

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

---

# **Wirkung**

## **immunstimulatorischer Gentherapie auf das hepatozelluläre Karzinom in der Ratte**

**Dissertation**

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

**Daniel Philipp Pfalzgraf**  
aus Köln

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 22.01.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der /die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. L. Fischer

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Arbeitshypothese .....	3
1. Einleitung .....	4
1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC) .....	4
1.2 Tumorabwehr und Immunantwort: Bedeutung verschiedener Immunzellen zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten .....	6
1.3 Tumorgentherapie .....	7
1.3.1 Vektoren für die Tumorgentherapie .....	7
1.3.2 Tumorgentherapie mit immunstimulatorischen Cytokinen .....	10
1.3.3 Interleukin-12 .....	11
1.3.4 Interleukin-2 .....	15
1.3.5 Kombinationstherapie mit IL-12 und IL-2 .....	15
1.3.6 Kostimulatoren .....	16
1.3.7 B7 .....	17
1.3.8 4-1BBL .....	18
1.4 Durchflusszytometrische Analysen .....	19
1.5 Zielsetzung .....	20
2 Material und Methoden .....	22
2.1 Zellkultur .....	22
2.1.1 Verwendete Zellen .....	22
2.1.2 Passagieren der Kultur .....	23
2.1.3 Einfrieren von Zellen .....	23
2.1.4 Auftauen eingefrorener Zellen .....	24
2.1.5 Vorbereitung der Zellen zur Inokulation .....	24
2.2 Adenovirale Vektoren .....	25
2.3 HCC-Modell in der Ratte .....	27
2.3.1 Tiere .....	27
2.3.2 Tumor- und Virusinokulation .....	28
2.3.3 Magnetresonanztomographie (MRT) der Ratten .....	29
2.3.4 Präparation der Ratten zur Gewinnung von Gewebeproben .....	31
2.4 Isolierung von Milz-, Leber-, und Tumorzellen für die Durchflusszytometrie ...	32
2.5 Durchflusszytometrie .....	34
2.6 Blutentnahme bei Buffaloratten .....	35
2.10 Serumanalysen .....	36
2.11 Immunhistologie .....	37
2.11.1 APAAP-Methode .....	37
2.12 Histologie .....	41
2.12.1 Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE) .....	41
2.13 Liste der Antikörper .....	42
2.14 Statistik .....	44
3 Ergebnisse .....	45
3.1 Gewichtsentwicklung .....	45
3.2 Tumolvolumenentwicklung .....	46
3.3 Serumanalysen .....	52
3.3 Serumanalysen .....	53
3.4 Auswertung der Serumanalysen .....	53
3.5 Etablierung der Lebendzellpräparation .....	62

3.6 Histologische Analyse der Immunzellinfiltrate in den Tumoren und dem Lebergewebe .....	69
3.6.1 Etablierung von Histologieprotokollen .....	69
3.6.2 Auswertung der Histologien.....	72
4 Diskussion .....	85
4.1 Gewichtsverläufe .....	85
4.2 Behandlungsverlauf anhand der Tumorumfänge.....	85
4.3 Serumanalysen .....	87
4.4 Methodvalidierung der Zellpräparation und Lebend-Tod-Färbung .....	89
4.5 Histologische Untersuchungen zur Infiltration des Tumor- und Lebergewebes mit Immunzellen.....	89
Ausblick.....	92
Aktuelle klinische Ergebnisse genetischer Immuntherapie mit Zytokinen .....	92
5 Zusammenfassung .....	94
6 Abkürzungsverzeichnis.....	96
7 Abbildungsverzeichnis und Verzeichnis der Tabellen.....	98
8 Literaturverzeichnis .....	100
Danksagung .....	119
Lebenslauf.....	120

## **Arbeitshypothese**

Der Tumorthherapie mit immunstimulatorischen Zytokinen liegt die Erkenntnis zugrunde, dass Tumorzellen der Erkennung durch die körpereigene Abwehr entgehen und auf diese Weise ungehindert wachsen können. Durch den Einsatz geeigneter Zytokine und Kostimulatoren lässt sich eine Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem erreichen, was im günstigsten Fall zu einer vollständigen Regression des Tumors und sämtlicher Metastasen führt. Da die systemische Applikation von Zytokinen in zahlreichen Fällen von schweren toxischen Nebenwirkungen gefolgt war, gilt es, die verwendeten Zytokine und Kostimulatoren möglichst lokal einzusetzen, was sich im Falle des hepatozellulären Karzinoms gut mittels adenoviraler Vektoren verwirklichen lässt.

