (n=10). Kontrollgruppe: Ad-GFP (n=9). Alle Therapiegruppen überleben statistisch signifikant länger als die Kontrollgruppe (p≤0,00001; Log-rank Test).

Alle Therapiegruppen überlebten statistisch signifikant länger als die Kontrollgruppe. Zwischen den Therapiegruppen zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

"Rechallenge"

Die immunstimulatorische Behandlung sollte den Effekt einer Impfung haben. Demzufolge sollten Tumorzellen nach einmaliger, erfolgreicher Behandlung bei erneuter Gabe abgestoßen werden. Die erneute Gabe von Tumorzellen dient der Überprüfung des immunologischen Gedächtnisses.

Die Tumorfreiheit wurde in der 13. Woche zunächst mittels MRT für die vier Tiere überprüft, die in der 7 Woche noch intra- oder extrahepatische Tumore gezeigt hatten. Von den ursprünglich 30 Tieren aus den therapeutischen Gruppen war ein Ad-1 Tier verstorben und ein Ad-2 Tier zum Zeitpunkt der "Rechallenge" nicht tumorfrei. Den verbleibenden 28 tumorfreien Tiere wurden (wie in Abb. 3.30 dargestellt) in der 13. Wochen nach der Behandlung erneut 1 x 10⁶ Tumorzellen intrahepatisch appliziert. Drei Wochen nach dieser "Rechallenge" konnte bei keinem dieser Tiere ein Tumor im MRT-Scan gefunden werden. Keines dieser 28 Tiere entwickelte im Beobachtungszeitraum von insgesamt 250 Tagen ein neues Tumorleiden.

Abb. 3.31 zeigt MRT-Bilder aus den verschiedenen Gruppen am Beispiel von jeweils einem Tier. Deutlich ist zu sehen, daß die intrahepatischen Tumore in allen therapeutisch behandelten Gruppen schon innerhalb von 3 Wochen stark zurückgehen.

	<u>Ad-1</u>	<u>Ad-2</u>	<u>Ad-3</u>	Ad-GFP
Woche 0	Eff A Deve Andrage UR Andrage Note of the second	151 A Backgo DArea Berlan Berl	151 A Backard 154 and	107 A Residue 10 A
Leber	na 22 n n n n n n n n n n n n n	Han 2.2.4 A state of the state		Hang 2 20 Hang 2 20
Abdomen		ar ar ar ar ar ar ar ar ar ar		
Woche 3	E87 A Dumo/Add Toles V 200 10 T Shi 10 T Shi	107 127 129 129 129 120 120 120 120 120 120 120 120	107 127 129 129 129 129 129 129 129 129	120 121 121 123 125 125 125 125 125 125 125 125
Leber	n j. n n n n n n n n n n n n n	Ma 2.0	No 27 a a a a a a a a a a a a a	n in in in in it is i
Abdomen				
Woche 7	107 10 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	107 101 101 101 101 101 101 101	101 101 101 101 101 101 101 101	107 107 107 107 107 107 107 107
Leber	No. 2 2 H - 1 H	No LA - - - - - - - - - - - - -		n particular and the second se
Abdomen		A Landau and the second		5 1 1 1 2 2 2 5 1 2 2 2 2 2 2 5 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

Abb. 3.31 MRT-Monitoring der Tumorgrößen anhand von Beispieltieren der 4 Gruppen (Ad-1, Ad-2, Ad-3 und Ad-GFP). Die MRT-Scans (T1) erfolgten einen Tag vor Vektorinjektion (Woche 0) sowie 3 und 7 Wochen danach. Während die hier gezeigten Ad-1 bis Ad-3 Tiere komplette Tumorremissionen innerhalb von 7 Wochen zeigten, sind bei dem Ad-GFP-Tier (Kontrolltier) ein kontinuierliches Tumorwachstum und in der 7. Woche auch Lungemetastasen zu beobachten. Das mit Ad-2 behandelte Tier ist ein Beispiel für die bei 30% der Ad-1 bis Ad-3 Tiere auftretenden Abdominalmetastasen. Auch diese sehr großen multiplen Metastasen verschwanden komplett. → Implantierter Tumor, → Metastase, ■ tumorfreies Tier.

Von den 28 langzeitüberlebenden Tieren hatten nach 7 Wochen nur noch drei Tiere Tumore in der Leber (ein Ad-1 Tier mit 0,01 cm³; ein Ad-2 Tier mit 0,55 cm³ und ein Ad-3 Tier mit 0,04 cm³).

Vergleich von behandeltem und nicht behandeltem intrahepatischen Tumor

In der Studie wurde der Vektor stets nur in den linken Tumor injiziert. Ein Unterschied zwischen diesem behandelten und dem nicht behandelten intrahepatischen Tumor ist jedoch nicht ersichtlich wie in Abb. 3.32 illustriert wird.



Abb. 3.32 Vergleich der intrahepatischen Tumore. In den drei therapeutischen Gruppen wurde das Tumorvolumen des behandelten (linken) und des unbehandelten (rechten) Tumors 0, 3 und 7 Wochen nach Vektorinjektion (5 x 10^7 n.i.u.) bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Volumina der beiden Tumore in keiner der drei Gruppen zu diesen Zeitpunkten. Ad-1: behandelte Tumore in der Ad-1 Gruppe; Ad-1, nb: nicht behandelte Tumore in der Ad-1 Gruppe (entsprechend für Ad-2/3). Die Wochen beziehen sich auf den jeweiligen Zeitpunkt nach Vektorinjektion.

Bauchraummetastasen:

Die Entwicklung der Gesamttumorgröße war bei Ratten mit Bauchraummetastasen deutlich anders als bei den Tieren ohne Bauchraummetastasen. Dies ist in Abb. 3.31 beispielhaft an einem Ad-2 Tier gezeigt. 30% (9 von 30) der therapeutisch behandelten Tiere entwickelten solche Metastasen. Zwei von diesen 9 Tieren hatten nur eine einzige Metastase mit einem Durchmesser von weniger als 1 cm, die anderen 7 hatten multiple extrahepatische Metastasen in der 3. Woche nach Vektorinjektion. Alle 9

Tiere hatten auch schon vor Vektorgabe eine Metastase. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die Metastasen in den verschiedenen Gruppen.

Woche	0	3	7	13	16
Ad-1	3 (10)	3 (10)	1 (10)	0 (9)	0 (9)
Ad-2	3 (10)	3 (10)	0 (10)	1 (10)	1 (10)
Ad-3	3 (10)	3 (10)	1 (10)	0 (10)	0 (10)
Ad-GFP	2 (9)	8 (9)	†	†	†

 Tabelle 3.3 Anzahl der Tiere mit extrahepatischen Metastasen

In Klammern ist die Gesamttierzahl der jeweiligen Gruppe angegeben.

Das eine Tier, das in der 13. Woche eine extrahepatische Metastase hat, hatte zuvor keine solchen Metastasen, zeigte aber ein langsames kontinuierliches Tumorwachstum der primären Lebertumore. Es erlag in der 19. Woche seinem Tumorleiden. Bis auf ein Ad-1 Tier überlebten alle therapeutisch behandelten Tiere, die in der 3. Woche Metastasen hatten. Bemerkenswert ist, daß bei diesen 8 überlebenden Tieren die primären Lebermetastasen innerhalb der ersten 3 Wochen nach Vektorgabe deutlich zurückgingen, während die extrahepatischen Metastasen in derselben Zeit deutlich größer wurden. Abb. 3.33 verdeutlicht die Entwicklung für diese 8 Tiere.



Abb. 3.33 Veränderung von Tumorvolumina innerhalb und außerhalb der Leber im Zeitraum von 3 Wochen nach Applikation von Ad-1, Ad-2 oder Ad-3. Es wurden die 8 Tiere für diese Abbildung ausgewählt, die in der 3. Woche extrahepatische Metastasen hatten und zu den Langzeitüberlebenden gehören. Die intrahepatischen Tumore aller dieser Tiere nehmen deutlich ab in dieser Zeit. Bei 7 von 8 Tieren nehmen die extrahepatischen Tumore innerhalb dieser 3 Wochen jedoch zu. Auch wenn die extrahepatischen Tumore in sehr unterschiedlichem Ausmaß zunehmen, so ist die gegenläufige Tendenz von intra- zu extrahepatischen Tumoren doch sehr deutlich. Da die 3 therapeutischen Vektoren bei einer Dosis von 5 x 10^7 n.i.u. sich hinsichtlich der Tumorreduktion nicht signifikant unterschieden, wurde hier über alle 3 Gruppen gemittelt (Ad-1: n=2; Ad-2: n=3; Ad-3: n=3). Die Änderungen in den Tumorgrößen sind statistisch signifikant (intrahepatisch: *p=0,001; extrahepatisch: **p=0,027; U-Test). Alle Ad-GFP Tiere entwickelten innerhalb von 7 Wochen extrahepatische Metastasen. Abb. 3.31 zeigt die Lungenmetastasen, bei dem Kontrolltier, das am längsten überlebt hat. Alle Kontrolltiere hatten zum Todeszeitpunkt Lungenmetastasen.

Eine Serumanalytik wurde bei den Tieren der Langzeitgruppe nicht durchgeführt, um die Immunantwort der Tiere gegen den Tumor nicht zu beeinflussen. Da die Blutabnahmen nur unter Ethernarkose erfolgen konnten, hätte dieser Eingriff jedesmal einen Streßfaktor dargestellt, dessen Auswirkungen auf das Immunsystem vor allem bei mehrfachen Blutabnahmen über zwei Wochen ungewiß sind.

Entwicklung der Tiergewichte im Versuch:

Zur Überwachung des Gesundheitszustandes, aber auch als ein Marker für die therapeutische Effizienz wurden die Gewichte der Ratten regelmäßig bestimmt. Alle Gruppen nahmen von Woche 0 bis zur Woche 3 im Mittel an Masse ab; die Kontrolltiere mit durchschnittlich 35 g am deutlichsten, gefolgt von der Ad-2 Gruppe mit 14 g, der Ad-1 Gruppe mit 8,2 g und der Ad-3 Gruppe mit 4,9 g. Abb. 3.34 und Abb. 3.35 veranschaulichen diese Resultate.

Allerdings gab es einige Tiere, die deutlich größere Gewichtsverluste zeigten. Die beiden größten Gewichtsverluste in den Gruppen waren jeweils (Woche 0 bis 3):

Ad-1: 30 g (12%), 71 g (22%) Ad-2: 36 g (15%), 67 g (23%) Ad-3: 28 g (11%), 42 g (16%) Ad-GFP: 43,3 g (17,5%), 69,7 g (26,6%)

Bis auf das Ad-1 Tier mit 22% Gewichtsverlust gehören alle anderen Tiere aus den therapeutischen Gruppen zu den Langzeitüberlebenden. Bei 6 der Kontrolltiere wurde die Gewichte zum Todeszeitpunkt mit der in Woche 0 verglichen. Der mittlere Gewichtsverlust lag hier bei 33%, das Gewicht zum Todeszeitpunkt im Mittel bei 220 g.



Abb. 3.34 Entwicklung der durchschnittlichen Tiergewichte in den verschiedenen Gruppen im Versuchszeitraum. Bis zur 3. Woche ist eine tendenzielle Abnahme der Tiergewichte zu beobachten, danach nehmen die therapeutisch behandelten Tiere deutlich zu. Das Verhältnis der Gewichte in den therapeutischen Gruppen bleibt relative zueinander nahezu konstant. Tierzahlen: Ad-GFP n=9 bis zur 3. Woche und n=1 in der 7. Woche; Ad-1 n=10 bis zur 7. Woche, danach n=9; Ad-2 n=10; Ad-3 n=10.



Abb. 3.35 Entwicklung der durchschnittlichen Tiergewichte in der Kontrollgruppe (Ad-GFP) und in der therapeutischen Gruppe im Versuchszeitraum. Als therapeutische Gruppe wurden hierfür die Gruppen Ad-1, Ad-2 und Ad-3 zusammengefaßt, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen. Ansonsten ist diese Abbildung mit Abb. 3.34 identisch. Tierzahlen: Ad-GFP n=9 bis zur 3. Woche und n=1 in der 7. Woche; Ad-1,2,3 n=30 bis zur 7. Woche, n=29 in der 7.-16. Woche.

3.3.6 De-Eskalation mit Ad-1 und Ad-3

Da sich mit einer Dosis von 5 x 10^7 n.i.u. keine signifikanten Unterschiede zwischen Ad-1, Ad-2 und Ad-3 erkennen ließen wurde eine Studie mit niedrigeren Vektordosen durchgeführt. Um diese von der anfänglichen Dosiseskalation mit Ad-3 deutlich abzusetzen, wird diese Studie als De-Eskalation bezeichnet.

Es wurden wie bei der Ad-3 Dosiseskalation 1 x 10⁶ MH-7777A Tumorzellen in den rechten Leberlappen injiziert. Zwei Wochen später wurden die Vektoren in den Tumor injiziert.



Abb. 3.36 Änderung der Tumorvolumina bei der De-Eskalation. Es wurden 1 x 10^6 MH-7777A Tumorzellen in den rechten Leberlappen injiziert und zwei Wochen danach der Vektor intratumoral appliziert. MRT-Scans erfolgten einen Tag vor und 13 Tage nach Vektorapplikation. Bei 5 x 10^6 n.i.u. Ad-1 nimmt das mittlere Tumorvolumen deutlich zu während es bei 1 x 10^7 n.i.u. nur minimal zunimmt. Diese nur minimale Zunahme ist für Ad-3 schon bei einer Dosis von 5 x 10^6 n.i.u. festzustellen, bei 1 x 10^7 n.i.u. wird eine Verringerung ersichtlich. Die Werte für 1 x 10^7 n.i.u. Ad-3 entstammen der Dosiseskalation (gepunkteter und grauer Balken; vergl. Abb. 3.17) und wurden hier zum Vergleich in die Abbildung aufgenommen (es handelt sich dabei um die Werte von Tag 3 und Tag 12 nach Vektorapplikation). Die Kontrollen (Ad-GFP) nehmen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2 Wochen massiv zu. Extrahepatischen Metastasen wurden bei den Tieren, in denen sie auftraten, nicht für die Berechnung berücksichtig. Tierzahl pro Gruppe: n=3. Die Gruppenstärke war zu klein für Signifikanzbetrachtungen.

Es zeigt sich eine dosis- und vektorabhängige Tumorreduktion (Abb. 3.36). Ad-1 und Ad-3 unterscheiden sich am deutlichsten bei einer Dosis von 5 x 10^6 n.i.u. Daher wurde dann eine weitere Langzeitstudie mit dieser Dosis durchgeführt.

Durchflußzytometrische Analyse des Milzgewebes

Zwei Wochen nach Vektorinjektion wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen. Diese wurden auf NKT-, CD8- und CD4-Zellen gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Abb. 3.37 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.



Abb. 3.37 Änderung der Lymphozytenpopulation in der Milz. Zwei Wochen nach Implantation der Tumore wurden die Vektoren injiziert: 1×10^8 i.u. Ad-GFP (Kontrollvektor), 5×10^6 n.i.u. Ad-1, 5×10^6 n.i.u. Ad-3 und 1×10^7 n.i.u. Ad-1. Zwei Wochen nach Vektorgabe wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen. Die Prozentzahl der untersuchten Lymphozyten änderte sich bei Gabe eines therapeutischen Vektors im Vergleich zu Kontrolle. Tierzahl: n=3. Ein Tier hatte zum Zeitpunkt der Vektorinjektion keinen Tumor und blieb unbehandelt (weißer Balken), n=1.

Eine zunehmende Dosis von Ad-1 bewirkt im Vergleich zur Ad-GFP Gruppe, daß NKT- und CD8-Zellen prozentual zunehmen während CD4-Zellen abnehmen. Für Ad-3 gilt das auch, wobei für die CD8-Zellen hier keine Aussage möglich ist. Insgesamt kann dieses Experiment aufgrund der geringen Tierzahlen und der Schwankungsbreite in der zytometrischen Analyse nur einen vorläufigen Charakter haben. Eine Tendenz ist jedoch erkennbar. Ein Tier zeigte zum Zeitpunkt der Vektorinjektion noch keinen Tumor und blieb unbehandelt. Zwei Wochen später war jedoch ein Tumor sichtbar, weshalb dieses Tier in die Untersuchung einbezogen wurde. Da nur dieses eine Tier keinen Vektor erhielt, können aus den prozentualen Zellanteilen bei diesem Tier zwar keine Schlußfolgerung gezogen werden, als Vergleich zu weiteren Studien wird es hier dennoch aufgeführt.

3.3.7 Langzeit-Rattenstudie mit 5 x 10⁶ n.i.u. Vektor

Analog zur ersten Langzeitstudie (3.3.5) wurde unter Verwendung desselben Tumormodells aber mit 1/10 der Vektordosis eine weitere Langzeitstudie durchgeführt. Die Tumorgrößen wurden wieder nach 0, 3 und 7 Wochen bestimmt. Die Kontrollgruppe wurde aus der ersten Langzeitstudie übernommen. In der 7. Woche scheint sich eine Tendenz abzuzeichnen, daß Ad-3 effektiver als Ad-2 und Ad-2 wiederum effektiver als Ad-1 ist (Abb. 3.38). Es sei jedoch deutlich darauf hingewiesen, daß sich Ad-1, Ad-2 und Ad-3 in ihrer Wirkung statistisch nicht signifikant unterscheiden (t-Test, U-Test). In der 7. Woche ergeben sich folgende statistische Werte (U-Test): Ad-1 zu Ad-2 p=0,22; Ad-1 zu Ad-3 p=0,56; Ad-2 zu Ad-3 p=0,92. Eindeutig hingegen ist, daß auch mit einer 10fach geringeren Vektordosis die Tumore äußerst effizient behandelt werden können.



Abb. 3.38 Veränderung der Tumorvolumina. In den Gruppen Ad-1, Ad-2 und Ad-3 wurden 5 x 10^6 n.i.u. in den Tumor zum Zeitpunkt 0 injiziert. Das Tumorvolumen wurde mittels MRT einen Tag vor Vektorinjektion sowie 3 und 7 Wochen danach ermittelt. Alle Tiere der Kontrollgruppe (Ad-GFP, 5 x 10^8 i.u.) waren bis zur 7. Woche verstorben bis auf ein Tier, das zu diesem Zeitpunkt verstarb. Die Kontrollgruppe ist dieselbe wie aus der ersten Langzeitstudie (Abb. 3.29). Alle Kontrolltiere waren in der 3. Wochen noch am Leben. Die angegebenen Tumorvolumina beinhalten sowohl intra- als auch extrahepatische Tumore. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen besteht weder in der 3. noch in der 7. Woche. Alle Therapie-Gruppen haben in der 3. Woche jedoch ein statistisch signifikant kleineres Tumorvolumen als die Kontrolltiere (p≤0,001, U-Test). Therapie-Gruppen: Ad-1 (n=13), Ad-2 (n=11) und Ad-3 (n=12). Kontrollgruppe: Ad-GFP (n=9).

Ein in der 13. Woche nach Vektorinjektion durchgeführtes MRT zeigte, daß nahezu alle bis dahin überlebenden Tiere (vergl. Abb. 3.39) tumorfrei waren. In der Ad-1 Gruppe hatte ein Tier noch einen Resttumor von 0,01 cm³, die restlichen 9 Tiere waren tumorfrei. In der Ad-2 Gruppe waren alle 10 Tiere tumorfrei. In der Ad-3 Gruppe verstarb ein Tier während der Narkose für das MRT. Dieses hatte ein Tumorvolumen von 20,5 cm³. Ein weiteres Tier hatte einen Resttumor von 0,26 cm³, die anderen 10 Tiere aus dieser Gruppe waren tumorfrei.

Einige Tiere wurden aus der Studie ausgeschlossen und finden sich daher auch nicht in den Abbildungen wieder. Dies war erforderlich, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu gewährleisten. Ausschlußkriterien waren: 1. Mehr als eine extrahepatische Metastase vor Vektorinjektion (drei Tiere), 2. Versterben in Narkose aufgrund unklarer, nicht tumorbedingter Ursache (drei Tiere) und 3. Versterben vor Erreichen des 3-Wochen MRT-Scans aufgrund unklarer, nicht tumorbedingter Ursache (ein Tier). Von diesem Ausschluß betroffen waren ein Ad-1 Tier (Metastasen), 3 Ad-2 Tiere (1x Metastasen, 1x Narkosetod, 1x 3-Wochen MRT nicht erreicht) und 3 Ad-3 Tiere (1x Metastasen, 2x Narkosetod).

Abb. 3.39 zeigt die Langzeitüberlebensrate in den Gruppen. Insgesamt verstarben zwei Ad-1 Tiere, ein Ad-2 Tier und deutlich später ein Ad-3 Tier an ihren Tumorleiden. Hierbei verstarb ein Ad-1 Tier ohne Eingriff, zwei Ad-1 Tiere und das Ad-2 Tier wurden eingeschläfert und das Ad-3 Tier verstarb in Narkose während des MRT. Ein Ad-1 Tier wurde in der 9. Woche nach Vektorinjektion von den anderen Ratten getötet. Diese war in der 7. Woche tumorfrei. Daher findet es sich in Abb. 3.38, wurde aber aus Abb. 3.39 herausgenommen, da nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob sich bei diesem Tier noch ein Rezidiv gebildet hätte, wenn es weitergelebt hätte.



Abb. 3.39 Langzeitüberlebensrate. Es handelt sich um dasselbe Experiment wie in Abb. 3.38. Die Tumore wurden mit 5 x 10^6 n.i.u. des jeweiligen therapeutischen Vektors behandelt. Die Kontrollgruppe wurde aus Abb. 3.30 übernommen. Alle Therapiegruppen überlebten statistisch signifikant länger als die Kontrollgruppe (p≤0,000004; Log-rank Test). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Therapiegruppen besteht jedoch nicht (für Ad-1 gegen Ad-3: p=0,43; Log-rank Test). Therapiegruppen: Ad-1 (n=12), Ad-2 (n=11) und Ad-3 (n=12). Kontrollgruppe: Ad-GFP (n=9).

Die schon in Abb. 3.38 erkennbare Tendenz, daß Ad-3 effektiver als Ad-2 und Ad-2 wiederum effektiver als Ad-3 ist, spiegelt sich auch in der Langzeitüberlebensrate wieder. Allerdings handelt es sich auch hier nicht um einen statistisch signifikanten Unterschied. Verglichen mit der Kontrollgruppe überlebten aber alle Therapiegruppen auch bei einer Dosis von 5 x 10^6 n.i.u. signifikant länger.

Abb. 3.40 zeigt ein Ad-1 Tier, das bis zur 3. Woche nach Behandlung ein im Vergleich zu den anderen Tieren extremes Tumorwachstum zeigt, in der 7. Woche aber nur noch kaum sichtbare Tumorreste hatte. Es gab noch ein Tier der Ad-1 Gruppe mit einer vergleichbaren Tumorgröße bei Vektorgabe (in Woche 0), das in der 7. Woche mehrere sehr große Tumore und Lungenmetastasen zeigte und dann getötet werden mußte. Der hier abgebildete Verlauf stellt somit den therapeutisch positiven Fall dar und dient als Beispiel für das Potential des Therapieverfahrens.



Abb. 3.40 Tumorentwicklung an einem Beispieltier der Ad-1 Gruppe das 5 x 10⁶ n.i.u. bekam (MRT-Scans, T2). Dieses Tier stellt keinen Durchschnittsfall dar, unterstreicht aber die Effektivität der Behandlung. Beide implantierte Tumore haben bereits zum Zeitpunkt der Vektorinjektion (Woche 0) die Leberkapsel durchbrochen. Zu sehen sind verschiedene Ebenen des Tiers in den Wochen 0 und 3. Gezeigt wird jeweils der linke oder rechte Tumor in seiner maximalen Ausdehnung. Das Tumorvolumen nimmt trotz Behandlung bis zur 3. Woche auf 182% zu, gleichzeitig magert das Tier deutlich sichtbar ab. Nach 7 Wochen sind jedoch nur noch Tumorreste sichtbar. Links sind die Gesamttumormasse und das Gewicht des Tieres angegeben. → rechter Tumor, → linker Tumor, weißer Pfeil: Tumorreste.

Vergleich von behandeltem und nicht behandeltem intrahepatischen Tumor

In der Studie wurde der Vektor stets nur in den linken Tumor injiziert. Ein klarer Unterschied zwischen diesem behandelten und dem nicht behandelten intrahepatischen Tumor ist jedoch nicht erkennbar wie in Abb. 3.41 ersichtlich wird. Dieses Ergebnis unterscheidet sich damit im Grundsatz nicht von dem oben für eine Dosis von 5 x 10^7 n.i.u. gezeigten (Abb. 3.32).



Abb. 3.41 Vergleich der intrahepatischen Tumore. In den drei therapeutischen Gruppen wurde das Tumorvolumen des behandelten (linken) und des unbehandelten (rechten) Tumors 0, 3 und 7 Wochen nach Vektorinjektion (5 x 10⁶ n.i.u.) bestimmt. Ein signifikanter Unterschied zwischen behandeltem und nicht behandeltem Tumor ist auch bei dieser niedrigeren Dosis nicht erkennbar. Ad-1: behandelte Tumore in der Ad-1 Gruppe; Ad-1, nb: nicht behandelte Tumore in der Ad-1 Gruppe (entsprechend für Ad-2/3). Die Wochen beziehen sich auf den jeweiligen Zeitpunkt nach Vektorinjektion.

Entwicklung der Tiergewichte im Versuch

Wie auch schon in der ersten Langzeitstudie, so wurden auch hier die Tiergewichte mehrfach bestimmt. Zum Vergleich sind in Abb. 3.42 die Tiergewichte der Kontrolltiere (Ad-GFP) angegeben.

Alle Gruppen nahmen von Woche 0 bis zur Woche 3 im Mittel an Masse ab; Die Ad-1 Gruppe nahm im Mittel 17 g, die Ad-2 Gruppe mit 13 g und die Ad-3 Gruppe 21 g ab. Abb. 3.42 veranschaulichen die Resultate über den Beobachtungszeitraum von 7 Wochen. Da die 3 Gruppen am Untersuchungsdatum nie mehr als 9 g auseinander lagen und in ihrer Entwicklung nahezu gleich waren, wurden sie zu einer therapeutischen Gruppe gemittelt (Ad-1,2,3). In den therapeutischen Gruppen gab es einige Tiere, die deutlich größere Gewichtsverluste als der Durchschnitt zeigten. Die beiden größten (prozentualen) Gewichtsverluste in den Gruppen waren jeweils (Woche 0 bis Woche 3):

Ad-1: 63 g (23%), 65 g (19%) Ad-2: 40 g (14%), 53 g (16%) Ad-3: 48 g (16%), 49 g (16%) Bis auf eins dieser Tiere lebten alle in der 9. Woche noch. Das eine Ad-1 Tier mit 63 g Gewichtsverlust wurde in der 8. Woche eingeschläfert; zum Todeszeitpunkt lag der Gewichtsverlust relativ zu Woche 0 bei 73 g (27%). 13 Wochen nach Vektorinjektion lebten noch vier von diesen sechs Tieren. Diese hatten keine detektierbaren Tumore mehr, hatten sich also augenscheinlich komplett erholt.

Das Tiergewicht stellt einen diagnostischen Parameter für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs dar wie sich in Abb. 3.42 zeigt.



Abb. 3.42 Gewichtsentwicklung über den Beobachtungszeitraum. Die Ad-GFP Tiere stammen aus der ersten Langzeitgruppe. Die Tiergewichte erreichen in der 3. Woche ihren Tiefpunkt, nehmen danach aber im Durchschnitt wieder zu.

3.3.8 Vergleich der beiden Langzeitstudien

Die beiden folgenden Abbildungen stellen die Ergebnisse der beiden Langzeitgruppen gegenüber. Eine Tendenz zu höheren Effizienz der höheren Dosis ist in der 7. Woche sowohl für das Tumorvolumen (Abb. 3.43) als auch für die Rattengewichte (Abb. 3.45) erkennbar. Eine klare, statistisch signifikante Unterscheidbarkeit der 3 Vektoren bezüglich ihrer Antitumoreffiziens ist aufgrund dieser Daten jedoch nicht möglich. Weitere Experimente, die eine Differenzierung ermöglichen sollen, sind in Planung und werden in der Diskussion im Abschnitt "Langzeittierstudien und De-Eskalation" beschrieben.