Der zum Zweck einer solchen Tumorthherapie in der Arbeitsgruppe entwickelte Vektor erlaubt die Expression von IL-12, IL-2 und 4-1BBL. Um die Einzelwirkungen der immunstimulatorischen Faktoren bestimmen zu können, wurden zwei weitere Vektoren konstruiert, von denen der eine nur für IL-12 und der andere für IL-12 und 4-1BBL zusammen kodiert. Die Vektoren induzierten im verwendeten Tumormodell eine deutliche Tumorregression in den Buffaloratten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung der drei Vektoren gegen HCC-Tumoren im Niedrigdosisbereich zu untersuchen. Hierzu sollten die mittels MRT bestimmten Tumorgrößen ausgewertet und die Immunzellinfiltration durch histologische Färbungen begutachtet werden. Des Weiteren galt es, ein Protokoll zur Lebendzellpräparation zu etablieren, das in Zukunft auch quantitative Aussagen zur Infiltration von Tumorgewebe mit Immunzellen erlauben soll.

# 1. Einleitung

## 1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Als maligner Tumor mit hepatozellulärer Differenzierung ist das hepatozelluläre Karzinom in Afrika und Südostasien einer der häufigsten Tumoren, für den es eine Reihe prädisponierender Faktoren gibt:

- Hepatitis B-Virus-Infektion
- Aflatoxine
- Alkohol
- Steroide (Anabolika)
- Hepatitis C-Virus-Infektion
- Stoffwechselerkrankungen (Hämochromatose,  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangel, Glykogenspeicherkrankheit Typ I und hereditäre Tyrosinämie)

(Okuda 2000)

In den westlichen Industrieländern ist das HCC relativ selten. (Die Inzidenz in Europa und den USA beträgt etwa 3 Fälle / 100 000 Einwohner im Jahr). In Südafrika und Ostasien liegt die Inzidenz bei 50-150 Fällen / 100 000 Einwohnern im Jahr. Die in Abb. 1 dargestellte Karte bietet einen guten Eindruck über das unterschiedliche Auftreten des hepatozellulären Karzinoms (aus Böcker, Denk, Heitz: Pathologie, 2001 nach GloboCan, IARC, Lyon, 1997).

Die Bedeutung der Prävention wird besonders deutlich, wenn man sich die Therapiemöglichkeiten vor Augen führt (Okuda 2002, Hall et al. 2003):

Das HCC lässt sich mit konventioneller Chemotherapie kaum behandeln (Venook 1994). Die Operabilität variiert stark mit dem makroskopischen Tumortyp, wobei es für Patienten mit multiplen Tumorherden noch immer keine effiziente Therapie gibt, da sich hier auch keine Chemoembolisationen durchführen lassen. Die Radiofrequenzablation stellt ebenfalls nur für einige Fälle eine Behandlungsmöglichkeit dar (Guglielmi et al. 2003). Die Prognose ist nach wie vor insgesamt schlecht (Colombo 2001, Venook 1994). Hinzu kommt die beim HCC

ausgeprägte Tendenz zur Gefäßinvasion sowie zur intra- und extrahepatischen Metastasierung (insbesondere in Lunge, Knochen und Haut), die eine Behandlung im fortgeschrittenen Stadium zusätzlich erschweren.