Auffällig in Abb. 3.43 ist, daß die Fehlerbalken der therapeutischen Gruppen in Woche 0 in der 5 x 10^{6} -Gruppe deutlich höher als in der 5 x 10^{7} -Gruppe sind. Berechnet man die relative Standardabweichung über alle therapeutischen Gruppen einer Dosis, so ergeben sich in Woche 0 für die 5 x 10^{6} -Gruppe 101% und für die 5 x 10^{7} -Gruppe 32%.



Abb. 3.43 Veränderung der Tumorvolumina. In der 5 x 10^6 n.i.u. Langzeitgruppe und in der 5 x 10^7 n.i.u. Langzeitgruppe wurden Ad-1 bis Ad-3 in den Tumor zum Zeitpunkt 0 injiziert. Das Tumorvolumen wurde mittels MRT einen Tag vor Vektorinjektion sowie 3 und 7 Wochen danach ermittelt. Alle Tiere der Kontrollgruppe (Ad-GFP, 5 x 10^8 i.u.) waren bis zur 7. Woche verstorben bis auf ein Tier was zu diesem Zeitpunkt verstarb. Alle Kontrolltiere waren in der 3. Wochen noch am Leben. Die angegebenen Tumorvolumina beinhalten sowohl intra- als auch extrahepatische Tumore. Diese Abbildung ist die Zusammenfassung von Abb. 3.29 und Abb. 3.38. In der 7. Woche ist eine Tendenz in der Tumorreduktion zu Gunsten der höheren Dosis erkennbar. Die Ad-1 Tiere der 5 x 10^7 Dosis sind hier bis auf ein Tier alle tumorfrei. Die Vergleichbarkeit der Daten wird allerdings dadurch erschwert, daß bei der 5 x 10^6 Gruppe die Schwankungsbreite der Tumorgröße schon zum Zeitpunkt der Vektorinjektion sehr viel höher war als bei der 5 x 10^7 Gruppe. Die Unterschiede zwischen den beiden Dosen sind in der 7. Woche für Ad-2 (p=0,080) und Ad-3 (p=0,169) nicht statistisch signifikant (U-Test); bezüglich Ad-1 besteht ein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,013, U-Test). Der Unterschied bezüglich Ad-1 wird in dieser Abbildung durch das eine Tier, das bei 5 x 10^7 Ad-1 fortschreitendes Tumorwachstum zeigte, maskiert.

Die Mittelwerte der Tumorvolumina stellen in Abb. 3.43 die Grundlage der Abbildung dar. Alternativ dazu kann man den Median als Grundlage einer Abbildung verwenden und ein Box-Whisker Plot erstellen (Abb. 3.44), was insbesondere bei Gruppen sinnvoll ist, die nicht einer Normalverteilung folgen. Der Median ist ein Lagemaß, das das Zentrum der Daten charakterisiert (50% der Daten sind gleich oder kleiner bzw. größer als der Median). Im Box-Whisker Plot wird die unterschiedliche Streuung in den beiden Langzeitgruppen deutlicher als in Abb. 3.43.



Abb. 3.44 Veränderung der Tumorvolumina. Es liegen dieser Abbildung dieselben Daten wie Abb. 3.43 zugrunde. Auch hier werden die Tumorvolumina beider Langzeitgruppen wiedergegeben. Allerdings handelt es sich hier um ein Box-Whisker Plot, das mit dem Median das Zentrum der Daten anzeigt sowie Ausreißer und Extremwerte veranschaulicht. Die Achseneinteilung in den drei Diagrammen ist unterschiedlich, um zu jedem Zeitpunkt eine optimale graphische Auflösung zu ermöglichen. Die Box (25-75%) gibt den Bereich an, in dem die zentralen 50% der Daten liegen und stellt ein Streumaß dar. Der "Bereich ohne Ausreißer" zeigt den Bereich an, der weniger als 1,5 Boxenlängen von der Box entfernt liegt und in dem Werte liegen. Ausreißer liegen mehr als 1,5, aber weniger als 3 Boxlängen von der Box entfernt. Extremwerte liegen mehr als 3 Boxlängen von der Box entfernt.

Die vier höchsten Extremwerte in der 7. Woche zeigen die Tiere an, die im weiteren Verlauf der Studie an ihrem Tumorleiden verstorben sind.

Die Darstellung der Daten in einem Box-Whisker Plot veranschaulicht die Streuung in einem Maß, zu dem Balkendiagramme, die Mittelwert und Standardabweichung wiedergeben, nicht in der Lage sind. Die Änderung der Tumorgrößen über den Zeitraum von sieben Wochen ließ sich allerdings besser mit Balkendiagrammen darstellen, weshalb diese in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendet wurden.

Abb. 3.45 gibt den Verlauf der zum Ausgangsgewicht relativen Tiergewichte wieder. Auch hier setzen die beiden therapeutischen Vektordosen von 5 x 10^6 und 5 x 10^7 n.i.u. sich nur tendenziell, aber nicht signifikant voneinander ab.



Abb. 3.45 Relative Gewichtsentwicklung der beiden Langzeitgruppen in Prozent des Ausgangsgewichts (Woche -2 = 100%). Die höhere therapeutische Dosis von 5 x 10^7 n.i.u. führt tendenziell in der 3. und 7. Woche zu höheren Tiergewichten. Davor und danach ist praktisch kein Unterschied zu sehen.

4 Diskussion

Tumore verstehen es auf vielfältigen Wegen, dem Immunsystem zu entgehen. Um die Tarnung der Tumore gegenüber dem Immunsystem aufzuheben, bedarf es einer Immunstimulation. In dieser Arbeit wurde so eine Stimulation durch die einmalige, intratumorale Gabe von adenoviralen Vektoren erreicht. Die vorrübergehende, lokale Expression der immunstimulatorischen Faktoren vom Vektor führte auch zur Ausräumung sehr großer Metastasen und zeigte damit das Potential eines derartigen Therapieansatzes.

4.1 Konstruktion der adenoviralen Vektoren

Interleukin-12, 4-1BBL und Interleukin-2 wurden in einer einzigen Expressionskassette auf einem adenoviralen Vektor untergebracht. Die Kassette wurde für eine maximale Expression optimiert und zwei IRES-Elemente dabei funktionsfähig kombiniert. Zur Kontrolle der Beiträge von 4-1BBL und IL2 zum IL12-Effekt wurden auch zwei weitere Vektoren konstruiert. Insgesamt wurden in dieser Arbeit drei neuartige adenovirale Vektoren erstmalig konstruiert, beschrieben und charakterisiert:

Ad-1 (Transgen: scIL12)

Ad-2 (Transgene: scIL12 + 4-1BBL)

Ad-3 (Transgene: scIL12 + 4-1BBL + IL2)

Sowohl die Verwendung eines einkettigen ("single chain") IL12 in einem adenoviralen Kontext für die *in vivo* Gentherapie als auch die Verwendung von drei immunstimulatorischen Genen in einem Vektor wurden hier erstmals beschrieben. Ad-2 und Ad-3 wurden zum Patent angemeldet (Waehler 2002).

Die klassische Methode zur Erzeugung adenoviraler Vektoren beruht auf der homologen Rekombination in 293-Zellen. Ein die Transgene enthaltenes Transferplasmid rekombiniert dabei mit einem Plasmid, das das adenovirale Genom trägt (Bett 1994). Nachteil dieses Systems ist das sehr zeitaufwendige "Screening" vieler Rekombinationsereignisse. Dies läßt sich wesentlich vereinfachen und beschleunigen, wenn die homologe Rekombination in *E. coli* durchgeführt wird, weil das rekombinierte Plasmid sich schneller und in größeren Mengen aus *E. coli* verglichen mit dem Virus aus 293-Zellen gewinnen läßt (He 1998). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt. Sie ermöglicht eine schnelle Analyse (Sequenzierung, Restriktionsanalyse) des Vektorgenoms auf Plasmidebene. Da die homologe Rekombination aber auch in *E. coli* oft mit sehr geringer Effizienz abläuft, wurden Verfahren entwickelt, die eine Direktligation *in vitro* ermöglichen (Danthinne 2001). Für weitere Vektorkonstruktionen erscheint die Direktligation als die einfachste und schnellste Methode.

4.2 In vitro - Charakterisierung der Vektoren

4.2.1 Vektor-Titration und Normalisierung auf IL12

Um die drei Vektoren Ad-1, Ad-2 und Ad-3 miteinander vergleichen zu können, war eine möglichst exakte Konzentrationsbestimmung erforderlich, wobei gleiche Konzentrationen zu gleichen IL12-Mengen führen sollten.

Hier erfolgte als erstes eine Bestimmung des Virus-Titers (der infektiösen Viruspartikel pro ml). Die Schwankungsbreite einer Endpunkttitration war aus der Literatur nicht zu entnehmen. Ein Hinweis, nach dem zwei Titrationen eines Virus bis zu einem Faktor von fünf schwanken können, fand sich lediglich in einem Anleitungsheft der Fa. Qbiogene ("AdEasy Vector System"). Diese Angabe bestätigte sich in den Titrationen, die für diese Arbeit durchgeführt wurden. Um eine Vergleichbarkeit mit den meist publizierten Plaque-Assays zu gewährleisten, wurde auch ein Spot-Assay durchgeführt, der zu sehr ähnlichen Ergebnissen führt (Bewig 2000).

In den Tierstudien sollte die Effizienz von Ad-1, Ad-2 und Ad-3 in der Immunstimulation und Tumorabwehr getestet und verglichen werden. Vorraussetzung für diesen Vergleich war aber, daß die Konzentrationen der Vektoren möglichst exakt bestimmt werden. Dies war mit einer Virustitration nicht in ausreichendem Maß möglich, wie sich an IL12-Expressionsvergleichen von Vektoren zeigte. Obwohl die Vektoren gleichzeitig und mehrfach titriert wurden, zeigten sie doch sehr unterschiedliche IL12-Expression. Abgesehen von Titrationsungenauigkeiten kann prinzipiell auch eine unterschiedliche Transkriptions- oder Translationseffizienz für die Expressionsunterschiede verantwortlich sein. Da sich starke Schwankungen in der IL12-Expression aber auch bei verschiedenen Präparationen eines Vektors zeigten, scheint es wahrscheinlicher, daß die Schwankungen der Titerbestimmung verantwortlich sind.

Der Vergleich von Ad-1, Ad-2 und Ad-3 diente dem Zweck, die Beiträge von 4-1BBL und IL2 zu ermitteln. Hierfür sind gleiche Expressionshöhen von IL12 Vorraussetzung, da die Effekte sonst nicht klar zugeordnet werden können. Daher erfolgte eine funktionelle Titration oder Normalisierung auf IL12. Ausgangsbasis hierfür war ein Virustiter (Spot-Assay) von Ad-3 (4,8 x 10¹⁰ i.u.). Ein Abgleich bezüglich der IL12 Expression für die drei Vektoren wurde erfolgreich durchgeführt. Es wurde die Konzentration berechnet, die 48h nach Infektion mit einer MOI 10 zu 14-15 µg IL12 pro 10⁶ infizierter MH-7777A Zellen führte. Diese errechnete Konzentration wurde dann als normalisierter Titer bezeichnet.

Tabelle 4.1 vergleicht Virustiter (Mittelwert aller Endpunkttitrationen und des Spot-Assays) mit dem durch den Abgleich auf gleiche IL12-Expression (Normalisierung) erhaltene Titer. Der auf einem Spot-Assay beruhende Bezugswert für die Normalisierung wurde in der Tabelle unterstrichen. Für diesen Bezugswert wurde das Ergebnis des Spot-Assays verwendet, da dieser Assay eine gute Vergleichbarkeit mit dem in der Literatur meist verwendeten Plaque-Assay gewährleistet. Hierbei den Titer von Ad-3 zu verwenden, war eine willkürliche Wahl.

	normalisierter Titer auf IL12	Mittelwert der Virustiter		
Ad-3	<u>4,8 x 10¹⁰ n.i.u./ml</u>	1,0 x 10 ¹¹ i.u./ml		
Ad-2	1,0 x 10 ¹¹ n.i.u./ml	3,0 x 10 ¹¹ i.u./ml		
Ad-1	8,0 x 10 ¹⁰ n.i.u./ml	3,4 x 10 ¹⁰ i.u./ml		
u infektione Einheiten nitt, neumelisiente infektione Einheiten				

Tabelle 4.1 Vergleich von Virustiter und normalisiertem Titer

i.u.=intektiöse Linheiten, n.i.u.=normalisierte intektiöse Linheiten

Bei Ad-3 liegt ein Faktor 2 zwischen dem als Ausgangsbasis genommenen Titer aus dem Spot-Assay und dem Mittelwert aus allen Virustitern. Bei Ad-2 ist es ein Faktor 3 und bei Ad-1 liegt der Mittelwert bei knapp der Hälfte des normalisierten Titers. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die Mittelwerte der Virustiter noch aus einer zu geringen Zahl an Titrationen ermittelt worden. Betrachtet man die Standardabweichungen bei den drei Präparationen, so wird ersichtlich, daß Virustiter und normalisierter Titer nicht um mehr als die zweifache Standardabweichung des Virustiters voneinander abweichen.

Wichtig ist eine Betrachtung der Virustiter und der *in vitro* - Expressionslevel auch, wenn man Ergebnisse aus verschiedenen Quellen miteinander vergleichen will. Eine echte Vergleichbarkeit mit anderen Studien ließe sich nur gewährleisten, wenn die Expressionshöhen derselben Transgene mit demselben Verfahren verglichen werden. Hierfür müßte dieselbe Zellinie in gleicher Weise infiziert und die Transgenexpression nach dem gleichen Verfahren gemessen werden. Eine Vergleichsmöglichkeit dieser Art existiert nicht. Man kann daher nur die angegebenen Virustiter für einen Vergleich heranziehen. Dabei gilt es aber zu beachten, daß, selbst wenn in zwei Studien derselbe Titer und dieselbe Behandlungsdosis angegeben werden, die tatsächlichen Dosen um einen Faktor von ungefähr fünf voneinander abweichen können.

4.2.2 Expression von 4-1BBL

Ad-2 und Ad-3 zeigten klar 4-1BBL Expression während Ad-1 das erwartungsgemäß nicht tat. Eine Quantifizierung der Expression pro Zelle war mit der verwendeten Technik nicht möglich. Aufgrund publizierter Daten für eine bicistronische Expressionskassette kann aber angenommen werden, daß die Expression von 4-1BBL um den Faktor 2-5 unter der von IL12 liegt (Mizuguchi 2000).

Durchflußzytometrie ist eine hervorragende Technik, wenn es darum geht, bei einer hohen Zellzahl eine ja/nein Antwort bezüglich der Expression eines Proteins zu bekommen. Möchte man hingegen den Expressionslevel pro Zelle quantifizieren, benötigt man einen Standard. Hierfür kann man Kügelchen ("beads") verwenden, die eine bekannte Anzahl an Fluorochrom-Molekülen auf ihrer Oberfläche haben. Damit läßt sich eine Standardkurve erzeugen. Allerdings ist diese Art des Standards mit einigen Problemen behaftet: Zuerst muß die Anzahl der Fluorochrome pro Antikörpermolekül bekannt sein, was häufig nicht der Fall ist. Insbesondere bei indirekten Färbemethoden (sekundärer Antikörper fluoresziert) ist es meist unmöglich die Fluorochrome pro primären Antikörper zu ermitteln. Auch muß bekannt sein wie viele Antikörper an das Zielprotein binden. Liegen die antikörpergekoppelten Fluorochrom-Moleküle auf einer Zelle sehr dicht beieinander, kann es zu "Quenching"-Phänomenen kommen, d. h. die Fluoreszenz wird verringert (Givan 2001). Trotz dieser zum Teil der Technik intrinsischen Probleme, soll in der Zukunft versucht werden, ein System zu etablieren, mit dem wenigstens die Größenordnung der 4-1BBL Expression quantifiziert werden kann. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Färbe-Methode, ist den Herstellerangaben der Fa. BD Pharmingen weder zu entnehmen, wie viele Moleküle des sekundären Antikörpers den primären binden können, noch ist ersichtlich, wie viele Fluorochrome an ein Molekül des polyklonalen sekundären Antikörper gebunden sind. Prinzipiell läßt sich eine Quantifizierung der 4-1BBL Expression auch über einen Western-Blot durchführen. Allerdings bräuchte man einen 4-1BBL Standard für diese Quantifizierung. So ein Standard steht gegenwärtig nicht zur Verfügung und auch

Die zuvor auf IL12 Expression normalisierten Titer führten bei gleicher MOI zu einer gleichen Anzahl an positiven Zellen bei Ad-2 und Ad-3. Dies läßt sich als intrinsische Kontrolle dafür ansehen, daß die Normalisierung zumindest für Ad-2 und Ad-3 zuverlässig funktioniert hat.

von dem 4-1BBL-Antikörper ist unklar, ob er im Western-Blot funktionieren würde.

4.2.3 Relative Expressionslevel von IL12 zu IL2

IL2 wird nur von Ad-3 exprimiert und konnte nach Zellkulturinfektion von Ad-1/Ad-2 nicht nachgewiesen werden. In der tricistronischen Expressionskassette von Ad-3 wird 24 h nach Infektion molar etwa 1600x weniger IL2 als IL12 exprimiert. Dieses Ergebnis weist eine sehr deutliche Differenz zu den Literaturangaben auf (Fussenegger 1998). Dort wurde die Angabe gemacht, daß die Expression vom dritten Cistron nur um den Faktor 2 unter der Expression des ersten Cistrons liegt. Diese Quantifizierung erfolgte durchflußzytometrisch; genauere Angaben, wie diese Quantifizierung erfolgte, fehlen leider. Ob das gemessene zweifach schwächere Signal aus dem dritten Cistron auch mit einer zweifach geringeren Expression korreliert, ist unklar. Andere Daten zeigen, daß schon die Expression vom ersten zum zweiten Cistron i.d.R. um einen Faktor von 2-5 abnimmt (Mizuguchi 2000). Der Mechanismus, durch den IRES-Elemente funktionieren, ist noch unklar. Modellvorstellungen sind (Houdebine 1999): 1. daß ein Scanprozeß an der ribosomalen Eintrittsstelle, dem eukaryotischen CAP, beginnt und dann die IRES den Ribosomen einen effizienten erneuten Translationsbeginn ermöglicht. Eine treffendere Bezeichnung für IRES wäre dann "rettende Translationsstimulatoren".

2. daß es sich tatsächlich um interne Eintrittstellen handelt, die gänzlich unabhängig von einer Cap-Struktur sind.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete starke Abnahme vom ersten zum dritten Cistron spricht eher für Modell 1. Die Effizienz der IRES hängt immer auch sehr stark von der Zellinie ab, in der sie verwendet werden (Borman 1997). Eine geringe Effizienz des EMCV-IRES in MH-7777A-Zellen könnte also auch verantwortlich für die relativ geringe IL2 Expression sein. Es ist auch möglich, daß sich in der mRNA Sekundärstrukturen ausbilden, die eine Translation erschweren und dadurch für weniger IL2-Protein sorgen. Diese Hypothese ließe sich überprüfen, indem man die ersten beiden Cistrone gegen völlig andere austauscht. Findet IL2 sich dann in einer deutlich anderen Menge im Zellkulturüberstand als zuvor, könnte auch hier ein Grund liegen. Eine weitere Möglichkeit ist, daß IL2 generell schlechter translatiert wird als IL12. Hiefür sprechen publizierte Daten, die zeigen, daß bei gleicher Expressionskassette etwa 10 mal weniger IL2 als IL12 einen Tag nach Infektion exprimiert wird. Die Expressionsmaxima nach mehreren Tagen liegen sogar um einen Faktor von ca. 20 niedriger (Emtage 1999). In dieser und weiteren Studien (Emtage 1998a; Emtage 1998b) wurde eine bicistronische Expressionskassette verwendet, bei der IL2 im zweiten Cistron war. Verglichen mit einer monocistronischen Expressionskassette, bei der IL2 direkt hinter dem Promoter liegt, war die Expression im zweiten Cistron etwa 10x niedriger. Die absolute IL2 Expressionshöhe vom zweiten Cistron lag im Bereich von 9-60 ng/10⁶ Zellen, abhängig vom infizierten Zelltyp (persönliche Kommunikation: Peter Emtage). Die Infektion erfolgte hierbei wie auch in der vorliegenden Arbeit mit einer MOI von 10. Zieht man eventuelle Unterschiede in der Virus-Titrationen in Betracht, so läßt sich feststellen, daß die IL2 Expression von Ad-3, die im Bereich von 2-21 ng/10⁶ Zellen liegt, sich im selben Bereich befindet wie in den hier aufgeführten Vergleichsstudien. Damit ist die IL2-Expression von Ad-3 in einem Bereich, die bei anderen Studien zu einem deutlichen Antitumor-Effekt führte. Ob überhaupt ein signifikanter Unterschied zwischen zweitem und drittem Cistron besteht, mag anhand dieser Daten bezweifelt werden.

Eine ca. 64x größere Halbwertszeit von IL12 verglichen mit IL2 im Blut (Atkins 1997; Lotze 1985) stellt die einleuchtendste Erklärung für die unterschiedlichen Expressionshöhen von IL12 und IL2 dar. Dann würde die Expression selbst sich nämlich sehr viel weniger unterscheiden, aber das nach 24 h meßbare IL2-Konzentration wäre einfach viel geringer als bei IL12, weil das meiste IL2 schon wieder zerfallen ist. Vielleicht wird IL2 tatsächlich nur um einen Faktor von z. B. 20 weniger exprimiert. Diese Hypothese ließe sich mit IL12 und IL2 Protein, das man zur Zellkultur hinzugibt, verifizieren. Allerdings wäre es sinnvoll, hierfür das single chain IL12 Protein zur Verfügung zu haben, da dieses vermutlich eine andere Halbwertszeit als das in den klinischen Studien verwendete hat. Vielleicht ist dessen Halbwertszeit sogar noch höher als die für natives IL12 publizierte.

Letztendlich kann auch in einer Kombination dieser Hypothesen die Antwort liegen.

4.3 In vivo Charakterisierung der Vektoren (Tierstudien)

In einem syngenen HCC-Modell der Ratte wurden Tumorzellen in die Leber injiziert und zwei Wochen später der Vektor in den Tumor injiziert. Zunächst wurden eine Dosiseskalation und eine Kurzzeitstudie durchgeführt, um eine therapeutisch sinnvolle Dosis zu besimmten sowie Histologien und Blutuntersuchungen durchzuführen. Die Langzeitstudien dienten primär der Bestimmung der Überlebensrate.

4.3.1 Dosiseskalation und 2-Wochen Tierstudie mit Ad-3/Ad-1

Hier zeigte sich, daß Ad-3 in einem Zeitraum von 9 Tagen nach Vektorinjektion eine deutliche Tumorreduktion induzieren kann. Die Tumorreduktion war in ihrer Tendenz klar dosisabhängig. Darüber hinaus zeigte sich in diesem Pilot-Experiment, daß die injizierten Tumore unbehandelt sehr schnell wachsen und daß sie zu Metastasenbildung neigen. Aufgrund der Daten aus der Dosiseskalation wurde im Folgenden eine Dosis von 5 x 10^7 n.i.u. verwendet.

Bei der anschließenden Kurzzeitstudie mit 5 x 10^7 n.i.u. Ad-1 bzw. Ad-3 bestätigte sich, daß diese Dosis zu einer Tumorreduktion führt. Allerdings war die Streuung in den Tumorgrößen sehr hoch und die Tierzahl sehr klein.

Die zusammenfassende Auswertung aller 2-Wochen Tierstudien mit Ad-1 ergab eine Dosiseskalation für Ad-1. Diese zeigte, daß mit zunehmender Vektordosis das Tumorvolumen abnimmt. Bei zwei Vektordosen wurden zuvor 2 Tumore gesetzt und bei den anderen zwei Dosen nur 1 Tumor. Interessant hierbei ist, daß die prozentuale Reduktion des Gesamttumorvolumens unabhängig davon zu sein scheint, ob 1 oder 2 Tumore zuvor in der Leber gesetzt wurden. Auch wenn hier kein direkter Vergleich zwischen 1 und 2 gesetzten Lebertumoren mit derselben Vektordosis erfolgte, so deutet die augenscheinliche Korrelation zwischen Dosis und prozentualer Reduktion des Gesamttumorvolumens doch an, daß das Ausgangstumorvolumen hiefür eher nebensächlich ist. Dies weist bereits darauf hin, daß die Behandlung eines von zwei Lebertumoren durch die systemische Wirkung auf das Immunsystem zu einem Effekt auf den unbehandelten wie auf den behandelten Tumor führt. Dies bestätigte sich in den Langzeitstudien (s. 4.3.4).

4.3.2 Durchflußzytometrische Analyse des Milzgewebes

Nach Stimulation durch IL12 sind Lymphozyten wie NKT-, CD4- und CD8-Zellen an der Immunantwort gegen den Tumor beteiligt (vergl. 4.3.6) und finden sich vermehrt im Tumorinfiltrat verglichen mit Kontrolltieren (Andrews 2000). Darüberhinaus kann IL12 komplexe Interaktionen zwischen Milzzellen induzieren (Horvath-Arcidiacono 1996). Daher wurde einigen 2 Wochen nach Vektorgabe getöteten Tieren auch die Milz entnommen und einige Lymphozytenpopulationen in der Milz durchflußzytometrisch quantifiziert.

Die Durchflußzytometrische Analyse des Milzgewebes im Zusammenhang mit der De-Eskalationsstudie ergab, daß sich NKT-, CD8- und CD4-Zellzahlen in der Milz nach therapeutischer Behandlung verglichen mit der Kontrollgruppe änderten. NKT- und CD8-Zellen nahmen tendenziell zu CD4-Zellen ab. Die Tiergruppen waren bei dem Versuch mit n=3 zu klein, um statistisch signifikante Daten zu erhalten. Die starke Variabilität im Versuch und die daraus resultierende Notwendigkeit für höhere Tierzahlen zeigten sich hier. Da der Effekt mit 1 x 10⁷ n.i.u. Ad-1 aber stärker war als mit 5 x 10⁶ n.i.u. Ad-1 läßt sich aus dieser Tendenz doch herauslesen, daß die Behandlung Auswirkungen auf die Größe der drei untersuchten Zellpopulationen in der Milz hat. Die Bedeutung dieser Beobachtung läßt sich aus dem vorhandenen Datenmaterial noch nicht abschließend beurteilen.

4.3.3 Serumanalytik und Toxizitätsbetrachtungen

Serumanalytik wurde in dieser Arbeit nur für IL12 aus der Maus und IFNγ aus der Ratte durchgeführt. 4-1BBL läßt sich als Transmembranprotein nicht aus dem Serum bestimmen und IL2 wurde in zu geringen Mengen vom Vektor exprimiert, als daß es nachweisbar gewesen wäre.

IL12-Toxizität

Bei der Behandlungsdosis von 5 x 10⁷ n.i.u. Ad-1 lag die maximale IL12 Menge im Serum bei 1,7 ng/ml (erster Tag nach Vektorgabe). Es ist unklar, wie aussagekräftig diese Bestimmung ist, da eine 20fach höhere Vektordosis zu 122fach höheren IL12-Konzentration (bis zu 207 ng/ml) führte. Mittelt man die Serumkonzentrationen über die erste Woche, ergibt sich sogar eine 161fach höhere IL12 Menge bei nur 20fach erhöhter Vektordosis. Diese offensichtliche Diskrepanz zwischen Vektordosis und resultierender IL12-Menge läßt sich vermutlich auf Meßungenauigkeiten des ELISA zurückführen. Betrachtet man hingegen IFNγ, so korrelieren Vektordosis und Serumlevel (eine 20fach höhere Vektordosis führt zu zu einer 18fach höheren IFNγ-Serumkonzentrationen).

Bei der niedrigen Dosis war der IL12-ELISA relativ dicht am Meßlimit und eventuell ungenau. Extrapoliert man von der hohen Vektordosis (1×10^9 n.i.u.) auf die niedrige (5×10^7), erhält man eine IL12 Serumkonzentration von 12,5 ng/ml für die niedrige Dosis. Auf der Basis der hier erhaltenen Serumkonzentrationen kann man eine theoretische Betrachtung für die Toxikologie bei einer Behandlung im Menschen durchführen. Problematisch ist dabei sicher, daß in dieser Arbeit ein "single chain" IL12 verwendet wurde, bei dem unklar ist, ob es sich toxikologisch wie das natürliche IL12 verhält (z. B. in Bezug auf die Halbwertszeit).

Geht man davon aus, daß eine Vektordosis von 1 x 10^9 n.i.u. Ad-3 zu 250 ng IL12 / ml Serum in der Ratte führt, eine Ratte ca. 20 ml Blut hat und das Serum die Hälfte des Blutvolumens ausmacht, kommt man auf m = 250 ng/ml x 20 ml x 0,5 = 2,5 µg. 1 x 10^9 n.i.u. Vektor würden somit zumindest für einen Tag (gemessener Maximalwert) eine Menge von 2,5 µg in der Zirkulation eines Organismus freisetzen können.

Die kritische Grenze beim Menschen liegt bei 6 ng/ml IL12 im Blut (vergl. Einleitung, (Leonard 1997)). Der sichere Bereich soll hier mit ca. 10% der kritischen Dosis festgelegt werden ($\leq 0,5$ ng/ml). Bei dieser Konzentration im Blut konnte keine dosislimitierende Toxizität festgestellt werden (Mazzolini 2003). Bei einem Blutvolumen von 5,6 l (70 kg Körpergewicht) entsprechen 0,5 ng/ml einer Menge von 2,8 µg IL12 für einen Menschen. Aus diesen Überlegungen ließe sich ableiten, daß eine Dosis von 1 x 10⁹ n.i.u. für einen Menschen unbedenklich oder zumindest nicht toxisch bezüglich der IL12 Expression ist. Dieser Wert stellt eine erste Abschätzung dar. Es sind jedoch noch weitere Versuche erforderlich, um die Serumkonzentrationen nach Vektorinjektion genau bestimmen zu können und um dabei die Diskrepanz zwischen den IL12 Serumkonzentrationen bei verschiedenen Vektordosen erklären zu können.

IFNy-Toxizität

IFNγ vermittelt nicht nur einen Großteil der biologischen Aktivität von IL12, sondern ist auch für seine toxischen Nebenwirkungen bei systemischer Gabe hauptverantwortlich. In einer klinischen Studie, bei der IFNγ intravenös über einen Zeitraum von 30 min gegeben wurde, lag die maximal tolerierte Dosis (MTD) bei 1000 μ g/m², wobei es zu einem Todesfall kam (Ernstoff 1990). Als sicherer erscheint eine Dosis von 300 oder 30 μ g/m², die bei dieser Studie ebenfalls verwendet wurde. Eine Dosis in μ g/ml Blut läßt sich mit Hilfe der Du-Bois-Formel A = m^{0,425} x l^{0,725} x 71,84 (m=Körpermasse in kg, I=Körperlänge in cm, A=Körperoberfläche in cm²) bestimmen (Gierse 2000). Nimmt man einen Durchschnittsmenschen mit 175 cm und 70 kg an, so beträgt die Körperoberfläche 1,85 m². Dieser Patient hätte 555 μ g IFNγ bekommen (bei einer Dosis von 300 μ g/m²), das bei einer Halbwertszeit von 6-9 h sich am Analog zu obiger Betrachtung für IL12 läßt sich berechnen, daß Ad-3 bei einer Dosis von 1 x 10^9 n.i.u. zu 23 ng IFN γ pro Organismus führt. Für den oben angenommenen Durchschnittsmenschen würde das zu einer Konzentration von 4 pg/ml Blut führen.

von 5,6 l ergibt sich daraus eine Konzentration von 100 ng/ml Blut.

Auch diese Abschätzung läßt eine Dosis von 1 x 10^9 n.i.u. Vektor als eine sichere und vertretbare Menge für einen Menschen erscheinen.

Auch wenn diese Toxizitätsabschätzungen einen vorläufigen Charakter haben, so bieten sie doch einen Anhaltspunkt für weitere Planungen. Sie setzen allerdings voraus, daß die Infektion eines realen Tumors im Menschen gleich gut abläuft und damit auch die IL12-Expression ähnlich hoch ist wie im hier verwendeten Modell.

Versucht man die Rattendaten auf eine Anwendung im Menschen zu übertragen, so gilt es auch hinsichtlich der Toxizität einige Einschränkungen zu beachten. Der humane Tumor hat höchstwahrscheinlich eine deutlich schlechtere Infizierbarkeit als der Tumor im hier verwendeten Modell (vergl. 4.3.5). Dies sollte höhere Vektordosen in Bezug auf die IL12 Toxizität ermöglichen und aus therapeutischer Sicht evtl. erforderlich machen, da die schlechtere Infizierbarkeit auch zu einer geringeren IL12 Expression führt. Jedoch gilt es hierbei, das Risiko eine Infektion des umliegenden Normalgewebes und einer IL12-Expression von dort zu beachten. Auch kann die Promoteraktivität, die für die IL12 Expression verantwortlich ist, in anderen Zellen anders sein. Daher ist eine endgültige Toxizitätsbetrachtung erst am Menschen möglich.

Es gibt bislang erst eine in Abstraktform veröffentlichte Studie, bei der humanes IL12, exprimiert von einem adenoviralen Vektor, im Mensche zur Tumorbekämpfung eingesetzt wurde (Mazzolini 2003). Mit einer Dosis von bis zu 3 x 10¹² Viruspartikeln pro Patient wurde keine dosislimitierende Toxizität erreicht. Die maximale IL12 Produktion lag bei 520 pg/ml. Bei diesem IL12 handelt es sich jedoch höchstwahrscheinlich um das native Protein, bestehend aus zwei Untereinheiten und nicht um ein "single chain" IL12. Genauere Angaben bezüglich des Vektors sind dem Abstrakt nicht zu entnehmen

4.3.4 Langzeittierstudien und De-Eskalation

In den Studien zeigte sich, daß die therapeutischen Vektoren Ad-1, Ad-2 und Ad-3 innerhalb kürzester Zeit zu einem Tumorrückgang führen können und sich hinsichtlich Tumorwachstum und Überlebensrate sehr stark von den Kontrollgruppen absetzen.

Die 2-Wochen Kurzzeitstudie mit 5 x 10^7 n.i.u. hat aufgrund der geringen Tierzahl (n=3) und der starken Streuung im Tumorvolumen zu keinen klaren Ergebnissen hin-

sichtlich der Unterscheidbarkeit von Ad-1 und Ad-3 geführt. Ein Rückgang des durchschnittlichen Tumorvolumens zeigte sich jedoch auch innerhalb dieses kurzen Beobachtungszeitraumes von nur zwei Wochen deutlich.

Es wurde dann eine Langzeitstudie mit größerer Tierzahl durchgeführt, um die Uberlebensrate relativ zur Kontrollgruppe zu bestimmen und um die Tumorvolumina mit einer größeren Tierzahl auch zu anderen Zeitpunkten zu analysieren. Die erste Langzeitstudie zeigte, daß eine Dosis von 5 x 10⁷ n.i.u. Ad-1, Ad-2 oder Ad-3 bei 90% oder mehr der behandelten Tier zu einer Komplettremission der Tumoren führte, während die Kontrolltiere innerhalb weniger Wochen verstarben. Ein signifikanter Unterschied zwischen den therapeutischen Gruppen bestand nicht. Die Tiere, die eine Komplettremission gezeigt hatten, wurden erneut mit denselben Tumorzellen wie zuvor injiziert, es war jedoch bei keinem Tier das Anwachsen eines Tumors zu beobachten. Dadurch konnte klar gezeigt werden, daß die einmalige Immunstimulation zu einem immunologischen Gedächtnis gegen den behandelten Tumor geführt hat. Das Immunsystem wurde durch die Behandlung erfolgreich trainiert, den Tumor zu erkennen und auch bei einem erneuten Auftreten desselben Tumors bzw. derselben Tumorzellen, diese ohne weitere Behandlung auszuräumen. Man kann somit von einer erfolgreichen Impfung gegen die injizierten Tumorzellen sprechen.

Die Verwendung einer 10fach niedrigeren Vektordosis (5 x 10^6 n.i.u.) zeigte eine vergleichbare Tumoreliminierung. Nimmt man die drei therapeutischen Gruppen zusammen, so sind mehr als 80% der Tiere 13 Wochen nach Behandlung tumorfrei und mehr als 85% zeigen ein Überleben über den gesamten bisherigen Beobachtungszeitraum von 150 Tagen. Leider war auch bei dieser sehr niedrigen Dosis in der Langzeitstudie kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei therapeutischen Vektoren zu erkennen. Eine Tendenz, daß die therapeutische Effizienz von Ad-3 > Ad-2 > Ad-1 ist, läßt sich aber in den Tumorgrößen und in der Überlebensrate erkennen.

Auch zwischen den beiden Vektordosen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied außer für Ad-1 in der 7. Woche. Eine Tendenz zu einer höheren Effizienz der höheren Dosis ist jedoch bei allen Gruppen zu erkennen. Die Ursache dafür, daß selbst bei dieser sehr geringen Dosis keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind, liegt wahrscheinlich in einer immer noch zu hohen Dosis und vielleicht auch an der in der zweiten Langzeitstudie (5 x 10⁶ n.i.u.) schon in Woche 0 zu hohen Streuung der Tumorgrößen in den therapeutischen Gruppen. Eventuell wäre ein Unterschied nur in der 1. oder 2. Woche nach Vektorgabe sichtbar gewesen, wenn die Vektoren sich in der Stärke und damit Geschwindigkeit der Immunantwort unterscheiden. In der zuvor durchgeführten De-Eskalation ließ sich nämlich deutlich erkennen, daß Ad-3 effizienter als Ad-1 in der Tumorreduktion ist. Allerdings lag der Beobachtungszeitraum hier bei nur 2 Wochen und diese Ergebnisse sind aufgrund der geringen Tierzahl (n=3) nicht statistisch signifikant. Die Tendenz ist jedoch sehr deutlich ersichtlich. Ob die höhere Effizienz von Ad-3 relativ zu Ad-1 auf 4-1BBL oder IL2 oder beide zurückzuführen ist, ist gegenwärtig noch unklar.

Zur Zeit wird eine weitere Studie durchgeführt mit einer Dosis von 1 x 10⁶ n.i.u., wobei MRT-Scans nach 1, 2 und 3 Wochen durchgeführt werden, mit dem Ziel, zumindest in der Kinetik der Tumorreduktion einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Vektoren beobachten zu können.

Die Tiergewichte korrespondierten mit dem Gesundheitszustand der Tiere und eine höhere Vektor-Dosis (5 x 10^7 gegenüber 5 x 10^6 n.i.u.) spiegelte sich hier tendenziell auch in einer schnelleren Genesung der Tiere wider. Ein Unterschied zwischen den drei therapeutischen Vektoren war aber hier nicht erkennbar.

Vergleich der Tierdaten mit publizierten Daten

Es gibt eine Studie, in der ein nahezu identisches Tiermodell verwendet wurde (Barajas 2001). Tumorimplantation und Vektorgabe wurden nach annähernd demselben Schema wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Allerdings lag die Tumorzellzahl mit 5 x 10⁵ Zellen zur Implantation von 2 Tumoren bei Barajas et al. deutlich niedriger. Es handelt sich um denselben Rattenstamm und um denselben Ursprungstumor (Morris Hepatoma 7777), allerdings wurde die Tumorzellinie McA-RH7777 verwendet. In wie weit, falls überhaupt, sich diese Linie von der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Linie MH-7777A unterscheidet, ist unklar. Aufgrund desselben Ausgangtumors kann diese Studie aber zum Vergleich herangezogen werden. Auch in dieser Studie wurden 2 Tumore in die Leber implantiert und durch eine einmalige Vektorinjektion in einen Tumorherd behandelt. Als Vektor wurde AdCMVIL-12 verwendet. Das Konstrukt ähnelt dem hier verwendeten Ad-1, mit dem einzigen Unterschied, daß es kein "single chain" IL12 benutzt. Statt dessen wurde das native IL12 bestehend aus seinen zwei Untereinheiten, die über ein IRES-Element verknüpft wurden (p35-IRES-p40), verwendet. Es wurden 5 x 10⁹ pfu/Tier verwendet und eine Langzeitüberlebensrate von 60% erreicht. Vergleicht man das mit der Überlebensrate von 90% bei 5 x 10⁷ n.i.u./Tier Ad-1, so wird die Differenz mehr als deutlich. Da sich nach 150 Tagen schon klar abzeichnet, daß auch die Dosis von 5 x 10⁶ n.i.u. Ad-1 im Langzeitüberleben ähnlich effizient ist (Ad-1: 83%, Ad-2: 91%, Ad-3: 92%), wie die höhere Dosis von 5 x 10^7 , so kann man von einer ca. 1000x höheren Effizienz sprechen, die weitgehend auf die Verwendung des "single chain" IL12 zurückzuführen sein dürfte (Lieschke 1997). Dieses "single chain" Konstrukt hat den Vorteil, daß p40 Homodimere nicht auftreten können. Da diese p40 Homodimere inhibitorisch wirken können, könnte hierin eine Erklärung für die bessere Antitumoreffizienz liegen. "Single chain" IL12 könnte aber auch effizienter an seinen Rezeptor binden als das native Protein und es könnte stabiler sein, also eine längere Halbwertszeit haben. In der oben zitierten Studie von Barajas et al. wurden die cDNA-Sequenzen der Untereinheiten des nativen IL12 über IRES verbunden

(p35.IRES.p40). In einem *in vitro* Bioassay hat sich ein derartiges Konstrukt als etwa 80x weniger aktiv als das "single chain" IL12 erwiesen (Lieschke 1997). Diese Tatsache zusammen mit eventuellen Unterschieden in der Titration zwischen der Barajas-Studie und der vorliegenden Arbeit stellt eine plausible Erklärung für die um drei Größenordnungen höhere Effizienz von Ad-1 dar.

4.3.5 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Nach Auswertung der sehr positiven Daten aus dem Rattenmodell stellt sich die Frage, ob das Verfahren auch beim Menschen in der Tumortherapie erfolgreich einsetzbar ist.

Daß eine einmalige Immunstimulation mit einer extrem niedrigen Vektordosis von 5 x 10^6 n.i.u. ausreichen kann, um auch außerordentlich große Bauchraummetastasen auszuräumen wurde hier erstmals gezeigt. Besonders eindrucksvoll ist ein Beispiel aus der 5 x 10^6 Ad-1 Gruppe: Ein Tier, das in der 3. Woche nach Behandlung ein Tumorvolumen von 5,84 cm³ hatte, war vier Wochen später nahezu tumorfrei. Das einmal am Tumor durch die Behandlung trainierte Immunsystem war ohne weitere Unterstützung selbstständig in der Lage, selbst eine derart große Tumormasse auszuräumen. Extrapoliert man diese Tumorgröße auf den Menschen (Gewicht der Ratte: 232 g, Gewicht eines Menschen 70 kg), erhält man ein Tumorvolumen von 1762 cm³, was einem Quader von etwa 12 x 12 x 12 cm entspricht. Dieser Vergleich zeigt, daß das Immunsystem grundsätzlich die Fähigkeit hat, auch große Tumormassen nach entsprechender Stimulation beseitigen zu können.

Es gilt jedoch zu beachten, daß das hier verwendete Rattenmodell i.d.R. nicht das Tumorgeschehen eines humanen Tumors widerspiegeln dürfte. Dieses Modell benutzt einen monoklonalen, sehr schnell wachsenden Tumor. Das Tumorgeschehen im Menschen dürfte jedoch häufig polyklonaler Natur sein. Die Behandlung eines Tumorherdes, kann wahrscheinlich auch hier zu einer effizienten Reaktion gegen die getroffenen Tumorzellklone führen. Es handelt sich quasi um einen Art Impfung gegen die mit dem Vektor infizierten Tumorzellen. Wie stark sich andere Tumorzellklone von den behandelten Tumorzellen unterscheiden, dürfte dann bestimmen, ob auch diese vom Immunsystem ausgeräumt werden können. Eine Vorhersage, wie gut der hier vorgestellte Therapieweg im Menschen funktioniert, ist zur Zeit nicht möglich.

Es gibt ein Tumormodell im Murmeltier, das "woodchuck" Hepatitis Virus (WHV) -Modell, bei dem die chronische WHV-Infektion Auslöser eines HCC ist. Da auch beim Menschen das HCC in Folge einer chronischen Virusinfektion (HBV, HCV) entstehen kann, handelt es sich hierbei um ein mit dem humanen HCC gut vergleichbares Tumorgeschehen. In dem "woodchuck" Hepatitis Virus - Modell, wurde die Antitumorwirkung eines adenoviralen Vektors, der IL12 und B7.1 exprimiert, untersucht (Putzer 2001). Hier zeigten sich deutlich Tumorreduktionen um ca. 80% in den behandelten Tumorknoten innerhalb von 2 Wochen. Nichtbehandelte Tumorknoten im umgebenden Lebergewebe zeigten jedoch keine Volumenreduktion. Man kann beim HCC jedoch vermuten, daß die Tumorherde in der Leber unabhängig voneinander entstanden sind und somit nicht von einem einzigen Ursprungstumor ausgehen. Bei anderen Tumorarten entwickeln sich Metastasen ausgehend von einem Ursprungstumor. Hier sollte die Wahrscheinlichkeit größer sein, daß auch die Metastasen - trotz eventueller Veränderungen - nach Immunstimulation am Primärtumor erkannt und ausgeräumt werden. Diese Hypothese ist noch ungeklärt und die Reaktion auf eine Immuntherapie mit einem der hier vorgestellten Vektoren könnte sich bei verschiedenen Patienten unterschiedlich auswirken. Ähneln die nicht behandelten Tumorherde den behandelten stark, dürfte die Wahrscheinlichkeit eines therapeutischen Erfolgs höher liegen als bei großen Unterschieden zwischen den Tumorherden.

Eine Behandlung möglichst jedes injizierbaren Tumorherdes erscheint somit als sinnvoll, weil damit die Wahrscheinlichkeit höher ist, alle Tumorzellvarianten zu erreichen. Es ist weder erforderlich noch möglich, jede Tumorzelle in einem Tumorherd zu treffen, aber durch die Behandlung mehrerer Tumorherde steigt die Wahrscheinlichkeit, alle klonalen Varianten eines Ursprungstumors zu treffen und durch das Immunsystem eliminieren zu lassen. Sind die Unterschiede zwischen den Tumorzellklonen nicht zu groß, könnte vielleicht auch die Behandlung nur eines Tumorherdes ausreichen. Würde man sehr viele Tumorherde gleichzeitig behandeln, könnte die Toxizität durch den Virus oder durch IL12 limitierend werden, weshalb eine möglichst geringe Vektor- und Transgendosis pro Tumorherd erstrebenswert ist.

Interessant wäre ein Tiermodell mit einem langsam wachsenden, stark differenzierten Tumor, der Metastasen bildet, aber nicht zu einem schnellen Versterben der Tiere führt. Dieses Modell würde sich deutlich von dem schnell wachsenden und wenig differenzierten MH-7777A Tumormodell unterscheiden. Idealerweise sollten sich die Tochtergeschwülste in einem neuen Modell auch leicht vom Primärtumor unterscheiden. In der Praxis ist so ein Modell aber außerordentlich aufwendig, da eine große Zahl von Tieren überwacht werden müßte und die Tiere individuell und nicht in Gruppen behandelt werden könnten. Dies erschwert die Durchführung erheblich, falls man so ein Modell überhaupt realisieren kann. Letztendlich bleibt jeder Tierversuch mit modellhaften Einschränkungen behaftet und kann nur beantworten, ob eine Therapie vom Prinzip her funktionieren kann. Dies zumindest wurde für adenovirale Immuntherapieansätze in zahlreichen Tiermodellen belegt. Abgesehen von den bereits erwähnten HCC-Modellen, konnte eine hohe Effizienz in sehr vielen Tiermodellen nachgewiesen werden. Einige Beispiele seien hier aufgeführt:

- Kolorektales Adenokarzinom (Zellinie CT26, Transgene der Vektoren: IL12, IP-10) (Narvaiza 2000),
- Kolonkarzinom (Zellinie MCA 26, Transgen des Vektors: IL12) (Caruso 1996)

- Pankreas-Adenokarzinom (Zellinie Pan02, Transgene des Vektors: IL12 und B7.1) (Putzer 2002),
- Lungenkarzinom (Zellinie Lewis Lung Carcinoma LLC, Transgene der Vektoren: IL12 und IL2) (Tanaka 2000)
- Osteosarkom Lungenmetastasen (Zellinie SAOS-LM6, Transgen des Vektors: IL12) (Worth 2000)
- Gliom (Zellinie GL-26, Transgen des Vektors: IL12) (Liu 2002)
- Brusttumor (transplantierte, durch PyMidT erzeugte, primäre Brusttumorzellen, Transgene der Vektoren: IL12 und IL2) (Addison 1998)

Die meisten dieser Studien erschienen während die vorliegende Arbeit entstand und sie bestätigen die Wirksamkeit eines immunstimulatorischen Ansatzes in der Tumortherapie. Jedoch wurden in keiner dieser Arbeiten vergleichbar große Tumore mit einer derart geringen Vektordosis behandelt. Ein therapeutischer Vorteil, der sicher auf die Verwendung des "single chain" IL12 zurückzuführen ist. In wie weit die Kombination mit 4-1BBL und IL2 ein weiteres Herabsetzen der ohnehin schon sehr niedrigen Dosis ermöglicht, muß in weiteren Experimenten bestimmt werden. Auch die Testung der Vektoren Ad-1/2/3 in anderen Tiermodellen wird für eine Vergleichbarkeit mit den publizierten Daten wichtig sein.

Die Effizienz immuntherapeutischer Ansätze in verschiedensten Tiermodellen läßt es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß auch im Menschen therapeutische Erfolge mit einem solchen Ansatz erzielt werden können.

Ein wichtiger Punkt, in dem das MH-7777A-Tumormodell ein idealisiertes Szenario darstellt ist neben der oben erwähnten Monoklonalität die hervorragende Infizierbarkeit durch Adenoviren. Diese ist bei MH-7777A außergewöhnlich hoch, wie ein Vergleich mit der humanen Lungenfibroblastenlinie MRC-5 und der humanen HCC-Linie HuH-7 zeigte (Infizierbarkeit: MH-7777A >> HuH-7 > MRC-5) (Bähr 2002). Eine derartig hohe Infizierbarkeit wird bei humanen Tumoren i.d.R. nicht anzutreffen sein. Der für die Infizierbarkeit entscheidende Rezeptor (CAR) ist nämlich in vielen humanen Primärtumoren herunterreguliert (Douglas 2001; Li 1999).

Aus der bereits oben erwähnten Studie (Kap. 4.3.3), in der humane Tumore mit einem IL12 exprimierenden Adenovirus behandelt wurden, geht hervor, daß diese Therapieform zu klinisch relevanten Ergebnissen führen kann (Mazzolini 2003): Von 21 behandelten Patienten zeigten drei ein 25%iges Absinken der Tumormarker, ein Patient zeigte ein teilweises Ansprechen des Tumors und 6 Patienten eine Stabilisierung. Da sich in verschiedenen Tierstudien die Effekte von IL12 durch Kombination mit einem T-Zell-Kostimulator wie 4-1BBL (Martinet 2002) oder mit IL2 erheblich steigern ließen, kann auch für die Anwendung im Menschen durch derartige Kombinationen eine Steigerung deutlich über die Ergebnisse dieser Studie erwartet werden.

4.3.6 Mechanismus der Immunantwort gegen den Tumor

Aus den histologischen und durchflußzytometrischen Daten geht eine Beteiligung von NK-, NKT-, CD4- und CD8-Zellen an der Immunantwort hervor. Die Untersuchungen für die Vektoren Ad-1/2/3 sind diesbezüglich noch nicht abgeschlossen. So sollen weitere histologische und durchflußzytometrische Untersuchungen an größeren Tierzahlen folgen und dabei auch das Tumorinfiltrat quantitativ mittels Durchflußzytometrie analysiert werden. Es soll auch noch ein Test auf zytotoxische T-Zellen aus dem Milzgewebe erfolgen, mit dessen Hilfe sich evtl. Ad-2 und Ad-3 in ihrer therapeutischen Wirkung von Ad-1 absetzen lassen. Da bislang noch unklar ist, welche Beiträge 4-1BBL und IL2 zu der durch IL12 vermittelten Immunstimulation leisten, soll hier primär IL12 diskutiert werden.

Aus dem Vergleich mit den Literaturdaten läßt sich einiges über den Mechanismus der Immunantwort sagen. In einem murinen HCC-Modell wurde dieser Mechanismus nach intratumoraler Injektion mit IL12 exprimierenden adenoviralen Vektor ausführlich charakterisiert (Andrews 2000). Verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe nahm die Zahl an Makrophagen, CD4/CD8-, NK- und NKT-Zellen im Tumor zu, während die Tumorzellzahl selbst abnahm. IL12 führte erwartungsgemäß zu einer Infiltration des Tumors durch Immunzellen. In dieser Studie konnte durch Verwendung verschiedener "knockout"-Modelle jedoch gezeigt werden, daß die Tumorregression nicht durch das zelluläre Immunsystem vermittelt wird, also unabhängig von NK-, NKT- und CD4/CD8-Zellen ist. Verantwortlich für den Antitumoreffekt war hingegen die antiangiogenetische Wirkung von IL12. Der Beobachtungszeitraum lag jedoch nur bei 3-4 Wochen. Dies läßt darauf schließen, daß die antiangiogenetischen Effekte von IL12 in der Anfangsphase der Tumorregression eine wichtige und zumindest in diesem Modell sogar die entscheidende Rolle spielen.

In einem murinen Kolonkarzinommodell wurde gezeigt, daß NK-Zellen für die frühe Immunantwort essentiell sind (Pham-Nguyen 1999). T-Zellen (CD4 und CD8) waren verantwortlich für das langfristige Überleben der Tiere. T-Zellen und in einem geringeren Maße NK-Zellen waren für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich. Tiere, bei denen die Behandlung zu einem kompletten Tumorrückgang geführt hat, zeigen in den meisten untersuchten Modellen auch ein immunologisches Gedächtnis. Dieses Gedächtnis führt dazu, daß nach erfolgreicher Behandlung bei erneuter Injektion derselben Tumorzellen diese Zellen abgestoßen werden (Chen 1997; Mazzolini 1999). Die Studie von Chen et al. (1997) zeigte, daß CD4- und CD8-Zellen für eine effiziente Tumoreliminierung erforderlich sind. Andere Studien mit rekombinantem IL12-Protein zeigen, daß für die IL12-Tumortherapie NK-Zellen und in Abhängigkeit vom verwendeten Modell, vor allem bei niedriger IL12-Dosis, NKT-Zellen entscheidend für die Tumorabwehr sind (Smyth 2002; Smyth 2000). Zusammenfassend ergibt sich damit für die adenovirale IL12-Immuntherapie von Tumoren folgendes Bild: Die unmittelbare Reaktion auf die IL12-Expression im Tumor liegt in der Antiangiogenese und in einer NK-Zellinfiltration begründet. Oft sind wahrscheinlich auch NKT-Zellen entscheidend für die Tumorabwehr. Für eine dauerhafte Ausräumung des Tumorgewebes und für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses sind darüber hinaus CD4- und CD8-Zellen erforderlich.

Für 4-1BBL liegen noch keine Studien vor, die in einem Tumormodell und unter Verwendung adenoviraler Vektoren den Mechanismus der Antitumorantwort genau charakterisieren. Bei einem T-Zell-Kostimulator ist aber davon auszugehen, daß die Wirkung auf CD4- und CD8-Zellen entscheidend für die Antitumoraktivität von 4-1BBL ist. Eine synergistische Wirkung mit IL12 konnte klar gezeigt werden (Martinet 2002). 4-1BBL, exprimiert von einem adenoviralen Vektor, verstärkt die Antitumoraktivität von prä-aktivierten T-Zellen und auch von naive peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). IFNγ, IL2 und GM-CSF werden als Folge verstärkt ausgeschüttet (Yoshida 2003).

Wie IL12 kann auch IL2, exprimiert von einem adenoviralen Vektor, zu einer Immunantwort gegen den Tumor führen. Diese kann zur Ausbildung von CTLs in erfolgreich behandelten Mäusen führen. Für eine erfolgreiche Therapie sind NK- und CD8-Zellen erforderlich, CD4-Zellen wahrscheinlich nicht (Slos 2001).