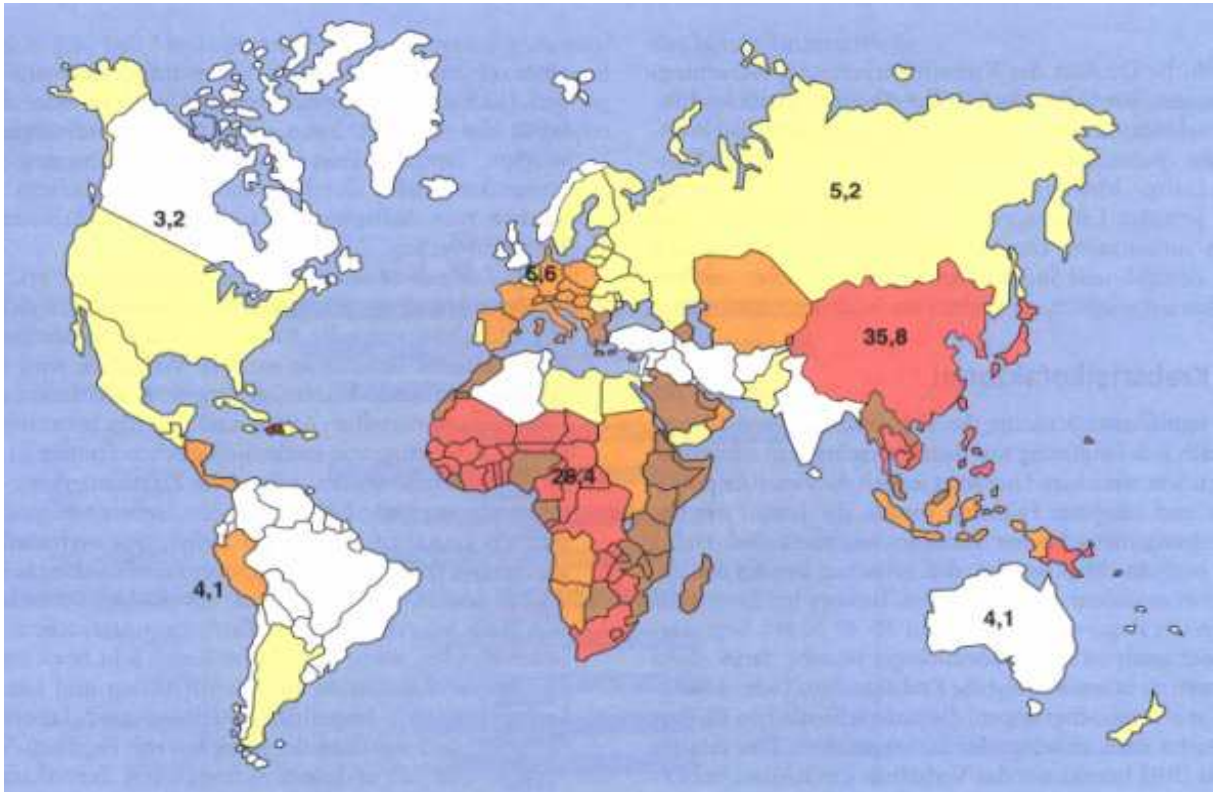


Abb. 1: Inzidenz des HCC weltweit. Die Zahlen entsprechen den Neuerkrankten je 10 000 Einwohnern pro Jahr für die jeweiligen Länder. (aus Böcker, Denk, Heitz: Pathologie, 2001 nach GloboCan, IARC, Lyon, 1997)

Makroskopisch unterscheidet man beim HCC massive, multinoduläre und diffuse Typen der Tumoren, deren Farbe je nach Differenzierung braunrot, grünlich oder grauweiß ist.

Mikroskopisch sind die Tumorzellen trabekulär angeordnet, doch finden sich auch tubuläre und papilläre Strukturen. Zwischen den mehreren Zellschichten dicken Trabekeln finden sich von Endothelzellen ausgekleidete sinusoidähnliche Bluträume, die frei von Kupferzellen sind. Es finden sich Nekrosen sowie häufig Gefäßeinbrüche.

Im Serum ist häufig ein Anstieg des  $\alpha_1$ -Fetoproteinspiegels festzustellen.

## ***1.2 Tumorabwehr und Immunantwort: Bedeutung verschiedener Immunzellen zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten***

Eine Problematik bei der Tumorabwehr besteht in einer mangelnden Bekämpfung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Zum einen ist die allgemeine Schwächung des Immunsystems eines Patienten zu nennen, wie sie durch fortgeschrittenes Alter, als Folge von Bestrahlung oder durch Immundefekte wie AIDS hervorgerufen werden kann. Zum anderen sind Defizienz und Toleranz als mögliche Gründe zu nennen. Defizienz beschreibt die Unfähigkeit eines Organismus, eine Immunantwort gegen den Tumor zu initiieren und ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass nicht für jedes Antigen auch immer ein entsprechender Immunzellklon existiert, so dass sich gewissermaßen eine Nische für den Tumor findet. Toleranz beschreibt das Ausbleiben einer adäquaten Immunreaktion gegen einen Tumor, wenn dieser eine zu geringe Immunität aufweist, sprich immunologisch körpereigenen Strukturen sehr ähnlich ist. Dass es im gesunden Individuum regelhaft zur Bekämpfung entarteter Zellen kommt (sofern die Immunität groß genug ist) wird u. a. durch die Beobachtung nahegelegt, dass immungeschwächte Patienten zur Ausbildung von Tumoren neigen. Hier sind zum einen Karposi Sarkome, non-Hodgkin-Lymphome wie das Burkitt-Lymphom, oder Angiosarkome bei AIDS zu nennen (Goedert et al. 1998, Dal Maso et al. 2001, Launay et al. 2003, Dal Maso et al. 2003), wobei weitere Tumorarten in diesem Zusammenhang untersucht wurden (Grulich et al. 2002), zum anderen ist ein Anstieg maligner Erkrankungen mit höherem Alter festzustellen (z.B. chronisch lymphatische Leukämien).