5 Material und Methoden

5.1 Adenovirale Vektoren

5.1.1 Übersicht zur Klonierung der adenoviralen Vektoren Ad-1/2/3

Startpunkt für die Klonierungen war das Plasmid pTrident 3 und die einzelnen therapeutischen Transgene. In pTrident 3 wurden sukzessiv alle Transgene eingesetzt. Dann erfolgte die Umsetzung der Transgene mit den IRES-Elementen (aber ohne Promoter/polyA) in das Plasmid pShuttle-CMV. Letzteres wurde dann in einen rekombinationsaktiven Stamm von *E. coli* zusammen mit pAdEasy-1 transformiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination wurde das adenovirale Genom in 293 Zellen transfiziert und die entstandenen Viren vermehrt.

Verwendete Plasmide und ihre Quellen: pTrident 3 (pT3): M. Fussenegger, (Fussenegger 1998) pSFG-mIL-12.p40.L.delta.p35: R. C. Mulligan, (Lieschke 1997) pJR-IL2: (Hock 1993) pORF-m4-1BBL v.10: Fa. Invivogen pShuttle-CMV und pAdEasy-1: B. Vogelstein, (He 1998)

Die wichtigsten Plasmidkarten sind im Anhang zu finden. Bei allen verwendeten Transgenen (IL12, 4-1BBL, IL2) handelt es sich um die murine Variante dieser Gene, bei IL12 um das murine Fusionsprotein der beiden Untereinheiten ("single chain" IL12).

5.1.2 Klonierungsdetails

Die Klonierungsschritte sind hier nur stichwortartig genannt. Die methodischen Details werden weiter unten erläutert: homologe Rekombination unter 5.1.4, enzymatische Reaktionsschritte, Gelaufreinigung, Transformation und andere molekularbiologische Methoden unter 5.5.

In der ersten Zeile jedes Klonierungsschrittes wird der Zweck dieses Schrittes benannt. Danach folgen unter a) bzw. b) die experimentellen Teilschritte. Die Aufteilung in a/b fällt weg, wenn die Übersichtlichkeit diese nicht erfordert. Genannt wird zuerst das Ausgangsplasmid für die Reaktion, gefolgt von den Enzymen, mit denen dieses Plasmid modifiziert wurde. An diese enyzmatischen Reaktionen schloß sich meist eine Gelaufreinigung an, um das gewünschte DNA-Fragment getrennt von den nicht erwünschten Fragmenten zu erhalten oder um zuvor verwendete Enzyme abzutrennen. Hinter dem Pfeil steht dann stichwortartig mit welchem Schritt das jeweilige Zielkonstrukt hergestellt wurde. Dieses Konstrukt ist unterstrichen. Bei Schritt 8) wurde von diesem Schema abgewichen, da es sich hier schon um den ersten Schritt der Virusherstellung handelt, der dann im Abschnitt 5.1.4 ausführlich erläutert wird.

Klonierung von Ad-3

1) Einsetzen von IL12 hinein in pT3:

- a) pT3: *Pst*l, T4 DNA-Pol, CIP, Gelaufreinigung.
- b) pSFG scIL12: *Nco*I, *Eco*RV, *BgI*II; Klenow, Gelaufreinigung (1672 bp)
- → Ligation der Fragmente gefolgt von Transformation in *E. coli* (Stamm: DH5α) ergab <u>pT3 IL12</u>.
- 2) Einsetzen eines Kozak-Oligonukleotids (Kozak 1987) an den Anfang von IL12 in pT3 IL12:
 - a) pT3 IL12: *Eco*RI, *Ppu*MI; Gelaufreinigung.
 - b) Oligonukleotide (aattcgccgccaccatgg, gacccatggtggcggcg).

→ Ligation von pT3 IL12-Fragment mit dem Oligonukleotidmix gefolgt von Transformation in *E. coli* (Stamm: DH5α) ergab <u>pT3 Kozak IL12</u>.

3) Einsetzen von IL2 hinein in pT3 Kozak IL12:

a) IL2 wurde mittels PCR aus pJR-IL2 amplifiziert. Dabei wurde eine Kozak-Sequenz eingefügt. Primer: ttagccactagtgccaccatgtacagcatgcagctc, gcctaaacgcgttacatagttattgagggcttg. Zyklen: 2 min 96 °C, 3x (40s 94 °C, 40s 50 °C, 60s 72 °C), 27x (40s 94 °C, 40s 60 °C, 60s 72 °C), 8 min 72 °C. Gelaufreinigung des PCR-Produktes. Verdau des aufgereinigten PCR-Produktes mit *Spe*I, *Mlu*I; CIP, Gelaufreinigung.

b) pT3 Kozak IL12: Spel, Mlul; Gelaufreinigung

→ Ligation des IL2 PCR-Produktes mit dem pT3 Kozak IL12 - Fragment gefolgt von Transformation in *E. coli* (Stamm: DH5α) ergab <u>pT3 Kozak IL12, IL2</u>.

4) Einsetzen von 4-1BBL hinein in pT3 Kozak IL12, IL2:

a) 4-1BBL wurde aus pORF-m4-1BBL mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde der 5' Bereich zur Realisierung der nativen 4-1BBL Aminosäuresequenz geändert und es wurde eine Kozak-Sequenz eingefügt. Primer: gcgatgcggccgcgccaccatggaccagcacacacttgatg, ggcatggcgccgccagtcacaagaaggatagttc. Zyklen wie bei der IL2-PCR (oben). Gelaufreinigung des PCR-Produktes. Verdau des aufgereinigten PCR-Produktes mit *Asc*l, *Not*l; CIP, Gelaufreinigung.

b) pT3 Kozak IL12, IL2: *Asc*l, *Not*l; Gelaufreinigung.
→ Ligation des 4-1BBL PCR-Produktes mit dem pT3 Kozak IL12, IL2- Fragment gefolgt von Transformation in *E. coli* (Stamm: DH5α) ergab <u>pT3 Kozak IL12, 4-</u> <u>1BBL, IL2</u>.

5) Einsetzen des Fragmentes "Kozak IL12, 4-1BBL, IL2" hinein in pShuttle CMV:

a1) pT3 Kozak IL12, 4-1BBL, IL2: EcoRI, Mlul; Klenow, Gelaufreinigung

b1) pShuttle CMV: *Eco*RV; CIP, Gelaufreinigung

→ Da eine Direktligation dieser Fragmente nicht funktionierte - vermutlich war das Einsatzstück zu groß für eine "blunt-end" Ligation - wurde ein Umweg mit "Verbindungs"-Oligonukleotiden beschritten. "Verbindungs"-Oligonukleotide 5' vom "Kozak IL12, 4-1BBL, IL2"-Einsatzstück: GATCTggatccG, AATTCggatccA (enthalten eine *Bam*HI-Stelle, um später die Klonierung überprüfen zu können) und 3' davon: CGCGTgctagcATggccggccGC, GGCCGCggccggccATgctagcA. Diese Oligonukleotide ermöglichen eine "sticky-end" Ligation.

a2) pT3 Kozak IL12, 4-1BBL, IL2: *Eco*RI, *Mlu*I; Gelaufreinigung. Ligation des aufgereinigten Fragmentes mit den vier "Verbindungs"-Oligonukleotide. Gelaufreinigung.

b2) pShuttle CMV: *Bgl*II, *Not*I; Gelaufreinigung.

→ Ligation der Fragmente von a2) und b2) gefolgt von einer Transformation in *E. coli* (Stamm: DH10B) ergab pShuttle-3 (pShuttle-CMV Kozak IL12, 4-1BBL, IL2).

Dieses Konstrukt wurde im Bereich seiner Expressionskassette komplett sequenziert. Dafür wurden alle Sequenzbereiche mit mindestens 2 unabhängigen Sequenzier-Primern sequenziert, um Fehlanalysen auszuschließen. Es stellte sich ein Fehler im scIL12 heraus (Ser -> Pro, AS 158) (Lieschke 1997). An dieser Stelle entsprach die Sequenz nicht der von B. Vogelstein mitgeteilten. Dieser Fehler war jedoch auch im Originalkonstrukt von B. Vogelstein vorhanden, wie eine weitere Sequenzierung ergab. Deshalb wurde hier nichts geändert. Vier Nukleotide in den IRES-Elementen stimmten nicht mit der mitgeteilten Sequenz überein, waren jedoch identisch mit dem Originalplasmid, weshalb auch hier keine Änderung erfolgte.

Im IL2 fehlte ein Nukleotidtriplet für Gln (AS 45). Daher wurde IL2 im pShuttle-3 ausgetauscht.

6) Austausch des "mutierten" IL2 in pShuttle-3:

a) IL2 wurde wie zuvor mittels PCR aus pJR-IL2 amplifiziert. Dabei wurde eine Kozak-Sequenz eingefügt. Primer: ttagccactagtgccaccatgtacagcatgcagctc, gcctaaacgcgttacatagttattgagggcttg. Zyklen: 2 min 96 °C, 3x (40s 94 °C, 40s 50 °C, 60s 72 °C), 25x (40s 94 °C, 40s 60 °C, 60s 72 °C), 8 min 72 °C. Gelaufreinigung des PCR-Produktes. Verdau des aufgereinigten PCR-Produktes mit *Spe*l, *Mlu*l; CIP, Gelaufreinigung.

b) pShuttle-3: Spel, Mlul; Gelaufreinigung.

→ Ligation der Fragmente von a) und b) gefolgt von einer Transformation in *E. coli* (Stamm: DH10B) ergab <u>pShuttle-3</u> (pShuttle-CMV Kozak IL12, 4-1BBL, IL2). Die Kontrollsequenzierung ergab, daß diesmal keine Mutation bei IL2 vorlag.

7) Homologe Rekombination von pShuttle-3 mit pAdEasy-1:

pShuttle-3: *Bst*1107I; Gelaufreinigung.

pAdEasy-1: unverdaut

→ Elektroporation von 100 ng pAdEasy-1 zusammen mit 100 ng pShuttle-3 (letzteres damit in ca. dreifachem molaren Überschuß) in *E. coli* (Stamm: BJ5183 EC), gefolgt von Retransformation erfolgreicher Rekombinanten in *E. coli* (Stamm: DH10 α) ergab <u>pAd-3</u>.

8) Transfektion von pAd-3 in QBI-HEK 293A:

Bei QBI-HEK 293A - Zellen handelt es sich um einen kommerziellen Klon der Zelllinie HEK 293, der von der Fa. Qbiogene stammt. pAd-3 wurde mit *Pac*I verdaut und in die 293-Zellen transfiziert. Nach 7 Tagen wurden einzelne Plaques isoliert und vermehrt. Aus 3 Plaques erfolgten Viruspräparationen. Alle ergaben funktionelle, korrekt ihre Transgene exprimierende, adenovirale Vektoren.

→ <u>Ad-3</u>

Klonierung von Ad-2

- 1) Herausschneiden von IL2 aus pShuttle-3:
 - p-Shuttle-3: EcoRV, Ascl; Klenow, Gelaufreinigung
 - Selbstligation des aufgereinigten Fragmentes gefolgt von Transformation in *E. coli* (Stamm DH5α) ergab <u>pShuttle-2</u> (pShuttle-CMV Kozak IL12, 4-1BBL).
- Analog zu den Schritten 7) und 8) bei Ad-3 wurde auch hier der virale Vektor hergestellt. → <u>Ad-2</u>

Klonierung von Ad-1

1) Herausschneiden von 4-1BBL und IL2 aus pShuttle-3:

p-Shuttle-3: HindIII; Gelaufreinigung

- Selbstligation des aufgereinigten Fragmentes gefolgt von Transformation in *E. coli* (Stamm DH5α) ergab <u>pShuttle-1</u> (pShuttle-CMV Kozak IL12).
- Analog zu den Schritten 7) und 8) bei Ad-3 wurde auch hier der virale Vektor hergestellt. → <u>Ad-1</u>

5.1.3 Adenovirale Kontrollvektoren

In den Tierexperimenten wurden zwei Vektoren eingesetzt, die kein therapeutisches Transgen enthielten.

1. Ad-GFP ist abgesehen vom Transgen mit den therapeutischen Vektoren Ad-1/2/3 identisch. GFP steht für das "Green Fluorescent Protein". Dieses Transgen ist ein nicht-therapeutischer Marker. Der Vektor Ad-GFP wurde von Dr. Roland Vogel (Max-Planck-Einheit für Stukturbiologie, Hamburg, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2. Ad-Null enthält kein Transgen, ist aber wie die anderen adenoviralen Vektoren ein in E1 und E3 deletiertes Konstrukt (Adeno-X-Null, Fa. Clontech, Katalog-Nr. 631517).

5.1.4 Herstellung adenoviraler Vektoren

Die Herstellung der adenoviralen Vektoren erfolgte mit Hilfe des AdEasy-Systems (He 1998) und wird in Abb. 5.1 illustriert. Bei diesem System erfolgt zunächst die Klonierung des Transgens in den Transfervektor (pShuttle-CMV). Daran schließt sich die homologe Rekombination von Transfervektor mit pAdEasy-1 an. pAdEasy-1 verfügt über alle adenoviralen Gene, abgesehen von den Deletionen in E1 und E3. Die Rekombination findet wie oben dargestellt über den rechten und linken homologen Arm statt, kann aber statt über den linken Arm auch über den bakteriellen Ori stattfinden. War die homologe Rekombination erfolgreich, so folgt zunächst eine Retransformation in einen rekombinationsinkompetenten *E. coli* - Stamm, damit die Plasmid-DNA sich ohne die Gefahr weiterer Rekombinationsereignisse vermehren läßt. Daran schließt sich die Linearisierung mittels *Pac*l und die Transfektion in HEK 293 Zellen an. In diesen wächst dann der Virus heran. Der große Vorteil dieser Methode gegen-über der herkömmlichen Viruserzeugung durch Rekombination in 293 ist, daß sich das Rekombinationsprodukt als Plasmid sehr viel leichter und schneller auf Richtigkeit hin überprüfen läßt als virale DNA.



Generation of a Recombinant Adenovirus Using AdEasy™

Abb. 5.1 Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem AdEasy System (Bsp. für Ad-3). Verändert nach der Gebrauchsanweisung Vers. 1.2 für das AdEasy-System der Fa. Qbiogene (S. 4). (http://www.qbiogene.com/literature/protocols/gene-expression/pdf/m-adeasy.pdf)

Die Klonierung der hier verwendeten Vektoren wurde unter 5.1.2 ausführlich dargelegt. Hier soll nun auf die Schritte zur Herstellung adenoviraler Vektoren beginnend mit der homologen Rekombination eingegangen werden.

Homologe Rekombination in E. coli

- 2) Das jeweilige Transferplasmid (pShuttle-1/2/3) mit den Transgenen wurde linearisiert, über ein Agarose-Gel schonend aufgereinigt (mittels GELase und Centricon-Röhrchen wurde die DNA aus dem Gel isoliert).
- 3) 1-5 μl (100 ng pAdEasy-1 zusammen mit 100 ng des Transferplasmids) wurden per Elektroporation in 35 μl des rekombinationspositiven *E. coli* - Stamm BJ5183 (Fa. Qbiogene) transformiert: Die Transformationsbedingungen waren: 200 Ohm, 25 μF und 2,5 kV (Fa. BioRad, Gene Pulser II). Unmittelbar nach der Elektroporation wurden 500 μl eiskaltes LB-Medium zu den Bakterien gegeben.

Als Kontrolle für die Transformation diente ein Ansatz nur mit Transferplasmid.

- 4) Die transformierten Bakterien wurden f
 ür 7,5 30 min bei 37 °C gesch
 üttelt und dann jeweils 250 μl auf eine Agarose-Platte mit Tetrazyklin ausgestrichen. Die anschließende Inkubationszeit lag bei 12-20 h bei 37 °C.
- 5) Waren auf der Platte des Rekombinationsansatzes mehr als 3-10x so viele Kolonien wie bei der Kontrolle, wurde Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus den Kolonien präpariert. Gepickt wurden dabei bevorzugt besonders kleine Kolonien, da diese mit höherer Wahrscheinlichkeit über ein großes Plasmid verfügen. Klone von erfolgreichen Rekombinationsereignissen wurden in einen rekombinationsnegativen *E. coli* - Stamm wie DH5α oder DH10B transformiert. Hiervon wurde wieder Plasmid-DNA in kleinem Maßstab hergestellt, der Klon mittels Restriktionsanalyse überprüft und dann Plasmid-DNA im großen Maßstab hergestellt.

Transfektion der Vektor-DNA in 293-Zellen

Um aus der Plasmid-DNA einen Virus zu machen, wurde erstere in HEK-293 Zellen transfiziert. Es wurde ein Subklon der 293 Linie verwendet (QBI-293A), der von der Fa. Qbiogene erhalten wurde. Dieser Subklon haftet besonders fest auf Plastik-zellkulturschalen.

Die verwendete und auch üblichste Transfektionsmethode zur Herstellung von adenoviralen Vektoren ist die Kalziumphosphat-Transfektion.

- Verschiedene Mengen an adenoviraler Vektor-DNA (2,5-7 μg) wurden mit neutraler Plasmid-DNA auf 20 μg Gesamt-DNA Menge aufgefüllt. Diese 20 μg DNA wurden dann in 225 μl H₂O bereitgestellt.
- 2) Zu der DNA wurde dann 25 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung tropfenweise hinzupipettiert. Dabei befand sich die DNA in einem 15 ml Plastikröhrchen und auf einem Vortexer, der bei mittlerer Stärke lief. Dadurch wurde eine sofortige Mischung des zugegebenen CaCl₂ gewährleistet.
- 3) Nun erfolgte die tropfenweise Zugabe von 250 μl 2xHBS, wie zuvor unter vortexen. (2xHBS: 140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH 7,05. Der pH-Wert ist kritisch! Der Puffer wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert)
- 4) Diese Mischung wurde dann für 15-30 min bei RT inkubiert.

- 5) Ca. 70% (Bereich: 50-80%) konfluente 293-Zellen wurden vorsichtig mit dem DNA-Ca₃(PO₄)₂-Kopräzipitat beträufelt. Bei einer 6 cm Zellkulturschale, in der sich 5 ml Medium befanden, konnte der gesamte Transfektionsmix von 500 μl auf eine Schale gegeben werden. Meist wurde ein 500 μl - Transfektionsansatz jedoch zu jeweils 250 μl auf zwei 6 cm Schalen verteilt.
- 6) Nach 5-7 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen maximal 1x mit 2,5 ml Medium vorsichtig gewaschen und dann mit 3,5 ml eines Agarose/Medium-Gemisches überschichtet.

Agarose/Medium-Gemisch: Hierfür wurde Seaplaque-Agarose in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, so daß eine 4%ige Agaroselösung entstand. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde sie auf 42 °C temperiert (>1,5 h bei dieser Temperatur im Wasserbad gehalten). Unmittelbar vor der Überschichtung der Zellen wurde 1 Teil dieser Agaroselösung mit 4 Teilen des auf 37 °C vortemperierten Mediums gemischt (z. B. 1,6 ml der Agarose Lösung mit 6,4 ml Medium für zwei 6 cm Schalen). Der Sinn der Agarose besteht darin, eine Vermischung von an verschiedenen Orten auf der Schale entstehende Viren zu verhindern. Dadurch ist es möglich, später einzelne Klone zu isolieren.

- 7) Alle 2-4 Tage wurden 1,5 bis 2,5 ml Medium vorsichtig zu der 6 cm Schale gegeben, ohne die Agarose-Schicht zu beschädigen.
- 8) Nach 5-10 Tagen waren Plaques im Zellrasen deutlich sichtbar. Davon wurden mehrere mit einer abgeschnittenen 200 μl Pipettenspitze vom Plattenboden abgesaugt und einzeln in 500 μl Medium bei -80 °C gelagert.

Aufzucht von adenoviralen Vektoren

Frier-Tau-Lyse:

Die zuvor gestochenen Plaques wurden einer Frier-Tau-Lyse unterzogen. Um Adenoviren aus Zellen gewinnen zu können, müssen die Zellen aufgeschlossen werden ohne die Viren zu zerstören. Hierfür wurden die Zellen drei Frier-Tau-Zyklen unterzogen. Dafür wurden die virusinfizierten Zellen für jeden Zyklus in flüssigen Stickstoff gegeben, bis sie komplett gefroren waren und anschließend in einem 37 °C Wasserbad vollständig aufgetaut. 1,5 ml Reaktionsgefäße mit einem Sicherheitsverschluß ("safe lock") haben sich hierfür bewährt.

Infektion aus einem Plaque:

Hierfür wurden zunächst 293-Zellen bereitgestellt. 1,75 x 10^6 Zellen wurden am Vortag der Infektion auf einer T25 Zellkulturflasche eingesät. Am nächsten Tag war der Zellrasen ca. 70% konfluent. Das Medium über den Zellen wurde abgesaugt und die Zellen in einem Volumen von 400 µl Medium infiziert. Für die Infektion wurden 25-50% des eingefrorenen Plaques eingesetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden 3 ml Medium hinzugegeben. Nach 2-7 Tagen zeigten die Zellen einen CPE ("cyto-

pathic effect") von 50% und wurden durch Abspülen mit einer Pipette im Zellkulturüberstand geerntet. Alternativ wurde gelegentlich auch ein Zellschaber zum Ablösen der Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden dann in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen der Frier-Tau-Lyse unterzogen. Dabei war es wichtig zuvor auszutesten, daß die Röhrchen bei dieser Prozedur nicht platzen oder Risse bekommen. Nach den drei Zyklen wurden die Zellen für 15 min bei 6000x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit orientiert sich hierbei an der maximalen Geschwindigkeit, die die Röhrchen sicher aushalten. Die knapp 3 ml Überstand wurden in ein neues Röhrchen überführt und in zwei gleichen Aliquots gelagert. 200 µl des Überstandes wurden für eine erneute Infektion einer T25 bereitgestellt. Aus dieser wurde dann mittels HIRT-Extraktion adenovirale DNA extrahiert und per Restriktionsverdau analysiert.

Infektion einer T175-Flasche:

Die Prozedur war im Grundsatz dieselbe wie zuvor. 293 Zellen wurden in einem minimalen Volumen infiziert, bei 50% CPE geerntet, einer Frier-Tau-Lyse unterzogen, um dann wurden mit 50% des abzentrifugierten Lysats erneut Zellen zu infizieren.

Für eine T175 Zellkulturflasche wurde ein Aliquot (ca. 1,4 ml) des von einer T25 erhaltenen Virus verwendet. Am Vortag wurden hierzu 1,2 x 10⁶ 293-Zellen auf einer T175 eingesät, die am Infektionstag ca. 70% konfluent waren. Der Virus wurde dann in einem Volumen von 2,5-3 ml für 90-120 min auf die Zellen gegeben. Dann wurden 22 ml Medium hinzugegeben. Nach 48 h, wenn sich ein CPE von ca. 50% zeigte, wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden sie in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen 8 min bei 600x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml Überstand resuspendiert, in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen einer Frier-Tau-Lyse unterzogen, anschließend 10 min bei 6000x g zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert.

Infektion von 10 T300-Flaschen:

Hierfür wurden auf 10 T300-Zellkulturflaschen 1,5 x 10^7 293-Zellen pro Flasche ausgesät. Nach zwei Tagen waren die Platten 80-95% konfluent. Die Infektion aller 10 Platten zusammen erfolgte mit 50% des Frier-Tau-Lysat - Überstandes einer T175 (ca. 10 ml). Dafür wurde der Virus mit 82 ml Medium gemischt und je 9 ml davon auf eine T300 gegeben. 2 h später wurden 41 ml Medium hinzugegeben. Nach 48 h hatten sich die meisten Zellen (70-95%) abgelöst. Sie wurden wie oben für den T175-Maßstab beschrieben geerntet. Die erste Zentrifugation erfolgte in 10 50 ml Röhrchen für 8 min bei 600x g. Die Pellets aller Röhrchen zusammen wurden mit 3-4 ml Überstand resuspendiert und für die Frier-Tau-Lyse auf zwei 15 ml Röhrchen verteilt. Alle Lysate wurden in einem 50 ml Röhrchen vereint und 10 min bei 6000x g zentrifugiert und der Überstand bei -80 °C gelagert.

CsCl-Aufreinigung von Adenoviren

Um die adenoviralen Vektoren aufzureinigen, wurden sie auf einen CsCl Gradienten gegeben. Die Aufreinigungsprozedur befreit die Viruspräparation von Zellresten und weitgehend von leeren Virushüllen.

Lösungen:

- CsCl (a) 13 g CsCl + 37 g H₂O (ρ =1,2411 g/cm³)

(b) 17 g CsCl + 33 g H₂O (ρ=1.3393 g/cm³)

(c) 21 g CsCl + 29 g H₂O (ρ =1.4525 g/cm³)

(steril filtrieren und bei RT lagern).

- Lagerungspuffer für Adenoviren:

10 mM TrisCl pH 8,0; 135 mM NaCl; 3 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 10% Glyzerin bzw. für 500 ml aus folgenden Vorratslösungen: 5 ml von 1 M TrisCl PH 8,0; 16,88 ml von 4 M NaCl; 1,5 ml von 1 M KCl; 0,5 ml von 1 M MgCl₂; 50 ml Glyzerin.

- 1) Der Rotor der Ultrazentrifuge (UZ) wurde über Nacht bei 4 °C vorgekühlt.
- Die CsCl-Lösungen wurden in einem Ultranzentrifugationsröhrchen (Fa. Beckmann, 14x89mm) mittels einer Lumbarpunktionsnadel und Spritze nacheinander unterschichtet: 2,5 ml CsCl (a), 2,5 ml CsCl (b) und zuletzt 2,0 ml CsCl (c).
- 4) Das zuvor aufgetaute Adenovirus-infizierte HEK-293 Lysat (aus der Präparation von 10 T300 Flaschen) wurde langsam überschichtet. Maximal 2,5 ml Viruslösung pro Röhrchen wurden überschichtet. Limitierend war hierbei die Höhe des Röhrchens. Gegenüberliegende Röhrchen wurden mittels Medium und einer Feinwaage austariert. Für eine Viruspräparation wurden immer zwei Röhrchen benötigt. (Hinweis: Niemals leere Röhrchen in eine Ultrazentrifuge stellen.)
- Die Zentrifugation erfolgte f
 ür 2 h bei 30.000 rpm und 4 °C in einer UZ der Fa. Beckmann mit einem SW41-Rotor.
- 5) Die dünne(n) Bande(n) (defekte Viruspartikel/Hüllenbande) oberhalb der dicken Virusbande wurden mit einer 5 ml Pipette langsam abgenommen, wobei die Pipettenspitze stets am Meniskus blieb.
- 6) Die Virusbande wurde mit einer 1 ml Spritze, die eine 27 gauche Nadel hatte, abgenommen. Hierbei wurde für einen schwarzen Hintergrund gesorgt, weil so die Bande besser zu erkennen war. Es wurde versucht, die Virusbande in einem minimalen Volumen abzunehmen, das bei 1-2 ml lag. Diese Bande wurde in ein neues UZ-Röhrchen überführt. Jeweils 2 Banden desselben Virus wurden an dieser Stelle in einem Röhrchen vereint.
- 7) Das neue Röhrchen wurde mit CsCl (b) bis 0,5 cm unter den Rand gefüllt (ca. 8 ml). Anschließend erfolgte die Zentrifugation wie zuvor, aber diesmal für 20 h.

- 8) Für jedes UZ-Röhrchen des Vortages wurde eine NAP25 Säule (Fa. Pharmacia, Bestellnummer 17-0852-02) vorbereitet: Der auf der Säule befindliche Puffer wurde verworfen und die Säule mit 5 x 5 ml Lagerungspuffer äquilibriert.
- Die CsCl-Lösung im UZ-Röhrchen wurde bis ca. 1 cm über der Virusbande vorsichtig abpipettiert. Die Virusbande wurde in einem Volumen von 1-1,5 ml wie zuvor abgenommen.
- 10) Die Virusbande wurde auf die Säule gegeben. Nachdem die Probe eingelaufen war, wurden 1-1,5 ml Lagerungspuffer aufgegeben (Gesamtvolumen in diesem Schritt: 2,5 ml). Das Eluat wurde verworfen.
- Das Virus wurde mit 2 ml in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Lagerungspuffer eluiert, vorsichtig gemischt und zu 20 und 50 µl Aliquots aufgeteilt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

5.1.5 Hirt-Extraktion von viraler DNA

Diese Methode dient der Gewinnung adenoviraler DNA aus infizierten Zellen. Dies ist ein notwendiger Schritt für die Überprüfung der aus einer Transfektion entstandenen Viren.

- Zellen ernten: Etwa 48 Stunden nach Infektion der Zellen, wenn sich ca. die Hälfte der Zellen vom Boden gelöst hatte, wurden die Zellen einer T25 mit Medium in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt.
- 2) Zellen waschen: Nach 15 min Zentrifugation bei 1500 rpm (max. 400x g) wurde das Pellet in 3,5 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation, wobei das Pellet danach in 50 µl PBS resuspendiert wurde.
- 3) Zellen lysieren: 400 μl Hirt-lyse-Puffer (0,6% SDS, 10 mM EDTA) wurden zum gelösten Pellet gegeben und durch Schütteln gemischt. Anschließend wurden 5 μl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben, vorsichtig durch Invertieren gemischt und dann für 2 h bei 55 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert.
- 4) Ausfällen der genomischen DNA: 100 μl 5 M NaCl wurden hinzugegeben, gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 45 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge.
- 5) Phenol/CHCl₃-Extraktion: Der Überstand wurde nacheinander mit 400 μl Phenol, 350 μl Phenol/CHCl₃ (1:1) und 300 μl CHCl₃/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert.
- 6) Ausfällen der DNA/RNA: Unter Hinzugabe von 1/10 Volumen 3M NaOAc-Lösung und 2,5 Volumina EtOH fand eine Fällung statt. Es folgten eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min und ein Waschschritt mit 70%igem EtOH.
- 7) RNAse-Verdau: Das Pellet wurde in 100 µl RNAse (1 g/l RNAse in TE) für 15 min bei 37 °C inkubiert.
- 8) Das Pellet wurde wie zuvor gefällt und gewaschen und dann in 40 µl TE gelöst.

5.1.6 Titration von Adenoviren

Die Titerbestimmung (Konzentrationsbestimmung) der Viren erfolgte durch Infektion von 293- oder 911-Zellen mit seriellen Virusverdünnungen.

Endpunkttitration

Bei dieser Methode werden Zellen auf einer 96-Lochplatte mit seriellen Verdünnungen infiziert und man überprüft bis zu welcher Verdünnung noch ein CPE sichtbar ist. Die Methode wird auch als Bestimmung der TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) bezeichnet. Als Medium für die Zellen und für die Virusverdünnung wurde ausschließlich DMEM Glutamax (2%FBS) verwendet.

- Einsäen der Zellen: 10⁴ 911- bzw. 293-Zellen wurden in jedem Loch einer 96-Lochplatte in 100 μl vorgelegt. Die Zellen wurden 24 h vor Infektion eingesät.
- 2) Virusverdünnung: Ein 10 µl Virusaliquot wurde zu 990 µl Medium gegeben. Von dort aus wurde 4x verdünnt indem 100 µl der Verdünnung zu 900 µl Medium gegeben wurden bis eine Verdünnung von 10⁻⁶ erreicht war. Gemischt wurde mit der Pipette. Auf einer zweiten 96-Lochplatte erfolgte die weitere Verdünnung des Virus. In jedem Loch wurden 270 µl Medium (2% FBS) vorgelegt. Jeweils 30 µl der der 10⁻⁶-Verdünnung kamen in die ersten 10 Löcher der untersten Reihe der Platte (2 Löcher rechts am Rand blieben ohne Virus). Dann wurden mit einer 12-Kanalpipette 30 µl der untersten Reihe in die nächste pipettiert, gemischt (durch 6-8x auf und ab pipettieren), neue Spitzen aufgesetzt und der Vorgang bis zu obersten Reihe wiederholt. Dort lag dann eine Verdünnung von 10⁻¹⁴ vor.
- Umsetzen der verdünnten Viren: Jeweils 100 µl wurden von der Virusverdünnungsplatte auf die Zellkulturplatte pipettiert, beginnend mit der höchsten Verdünnung (also von oben).
- 4) Die Platte wurde für 14 Tage bei 37 °C inkubiert. Dann wurden alle Löcher überprüft, ob sich in ihnen ein CPE zeigte. Jedes Loch in dem sich auch nur ein geringfügiger CPE zeigte, wurde als viruspositiv gezählt. Vorraussetzung für einen funktionierenden Test war, daß die unterste Reihe komplett positiv und die oberste komplett negativ ist. In den zwei Kontrollspalten am rechten Rand durfte kein CPE zu sehen sein.
- 5) Berechnung: Sie beruht auf der KÄRBER Statistik-Methode und wurde der Gebrauchsanweisung für das AdEasy-System (Fa. Qbiogene) entnommen.
 Die Formel ist: T = 10^{1+d(S-0,5)}
 - d = Log 10 der Verdünnung (=1 für eine zehnfache Verdünnung)
 - S = Summe der Verdünnungsschritte (beginnend bei der ersten Verdünnung)

Bei dem hier angewandten Verdünnungsschema kommt man auf folgende vereinfachte Formel: $T = 10^{0.5+S}$

Waren beispielsweise die untersten beiden Reihen komplett positiv und die dritte zur Hälfte, so ergab sich:

 $T = 10^{0.5+(1+1+1+1+1+1+1+1+0,5)} = 1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}/100 \text{ }\mu\text{I} = 1 \times 10^{10} \text{ TCID}_{50}/\text{mI}$

Die von Qbiogene ermittelten Erfahrungswerte für die Umrechnung von $TCID_{50}$ in PFUs ("plaque forming units") haben eine Differenz von 0,7 Log (Faktor 5) ergeben, um den der $TCID_{50}$ höher liegt. Für das obige Beispiel hieße das:

 $1 \times 10^{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml} = 1 \times 10^{10-0.7} \text{ pfu/ml} = 2 \times 10^{9} \text{ pfu/ml}$

Die Schwankungsbreite zwischen zwei für denselben Virus ermittelten $TCID_{50}$ wird mit kleiner oder gleich 0,7 Log angegeben. Dies entspricht einer Schwankung des Titrationsergebnisses um den Faktor 5.

Die traditionelle Titrationsmethode ist der Plaque-Assay bei dem die Virus Plaques in einem Zellrasen ausgezählt werden. Diese Methode ist stark schwankungsbehaftet und führt in unterschiedlichen Laboren zu bisweilen stark abweichenden Ergebnissen. Dennoch ist dies immer noch die am häufigsten verwendete und publizierte Methode. Da die Schwankungsbreite eines Plaque-Titers sehr stark vom Experimentator abhängt (vergleiche Spot-Assay), kann es passieren, daß die beiden Titermethoden zu identischen oder auch stark abweichenden Ergebnissen kommen, wenn man nur wenige Bestimmungen durchführt.

Die Angabe der Titer erfolgte unabhängig vom Verfahren in infektiösen Einheiten pro ml (i.u./ml)

<u>Spot-Assay</u>

Das hier beschriebene Verfahren sollte Ergebnisse liefern, die einem traditionellen Plaque-Assay entsprechen, aber geringeren Schwankungen unterworfen sind. Die Schwankungsbreite beim Plaque-Assay ist vor allem darauf zurückzuführen, daß die Plaques sehr unterschiedlich in Größe und Form sind und daher oft unterschiedlich interpretierbar sind (Bewig 2000). Der Spot-Assay beruht darauf, daß mit Adenovirus infizierte Zellen 48 h nach Infektion für das virale Hexonprotein positiv färben. Bei Verwendung mehrerer Verdünnungen läßt sich ein Bereich finden, wo die getroffenen Zellen auszählbar sind. Unter dem Mikroskop-Geometrie und den positiven Zellen ließ sich der Titer berechnen. Das Verfahren wurde mit dem Adeno-X[™] Rapid Titer Kit (Fa. Clontech, Katalog-Nr. K1653-1) exakt nach Herstelleranweisung durchgeführt.

5.1.7 Infektion in vitro mit Adenoviren

Um die adenovirale Genexpression zu überprüfen und zu quantifizieren, wurden Zellen *in vitro* infiziert. Dabei wurde immer die Zellinie MH-7777A verwendet, die auch beim Setzen der Tumore in den Ratten Anwendung fand. Infiziert wurde mit einer MOI von 10. Analysiert wurden IL12 und IL2 aus dem Zellkulturüberstand bzw. 41BBL per Durchflußzytometrie nach Zellernte. Es wurden immer drei T25 Zellkulturflaschen mit einem Vektor parallel infiziert. Die Schritte im einzelnen:

- Mehrere T25 Flaschen wurden mit jeweils 1-1,5 x 10⁶ Zellen eingesät und für 16-24 h bei 37 °C inkubiert.
- 2) Die Zellen auf einer T25 wurden ausgezählt und die Virusverdünnung für eine Infektion mit MOI 10 berechnet. Diese T25 wurde dann verworfen.
- 3) Das Medium auf der T25 wurde abgesaugt und die Zellen mit dem Virus in einem Volumen von 600 µl infiziert. Für die Infektion wurden die Zellen 1,5 h bei 37 °C inkubiert, wobei die T25 alle 30 min geschwenkt wurde, um eine gleichmäßige Infektion zu gewährleisten und ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden.
- 4) 4,4 ml Medium wurden hinzugegeben. Die Zellen wurden f
 ür 1-5 Tage inkubiert. F
 ür die Interleukinbestimmungen wurden t
 äglich 100-200 μl Zellkultur
 überstand entnommen, zu 20 μl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. F
 ür die durchflu
 ßzytometrische Analyse von 4-1BBL wurden die Zellen nach einem oder zwei Tagen geerntet.

5.1.8 Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Adenoviren

Adenoviren sind potentiell humanpathogene Viren. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren waren zwar nicht replikationskompetent, wegen des Risikos der Entstehung replikationskompetenter Adenoviren während der Aufzucht mußten aber alle Arbeiten unter S2-Bedingungen (Sicherheitsstufe 2) durchgeführt werden. Sicherheitsmaßnahmen für den Umgang mit Adenoviren, die über das sonstige Maß im Labor hinausgehen, waren:

- Verwendung gestopfter Pipettenspitzen
- Alle Arbeiten mit offenem Virus erfolgten unter einer S2-Sicherheitswerkbank.
- Alle Materialien und Flüssigkeiten, die direktem Kontakt mit Adenoviren ausgesetzt waren, wurden anschließend autoklaviert.

5.2 Analyse der Vektor-Transgenexpression

5.2.1 ELISA für IL12, IL2 und IFNy

Alle ELISA wurden mit OptEIA[™] Sets der Fa. BD Pharmingen nach Herstellerangaben durchgeführt (www.bdbiosciences.com/pharmingen). Folgende Sets kamen zum Einsatz:

IL12: Mouse IL-12 (p70) ELISA Set #555256; Meßbereich: 62,5-4000 pg/ml

IL2: Mouse IL-2 ELISA Set #555148; Meßbereich: 3,1-200 pg/ml

IFNγ: Rat IFN-γ ELISA Set #558861; Meßbereich:: 31,3 - 2000 pg/ml

Die vom Hersteller angegebene Untergrenze des Meßbereiches war nur selten erreichbar, da sie sich vom Hintergrund oft nur geringfügig absetzte. IL12 und IL2 wurden aus Zellkulturüberstand bestimmt. IL12 und IFNγ wurden aus den Seren der Ratten bestimmt. IFNγ stellt hierbei kein Transgen des Vektors dar. Es wird als Reaktion auf das vom Vektor eingebrachte IL12 vom Organismus selbst produziert.

Der Ablauf des ELISA soll hier beispielhaft für IL12 geschildert werden, ist prinzipiell aber für alle Sets identisch. Unterschiede zu den anderen Sets ergeben sich nur in den verwendeten Antikörpern, ihren Verdünnungen und zum Teil in den Puffern. Allerdings sind die Verdünnungen auch chargen-spezifisch, so daß eine genaue Überprüfung der Herstellerangaben bei jedem neu bestellten Set erforderlich ist.

Jede Messung wurde i. d. R. als Dreifachansatz (Triplikat) durchgeführt.

IL12-ELISA (Ansatz für 2 Platten)

- Beschichtungspuffer: 0,2 M Natriumphosphat, PH 6,5 (0,59 g Na₂HPO₄, 0,805 g NaH₂PO₄, mit H₂O auf 40 ml aufgefüllt, pH auf 6,5 eingestellt, auf 50 ml aufgefüllt, sicherheitshalber steril filtriert und bis zu 7 Tagen bei 4 °C gelagert.
- 2) 88 μl "capture antibody" wurden mit 22 ml Beschichtungspuffer gemischt, jeweils 100 μl in jedes Loch der 96-Lochplatte gefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei den Platten handelte es sich um 96-well Maxisorb P/N, Katalog-Nr. 442404 der Fa. Nunc.
- 3) Waschpuffer: PBS 0,05% Tween 20 (700 ml PBS + 350 µl Tween 20).
 Verdünnungspuffer: PBS 10% FBS (135 ml PBS + 15 ml FBS),
 Beide Puffer sind bei 4 °C für 3 Tage haltbar.
- 3) Die Platten wurden 3x mit 200 µl/Loch Waschpuffer gewaschen und dann für eine Stunde bei RT mit 200 µl/Loch Verdünnungspuffer unter sehr leichtem und langsamen Schütteln inkubiert. Die Platten wurden mit Parafilm abgedeckt. Währenddessen wurden die Probenverdünnungen und der Standard vorbereitet.
- 4) Die Platten wurden wie zuvor gewaschen und dann wurden 100 µl/Loch Standard bzw. Probe aufgetragen. Dabei erfolgte von jeder Probe immer eine Dreifachbestimmung. Es folgte eine zweistündige Inkubation unter denselben Bedingungen wie zuvor.
- 5) Die Platten wurden 5x mit 200 µl/Loch Waschpuffer gewaschen.
- 6) 100 µl "working detector" (24 ml Verdünnungspuffer + 96 µl Detektionsantikörper + 96 µl Avidin-horseradish Peroxidase Konjugat (war innerhalb von 15 min vor Benutzung herzustellen)) wurden zu jedem Loch gegeben und für 1 h bei RT wie zuvor inkubiert.
- 7) Die Platten wurden 7x mit 200 µl/Loch Waschpuffer gewaschen, wobei der Puffer jedesmal f
 ür 30-60s auf der Platte verblieb.

- 8) 100 μl/Loch der Substratlösung (Tetramethylbenzidin + H₂O₂, Mischung der Fa. Pharmingen, Katalog-Nr. 555214) wurden auf die Platten gegeben, gefolgt von 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln.
- 9) 50 μ l/Loch 1 M H₂SO₄ (13,2 ml 37%ige H₂SO₄ + 36,8 ml H₂O) wurden hinzugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen.

5.2.2 Durchflußzytometrische Analyse für 4-1BBL

4-1BBL ist ein Transmembranprotein und wurde deshalb durchflußzytometrisch bestimmt. Es erfolgte keine Quantifizierung der 4-1BBL Expression, sondern nur eine Aussage über die Zahl der 4-1BBL positiven Zellen.

Kontrollen erfolgten stets durch Markierung ohne primären Antikörper.

- Wie unter 5.1.7 beschrieben erfolgte zunächst die Infektion mit den verschiedenen Vektoren (Ad1/2/3). Das Medium wurde abpipettiert und die Zellen in der T25-Flasche mit 2-3 ml PBS gewaschen.
- 2) Die Zellen wurden mit 1 ml Zellablösungspuffer ohne Trypsin, (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 13151-014) von der Plastikflasche gelöst.
- 3) Die Zellen einer nicht infizierten T25 wurden gezählt, um einen Anhaltspunkt für die Zellzahl zu erhalten.
- 4) Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 4 min bei 400x g und 4 °C zentrifugiert und dann in 440 µl PBS/4%FBS aufgenommen.
- 5) Der primäre monoklonale Antikörper TKS-1 (rat IgG2a, 1 g/l) war ein Geschenk von Prof. Hideo Yagita (Akiba 2000). Kommerziell ist er erhältlich von der Fa. Pharmingen, Katalog-Nr. 550532. Er wurde mit 1 μg / 1 x 10⁶ Zellen eingesetzt. Für die Versuche wurden 5 μl einer 1:10 Verdünnung von TKS-1 mit 0,5 x 10⁶ Zellen (ca. 100 μl) für 30 min bei 4 °C inkubiert.
- 6) Die Zellen wurden 4 min bei 400x g zentrifugiert, dann 2x mit 850 μl PBS/4%FBS gewaschen und in 100 μl aufgenommen.
- 7) Der sekundäre Antikörper wurde von der Fa. Pharmingen erhalten (Katalog-Nr. 550767, R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated goat anti-rat Ig specific polyclonal antibody (multiple adsorption); 0,2 g/l). Er wurde ebenfalls mit 1 μg / 1 x 10⁶ Zellen eingesetzt. 2,5 μl des unverdünnten sekundären Antikörpers wurden zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert (der sekundäre Antikörper ist lichtempfindlich).
- Nach erneuter Zentrifugation wie zuvor wurde das Pellet in 400 μl PBS/2% Paraformaldehyd aufgenommen und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.
- 9) Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte an Durchflußzytometern der Fa. BD Biosciences (Heidelberg).

5.3 Analyse von Lymphozyten

Nach Behandlung der Tumore mit den Vektoren wurden die Lymphozytenpopulationen in der Milz und im Tumorinfiltrat untersucht.

5.3.1 Lymphozyten aus der Milz

Isolierung der Milzzellen aus der Ratte

- 1) Die komplette Milz wurde der zuvor perfundierten und getöteten Ratten entnommen und mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten.
- Mit dem Kolben einer 10 ml Spritze wurde die Milz durch ein engmaschiges Metallsieb in eine mit PBS gefüllte Petrischale gepreßt.
- Zur weiteren Abtrennung grober Gewebeteile wurde die Milzzell/PBS-Mischung durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (Fa. BD Falcon) pipettiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zellen im PBS auf Eis gehalten.
- 4) Die Mizzellen wurden 10 min bei 200x g zentrifugiert und der klare Überstand verworfen.
- 5) Zur Abtrennung der Erythrozyten wurden die Zellen in 15 ml ACK-Puffer resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Für 500 ml ACK-Puffer: 4,012 g NH₄Cl, 0,692 g K₂CO₃ (M(K₂CO₃)=138,21 g/mol), 100 μl 0,5 M EDTA, H₂O ad 400 ml, pH auf 7,2 – 7,4 mit 1 N HCl eingestellt, H₂O ad 500 ml, durch 0,2 μm Filter sterilisiert.
- 20 ml eiskaltes PBS wurden hinzugegeben und 10 min bei 200x g und 4 °C zentrifugiert.
- 7) Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem Medium A gelöst. Medium A (Ansatz für 200 ml): 175 ml RPMI-1640 mit Gln und HEPES (Fa. Invitrogen Katalog-Nr. 22400), 2 ml 1 mM Na-Pyruvat, 2 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren (Fa. Invitrogen Katalog-Nr. 11140-035), 0,7 μl β-Mercaptoethanol, 20 ml 10% FBS, 1 ml Pennici-lin/Streptomycin (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 15140-122).
- Die Zellen wurden erneut bei 200x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend in 3 ml Medium A aufgenommen.
- 9) Die Zellen wurden im Durchflußzytometer gezählt. Diese Zählung ist nicht exakt, liefert aber zumindest die Größenordnung der Zellzahl und macht die Zellzahlen in den Ansätzen für die verschiedenen Tiere vergleichbar. Für die Zählung wurde ein Aliquot der Milzzellen mit PBS verdünnt. Das Durchflußzytometer hat eine Durchflußrate von ca. 60 µl/min. Gemessen wurde für 30 s.
- 10) Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1 x 10⁷ Zellen/ml mit Medium A eingestellt.

Antikörperfärbung

- Die Milzzellen wurden auf CD3-, CD8-, CD4- und NK-Zellen gefärbt. Eine eindeutige Zuordnung einer Zellpopulation erfolgte, wenn zwei Marker positiv waren. Für CD4-Zellen CD3 und CD4 positiv, für CD8-Zellen CD3 und CD8 positiv, für NKT-Zellen CD3 und NK positiv.
 - CD3: APC-conjugatet mouse anti-rat CD3 monoclonal antibody, Fa. BD Pharmingen, Katalog-Nr. 557030, c=0,2 g/l
 - CD4: R-PE-conjugatet mouse anti-rat CD4 monoclonal antibody, Fa. BD Pharmingen, Katalog-Nr. 551397, c=0,2 g/l
 - CD8: PerCP-conjugatet mouse anti-rat CD8a monoclonal antibody, Fa. BD Pharmingen, Katalog-Nr. 558824, c=0,2 g/l
 - NK: FITC-conjugatet mouse anti-rat CD161a (NKR-P1A) monoclonal antibody, Fa. BD Pharmingen, Katalog-Nr. 555008, c=0,5 g/l
 - 100 μI Milzzellen wurden mit einem Mix aus je 0,5 μI CD3/CD4/CD8, 0,2 μI NK und 8,3 μI PBS Antikörper gefärbt.
- 2) Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen 5 min bei 400x g zentrifugiert, in 500 μ l PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert.
- 3) Die Zellen wurden in 400 µl PBS/2% Paraformaldehyd gelöst (fixiert) und bis zur durchflußzytometrischen Analyse bei 4 °C gelagert. In dieser Lösung können die Zellen auch nach mehreren Tagen Lagerung noch problemlos analysiert werden.
- 4) Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte an Durchflußzytometern der Fa. BD Biosciences (Heidelberg).

5.3.2 Lymphozyten im Tumorinfiltrat

Das Tumorinfiltrat wurde immunhistochemisch untersucht.

Alle Antikörper wurden von der Fa. BD Pharmingen bezogen. CD4 Kat.-Nr.: 550297, CD8 Kat.-Nr. 550298, NKR-P1A (CD161) Kat.-Nr. 550306

Entwicklungslösung: 45 ml PB 0,1 M, pH 7,4 22,5 mg Diaminobenzidin 18 mg Ammoniumchlorid 900 µl Nickelsulfat (1,3 g/100 ml Vorratslösung) 900 µl 1% Glukose 150 µl Glukoseoxidase (1,2 g/l Vorratslösung)

Gewebe und Kryo-Schnitte

Die Gewebe wurden den Tieren nach Perfusion mit PBS und Tötung entnommen, in Tissue-Tek (Fa. Sakura, Katalog-Nr. 4583) eingebettet und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zum Anfertigen der Schnitte wurden die Kryoblöcke bei –80 °C gelagert und vor dem Schneiden für mindestens eine Stunde bei –20 °C vorgewärmt. Kryoschnitte von 5 μ m Dicke wurden auf beschichteten Objektträgern aufgezogen und bei –20 °C gelagert.

Immunhistochemische Färbung

Die Kryoschnitte wurden für 30 min bei RT in 4% PFA/PBS fixiert, 30 min mit 2% Kaninchen-Normalserum/PBS geblockt. Alle primären Antikörper wurden in 1:50 Verdünnungen in 2% Kaninchen- und 2% Mausnormalserum in PBS eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in PBS dreimal für je 10 min gewaschen und dann mit Anti-Maus IgG-Biotin (Kaninchen) 1:250 in PBS verdünnt für 60 min inkubiert. Dann wurden die Präparate zweimal für je 10 min in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit Maus-Peroxidase Antiperoxidase, 1:100 verdünnt in PBS, für 30 min. Dann wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nach 30 min Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex erfolgte ein Waschschritt mit PBS für 10 min. Dann folgte ein Waschschritt mit Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4). Es folgte die Entwicklung der Peroxidas-Aktivität für 10-30 min (unter dem Mikroskop verfolgt) mit der Entwicklungslösung. Dann wurde dreimal für 5 min in PBS gespült und anschlie-Bend mit Kernechtrot für 20 s bei RT gegengefärbt. Dann wurde mit PBS gespült. Nach Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (70, 80, 90, 100%) und zweimaliger Inkubation für 5 min in Histo-Clear (Fa. Roth) erfolgte das Eindeckeln in Entellan (Fa. Merck, Katalog-Nr. 1.07961.0100).

5.4 Zellkultur

Alle Zellen wurden in einem 37 °C Inkubator bei 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung gehalten. Alle Medien wurden, sofern sie nicht kommerziell bezogen wurden, sterilfiltriert oder autoklaviert bevor sie zum Einsatz kamen. Der Inkubator wurde wöchentlich mit 70% EtOH gereinigt. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Reinluftbank.

Standardlösungen:

- Waschpuffer: PBS (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 10010)

- Trypsin: Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin 0,53 mM EDTA•4Na), (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 25300-054)

5.4.1 QBI 293 und 911 Zellen

Standardmedium:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,500 mg/L D-Glucose, mit Natriumpyruvat und mit GlutaMAX (L-Alanyl-L-Glutamin). Fa. Invitrogen (www.lifetech.com), Katalog-Nr. 10569
- 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FBS von Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 16140)
- 0,1 % Pennicilin/Streptomycin (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 15140-122)

Die Zellen wurden alle 3-7 Tage aufgeteilt, wobei das Splitverhältnis bei 293 bis zu 1:20 und bei 911 bis zu 1:10 betrug.

Die QBI293 Zellen wurden von der Fa. Qbiogene (Heidelberg) bezogen. 911 Zellen wurden von der Fa. Introgene (Leiden, Niederlande) bezogen.

5.4.2 MH-7777A

Standardmedium:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X), flüssig, enthält 4,500 mg/L D-Glukose, Pyridoxin HCl und Natriumpyruvat. Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 10313
- 5 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FBS von Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 16140)
- 20% hitzeinaktiviertes Pferdeserum (HS von Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 26050)
- 2 mM L-Glutamin (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 25030-032)
- 0,1 % Pennicilin/Streptomycin (Fa. Invitrogen, Katalog-Nr. 15140-122)
- für 500 ml: 370 ml DMEM, 100 ml HS, 25 ml FBS, 5 ml Gln und 0,5 ml P/S.

Die Zellen wurden alle 1-3 Tage mit einem Splitverhältnis von 1:2 bis 1:6 passagiert. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen nicht konfluent wachsen, da das zur Ablösung der Zellen führt. Bei höheren Passagen (>30), bei denen die Zellen mehrfach Konfluenz erreicht hatten, lösten die Zellen sich erst einige Tagen nach Erreichen der Konfluenz ab.

Die Zellen wurden von der "Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" (Braunschweig, www.dsmz.de) bezogen.

5.4.3 Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und für 5 min bei 400x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium aufgenommen, aliquotiert und in einer geschlossenen Styroporbox bei -80 °C gelagert. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort dauerhaft gelagert.

Einfriermedium 293 und 911:

Standardmedium mit 45% FBS und 10% DMSO (für 50 ml: 27,5 ml Standardmedium, 17,5 ml FBS, 5 ml DMSO). Alternativ wurde hier auch das Standardmedium nur mit 10% DMSO versetzt und dann als Einfriermedium verwendet.

Einfriermedium MH-7777A: Standardmedium mit 10% DMSO.

5.5 Molekularbiologische Techniken

5.5.1 Präparation von Plasmid-DNA (durch alkalische Lyse)

Benötigte Pu	ıffer:
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton (Fa. Difco)
	0,5 % (w/v) Bacto Hefe-Extrakt (Fa. Difco)
	0,5 % (w/v) NaCl
	pH 7,5
S1-Puffer	50 mM Tris-HCl
	10 mM EDTA
	100 µg Rnase A
	(pH 8,0)
S2-Puffer	200 mM NaOH
	1 % SDS
S3-Puffer	2,8 M KOAc (pH 5,1)
S1, S2, S3: I	Fa. Macherey-Nagel aus NucleoBond Kit.
TE-Puffer	10 mM TrisCl pH 7,4
	1 mM EDTA pH 8,0

a) Im kleinen Maßstab:

1) Eine einzelne *E. coli*-Kolonie von einer Agarplatte wurde über Nacht in 2 ml LB-Medium (mit 50 mg/ml Ampicillin) bei 37 °C inkubiert.

2) 1,5 ml davon wurden bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl S1-Puffer vollständig gelöst.

3) 200 µl S2-Puffer wurden hinzugegeben und vorsichtig gemischt (durch mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes).

4) Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl S3-Puffer hinzugegeben und wieder vorsichtig gemischt.

5) Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Mischung wie zuvor zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

6) Die DNA wurde mit 750 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Dann wurde 10 min wie zuvor zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft oder in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

7) Das Pellet wurde in 40 µl TE-Puffer gelöst und 5 µl davon gelelektrophoretisch analysiert, gegebenenfalls wurde zuvor ein Restriktionsverdau durchgeführt.

b) Im großen Maßstab:

Ein mit der unter A beschriebenen Methode vermehrter und analysierter Klon wurde für weitergehende Reaktionen in großem Maßstab hergestellt. Die DNA-Präparationen in großem Maßstab wurden mit dem NucleoBond PC 500 - Kit der Fa. Macherey-Nagel gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Aufreinigung basiert auf einem Anionenaustauscher-Silikat. Die erhaltene Plasmidmenge wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm quantifiziert (c [µg/ml] = OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x F; F=50 für dsDNA).