Reagiert das Immunsystem gegen einen Tumor, so laufen die gleichen Prozesse ab, die auch gegen andere Antigene ablaufen. Dies bedeutet, dass sowohl natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als auch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen an der Bekämpfung des Tumors beteiligt sind. Des Weiteren sind spezifische Antikörper für die Antitumorantwort des Immunsystems maßgeblich an der Vermittlung der zytotoxischen Reaktion der T-Killerzellen beteiligt.



## **1.3 Tumorgentherapie**

Die Genterapie stellt eine vielversprechende Möglichkeit der Tumorbehandlung dar. Zu den möglichen Behandlungsarten gehören die Therapie mit zytotoxischen Genen (*suicide gene therapy*, Yamamoto et al. 2001) oder aber mit so genannten *Prodrugs*; hierbei werden Medikamente wie Ganciclovir, die z.B. durch die vektorkodierte Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase (HSV-tk) aktiviert werden, eingesetzt (Kuriyama et al. 1999, Chen et al. 1994). Auch andere Kombinationstherapien - zum Beispiel mit Cyclophosphamid, IL-2 und tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Rosenberg et al. 1986) oder mit für IL-12 und Angiostatin kodierenden adenoviralen Vektoren (Gyorffy et al. 2001) - werden beschrieben. Einen guten Überblick über die Tumorgentherapie gewähren Wadhwa et al. (2002).

Die in dieser Studie angewandte Therapie mit immunstimulatorischen Cytokinen stellt eine weitere Art der Tumorgentherapie dar, durch die das Erkennen von Tumorzellen durch das Immunsystem erreicht wird. Hierbei werden die Immunzellen durch die genterapeutisch eingesetzten Cytokine aktiviert und zur Proliferation angeregt.

### **1.3.1 Vektoren für die Tumorgentherapie**

Für die *in vivo* Genterapie von Tumoren stehen verschiedene Behandlungsarten und Vektoren zur Verfügung. Neben der Therapie mit zytokinmodifizierten Tumorzellen (Siapati et al. 2003) spielen vor allem mehrere virale Vektoren eine bedeutende Rolle: das Vaccinia-Virus (Chen et al. 2001) findet ebenso Verwendung wie retrovirale (Tanaka et al. 2000, Kuriyama et al. 1999) und adenovirale Vektoren (Addison et al. 1995, Yamamoto et al. 2001).

Adenovirale Vektoren haben nicht nur den großen Vorteil, dass sie verhältnismäßig leicht hochkonzentriert hergestellt werden können, sie infizieren auch sowohl proliferativ aktive als auch nicht aktive Zellen (Mazzolini et al. 1999, Breyer et al. 2001); für die Behandlung des HCC von Vorteil ist des weiteren der hohe Hepatotropismus dieser Viren (Alemany et al. 2000).

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren ohne Hüllmembran mit Ikosaederstruktur und einem Durchmesser von 60-90 nm. Ihr Genom ist linear organisiert und 36 kB groß.

Sie verursachen typischerweise lokale Infekte des Respirations- und Gastrointestinaltraktes, können jedoch aufgrund der weiten, wenn auch für verschiedene Gewebe sehr variablen Verbreitung des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Fechner et al. 1999) eine Vielzahl von Zellen infizieren (Bramson et al. 1995), wobei es zu bemerken gilt, dass der CAR in zahlreichen, nicht jedoch allen Tumorzelllinien herunterreguliert ist (Pandha et al. 2003). Der CAR ist ein membranständiges 46-kDa Glykoprotein (Bergelson et al. 1997), das vermutlich Bestandteil der *Zonula occludens (tight junction)* ist (Cohen et al. 2001). Der Rezeptor erleichtert die Internalisation von Adenoviren und kann einen Einfluss auf das Zellwachstum haben (Okewanga et al. 2001, Okewanga et al. 2000). Über seine physiologische Bedeutung ist nach wie vor wenig bekannt (Cohen et al. 2001).