5.5.2 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau stellt für jede Klonierung eine essentielle Technik dar. Mit seiner Hilfe gewinnt man das gewünschte DNA-Stück aus einem größeren Plasmid. Darüberhinaus wurde DNA zur Überprüfung der richtigen Zusammensetzung (beispielsweise nach einer Ligation) restriktionsanalytisch verdaut. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NEB (New England Biolabs), Roche und MBI-Fermentas verwendet.

Ein typischer Restriktionsansatz für ein Volumen von 50 µl:

5-10 µg DNA

50 Units (5 µI) Restriktionsenzym

5 µl 10x Restriktionsenzympuffer

 H_2O ad 50 μ l.

Der Verdau erfolgte für 1-3 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) und wurde dann gelelektrophoretisch analysiert.

5.5.3 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zu Amplifikation von 4-1BBL und IL2 eingesetzt. Ein typischer PCR-Ansatz sah folgendermaßen aus:

Gesamtvolumen 40 µl

10-100 ng DNA (PCR-Templat)

3 µl 2 mM dNTPs

5 µl 5'-Primer (10 pmol/µl Ausgangslösung)

5 µl 3'-Primer (10 pmol/µl Ausgangslösung)

4 µl 10x PCR-Puffer

1 µl Polymerase (z. B. Pfu, 1µl=2,5 U)

 H_2O ad 40 μ l

Dieser Ansatz kam dann in die PCR-Maschine. Dort waren typische Zyklen: 2 min 96 °C, 25x (40 s 94 °C, 40 s 55 °C, 60 s 72 °C), 8 min 72 °C, gefolgt von der Abkühlung auf 4 °C. Das PCR-Produkt wurde anschließend einer Gelektrophorese unterzogen und aufgereinigt. Die PCRs wurden im "GeneAmp 9700 thermal cycler" der Fa. Perkin-Elmer durchgeführt.

5.5.4 DNA-modifizierende Enzyme

Alle Enzyme wurden von der Fa. NEB oder MBI Fermentas bezogen.

a) Erzeugung stumpfer DNA-Enden

Sind nach einem Restriktionsverdau 5' oder 3' überlappende Enden entstanden, die mit einem DNA-Fragment ligiert werden sollen, das keine kompatiblen Enden hat, so werden die überstehenden Enden entweder mit Klenow aufgefüllt (funktioniert nur in 5' \rightarrow 3' Richtung) oder mit T4 DNA-Polymerase aufgefüllt bzw. abgeschnitten.

1) Klenow-Polymerase (DNA Polymerase I, großes (Klenow) Fragment)

Mit diesem Enzym läßt sich ein 3'-Überhang auffüllen. Eine Einheit Klenow pro μ g DNA und dNTPs für eine Endkonzentration von 33 μ M (jedes dNTP) wurden nach einem Restriktionsverdau diesem hinzugefügt. Dann folgte eine Inkubation über 15 min bei 37 °C. Anschließend wurde Klenow durch 20 min bei 75 °C hitzeinaktiviert oder durch eine Gelaufreinigung abgetrennt.

2) T4 DNA-Polymerase

Dieses Enzym diente der Entfernung eines 3'-Überhangs oder dem Auffüllen eines 5'-Überhangs. Eine Einheit T4 DNA-Polymerase pro μ g DNA und dNTPs für eine Endkonzentration von 100 μ M (jedes dNTP) wurden nach einem Restriktionsverdau diesem hinzugefügt. Dann folgte eine Inkubation über 20 min bei 12 °C. Anschließend wurde Klenow durch 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert oder durch eine Gelaufreinigung abgetrennt.

b) Dephosphorylierung, CIP

Die "Calf Intestinal Alkaline Phosphatase" (CIP) katalysiert die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe bei DNA (und RNA). Dadurch wird die Selbstligation von Vektoren mit kompatiblen Enden effizient vermindert. Es wurden 0,5 Einheiten CIP pro µg Vektor-DNA im von der Fa. NEB empfohlenen oder im Restriktionspuffer eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h oder länger bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die CIP durch Gelaufreinigung abgetrennt.

c) Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4 DNA-Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiester Bindung zwischen benachbartem 5'-Phosphatrest und der 3'-Hydroxylgruppe in doppelsträngiger DNA (oder RNA). Für die Ligationsreaktion wurde 1 µl Ligase (=400 Einheiten) zusammen mit den DNA-Fragmente in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 16 °C inkubiert. Als Reaktionspuffer wurde der mitgelieferte Puffer der Fa. NEB oder ein mit 1 mM ATP supplementierter Restriktionsenzympuffer verwendet. Bei Ligationen, die auf diesem Weg nicht funktionierten, wurde das DNA Ligation Kit, Version 1 der Fa. Takara (Katalog-Nr. 6021) exakt nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.5.5 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden mit dem "BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" der Fa. ABI Prism durchgeführt. Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der von Sanger entwickelten Kettenabbruchmethode (Sanger 1977). Eine DNA-Vorlage wird von einem Oligonukleotid-Primer ausgehend durch eine Polymerase repliziert. Neben den Deoxynukleotiden sind auch kleine Mengen von Dideoxynukleotiden im Reaktionsmix enthalten. Letztere führen beim Einbau zum Kettenabbruch. Somit entsteht ein Gemisch von Nukleinsäureketten, die alle mit dem gleichen Primer beginnen, aber an verschiedenen und statistisch auch an jeder Stelle(n) abbrechen. Jedes der vier Di-deoxynukleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ist an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Das ermöglicht die farbliche Zuordnung der Nukleinsäurekette zu dem entsprechenden zuletzt eingebauten Nukleotid. Die Position dieses Di-deoxynukleotids wird an Hand der Länge der Nukleinsäurekette nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel bestimmt.

Der "Terminator Ready Reaction Mix" enthielt die fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotide, die AmpliTaq DNA-Polymerase (FS), MgCl₂ und den Reaktionspuffer.

1) Ein typischer Sequenzieransatz sah folgendermaßen aus:

16 µl Terminator Ready Reaction Mix

0,5-1 µg DNA (Sequenzier-Templat)

5-10 pmol sequenzspezifischer Primer

 H_2O ad 40 μ l.

Die häufig verwendete Halbierung dieses Sequenzieransatzes führte insbesondere bei größeren Plasmiden (>5 kb) zu unbefriedigenden Ergebnissen und wurde daher nicht verwendet. Der Reaktionsmix wurde auf einer Perkin-Elmer 9700 PCR-Maschine folgenden Zyklen unterworfen: 5 min 95 °C, 30x (30 s 95 °C, 10 s 50 °C, 4 min 60 °C), Abkühlung auf 4 °C.

- 2) Anschließend wurde der Reaktionsmix in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 20 μl H₂O und 90 μl Isopropanol hinzugegeben (finale Isopropanolkonzentration: 60% +/- 5%), kurz auf den Vortexer gegeben und 15 min bei RT inkubiert.
- 3) Dann wurde 20 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschritt mit 250 µl 75% EtOH. Gewaschen wurde durch kurzes Vortexen gefolgt von 5 min Zentrifugation wie zuvor.
- 4) Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 1 min bei 90 °C getrocknet und bei 4 °C oder -20 °C gelagert.
- 5) Vor der Sequenzierung wurde das getrocknete Pellet im Auftragspuffer ("Template Suppression reagent" der Fa. ABI Prism) durch Vortexen gelöst, kurz anzentrifugiert, für 2 min auf 95 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Nach Abkühlen der Probe wurde diese erneut gevortext, zentrifugiert und bis zur Auftragung auf Eis gelagert.
- Es folgte die Sequenzierung in verschiedenen ABI-Squenziergeräten (ABI Prism 377 Sequencer oder 310 DNA Genetic Analyzer). Die Leseweite betrug beim 377er Modell 500-700 Nukleotide und beim 310er ca. 400 Nukleotide.

5.5.6 Gelelektrophorese von DNA

Benötigte Medien:

10x DNA-Auftragspuffer	50 % Glyzerin
	50 mM Tris HCI (pH 8,0)
	50 mM EDTA
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol
50x TAE	242 g Tris-Base
	57,1 ml Essigsäure
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	H ₂ O ad 1 I

Um die Größe (in kb) der DNA-Proben (Plasmide, PCR-Produkte) abschätzen zu können, wurde die DNA mit 10x DNA-Auftragspuffer im Verhältnis 10:1 vermischt und in einem 0,8-2 %igem Agarose-Gel (Seakem GTG, Fa. BioRad; für DNA-Fragmente größer als 400 bp) oder 2-3,5 %igem Nue-Sieve Agarose-Gel (Fa. Biozym; für DNA-Fragmente kleiner als 400 bp) aufgetrennt. Für die gelelektrophoretische Aufreinigung von DNA-Fragmenten hat sich die Nue-Sieve Agarose bewährt, da sie sich bei anschließend anstehender Gelextraktion leichter auflösen läßt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1x TAE-Puffer verwendet, die angelegte Span-

nung betrug ca. 10 V/cm. Zur Sichtbarmachung der DNA-Moleküle wurde dem Gel Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, enthielt der Auftragspuffer Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbmarker. Ersterer wandert abhängig von der Agarosekonzentration mit DNA-Fragmenten von 10-100 bp und markiert dadurch die Lauffront, während Xylencyanol mit Fragmenten von ca. 5 kb Länge wandert. Für die Bestimmung der Größe (in kb) der Fragmente kamen vor allem zwei Standards zum Einsatz:

A) "GeneRuler[™] DNA Ladder Mix" der Fa. MBI Fermentas, Fragmente in bp:10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

B) "Lambda *Eco*RI+*Hin*d III Marker, 3" der Fa. MBI Fermentas. Dieser Standard wurde auch zur Mengenabschätzung der aufgetragenen DNA verwendet, weshalb hier in Klammern die Massen (in ng) einiger Banden für 500 ng Standard angegeben sind. Fragmente in bp: 21.226 (255); 5148/4973 (zusammen 104); 4268 (44); 3530; 2027 (21); 1904 (19,6); 1584 (16,3); 1375 (14,2); 947 (9,8); 831; 564 (5,8).

5.5.7 Gelextraktion von Plasmid-DNA

Nach erfolgtem Lauf der DNA durch ein Agarose-Gel (TAE-Puffer), wurde die DNA mit zwei unterschiedlichen Methoden aus dem Gel isoliert. Die Gelextraktion bis zu einer Fragmentgröße von 10 kb erfolgte durch Bindung der DNA an Glasmilch (Fa. Biozym EasyPure® DNA Purification Kit). Dieses Verfahren hat sich durch einfache, schnelle Anwendung und hohe Ausbeuten bewährt. Es wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für größere Fragmente oder wenn für eine homologe Rekombination DNA besonders hoher Qualität (keine/möglichst wenige Einzelstrangbrüche) benötigt wurde, mußte ein anderer möglichst schonender Weg der Gelextraktion etabliert werden. Hinzukommt, daß für die Elektroporation bei der homologen Rekombination die Plasmide salzfrei vorliegen müssen. Hierfür wurde das die DNA enthaltene Gelstück zunächst mit GELase (β-Agarase der Fa. Biozym) verdaut und dann mittels Centricon-Säulen aufgereinigt:

- Ein möglichst kleines, die DNA enthaltendes Gelstück von 100-200 mg wurde mit einem Skalpell aus dem Gel (1% Agarose, niedrigschmelzend und bei 45 °C flüssig bleibend) geschnitten und mit 50x GELase-Puffer versetzt.
- 2) Das Gel wurde 4 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln inkubiert (bis das Gel vollständig geschmolzen war), gefolgt von mindestens 4 min bei 45 °C. Dann wurde 1 μl GELase (=1U) hinzugegeben, alles durch Pipettieren gemischt und anschließend für mindestens 90 min bei 45 °C inkubiert.

- Dieser Verdau wurde in 2 ml H₂O auf eine Centricon-100 Säule gegeben (Fa. Millipore, Centricon YM-100) und 30 min bei 1000g zentrifugiert. Es folgten 2 Waschschritte mit je 2 ml H₂O.
- 4) Eluation des Restvolumens von 30-40 µl, in der sich die aufgereinigte DNA befand.

5.5.8 Transformation (Hitzeschock)

Um Plasmid-DNA in *E. coli* hinein zu bekommen, kann man sich nicht nur der unter 5.1.4 beschriebenen Methode der Elektrotransformation bedienen, sondern auch der sogenannten Hitzeschock-Methode (Hanahan 1983). Der Vorteil hierbei ist, daß das Plasmid nicht salzfrei vorliegen muß und der apparative Aufwand geringer ist. Dafür ist die Methode i.d.R. weniger effizient.

Benötigte Medien:

LB-Medium siehe 5.5.1

Agar-Platten LB-Medium

1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Fa. Difco) 100 μg/ml Ampicillin oder 50 μg/ml Kanamycin

- Chemisch kompetent gemachte *E. coli* Bakterien (meist vom Stamm DH5α) wurden kommerziell erworben und von -80 °C langsam auf Eis aufgetaut.
- 2) Zu 50-100 µl dieser Bakterien wurden ca. 10-100 ng Plasmid DNA (häufig ein Ligationsprodukt) gegeben, kurz durch kräftiges Schnippen mit dem Finger gegen das Röhrchen gemischt und dann für 20-30 min auf Eis inkubiert. Das Volumen der DNA-Lösung lag unter 10% des Gesamtvolumens.
- 3) Das Röhrchen wurde dann für 45 s in ein Wasserbad von 42 °C gehalten und anschließend sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 500 ml LB-Medium zugegeben.
- 4) Nach einer Inkubation von 30-60 min bei 37 °C unter heftigem Schütteln wurde die Bakterienlösung auf Agar-Platten, die ein Selektions-Antibiotikum enthielten, ausgestrichen.

5.6 Tierexperimentelle Arbeiten

Bei den Ratten, von der Art *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Wanderratte) und dem Stamm Buffalo (BUF/SimRijHsd) handelt es sich um einen Inzuchtstamm. Die Tiere wurden von der Firma Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, einem kommerziellen, amtlich zugelassenen Züchter bezogen (www.harlan-winkelmann.de oder www.harlan.com). Die Tiere kamen aus der niederländischen Zweigstelle dieses Züchters.

Die Tierversuchsvorhaben Nr. 71/01, Gz. G21132/591-00.33, vom 14.11.2001 und Nr. 56/02, Gz. G21130/591-00.33, vom 30.10.2002 wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit, Amt für Gesundheits- und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärswesen, Lagerstr. 36, 20357 Hamburg, genehmigt. Tierversuchsleiter war Prof. Dr. Gerrit Krupski (Radiologische Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

5.6.1 Tumor-Inokulation

Männlichen Buffalo Ratten (250 - 350 g) wurden Zellen der HCC-Linie MH-7777A injiziert, um einen hepatischen Tumor in ihnen zu erzeugen. Für die Ad-3 Dosiseskalations- und Ad-1/3 De-Eskalations-Studien wurden 1 x 10^6 Zellen in den rechten Leberlappen (lobus hepatis dexter medialis) injiziert. Für die Langzeit- und Kurzzeitgruppen wurden 1 x 10^6 Zellen in den linken Leberlappen (lobus hepatis sinister lateralis) und 6,5 x 10^5 Zellen in den rechten Leberlappen injiziert. Der Tumor im rechten Leberlappen diente hier als modellhafte intrahepatische Metastase. Abb. 5.2 zeigt den Blick in die Bauchhöhle der Ratte, wie er sich bei der Operation darbot. Die Ratte wurde allerdings nur soweit aufgeschnitten (3-4 cm Längsschnitt), daß die Leber und Teile des Darms sichtbar wurden. Die Abb. 5.2 zeigt einen größeren Ausschnitt. Die operativen Eingriffe (Laparotomie, Injektion von Tumorzellen bzw. Virus in die Leber und das anschließende Verschließen der Bauchhöhle) wurden von Dr. Lars Müller (Abt. Hepatobiliäre Chirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) unter Assistenz des Autors durchgeführt.



Abb. 5.2 Links: Ventrale Ansicht der Bauchhöhle einer Ratte. Rechts: schematische Zeichnung einiger Leberlappen. Tumorzellen wurden in die Leberlappen 2 und 4 injiziert. Die adenoviralen Vektoren wurden einmalig nur in den Tumor im linken Leberlappen (4) injiziert. Verändert nach (Krinke 2000) S. 264 und S. 266.

Der Operationsablauf im Einzelnen:

- 1) Die Ratte wurde in einen Glastopf mit Diethylether gesättigten Atmosphäre gelegt bis sie schliefen. Dann wurden die Haare am Bauch rasiert.
- 2) Die Ratte wurde auf einer Styroporunterlage mit um die Beine gewickeltem Klebeband und Nadeln befestigt. Um ein Aufwachen während der OP zu vermeiden wurde die Ratte mittels eines 50 ml Röhrchens, das Ether getränkte Papiertücher enthielt, weiter begast.
- 3) Nach Laparatomie wurden die Tumorzellen in einem Volumen von 20 µl in die entsprechenden Leberlappen injiziert und die Injektionsnadel für 20-30 s in der Einstichstelle gelassen, um ein Verteilen der Zellen in der Leber zu gewährleisten und den Abbau des Injektionsdruckes abzuwarten. Die Injektion selbst wurde möglichst langsam durchgeführt. Dies sollte vermeiden, daß sich in der Leber ein Druck aufbaut, der zu einem Zurückschießen der Zellen führen kann. Während des Herausziehens der Nadel wurde die Einstichstelle mit einer Histoacrylplombe verschlossen.

Die Tumorzellen wurden unmittelbar bevor sie mit der Spritze aufgezogen wurden mit speziellen, unten abgeschnittenen Pipettenspitzen durchmischt ("cell saver tips" der Fa. Biozym). Für die Injektion wurden Insulinspritzen verwendet (BD, Micro-Fine, 0,3 ml // Bestell-Nr.: Ref 320813; 100 (10x10); Insulin U100; 0,33 x 12,7 mm (29G 1/2"); PZN 4400133; Becton Dickinson; orange Farbe). Diese Spritzen ermöglichten es, auch kleine Volumina von 10-30 µl genau zu applizieren. Als Nahtmaterial wurde Vicryl (Polyglactin 910, Ethicon, Inc., Johnson & Johnson)

verwendet, das resorbierbar ist. Das Histoacryl wurde von der Fa. Aesculap bezogen (Produktnummer A191050052).

- Der Ratte wurde 1 Tropfen Novalminsulfon (Fa. Ratiopharm) zur Schmerzlinderung in die Bauchhöhle getropft und anschließend wurde die Ratte wieder zugenäht.
- 5) Bei knapp 5% der Ratten kam es während der Ethernarkose zu einem kurzfristigen Atemstillstand. In so einem Fall erfolgte eine Mund zu Nase Beatmung über eine 2 ml Spritze ohne Stempel. Dadurch ließen die Tiere sich problemlos und schnell reanimieren.

5.6.2 Injektion des adenoviralen Vektors

Der Vektor wurde immer in den Tumor des linken Leberlappens injiziert, außer bei der Dosiseskalations- und De-Eskalationsstudie, wo es nur den rechten Tumorherd gab. Das Injektionsvolumen betrug 30 μ l und wurde zu Teilen von je ca. 10 μ l fächerartig im Tumor verteilt, wobei die Leberkapsel nur einmal an einer Stelle durchstochen wurde. Der restliche Ablauf war identisch mit dem unter 5.6.1 beschriebenen Vorgehen.

5.6.3 Darstellung des Tumors mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Tumorgröße wurde regelmäßig mit Hilfe der MRT visualisiert und analysiert. Die auch als Kernspintomographie bezeichnete Technik beruht auf der Anregung der Wasserprotonen. Mittels eines sehr starken statischen Magnetfeldes (Feldstärken zwischen 0,35 und 3 Tesla) werden die Protonen des Wassers in ihren magnetischen Momenten (Spins) parallel (oder antiparallel) zueinander ausgerichtet. Mit Hilfe eines eingestrahlten Hochfrequenzimpulses werden die Spins in unterschiedlichen Winkeln aus ihrer Gleichgewichtslage herausgeklappt. Beim Abschalten des Impulses geben die Protonen nun kleine magnetische Signale ab, die mit speziellen Spulen empfangen werden können. Durch zeitweise zugeschaltete Gradienten-Magnetfelder werden diese Signale bestimmten Orten zugeordnet.

Die Messungen erfolgten in einem 1,5 Tesla Gerät der Firma Siemens (Magnetom Symphony) durch eine Spulenkombination aus Kopfspule (CP-Head) und zweier ventral und dorsal der Untersuchungsregion (Leber) anliegenden Oberflächenspulen (small flex loop coil). Es wurden T1-gewichtete GRE-Sequenzen (Tumor signalarm in signalreicherer Umgebung) und T2-gewichtete TSE-Sequenzen (Tumor signalareich in signalarmer Umgebung) angewandt. Alle Arbeiten am MRT-Gerät wurden von Dr. Harald Ittrich in der Abteilung für Diagnostische und interventionelle Radiologie des Radiologischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf unter Leitung Prof. Gerrit Krupski durchgeführt (Krupski 2001). Für die Berechnung der Tumorgröße wurde näherungsweise eine Ellipsenform des Tumors angenommen. Bei jedem Tumor wurde in allen drei Dimensionen der maximale Durchmesser ausgemessen. Die angewandte Formel war:

 $V = 4/3 \times \pi \times A \times B \times C$ (A, B und C entspricht hier den Radien; π =pi).

Da die Tumore natürlich nicht immer ellipsenförmig waren, handelt es sich hierbei eher um eine gute Abschätzung der Tumorgröße als um eine exakte Berechnung derselben. Hinzukommt, daß die Querschnitte durch die Ratte im Abstand von 2,2 mm aufgenommen wurden. Für den ca. 15 min dauernden MRT-Scan erfolgte eine Ruhigstellung der Ratten durch Narkose.

5.6.4 Narkose der Ratten

Für den ca. 15 min dauernden MRT-Scan mußten die Ratten ruhig liegen und eine möglichst flache Atmung haben. Daher wurden sie narkotisiert. Hierfür wurden sie zuerst in einen Ethertopf gelegt und dann intraperitonal oder subkutan mit einem Ketamin/Rompun-Gemisch injiziert. Ketanest (115.34 mg/ml Esketaminhydrochlorid entspricht: Esketamin 100 mg/ml, Benzethoniumchlorid als Konservierungsmittel) diente als Narkotikum und wurde von der Fa. Pfizer (Parke-Davis) bezogen. Rompun 2% (Xylazin 20 mg/ml, Methyl-4-hydroxybenzoat als Konservierungsmittel) diente als Muskelrelaxanz und zur Induktion einer einer leichten Atemdepression. Es wurde von der Fa. BayerVital bezogen.

Der Mischungsansatz für 20 ml Narkoselösung war:

4,8 ml Ketanest

1,6 ml Rompun

13,6 ml 0,9% NaCl.

Die Einstichstelle wurde vor Injektion mit 70% EtOH eingesprüht. Kranke bzw. abgemagerte Tiere wurden mit 0,05 ml auf 10 g Rattengewicht injiziert (250 g \rightarrow 1,25 ml; 300 g \rightarrow 1,5 ml). Bei gesunden Tieren war diese Dosis völlig unzulänglich. Hier wurde wie folgt injiziert: 260 g \rightarrow 1,5 ml; 360 g \rightarrow 2,5 ml, mit den entsprechenden Abstufungen für die Zwischengewichte. War diese Dosis auch nach erneuten Etherbetäubung nicht ausreichend, wurden bei Tieren unter 300 g noch einmal 0,3 ml und bei Tieren über 300 g 0,5 ml injiziert. Die intraperitonale Injektion erfolgte mit einer 5 ml Spritze und einer 27 G Nadel (Injektionsnadel: Gr.20, 0.40 x 20mm BL/LB; 27 G x 3/4"). Lag das Injektionsvolumen über 1,8 ml wurde es auf zwei auseinander liegende Einstichstellen verteilt, um Hämatombildung vorzubeugen.

5.6.5 Tötungskriterien für die Ratten

Kriterien, die ein Einschläfern erforderlich machten, waren fortschreitender Gewichtsverlust von 20-30%, stark gekrümmte Haltung und deutlich zurückgezogene Augen, die meist von Schorf umgeben waren. Diese drei Kriterien wurden bei allen eingeschläferten Tieren eindeutig festgestellt. Die Wirbelsäule war deutlich fühlbar bei den eingeschläferten Tieren.

5.7 Statistische Berechnungen

Statistische Signifikanz

Um eine Aussage zu treffen, ob sich die Tumorgröße in zwei Stichproben statistisch signifikant unterscheiden, wurden Tests durchgeführt. Diese Tests erfolgten Computer-unterstützt mittels der Software MS Excel und dem Excel Add-In WinSTAT (www.winstat.de).

Ein sehr häufig in den Biowissenschaften angewandter Test ist der t-Test. Dieser setzt jedoch eine Normalverteilung der Zufallsvariablen voraus. Insbesondere bei nicht symmetrischer Verteilung sollte die Stichprobengröße mindestens bei 20 liegen. Anders läßt sich hingegen der U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon anwenden. Die Bedingungen sind hier im Vergleich zum t-Test schwach. Eine Normalverteilung ist nicht gefordert. Bei stark asymmetrischer Verteilung oder bei Ausreißern ist der U-Test zu bevorzugen (Weiß 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit meist ein U-Test durchgeführt, manchmal zusätzlich noch ein t-Test. Ergebnisse mit p<0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Bei der statistischen Auswertung der Überlebensrate wurde ein Log-rank Test nach Cox-Mantel verwendet. Dieser Test berechnet Signifikanzunterschiede zwischen den Gruppen. Die Signifikanz des Unterschiedes wurde durch p angegeben.

Balkendiagramme

Die Berechnung eines Mittelwertes wurde in dieser Arbeit bei allen Balkendiagrammen für die Balken benutzt. Bei Normalverteilung ist der Mittelwert optimaler Schätzer des Erwartungswertes. Nicht immer war eine Normalverteilung der Daten gegeben (insbesondere bei den Tumorvolumina). Trotzdem wurde diese Darstellungsweise meistens gewählt, da sich damit die Daten übersichtlicher präsentieren ließen. Zudem führte die alternative Darstellung mit dem Median als Grundlage nicht dazu, daß die Daten anders interpretierbar gewesen wären. Verwendete Software: MS Excel.

Box-Whisker Plot

Der Median stellt die Basis für die Darstellung der Box-Whisker Plots dar. Der Median charakterisiert die Daten bei Schieflage und Ausreißern besser als der Mittelwert. Daher wurde für die Gesamttumorgrößen in den beiden Langzeitgruppen zusätzlich zum Balkendiagram noch Box-Whisker Plots in der abschließenden Abbildung verwendet (s. Ergebnisteil). Diese Plots wurden mit der Software Statistica von der Fa. StatSoft angefertigt.

Standardabweichung

Standardabweichungen wurden mit der Software MS Excel und der Funktion STABW berechnet. Diese Funktion schätzt die Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe. Die Standardabweichung stellt ein Maß dafür dar, wie weit die jeweiligen Werte um den Mittelwert streuen. In den Abbildungen findet sich die Standardabweichung als Fehlerbalken wieder.

Um Standardabweichungen verschiedener Stichproben miteinander zu vergleichen, kann man die relative Standardabweichung heranziehen. Anschaulich handelt es sich um die Standardabweichung in % vom Mittelwert:

relative Standardabweichung = 100 x Standardabweichung/Mittelwert

Um bei einer Methode (Titration) ein anschauliches Maß für die Standardabweichung angeben zu können, wurden die relativen Standardabweichungen in diesem Fall gemittelt und dann als durchschnittliche relative Standardabweichung bezeichnet.

6 Literatur

- Addison CL, Bramson JL, Hitt MM, Muller WJ, Gauldie J and Graham FL (1998). "Intratumoral coinjection of adenoviral vectors expressing IL-2 and IL-12 results in enhanced frequency of regression of injected and untreated distal tumors." *Gene Ther* 5(10): 1400-9.
- Ahern KG, Wang K, Xu FY, Mathews CZ and Pearson GD (1991). "Strands hybridize in postreplicative adenovirus overlap recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(1): 105-9.
- Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H and Okumura K (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." J Exp Med 191(2): 375-80.
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP and Gabrilovich DI (2000). "Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer." *Clin Cancer Res* 6(5): 1755-66.
- Alt FW, Rathbun G, Oltz E, Taccioli G and Shinkai Y (1992). "Function and control of recombinationactivating gene activity." *Ann N Y Acad Sci* 651: 277-94.
- Amalfitano A and Parks RJ (2002). "Separating fact from fiction: assessing the potential of modified adenovirus vectors for use in human gene therapy." *Curr Gene Ther* 2(2): 111-33.
- Ameis D (2000). "[Approaches to gene therapy of hepatocellular carcinoma]." *Internist (Berl)* 41(2 Pt 2): 208-12.
- 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 and 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): 6457-64.
- Apte RS, Mayhew E and Niederkorn JY (1997). "Local inhibition of natural killer cell activity promotes the progressive growth of intraocular tumors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(6): 1277-82.

Atkins MB (2002). "Interleukin-2: clinical applications." Semin Oncol 29(3 Suppl 7): 12-7.

- 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 and Sherman ML (1997).
 "Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies." *Clin Cancer Res* 3(3): 409-17.
- Attal J, Theron MC and Houdebine LM (1999). "The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors." *Genet Anal* 15(3-5): 161-5.

- Bähr C (2002). Adenoviraler Gentransfer bei Hepatozellulärem Karzinom. Fachbereich Medizin. Hamburg, Universität Hamburg.
- Barajas M, Mazzolini G, Genove G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, Sangro B, Melero I, Qian C and Prieto J (2001). "Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12." *Hepatology* 33(1): 52-61.
- Barr D, Tubb J, Ferguson D, Scaria A, Lieber A, Wilson C, Perkins J and Kay MA (1995). "Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains." *Gene Ther* 2(2): 151-5.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* 285(5428): 727-9.
- Becker J. E., de Nechaud B. and R. PV, Eds. (1976). Two new rat hepatoma cell lines for studying unbalanced blocked ontogeny hypothesis. <u>Onco-developmental Gene Expression</u>. New York, Academic Press.
- Belsham GJ and Sonenberg N (1996). "RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation." *Microbiol Rev* 60(3): 499-511.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL and Finberg RW (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." *Science* 275(5304): 1320-3.
- Bergsland EK (2001). "Molecular mechanisms underlying the development of hepatocellular carcinoma." *Semin Oncol* 28(5): 521-31.
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L and 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 U S A* 91(19): 8802-6.
- Bett AJ, Prevec L and Graham FL (1993). "Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors." *J Virol* 67(10): 5911-21.
- Bewig B and Schmidt WE (2000). "Accelerated titering of adenoviruses." *Biotechniques* 28(5): 870-3.
- Bilbao G, Contreras JL and Curiel DT (2002). "Genetically engineered intracellular single-chain antibodies in gene therapy." *Mol Biotechnol* 22(2): 191-211.
- Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, Eklund B, Fjeldborg O, Friedberg M, Frodin L and et al. (1995). "Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986." *Int J Cancer* 60(2): 183-9.

- Biron CA, Young HA and Kasaian MT (1990). "Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo." *J Exp Med* 171(1): 173-88.
- Blaese M, Blankenstein T, Brenner M, Cohen-Haguenauer O, Gansbacher B, Russell S, Sorrentino B and Velu T (1995). "Vectors in cancer therapy: how will they deliver?" *Cancer Gene Ther* 2(4): 291-7.
- Blum HE (1995). <u>Tumoren der Leber und des biliären Systems</u>. München, Wien, Baltimore, Urban & Schwarzberg.
- Borman AM, Le Mercier P, Girard M and Kean KM (1997). "Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins." *Nucleic Acids Res* 25(5): 925-32.
- Bosch FX, Ribes J and Borras J (1999). "Epidemiology of primary liver cancer." *Semin Liver Dis* 19(3): 271-85.

Boshoff C and Weiss R (2002). "AIDS-related malignancies." Nat Rev Cancer 2(5): 373-82.

- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T and He TC (2001). "Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy." *Curr Gene Ther* 1(2): 149-62.
- Bubenik J (2001). "Genetically engineered dendritic cell-based cancer vaccines (review)." *Int J Oncol* 18(3): 475-8.

Burnet FM (1957). "Cancer - a biological approach." Brit med J 1: 841-847.

- Car BD, Eng VM, Lipman JM and Anderson TD (1999). "The toxicology of interleukin-12: a review." *Toxicol Pathol* 27(1): 58-63.
- Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre K and Zappacosta S (1997). "A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction." *J Exp Med* 185(12): 2053-60.
- Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Karre K and Zappacosta S (1999). "Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells." *Eur J Immunol* 29(12): 4022-9.
- Cariani E, Dubois N, Lasserre C, Briand P and Brechot C (1991). "Insulin-like growth factor II (IGF-II) mRNA expression during hepatocarcinogenesis in transgenic mice." *J Hepatol* 13(2): 220-6.
- Carson WE, Yu H, Dierksheide J, Pfeffer K, Bouchard P, Clark R, Durbin J, Baldwin AS, Peschon J, Johnson PR, Ku G, Baumann H and Caligiuri MA (1999). "A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells." *J Immunol* 162(8): 4943-51.

- Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong YL, Xu B, Kosai KI, Finegold M, Woo SL and Chen SH (1996). "Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11302-6.
- Castells A, Bruix J, Bru C, Fuster J, Vilana R, Navasa M, Ayuso C, Boix L, Visa J and Rodes J (1993). "Treatment of small hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a cohort study comparing surgical resection and percutaneous ethanol injection." *Hepatology* 18(5): 1121-6.
- Cavallo F, Signorelli P, Giovarelli M, Musiani P, Modesti A, Brunda MJ, Colombo MP and Forni G (1997). "Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12." *J Natl Cancer Inst* 89(14): 1049-58.
- Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC and Trinchieri G (1991). "Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers." *J Exp Med* 173(4): 869-79.
- Chappell SA, Edelman GM and Mauro VP (2000). "A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1536-41.
- Chehimi J, Valiante NM, D'Andrea A, Rengaraju M, Rosado Z, Kobayashi M, Perussia B, Wolf SF, Starr SE and Trinchieri G (1993). "Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus-infected cells." *Eur J Immunol* 23(8): 1826-30.
- Chen L, Chen D, Block E, O'Donnell M, Kufe DW and Clinton SK (1997). "Eradication of murine bladder carcinoma by intratumor injection of a bicistronic adenoviral vector carrying cDNAs for the IL-12 heterodimer and its inhibition by the IL-12 p40 subunit homodimer." *J Immunol* 159(1): 351-9.
- Chen QR, Kumar D, Stass SA and Mixson AJ (1999). "Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice." *Cancer Res* 59(14): 3308-12.
- Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS and Woo SL (1995). "Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2577-81.
- Chen W, Frank ME, Jin W and Wahl SM (2001). "TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu." *Immunity* 14(6): 715-25.
- Chroboczek J, Bieber F and Jacrot B (1992). "The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2." *Virology* 186(1): 280-5.

Colombo M (1993). "Hepatocellular carcinoma in cirrhotics." Semin Liver Dis 13(4): 374-83.

- Colombo MP and Trinchieri G (2002). "Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2): 155-68.
- Coughlin CM, Wysocka M, Trinchieri G and Lee WM (1997). "The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12." *Cancer Res* 57(12): 2460-7.
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M and 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): 1041-8.
- D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C and Trinchieri G (1995). "Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production." *J Exp Med* 181(2): 537-46.
- D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E and et al. (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells." *J Exp Med* 176(5): 1387-98.
- Danthinne X (2001). "Simultaneous insertion of two expression cassettes into adenovirus vectors." *Biotechniques* 30(3): 612-6, 618-9.
- DeBenedette MA, Chu NR, Pollok KE, Hurtado J, Wade WF, Kwon BS and Watts TH (1995). "Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP." *J Exp Med* 181(3): 985-92.
- DeMatteo RP, Markmann JF, Kozarsky KF, Barker CF and Raper SE (1996). "Prolongation of adenoviral transgene expression in mouse liver by T lymphocyte subset depletion." *Gene Ther* 3(1): 4-12.
- Deuffic S, Poynard T, Buffat L and Valleron AJ (1998). "Trends in primary liver cancer." *Lancet* 351(9097): 214-5.
- Dighe AS, Richards E, Old LJ and Schreiber RD (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." *Immunity* 1(6): 447-56.

Dillman RO (1999). "What to do with IL-2?" Cancer Biother Radiopharm 14(6): 423-34.

Djeu JY, Liu JH, Wei S, Rui H, Pearson CA, Leonard WJ and Blanchard DK (1993). "Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against Candida albicans by IL-2." *J Immunol* 150(3): 960-70.

Donnelly JJ, Ulmer JB and Liu MA (1997). "DNA vaccines." Life Sci 60(3): 163-72.
- Doran T, Stuhlmiller H, Kim JA, Martin EW, Jr. and Triozzi PL (1997). "Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy." *J Immunother* 20(5): 372-6.
- Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Krajcsi P, Tollefson AE and Wold WS (2003). "Overexpression of the ADP (E3-11.6K) Protein Increases Cell Lysis and Spread of Adenovirus." *Virology* 305(2): 378-87.
- Douglas JT, Kim M, Sumerel LA, Carey DE and Curiel DT (2001). "Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors." *Cancer Res* 61(3): 813-7.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* 3(11): 991-8.
- El-Serag HB and Mason AC (1999). "Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States." *N Engl J Med* 340(10): 745-50.
- Emtage PC, Wan Y, Bramson JL, Graham FL and Gauldie J (1998). "A double recombinant adenovirus expressing the costimulatory molecule B7-1 (murine) and human IL-2 induces complete tumor regression in a murine breast adenocarcinoma model." *J Immunol* 160(5): 2531-8.
- Emtage PC, Wan Y, Bramson JL, Graham FL and Gauldie J (1998a). "A double recombinant adenovirus expressing the costimulatory molecule B7-1 (murine) and human IL-2 induces complete tumor regression in a murine breast adenocarcinoma model." *J Immunol* 160(5): 2531-8.
- Emtage PC, Wan Y, Hitt M, Graham FL, Muller WJ, Zlotnik A and Gauldie J (1999). "Adenoviral vectors expressing lymphotactin and interleukin 2 or lymphotactin and interleukin 12 synergize to facilitate tumor regression in murine breast cancer models." *Hum Gene Ther* 10(5): 697-709.
- Emtage PC, Wan Y, Muller W, Graham FL and Gauldie J (1998b). "Enhanced interleukin-2 gene transfer immunotherapy of breast cancer by coexpression of B7-1 and B7-2." *J Interferon Cytokine Res* 18(11): 927-37.
- Ernstoff MS, Nair S, Bahnson RR, Miketic LM, Banner B, Gooding W, Day R, Whiteside T, Hakala T and Kirkwood JM (1990). "A phase IA trial of sequential administration recombinant DNAproduced interferons: combination recombinant interferon gamma and recombinant interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 8(10): 1637-49.
- Espinoza-Delgado I, Bosco MC, Musso T, Gusella GL, Longo DL and Varesio L (1995). "Interleukin-2 and human monocyte activation." *J Leukoc Biol* 57(1): 13-9.
- Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D and Hoeben RC (1998). "New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replicationcompetent adenoviruses." *Hum Gene Ther* 9(13): 1909-17.

- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC and Van Der Eb AJ (1996). "Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors." *Hum Gene Ther* 7(2): 215-22.
- Fasler S, Aversa G, Terr A, Thestrup-Pedersen K, de Vries JE and Yssel H (1995). "Peptide-induced anergy in allergen-specific human Th2 cells results in lack of cytokine production and B cell help for IgE synthesis. Reversal by IL-2, not by IL-4 or IL-13." *J Immunol* 155(9): 4199-206.

Feitelson MA (1999). "Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis." J Cell Physiol 181(2): 188-202.

Flint J and Shenk T (1997). "Viral transactivating proteins." Annu Rev Genet 31: 177-212.

- Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA, Jr. and Zinkernagel RM (1989). "Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice." *J Immunol* 143(10): 3230-4.
- Fritsch M, Geilen CC, Heidrich C and Reutter W (1995). "Influence of extracellular matrices on ganglioside pattern of two hepatoma cell lines with different adhesive properties." *FEBS Lett* 376(3): 159-63.
- Fujiwara T, Kataoka M and Tanaka N (2000). "Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human cancer." *Mol Urol* 4(2): 51-4.
- Fussenegger M, Mazur X and Bailey JE (1998). "pTRIDENT, a novel vector family for tricistronic gene expression in mammalian cells." *Biotechnol Bioeng* 57(1): 1-10.
- Galea-Lauri J, Darling D, Gan SU, Krivochtchapov L, Kuiper M, Gaken J, Souberbielle B and Farzaneh F (1999). "Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells." *J Immunol* 163(1): 62-70.
- Gao GP, Engdahl RK and Wilson JM (2000). "A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus." *Hum Gene Ther* 11(1): 213-9.
- Garrido F and Algarra I (2001). "MHC antigens and tumor escape from immune surveillance." *Adv Cancer Res* 83: 117-58.
- Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, Familletti PC, Sinigaglia F, Chizonnite R, Gubler U and et al. (1991). "Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)." *J Immunol* 147(3): 874-82.
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G and Trinchieri G (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." *J Exp Med* 195(3): 327-33.

- Geutskens SB, van der Eb MM, Plomp AC, Jonges LE, Cramer SJ, Ensink NG, Kuppen PJ and Hoeben RC (2000). "Recombinant adenoviral vectors have adjuvant activity and stimulate T cell responses against tumor cells." *Gene Ther* 7(16): 1410-6.
- Ghattas IR, Sanes JR and Majors JE (1991). "The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos." *Mol Cell Biol* 11(12): 5848-59.
- Gierse M (2000). <u>Fachrechnen für Pflegeberufe. Grundrechenarten und medizinisches Fachrechnen</u>, Schlütersche Verlag.
- Girolomoni G and Ricciardi-Castagnoli P (1997). "Dendritic cells hold promise for immunotherapy." Immunol Today 18(3): 102-4.
- Givan AL (2001). Flow Cytometry: first principles. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Gollob JA, Mier JW and Atkins MB (2001). "Clinical use of systemic IL-12 therapy." *Cancer Chemother Biol Response Modif* 19: 353-69.
- Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA and et al. (1993). "Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor." *Eur J Immunol* 23(10): 2631-41.
- Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI and Arrick BA (1992). "Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer." *Cancer Res* 52(24): 6949-52.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G and Ricciardi-Castagnoli P (2001). "Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis." *Nat Immunol* 2(9): 882-8.
- Greber UF, Willetts M, Webster P and Helenius A (1993). "Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells." *Cell* 75(3): 477-86.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M and Harris CC (1994). "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis." *Cancer Res* 54(18): 4855-78.
- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ and Rosenberg SA (1982). "Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes." *J Exp Med* 155(6): 1823-41.

- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH and Spies T (1999). "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6879-84.
- Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K and Guldberg P (1998). "Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity." *Blood* 92(9): 3018-24.
- Gruss HJ and Dower SK (1995). "Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas." *Blood* 85(12): 3378-404.
- Guinn BA, DeBenedette MA, Watts TH and Berinstein NL (1999). "4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine." *J Immunol* 162(8): 5003-10.

Hagens Gv and Whalley A (1997). Körperwelten. Einblicke in den menschlichen Körper.

- Hallenbeck PL, Chang YN, Hay C, Golightly D, Stewart D, Lin J, Phipps S and Chiang YL (1999). "A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma." *Hum Gene Ther* 10(10): 1721-33.
- Hanahan D (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-80.
- Hanisch UK, Seto D and Quirion R (1993). "Modulation of hippocampal acetylcholine release: a potent central action of interleukin-2." *J Neurosci* 13(8): 3368-74.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW and Vogelstein B (1998). "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2509-14.
- Hehir KM, Armentano D, Cardoza LM, Choquette TL, Berthelette PB, White GA, Couture LA, Everton MB, Keegan J, Martin JM, Pratt DA, Smith MP, Smith AE and Wadsworth SC (1996). "Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence." J Virol 70(12): 8459-67.
- Hersey P and Zhang XD (2001). "How melanoma cells evade trail-induced apoptosis." *Nat Rev Cancer* 1(2): 142-50.
- Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N and Schuler G (1996). "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells." *Eur J Immunol* 26(3): 659-68.
- Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G and Ferrone S (1998). "beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma." *J Clin Invest* 101(12): 2720-9.

- Hillemann MR and Werner JR (1954). "Recovery of a new agent from patients with acute respiratory illness." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 85: 183-188.
- Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, Qin Z, Diamantstein T and Blankenstein T (1993). "Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 2774-8.
- Hoffman MA and Palmenberg AC (1996). "Revertant analysis of J-K mutations in the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site detects an altered leader protein." *J Virol* 70(9): 6425-30.
- Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT and Boulanger PA (1997). "Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells." *Embo J* 16(9): 2294-306.
- Horvath-Arcidiacono JA, Mostowski HS and Bloom ET (1996). "IL-12 administered in vivo to young and aged mice. Discrepancy between the effects on tumor growth in vivo and cytotoxic T lymphocyte generation ex vivo: dependence on IFN-gamma." *Int Immunol* 8(5): 661-73.
- Houdebine LM and Attal J (1999). "Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use." *Transgenic Res* 8(3): 157-77.
- Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H and Dubinett SM (1998). "Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production." *Cancer Res* 58(6): 1208-16.
- Huez I, Creancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC and Prats H (1998). "Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA." *Mol Cell Biol* 18(11): 6178-90.
- Hurtado JC, Kim YJ and Kwon BS (1997). "Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death." *J Immunol* 158(6): 2600-9.
- Igney FH and Krammer PH (2002). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." *J Leukoc Biol* 71(6): 907-20.
- Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Ke LD, Kim JS, Lee HY, Steck PA, Kyritsis AP and Yung WK (1999). "Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo." *Cancer Res* 59(4): 895-900.
- Jackson RJ and Kaminski A (1995). "Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond." *Rna* 1(10): 985-1000.

- Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. and Murphy KM (1995). "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4." *J Exp Med* 181(5): 1755-62.
- Ju DW, Yang Y, Tao Q, Song WG, He L, Chen G, Gu S, Ting CC and Cao X (2000). "Interleukin-18 gene transfer increases antitumor effects of suicide gene therapy through efficient induction of antitumor immunity." *Gene Ther* 7(19): 1672-9.
- Kanai F, Lan KH, Shiratori Y, Tanaka T, Ohashi M, Okudaira T, Yoshida Y, Wakimoto H, Hamada H, Nakabayashi H, Tamaoki T and Omata M (1997). "In vivo gene therapy for alpha-fetoproteinproducing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene." *Cancer Res* 57(3): 461-5.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ and Schreiber RD (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7556-61.
- Kashima N, Nishi-Takaoka C, Fujita T, Taki S, Yamada G, Hamuro J and Taniguchi T (1985). "Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs." *Nature* 313(6001): 402-4.
- Khong HT and Restifo NP (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* 3(11): 999-1005.
- Kim YJ, Kim SH, Mantel P and Kwon BS (1998). "Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses." *Eur J Immunol* 28(3): 881-90.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B and 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): 827-45.
- Kojima H, Yokosuka O, Kato N, Shiina S, Imazeki F, Saisho H, Shiratori Y and Omata M (1999). "Quantitative evaluation of telomerase activity in small liver tumors: analysis of ultrasonography-guided liver biopsy specimens." *J Hepatol* 31(3): 514-20.
- Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL and Gatter KC (1996). "Loss of antigenpresenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer." *Br J Cancer* 73(2): 148-53.
- Kouri REaN, D.W. (1977). <u>Origins of Human Cancer</u>. New York, Cold Spring Harbor Labaratory Press, Cold Spring Harbor.
- Kozak M (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." *Nucleic Acids Res* 15(20): 8125-48.

- Krinke GJ, Ed. (2000). The Laboratory Rat. <u>Handbook of Experimental Animals</u>, Academic Press (part of Elsevier Science).
- Krupski G, Ameis D, Cataldegirmen G, Herbst H, Henschel MG, Nicolas V, Rogiers X and Bucheler E (2001). "[Native magnetic resonance tomography imaging of the Morris hepatoma (MH-7777A) in the rat]." *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 173(7): 639-42.
- Kubin M, Chow JM and Trinchieri G (1994a). "Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells." *Blood* 83(7): 1847-55.
- Kubin M, Kamoun M and Trinchieri G (1994b). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells." J Exp Med 180(1): 211-22.
- Kumagai K, Takeda K, Hashimoto W, Seki S, Ogasawara K, Anzai R, Takahashi M, Sato M and Rikiishi H (1997). "Interleukin-12 as an inducer of cytotoxic effectors in anti-tumor immunity." *Int Rev Immunol* 14(2-3): 229-56.
- Kuriyama S, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Nakatani T, Akahane T, Toyokawa Y, Kojima H, Okamoto S and Fukui H (1999). "Comparison of gene therapy with the herpes simplex virus thymidine kinase gene and the bacterial cytosine deaminase gene for the treatment of hepatocellular carcinoma." *Scand J Gastroenterol* 34(10): 1033-41.
- Kwon B, Moon CH, Kang S, Seo SK and Kwon BS (2000). "4-1BB: still in the midst of darkness." *Mol Cells* 10(2): 119-26.
- Laes J, Parada LA, Johansson B, Levan G, Szpirer C and Szpirer J (2000). "Alterations of P19ARF in rodent hepatoma cell lines but not in human primary liver cancer." *Cancer Genet Cytogenet* 117(2): 118-24.
- Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS and Dalton WS (1997). "Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma." *Blood* 90(11): 4266-70.
- Le SY and Maizel JV, Jr. (1997). "A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs." *Nucleic Acids Res* 25(2): 362-69.
- Lee KH, Panelli MC, Kim CJ, Riker AI, Bettinotti MP, Roden MM, Fetsch P, Abati A, Rosenberg SA and Marincola FM (1998). "Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination." *J Immunol* 161(8): 4183-94.
- Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ and Ryan JL (1997). "Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production." *Blood* 90(7): 2541-8.

- Lewin AS and Hauswirth WW (2001). "Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine." *Trends Mol Med* 7(5): 221-8.
- Li Y, Pong RC, Bergelson JM, Hall MC, Sagalowsky AI, Tseng CP, Wang Z and Hsieh JT (1999). "Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy." *Cancer Res* 59(2): 325-30.
- Lieschke GJ, Rao PK, Gately MK and Mulligan RC (1997). "Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo." *Nat Biotechnol* 15(1): 35-40.
- Ling P, Gately MK, Gubler U, Stern AS, Lin P, Hollfelder K, Su C, Pan YC and Hakimi J (1995). "Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity." *J Immunol* 154(1): 116-27.
- Liu Y, Ehtesham M, Samoto K, Wheeler CJ, Thompson RC, Villarreal LP, Black KL and Yu JS (2002). "In situ adenoviral interleukin 12 gene transfer confers potent and long-lasting cytotoxic immunity in glioma." *Cancer Gene Ther* 9(1): 9-15.
- Lopez-Lastra M, Gabus C and Darlix JL (1997). "Characterization of an internal ribosomal entry segment within the 5' leader of avian reticuloendotheliosis virus type A RNA and development of novel MLV-REV-based retroviral vectors." *Hum Gene Ther* 8(16): 1855-65.
- Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, Rayner AA, Sharrow SO, Seipp CA, Custer MC and Rosenberg SA (1985). "In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2." *J Immunol* 135(4): 2865-75.
- Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczek RA and Pauli G (1995). "Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10." *Eur J Immunol* 25(7): 1943-50.
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM and O'Garra A (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." *J Immunol* 154(10): 5071-9.
- Maleckar JR and Sherman LA (1987). "The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice." *J Immunol* 138(11): 3873-6.
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G and Romagnani S (1993).
 "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells." *J Exp Med* 177(4): 1199-204.
- Martin LA, Vile R, Lemoine NR, Sikora K and Pandha HS (1997). "Genetic prodrug activation therapy." *Lancet* 350(9094): 1793-4.

- Martinet O, Divino CM, Zang Y, Gan Y, Mandeli J, Thung S, Pan PY and Chen SH (2002). "T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer." *Gene Ther* 9(12): 786-92.
- Martinez-Salas E (1999). "Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors." *Curr Opin Biotechnol* 10(5): 458-64.
- Martinez-Salas E, Regalado MP and Domingo E (1996). "Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution." *J Virol* 70(2): 992-8.
- Matsubara K and Tokino T (1990). "Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis." *Mol Biol Med* 7(3): 243-60.
- Mattner F, Fischer S, Guckes S, Jin S, Kaulen H, Schmitt E, Rude E and Germann T (1993). "The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer." *Eur J Immunol* 23(9): 2202-8.
- Mazzolini G, Qian C, Xie X, Sun Y, Lasarte JJ, Drozdzik M and 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): 514-22.
- Mazzolini GD, Sangro B, Ruiz J, Herraiz M, Herrero JI, Quiroga J, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Sola J, Sadaba B, Sarobe P, Melero I, Qian C and Prieto J (2003). A Phase I clinical trial of intratumoral injection of adenovirus encoding Interleukin-12 in patients with hepatocellular carcinoma and other advanced gastrointestinal tumors. 28th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Geneva, Switzerland.
- Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, Franken KL, Hahne M, Albar JP, Melief CJ and Offringa R (2001). "Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11515-20.
- Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ and Offringa R (1999). "Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein." *J Exp Med* 190(7): 1033-8.
- Melero I, Bach N, Hellstrom KE, Aruffo A, Mittler RS and Chen L (1998). "Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 costimulatory pathway." *Eur J Immunol* 28(3): 1116-21.
- Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L and Prieto J (2001). "IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies." *Trends Immunol* 22(3): 113-5.

Mitchell MS (2002). "Cancer vaccines, a critical review--Part II." Curr Opin Investig Drugs 3(1): 150-8.

- Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E and Hayakawa T (2000). "IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector." *Mol Ther* 1(4): 376-82.
- Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E and Hayakawa T (2000). "IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector." *Mol Ther* 1(4): 376-82.
- Modrow S and Falke F (1997). Adenoviren. <u>Molekulare Virologie</u>. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.: 391-411.
- Mogi S, Sakurai J, Kohsaka T, Enomoto S, Yagita H, Okumura K and Azuma M (2000). "Tumour rejection by gene transfer of 4-1BB ligand into a CD80(+) murine squamous cell carcinoma and the requirements of co-stimulatory molecules on tumour and host cells." *Immunology* 101(4): 541-7.
- Moradpour D, Allgaier H-P, Linhart HG and Blum HE (2002). <u>Hepatuzelluläres Karzinom</u>. Berlin, Springer-Verlag.
- Morris HP and Meranze DR (1974). "Induction and some characteristics of "minimal deviation" and other transplantable rat hepatomas." *Recent Results in Cancer Research* 44: 103-114.
- Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ and Caskey CT (1998). "An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 7866-71.
- Moscow JA, Huang H, Carter C, Hines K, Zujewski J, Cusack G, Chow C, Venzon D, Sorrentino B, Chiang Y, Goldspiel B, Leitman S, Read EJ, Abati A, Gottesman MM, Pastan I, Sellers S, Dunbar C and Cowan KH (1999). "Engraftment of MDR1 and NeoR gene-transduced hematopoietic cells after breast cancer chemotherapy." *Blood* 94(1): 52-61.
- Mosmann TR and Coffman RL (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* 7: 145-73.
- Mountford PS and Smith AG (1995). "Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis." *Trends Genet* 11(5): 179-84.

Mullen JT and Tanabe KK (2002). "Viral oncolysis." Oncologist 7(2): 106-19.

- Musiani P, Modesti A, Giovarelli M, Cavallo F, Colombo MP, Lollini PL and Forni G (1997). "Cytokines, tumour-cell death and immunogenicity: a question of choice." *Immunol Today* 18(1): 32-6.
- Nakagawa K, Miller FN, Sims DE, Lentsch AB, Miyazaki M and Edwards MJ (1996). "Mechanisms of interleukin-2-induced hepatic toxicity." *Cancer Res* 56(3): 507-10.