Der Wildtyp-Adenovirus bindet an die Ligandendomäne des CAR und über seine Pentonbasis an Integrine (membranständige Proteine der Wirtszelle) (Wickham et al. 1993, Soudais et al. 2000), wodurch es zur Internalisierung als *coated-pit*-Vesikel kommt (Wang et al. 1997). Sodann erfolgt die Aufnahme in Endosomen, wo Capsidproteine und ein kovalent an den DNA-Strang gebundenes Protein den lysosomalen Abbau durch Nucleasen verhindern. Durch Ruptur der Endosomenmembran wird das Nucleokapsid ins Cytosol freigesetzt, und nach Ablösung des Capsids wird das Genom in den Zellkern transferiert. Nun beginnt die Expression viruskodierter Gene: etwa acht Stunden nach der Infektion beginnt die Expression von E<sub>1</sub>, das die konsekutive Expression von E<sub>2</sub> (DNA-Polymerase), E<sub>3</sub> und E<sub>4</sub> transaktiviert. Diese fungieren als Transkriptionsregulatoren, die für die Replikation des viralen Genoms sorgen (Vorburger et al. 2002).

Ersetzt man nun die E<sub>1</sub>-Region durch andere Gene, so ermöglicht dies die Herstellung replikationsdefizienter Adenovirusvektoren (Graham et al. 1992, Bett et al. 1994). Inzwischen gibt es eine Anzahl weiterer Möglichkeiten der Deletion z.B. in der E<sub>3</sub>-Region und zwischen der E<sub>4</sub>-Region und dem Ende des Genoms, um replikationsdefiziente adenovirale Vektoren zu konstruieren (Vorburger et al. 2002). Die auf diese Weise konstruierten, mit Deletionen in verschiedenen Regionen

versehenen Vektoren zeigen bessere Wirkungen bei geringerer Toxizität (Schiedner et al. 1998).

Da das Genom von Adenoviren nicht in das Wirtsgenom eingebaut wird (Breyer et al. 2001), sinkt nicht nur das Risiko einer Insertionsmutation (Review: Vorburger et al. 2002), sondern auch die Gefahr toxischer Nebenwirkungen durch vektorkodierte Cytokine, die in zahlreichen Tierexperimenten (Colombo et al. 2002, Chen et al. 2001, Orange et al. 1995; teilweise IFN $\gamma$ -vermittelt: Sacco et al. 1997) und auch in einigen klinischen Studien (Robertson et al. 2002, Robertson et al. 1999, Lenzi et al. 2002, Leonard et al. 1997) bei höheren Dosen beobachtet wurden. Eine der Haupteinschränkungen der adenoviralen Gentherapie scheint durch die körpereigene Immunantwort gegen adenovirale Proteine zu bestehen, die eine wiederholte Vektorgabe uneffektiv machen (Yoon et al. 2001, Yang et al. 1994, Yang et al. 1993, Yang et al. 1995, Dai et al. 1995, Gilgenkrantz et al. 1995). Bramson et al. allerdings berichten, dass eventuell vorhandene Antikörper gegen Adenoviren keine Einschränkung bezüglich der Wiederholbarkeit einer Behandlung darstellen, sondern im Gegenteil eine Verringerung der Virus-Disseminierung von der Inokulationsstelle bewirken (Bramson et al. 1997). Die Bedeutung dieser Beobachtung wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass bei etwa 50% aller untersuchten Kinder in Washington im Alter von 6-11 Monaten bereits Antikörper gegen einen oder mehrere Serotypen von Adenoviren nachweisbar waren und der Prozentsatz derjenigen mit neutralisierenden Antikörpern mit zunehmendem Alter steigt (Heubner et al. 1954). Hilleman et al. (1955) berichten ebenfalls davon, dass mindestens 50% der Kinder bis zum Alter von 5 Jahren eine Infektion mit Adenoviren durchgemacht haben. Für die systemische Applikation (i.v.) der Vektoren ist zwar ein guter Transport zur Leber, dort aber die hauptsächliche Infektion von Hepatozyten und nur weniger Tumorzellen beschrieben (Yoon et al. 2001). Des Weiteren gilt, dass die Infizierbarkeit des Tumors auf vasculärem Weg abnimmt, je größer der Tumor zum Behandlungszeitpunkt bereits ist (Bilbao et al. 2000). Als mögliche Gründe gelten u.a. eine Blut-Tumor-Barriere für Adenoviren (Bilbao et al. 2000) und der Unterschied zwischen fenestrierten Lebersinusoiden und neoplastischen Blutgefäßen (Yoon et al. 2001), deren Aufbau von dem normaler Sinusoide verschieden ist (Dhillon et al. 1992). So erscheint die direkte Virusinokulation in den Tumor sinnvoll, bei der die um den Stichkanal liegenden Tumorzellen infiziert werden (Yoon et al. 2001, Bilbao et al.