- Nakamoto Y, Guidotti LG, Kuhlen CV, Fowler P and Chisari FV (1998). "Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma." *J Exp Med* 188(2): 341-50.
- Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S, Huez G and Prats AC (1997). "Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site." *J Biol Chem* 272(51): 32061-6.
- Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, Duarte M, Zaratiegui M, Qian C, Melero I and Prieto J (2000). "Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gammainducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy." J Immunol 164(6): 3112-22.
- Neumeier R, Dethlefs U and Reutter W (1984). "Different adhesion inhibiting activities of antisera against plasma membranes of liver and Morris hepatoma 7777." *FEBS Lett* 168(2): 241-4.
- NIH (2002). "Assessment of adenoviral vector safety and toxicity: report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee." *Hum Gene Ther* 13(1): 3-13.
- Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M and et al. (1994). "Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 54(12): 3107-10.
- Nishiyama M and Wands JR (1992). "Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* 183(1): 280-5.
- Nistico G and De Sarro G (1991). "Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain?" *Trends Neurosci* 14(4): 146-50.
- Ohno S, Fujii T, Ueda S, Nakamoto T, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Kumar Dhar D and Nagasue N (2003). "Predictive factors and timing for liver recurrence after curative resection of gastric carcinoma." *Am J Surg* 185(3): 258-63.
- Ohwada A, Hirschowitz EA and Crystal RG (1996). "Regional delivery of an adenovirus vector containing the Escherichia coli cytosine deaminase gene to provide local activation of 5fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver." *Hum Gene Ther* 7(13): 1567-76.
- Okada Y, Okada N, Nakagawa S, Mizuguchi H, Kanehira M, Nishino N, Takahashi K, Mizuno N, Hayakawa T and Mayumi T (2002). "Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors." *Cancer Lett* 177(1): 57-63.

- Okegawa T, Pong RC, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI and Hsieh JT (2001). "The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure." *Cancer Res* 61(17): 6592-600.
- Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y and Ohnishi K (1985). "Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients." *Cancer* 56(4): 918-28.
- Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP and Gabrilovich DI (1998). "Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factorkappa B activation in hemopoietic progenitor cells." *J Immunol* 160(3): 1224-32.

Ozturk M (1999). "Genetic aspects of hepatocellular carcinogenesis." Semin Liver Dis 19(3): 235-42.

- Pardoll DM (2002). "Spinning molecular immunology into successful immunotherapy." *Nat Rev Immunol* 2(4): 227-38.
- Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA and Graham FL (1996). "A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral pack-aging signal." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13565-70.
- Penn I (1996). "Malignant melanoma in organ allograft recipients." Transplantation 61(2): 274-8.

Penn I (1999). "Posttransplant malignancies." Transplant Proc 31(1-2): 1260-2.

- Penna C and Nordlinger B (2002). "Colorectal metastasis (liver and lung)." *Surg Clin North Am* 82(5): 1075-90, x-xi.
- Pham SM, Kormos RL, Landreneau RJ, Kawai A, Gonzalez-Cancel I, Hardesty RL, Hattler BG and Griffith BP (1995). "Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer." *Ann Thorac Surg* 60(6): 1623-6.
- Pham-Nguyen KB, Yang W, Saxena R, Thung SN, Woo SL and Chen SH (1999). "Role of NK and T cells in IL-12-induced anti-tumor response against hepatic colon carcinoma." *Int J Cancer* 81(5): 813-9.
- Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK and Kwon BS (1994). "4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells." *Eur J Immunol* 24(2): 367-74.
- Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK and Gubler U (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 14002-7.

- Puetzer BM, Hitt M, Muller WJ, Emtage P, Gauldie J and 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 U S A* 94(20): 10889-94.
- Putzer BM, Stiewe T, Rodicker F, Schildgen O, Ruhm S, Dirsch O, Fiedler M, Damen U, Tennant B, Scherer C, Graham FL and Roggendorf M (2001). "Large nontransplanted hepatocellular carcinoma in woodchucks: treatment with adenovirus-mediated delivery of interleukin 12/B7.1 genes." J Natl Cancer Inst 93(6): 472-9.
- Putzer BM, Rodicker F, Hitt MM, Stiewe T and Esche H (2002). "Improved treatment of pancreatic cancer by IL-12 and B7.1 costimulation: antitumor efficacy and immunoregulation in a nonimmunogenic tumor model." *Mol Ther* 5(4): 405-12.
- Qian C, Idoate M, Bilbao R, Sangro B, Bruna O, Vazquez J and Prieto J (1997). "Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma." *Hum Gene Ther* 8(3): 349-58.
- Qiu Z, Lao M and Wu C (2001). "Co-transfer of human wild-type p53 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes via recombinant adenovirus induces apoptosis and enhances immunogenicity in laryngeal cancer cells." *Cancer Lett* 167(1): 25-32.
- Quinn CM, Wiles AP, El-Shanawany T, Catchpole I, Alnadaf T, Ford MJ, Gordon S and Greaves DR (1999). "The human eukaryotic initiation factor 4AI gene (EIF4A1) contains multiple regulatory elements that direct high-level reporter gene expression in mammalian cell lines." *Genomics* 62(3): 468-76.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Propert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM and Batshaw ML (2002). "A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency." *Hum Gene Ther* 13(1): 163-75.
- Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR and Rosenberg SA (1996). "Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy." *J Natl Cancer Inst* 88(2): 100-8.
- Ries S and Korn WM (2002). "ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replicationselective adenovirus." *Br J Cancer* 86(1): 5-11.
- Roitt I, Brostoff S and Male D (1998). Immunology. London, Mosby.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, H. PR and Ward TG (1953). "Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degradation in tissue culture." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 84: 570-573.
- Rueckert RR (1996). Picornaviridae. The viruses and their replication. <u>Fields Virology</u>. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howleyet al. Philadelphia, Lippincott Raven Publishers: 609-654.

- Rygaard J and Povlsen CO (1974). "The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance." *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 82(1): 99-106.
- Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M and Kaibara N (1998). "Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue." *Br J Cancer* 78(12): 1573-7.
- Salazar-Onfray F, Charo J, Petersson M, Freland S, Noffz G, Qin Z, Blankenstein T, Ljunggren HG and Kiessling R (1997). "Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10." *J Immunol* 159(7): 3195-202.
- Salih HR, Kiener PA and Nussler V (2002). "4-1 BB ligand--just another costimulating molecule?" *Int J Clin Pharmacol Ther* 40(8): 348-53.
- Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, Starling GC, Loo DT, Lee F, Aruffo AA, Trail PA and Kiener PA (2000). "Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells." *J Immunol* 165(5): 2903-10.
- Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, Nuessler V and Kiener PA (2001). "Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies." *J Immunol* 167(7): 4059-66.
- Salvesen GS and Dixit VM (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 10964-7.
- Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM and Simons JW (1995). "Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 87(4): 280-5.
- Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J and Strauss M (1997). "Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death." *Nat Med* 3(3): 313-9.
- Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker ML, Savino R and Caskey CT (2000). "Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1002-7.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M and Hla T (1995). "Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer." *Cancer Res* 55(17): 3785-9.

- Santoni-Rugiu E, Preisegger KH, Kiss A, Audolfsson T, Shiota G, Schmidt EV and Thorgeirsson SS (1996). "Inhibition of neoplastic development in the liver by hepatocyte growth factor in a transgenic mouse model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9577-82.
- Schiedner G, Hertel S and Kochanek S (2000). "Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production." *Hum Gene Ther* 11(15): 2105-16.
- Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL and Kochanek S (1998). "Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity." *Nat Genet* 18(2): 180-3.
- Schmitz V, Barajas M, Wang L, Peng D, Duarte M, Prieto J and Qian C (2001). "Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 34(1): 72-81.
- Schoenhaut DS, Chua AO, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, McComas W, Familletti PC, Gately MK and Gubler U (1992). "Cloning and expression of murine IL-12." *J Immunol* 148(11): 3433-40.
- Schwartz RH (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science* 248(4961): 1349-56.
- Seigel LJ, Harper ME, Wong-Staal F, Gallo RC, Nash WG and O'Brien SJ (1984). "Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1." *Science* 223(4632): 175-8.
- Seliger B, Hohne A, Jung D, Kallfelz M, Knuth A, Jaeger E, Bernhard H, Momburg F, Tampe R and Huber C (1997). "Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas." *Exp Hematol* 25(7): 608-14.
- Selzner M, Morse MA, Vredenburgh JJ, Meyers WC and Clavien PA (2000). "Liver metastases from breast cancer: long-term survival after curative resection." *Surgery* 127(4): 383-9.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ and Schreiber RD (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 410(6832): 1107-11.
- Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M and Dubinett SM (1999). "T cellderived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function." *J Immunol* 163(9): 5020-8.
- Shaw G, Morse S, Ararat M and Graham FL (2002). "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." *Faseb J* 16(8): 869-71.

Sheil AG (1986). "Cancer after transplantation." World J Surg 10(3): 389-96.

- Shenk T (1996). Adenoviridae: The viruses and their replication. <u>Fields Virology</u>. B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howleyet al. Philadelphia, Lippincott Raven Publishers: 2111-2148.
- Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ and Lee SH (1999). "Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma." *Am J Pathol* 154(6): 1785-91.
- Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M and Delespesse G (1995). "Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction." *Eur J Immunol* 25(4): 1125-8.
- Slos P, De Meyer M, Leroy P, Rousseau C and Acres B (2001). "Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human IL-2 cDNA: induction of CD8(+) T-cell immunity and NK activity." *Cancer Gene Ther* 8(5): 321-32.

Smith KA (1984). "Interleukin 2." Annu Rev Immunol 2: 319-33.

Smith KA (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." Science 240(4856): 1169-76.

- Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H and Godfrey DI (2002). "NKT cells conductors of tumor immunity?" *Curr Opin Immunol* 14(2): 165-71.
- Smyth MJ, Taniguchi M and Street SE (2000). "The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent." *J Immunol* 165(5): 2665-70.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI and Trapani JA (2000). "Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma." *J Exp Med* 192(5): 755-60.

Sompayrac L (1999). How the Immune System Works. Massachusetts, USA, Blackwell Science.

- Sompayrac L (2002). <u>How Pathogenic Viruses Work</u>. Boston, Toronto, London, Singapore, Jones and Bartlett Publishers.
- Stewart SR and Semler BL (1997). "RNA determinants of picornavirus cap-independent translation initiation." *Sem Virol* 8: 242-255.
- Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ and Anderson GR (1999). "The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15121-6.
- Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY, Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnaw AK,

Grodzicky T, Fleisher TA and Lenardo MJ (2001). "The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis." *Blood* 98(1): 194-200.

- Street SE, Cretney E and Smyth MJ (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." *Blood* 97(1): 192-7.
- Stutman O (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." *Science* 183(124): 534-6.
- Sugie N, Fujii N and Danno K (2002). "Cyclosporin-A suppresses p53-dependent repair DNA synthesis and apoptosis following ultraviolet-B irradiation." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18(4): 163-8.
- Tabor E (1994). "Tumor suppressor genes, growth factor genes, and oncogenes in hepatitis B virusassociated hepatocellular carcinoma." *J Med Virol* 42(4): 357-65.
- Tada M, Omata M and Ohto M (1990). "Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing." *Cancer Res* 50(4): 1121-4.
- Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G and Ide T (1995). "Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas." *Cancer Res* 55(13): 2734-6.
- Takeda K, Oshima H, Hayakawa Y, Akiba H, Atsuta M, Kobata T, Kobayashi K, Ito M, Yagita H and Okumura K (2000). "CD27-mediated activation of murine NK cells." *J Immunol* 164(4): 1741-5.
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H and Okumura K (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." *J Exp Med* 195(2): 161-9.
- Tanaka M, Saijo Y, Sato G, Suzuki T, Tazawa R, Satoh K and Nukiwa T (2000). "Induction of antitumor immunity by combined immunogene therapy using IL-2 and IL-12 in low antigenic Lewis lung carcinoma." *Cancer Gene Ther* 7(11): 1481-90.
- Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K and Wands JR (1999). "Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma." *J Clin Invest* 103(3): 341-5.
- Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R and Hamuro J (1983). "Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2." *Nature* 302(5906): 305-10.
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC and Ihle JN (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." *Nature* 382(6587): 171-4.

- Tobe T and Arii S (1992). Improving survival after resection of hepatocellular carcinoma: characteristics and current status of surgical treatment of primary liver cancer in Japan. <u>Primary liver</u> <u>cancer in Japan</u>. T. Tobe, H. Kaneda, M. Okudairaet al. Berlin, Heidelberg, New York, Springer: 215-220.
- Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H and Tominaga T (1996). "Clinical significance of the determination of angiogenic factors." *Eur J Cancer* 32A(14): 2513-9.
- Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ and Wold WS (1996). "The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells." *J Virol* 70(4): 2296-306.
- Torimura T, Sata M, Ueno T, Kin M, Tsuji R, Suzaku K, Hashimoto O, Sugawara H and Tanikawa K (1998). "Increased expression of vascular endothelial growth factor is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma." *Hum Pathol* 29(9): 986-91.
- Trinchieri G (1994). "Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes." *Blood* 84(12): 4008-27.
- Trinchieri G (1998a). "Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity." *Adv Immunol* 70: 83-243.
- Trinchieri G (1998b). "Immunobiology of interleukin-12." Immunol Res 17(1-2): 269-78.
- Trinchieri G and Scott P (1999). "Interleukin-12: basic principles and clinical applications." *Curr Top Microbiol Immunol* 238: 57-78.
- van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM and Hengartner H (1996). "Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice." *J Exp Med* 184(5): 1781-90.

Vinay DS and Kwon BS (1998). "Role of 4-1BB in immune responses." Semin Immunol 10(6): 481-9.

- Vollmer CM, Jr., Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA and Economou JS (1999). "Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* 59(13): 3064-7.
- Waehler R and Schnieders F (2002). Nukleinsäuren und deren Verwendung für die Gentherapie. Deutsche Patentanmeldung Nr. 10248141.5.
- Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, Ganske I, Zabner J and Welsh MJ (2002). "Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape." *Cell* 110(6): 789-99.

Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ and Zabner J (1999). "Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia." *J Biol Chem* 274(15): 10219-26.

Weiß C (2002). Basiswissen medizinische Statistik. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H and Ristimaki A (1998). "Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma." *Cancer Res* 58(22): 4997-5001.
- Worth LL, Jia SF, Zhou Z, Chen L and Kleinerman ES (2000). "Intranasal therapy with an adenoviral vector containing the murine interleukin-12 gene eradicates osteosarcoma lung metastases." *Clin Cancer Res* 6(9): 3713-8.
- Wu CY, Warrier RR, Carvajal DM, Chua AO, Minetti LJ, Chizzonite R, Mongini PK, Stern AS, Gubler U, Presky DH and Gately MK (1996). "Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor beta chain." *Eur J Immunol* 26(2): 345-50.
- Wu H, Seki T, Dmitriev I, Uil T, Kashentseva E, Han T and Curiel DT (2002). "Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency." *Hum Gene Ther* 13(13): 1647-53.
- Yamada M, Lewis JA and Grodzicker T (1985). "Overproduction of the protein product of a nonselected foreign gene carried by an adenovirus vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(11): 3567-71.
- Yoshida H, Katayose Y, Unno M, Suzuki M, Kodama H, Takemura S, Asano R, Hayashi H, Yamamoto K, Matsuno S and Kudo T (2003). "A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances antitumor immunity." *Cancer Immunol Immunother* 52(2): 97-106.
- Young CS, Cachianes G, Munz P and Silverstein S (1984). "Replication and recombination in adenovirus-infected cells are temporally and functionally related." *J Virol* 51(3): 571-7.
- Yu JY, DeRuiter SL and Turner DL (2002). "RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6047-52.
- Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S and Burg G (1997). "Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules." *Int J Cancer* 71(4): 630-7.
- Zhang XK, Huang DP, Qiu DK and Chiu JF (1990). "The expression of c-myc and c-N-ras in human cirrhotic livers, hepatocellular carcinomas and liver tissue surrounding the tumors." *Oncogene* 5(6): 909-14.
- Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM and Weinstein IB (1993). "Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* 196(2): 1010-6.

- Zhu J, Grace M, Casale J, Chang AT, Musco ML, Bordens R, Greenberg R, Schaefer E and Indelicato SR (1999). "Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector." *Hum Gene Ther* 10(1): 113-21.
- Zou J, Presky DH, Wu CY and Gubler U (1997). "Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases." *J Biol Chem* 272(9): 6073-7.
- Zubler RH, Lowenthal JW, Erard F, Hashimoto N, Devos R and MacDonald HR (1984). "Activated B cells express receptors for, and proliferate in response to, pure interleukin 2." *J Exp Med* 160(4): 1170-83.
- Zwacka RM and Dunlop MG (1998). "Gene therapy for colon cancer." *Hematol Oncol Clin North Am* 12(3): 595-615

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

Die folgenden Seiten enthalten die Karten der wichtigsten Plasmide, die für die Klonierungsarbeiten und Experimente zum Einsatz gekommen sind. Auf die Darstellung der 4-1BBL und IL2 enthaltenden Plasmide wurde verzichtet, da diese cDNAs durch PCR amplifiziert wurden und die Karten der Ausgangsplasmide für die Klonierung der Vektoren daher irrelevant sind. Die Vektorkarte von pAd-3 ist hier am Ende dargestellt, um die Größenverhältnisse der Transgene in Relation zum adenoviralen Genom zu veranschaulichen. Die Karten von pShuttle-1/2/3 zeigen die Lage der Transgene in der Expressionskassette besser als das in pAd möglich ist, weshalb auf die Darstellung von pAd-1/2 verzichtet wurde. Die Reihenfolge der Plasmidkarten entspricht der Reihenfolge, in der sie für die Klonierungsarbeiten relevant war. Weitere Details finden sich unter Material und Methoden.

















7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AFP	Alpha-Feto-Protein
APC	Antigen Presenting Cell
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CC	Colon Carcinoma
CIP	Calf Intestine Phosphatase
cFLIP	cellular FLICE-Inhibitory Protein (Caspase-8 Inhibitor)
cm	Zentimeter
CPE	CytoPathic Effect
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
D	Dalton
DC	Dendritic Cell
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein Barr Virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EMVC	Encephalomyocarditis Virus
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FBS	fötales Kälberserum
g	Gramm
хg	Vielfaches der Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HEK	Human Embryonic Kidney (cell)
HER	Human Embryonic Retinoblast (cell)
hdAd	helperdependent Adenovirus (helferabhängige Adenoviren)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon (z. B. IFNγ=Interferon-gamma)

IL	Interleukin (z. B. IL12=Interleukin-12)
IRES	Interne Ribosomen-Eintritts-Stellen
i.u.	infectious units (infektiöse Einheiten oder Virus-Partikel)
kb	Kilobasenpaar
kD	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KOAc	Kaliumsalz der Essigsäure
LAK	Lymphokine Activated Killer cell
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
Μ	Molar (=mol/l)
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor (Überlebensfaktor für Monozyten)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	Migration Inhibitory Factor
min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection (Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro Zelle)
MTD	maximal tolerierte Dosis
NaOAc	Natriumsalz der Essigsäure
n.i.u.	normalized infectious unit (normalisierte infektiöse Einheit)
NK	Natural Killer (NK-Zelle=natürliche Killerzelle)
OP	Operation
р	Plasmid (z. B.: pAd = Plasmid aus dem der Adenovirus gemacht wurde)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PV	Poliovirus
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pfu	plaque forming units
rhIL12	rekombinantes humanes IL12
S	Sekunde
S	angehängt an eine andere Abkürzung indiziert das den Plural
S.	siehe
scIL12	"single chain" Interleukin-12 (= Einzelketten Interleukin-12)
siRNA	small interference RNA
ΤΑΑ	Tumor Assoziiertes Antigen
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50
TCR	T-Cell Receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β

Th	T-Helfer (Zelle)
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vergl.	vergleiche
WHV	woodchuck hepatitis virus (Murmeltier Hepatitis Virus)

7.3 Glossarium

- Anergie Zustand der Nicht-Funktionalität.
- CD4 Bezeichnug für eine T-Helfer-Zelle, die positiv für den Oberflächenmarker CD4 ist.
- CD8 Bezeichnug für eine zytotoxische T-Zelle, die positiv für den Oberflächenmarker CD8 ist.
- Cistron Bezeichnung für eine DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert. Bei einem monocistronischen Konstrukt, wird eine mRNA für ein Polypeptid unter einem Promoter exprimiert (z. B. Ad-1). Bei einem bicistronischen Konstrukt werden zwei mRNAs für zwei Polypeptide unter einem Promoter exprimiert (z. B. Ad-2) und bei einem tricistronischen sind es drei (z. B. Ad-3).
- Hypotonie 1) chronische Erniedrigung des Blutdruckes 2) Abnahme des Muskeltonus.
- Gewicht Im Zusammenhang mit den Ratten wird in dieser Arbeit von Gewichten gesprochen. Physikalisch korrekt handelt es sich hierbei um die Massen der Tiere. Der Begriff Tiermasse wurde wegen seiner Unüblichkeit jedoch gegen Tiergewicht ausgetauscht.
- Ischämie Blutleere
- NKT NKT-Zellen exprimieren Marker von NK und von T-Zellen und vereinen Funktionen von beiden Zelltypen. Es handelt sich um Zellen, die in die

frühen Prozesse eine akuten Entzündungsreaktion involviert sind. Sie spielen eine wichtige Rolle in der IL12-vermittelten Antitumorantwort, vor allem bei geringen IL12-Mengen. NKT-Zellen können IFNγ, IL4, IL13 und IL2 sekretieren. Sie spielen auch eine Rolle in der physiologischen Immunüberwachung von Tumoren

- Th1T-Helfer (Zelle) vom Typ 1: stimuliert eine zellvermittelte Immunantwort;Differenzierungszytokine (Th0 -> Th1): IL12, IFNγ, TNFα/β, IL3
- Th2 T-Helfer (Zelle) vom Typ 2: stimuliert eine humorale Immunantwort; Differenzierungszytokine (Th0 -> Th2): IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13
- Vektor Damit wird in dieser Arbeit in aller Regel ein Adenovirus bezeichnet, das in der E1 und E3 Region deletiert ist und der eine Transgenkassette enthält. Ad-1, Ad-2 und Ad-3 stellen die therapeutischen Vektoren da, Ad-GFP und Ad-Null die Kontrollvektoren. Durch das Wort Vektor soll betont werden, daß es sich um ein Transportvehikel für die Transgene handelt.
- Virus Wird in dieser Arbeit von einem Virus gesprochen, so ist meist einer der Vektoren gemeint. Durch Benutzung des Wortes "Virus" soll der virale Charakter betont werden. Die Begriffe Virus und Vektor werden im Rahmen dieser Arbeit weitgehend synonym füreinander bzw. für den Begriff adenoviraler Vektor verwendet.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Reinhard Wähler
geboren am:	16. März 1972 in Berlin
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1978-1984	Grundschule in Berlin
1984-1991	Gymnasium (Schadow-Schule) in Berlin; Abschluß: Abitur

Studium

1991-1997	Okt. 91 - Jan.97: Studium der Biochemie, Universität Hannover
1993	Sept.: Diplomvorprüfung im Studiengang Biochemie
1994	AugDez.: 2 Forschungsprojekte am Wistar-Institute in Philadelphia, USA
1995	März-Apr.: Forschungsprojekt bei der Bayer AG, Wuppertal JulAug.: Werkstudent bei der Bayer AG, Wuppertal
1997	Jan.: Diplom im Studiengang Biochemie an der Universität Hannover (Note: sehr gut). Diplomarbeit: "Strukturelle und funk- tionelle Analyse des murinen elk-1 Gens" bei Prof. Nordheim, Abteilung Molekulare Zellbiologie, Medizinische Hochschule Hannover

Berufliche Praxis

1997	AprNov.: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Moleku-
	larbiologie der Universität Tübingen bei Prof. Nordheim
1997	NovNov.1998.: Zivildienst
1998	Dez.: Beginn der Promotion am MDC in Berlin-Buch in der AG von Prof. Strauss (†), Institut für Molekulare Zellbiologie, Hum- boldt-Universität zu Berlin unter Anleitung von Dr. F. Schnie- ders
2000	März: Fortsotzung der Promotion am Heinrich-Potto-Institut in
2000	Hamburg unter Anleitung von Dr. F. Schnieders
2001	Febr.: Fortsetzung der Promotion am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Abteilung und unter Betreuung von Prof. Dr. U. Beisiegel und im Labor von Prof. Dr. D. Ameis
2003	Abschluß der Promotion. Titel: Adenovirale Immuntherapie soli- der Tumore am HCC-Modell der Ratte

7.5 Veröffentlichungen

Publikationen

Kauschke SG, Knorr A, Heke M, Kohlmeyer J, Schauer M, Theiss G, <u>Waehler R</u>, Burchardt ER; Two assays for measuring fibrosis: reverse transcriptase-polymerase chain reaction of collagen alpha(1) (III) mRNA is an early predictor of subsequent collagen deposition while a novel serum N-terminal procollagen (III) propeptide assay reflects manifest fibrosis in carbon tetrachloride-treated rats. Anal Biochem. 1999 Nov 15;275(2):131-40.

<u>Reinhard Waehler</u>, Harald Ittrich, Lars Mueller, Gerrit Krupski, Mareike Geissler, Detlev Ameis, Frank Schnieders. Low-dose adenoviral tumor therapy with single chain interleukin-12. *In Vorbereitung*

Patent

<u>Wähler R.</u>, Schnieders, F. Nukleinsäuren und deren Verwendung für die Gentherapie, Deutsche Patentanmeldung Nr. 102 48 141.5.: 2002

Kongreßbeiträge

<u>Reinhard Waehler</u>, Lars Mueller, Mareike Geissler, Harald Ittrich, Gerrit Krupski, Martin Fussenegger, Detlev Ameis, Frank Schnieders. Experimental gene therapy of hepatocellular carcinoma: expression of IL-12, 4-BBL and IL-2 from a single adenoviral vector. Poster 33, 10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy (ESGT), October 12-16, 2002 Antibes, Frankreich.

<u>Reinhard Waehler</u>, Harald Ittrich, Lars Mueller, Gerrit Krupski, Mareike Geissler, Martin Fussenegger, Detlev Ameis, Frank Schnieders. Immunostimulation by IL-12, 4-1BBL and IL-2 from a single adenovirus allows low-dose gene therapy of rat HCC. 109. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 26.-30. April, 2003 Wiesbaden, Deutschland

7.6 Danksagung

Ich möchte allen danken, die durch ihren Beitrag das Entstehen dieser Arbeit unterstützt und ermöglicht haben.

Herrn Dr. Frank Schnieders danke ich dafür, daß er mir ein guter Lehrer war, nie den Spaß an der Diskussion verloren hat, daß er mir den Freiraum gelassen hat und die Unterstützung gegeben hat, alle Ideen zu verwirklichen. Ohne die Teamarbeit mit Dr. Schnieders hätte es dieses Projekt nie gegeben.

Frau Prof. Dr. Ulrike Beisiegel danke ich für ihre Betreuung, Unterstützung und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach danke ich für seine Bereitschaft diese Arbeit als Dissertationsgutachter zu betreuen.

Der Arbeitsgruppe Beisiegel danke ich für die stete Hilfe und Diskussionsbereitschaft und den kollegialen Umgang. Es ist eine Freude, Teil dieser Arbeitsgruppe zu sein.

Herrn Prof. Hans Will und Herrn Prof. Günter Adam danke ich für die Bereitschaft als Disputationsgutachter tätig zu sein.

Herrn Prof. Dr. Detlev Ameis danke ich für die Aufnahme in sein Labor, für Diskussion, Anregung und vielfältige Unterstützung.

Der Arbeitsgruppe Ameis danke ich für Hilfe und Unterstützung im Laboralltag und für das hervorragende Betriebsklima. Mein besonderer Dank geht dabei an Dr. Olliver Zschenker, mit dem ich immer eine gute Zeit in Büro und Labor hatte sowie an Denise Juhr, Caro Schön, Mirjam Koger, Alexandra Zielinski, Christina Bähr und Joanna Schmid. Die Zusammenarbeit hat mir viel Freude gemacht.

Mareike Geißler und PD Dr. Süleyman Ergün danke ich für die umfassende Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen.

Herrn Prof. Dr. Gerrit Krupski und Dr. Halrald Ittrich danke ich für die enge Zusammenarbeit und umfassende Unterstützung bei den MRT-Scans.

Dr. Lars Müller danke ich für die enge Zusammenarbeit, Diskussion und umfassende Unterstützung bei der Durchführung der Ratten-OPs.

Herrn Rudolf Didszuhn danke ich für seine technische Unterstützung bei Softwareproblemen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung und auch während der Promotionszeit immer in jeder Weise unterstützt haben.

Danke!