2000), wodurch es zur hauptsächlichen Genexpression im Tumorgewebe kommt. Die dadurch bedingte lokale Produktion der Interleukine senkt die Gefahr toxischer Nebenwirkungen weiter (Mazzolini et al. 1998).

Die trotz allem stattfindende Infektion von benachbarten Hepatozyten geht auf rezirkulierende Adenoviren zurück, die den gut vaskularisierten Tumor vermutlich auf dem Blutweg verlassen (Yoon et al. 2001).

### **1.3.2 Tumorgentherapie mit immunstimulatorischen Cytokinen**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die die Genthherapie mit immunstimulatorischen Cytokinen wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 oder IL-12 als vielversprechende Möglichkeit der Krebstherapie erscheinen lassen (Barajas et al. 2001, Seidel et al. 1998, Brunda et al. 1993).

Für die primäre Immunantwort nach der Behandlung mit einem für IL-12 kodierenden adenoviralen Vektor scheinen vor allem NK-Zellen von größter Wichtigkeit zu sein (Pham-Nguyen et al. 1999, Yao et al. 1999). Sie werden durch die lokale IL-12-Produktion der transfizierten Tumorzellen chemotaktisch angelockt, zur Proliferation angeregt (Gately et al. 1992, Robertson et al. 1992) und in ihrer zytolytischen Aktivität gestärkt (Barajas et al. 2001, Kobayashi et al. 1989, Naume et al. 1992, Trinchieri 1995). Andererseits wird eine Antitumorwirkung durch IL-12 sowohl in NK-Zell-defizienten beige-Mäusen als auch in Mäusen ohne NK-Zellen beschrieben (Brunda et al. 1993), was die Bedeutung von Angiogeneseinhibition, Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung und direkte Wirkung von IL-12 auf Tumoren für die vollständige Tumorregression verdeutlicht (Review: Trinchieri 2003).

Die von uns untersuchte Behandlungsmethode nutzt die Expression von IL-12, IL-2 und 4-1BBL durch adenovirale Vektoren.

### 1.3.3 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) wird hauptsächlich von aktivierten inflammatorischen Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen (Macatonia et al. 1995), Mikroglia, und Monozyten produziert (Trinchieri 2003). Die Sekretion wird durch T-Zellen über IFN $\gamma$  (Ma et al. 1996) sowie durch Interaktion zwischen dem CD40-Liganden auf aktivierten T-Zellen und CD40 auf Makrophagen und dendritischen Zellen gefördert (Schulz et al. 2000). Des Weiteren erfolgt eine Stimulierung der IL-12-Produktion durch von NK-Zellen sekretiertes IFN $\gamma$  und IL-13 und durch Zell-Zell-Interaktion (Gerosa et al. 2002). Die T-Zellen und NK-Zellen wiederum werden im Rahmen der primären Immunantwort zur IFN $\gamma$ -Produktion angeregt. Gehemmt wird die IL-12-Sekretion durch IL-10 (D'Andrea et al. 1993), das die Synthese eines die IL-12-Gen-Transkription blockierenden Proteins induziert (Aste-Amazega et al. 1998). Außerdem wird die Bildung durch TNF, IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  gehemmt (Cousens et al. 1999).

Als heterodimeres Molekül besteht Interleukin 12 aus einer p35- und einer p40-Untereinheit (Stern et al. 1990, Kobayashi et al. 1989). Die beiden Untereinheiten des IL-12 müssen in derselben Zelle produziert werden, damit sich das biologisch aktive Cytokin bilden kann (Wolf et al. 1991). IFN $\gamma$ , dessen Produktion u.a. von IL-12 gefördert wird (Chan et al. 1991, Kobayashi et al. 1989, Kubin et al. 1994, Car et al. 1995, Wigginton et al. 2001, Manetti et al. 1994), fördert selbst die Transkription der p40- (Ma et al. 1996) wie auch die der p35-Untereinheit, was zur Bildung des Heterodimers führt (Trinchieri 2003). Hierbei handelt es sich also um einen sogenannten feed-forward Mechanismus (positive autokrine und parakrine Stimulation).

Aufgrund seiner aktivierenden (Kobayashi et al. 1989, Trinchieri 1995) und proliferationssteigernden (Perussia et al. 1992, Trinchieri 1995) Wirkung auf NK-Zellen (Barajas et al. 2001, Wolf et al. 1991, Trinchieri 1995), die es zur IFN $\gamma$  – Produktion anregt (Portielje et al. 2002, Mazzolini et al. 1999, Kobayashi et al. 1989, Manetti et al. 1994, Wolf et al. 1991, Seder et al. 1993, Trinchieri 1995, Chan et al. 1991), wurde es auch NK-stimulierender Faktor (NKSF) genannt (Kobayashi et al. 1989). Seine Bedeutung für die zellvermittelte Immunantwort geht jedoch weit über

diese Funktion hinaus: IL-12 stimuliert die antigenspezifische Antwort durch CD8-Zellen (Martarini et al. 2000, Curtsiger et al. 1999, Brunda et al. 1993), die CD4+ T-Zell-Antwort (Trincheri 1995, Hirschowitz et al. 1999) und hat antiangiogenetische Wirkung, die von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht wurde (Gee et al. 1999, Pertl et al. 2001, Barajas et al. 2001, Gerber et al. 2003). Diese ist auf eine IFN $\gamma$ -Wirkung zurückzuführen (Voest et al. 2003), da dieses die Produktion des Interferon-induzierbaren Proteins 10 (IP-10) fördert, welches schließlich die antiangiogenetische Wirkung vermittelt (Sgadari et al. 1996, Yao et al. 2000). Des Weiteren wird NK-Zellen ein entscheidender Beitrag zur antiangiogenetischen Wirkung von IL-12 zugeschrieben (Yao et al. 1999). Eine direkte hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum wird von einigen Autoren angezweifelt (in Brunda et al. 1993 erwähnte unveröffentlichte Beobachtungen), jedoch in einer Studie von Su et al. (2001) beschrieben. Auch die Induktion einer Antitumorimmunität durch IL-12 wird regelmäßig diskutiert (Hirschowitz et al. 1999, Bramson et al. 1997, Pützer et al. 1997).

Während die proliferationssteigernde Wirkung von IL-12 auf präaktivierte T- und NK-Zellen relativ ausführlich beschrieben ist (Perussia et al. 1992, Stern et al. 1990), wobei es zuerst zu einem Anstieg der NK-Zellzahl kommt, der ein - evtl. die NK-Zellen eliminierender - T-Zellanstieg folgt (Fogler et al. 1998), bleiben ruhende T- und NK-Zellen von der Anwesenheit von IL-12 weitgehend unbeeinflusst (Kobayashi et al. 1989, Perussia et al. 1992). Die Bedeutung dieser Zellen für die Antitumorwirkung von IL-12 ist weniger klar, obwohl sie Thema verschiedener Studien war. Mazzolini et al. (1999), Brunda et al. (1993) und Mogi et al. (2000) beschreiben übereinstimmend eine hervorragende Bedeutung von CD8+-Zellen für die Tumorregression. Im Gegensatz dazu sprechen Martinet et al. (2002) den NK-Zellen den entscheidenden Einfluß auf die Tumorzellen zu, den Pham-Nguyen et al. (1999) für die Initialphase der Antitumorantwort bestätigen, die jedoch für das Langzeitüberleben allein nicht ausreichen. In anderen Studien wird entweder den CD4+- und CD8+-Zellen (Guinn et al. 1999, Pützer et al. 2001, Tanaka et al. 2000) oder aber den CD8+- und NK-Zellen (Martinet et al. 2000) zusammen die Hauptwirkung zugeschrieben. In jüngerer Zeit wurde nun eine Tumorregression nach Behandlung mit IL-12 beobachtet, unabhängig davon, ob dem Versuchstier keine CD4+-, CD8+- oder NK-Zellen für die Antitumorwirkung zur Verfügung standen, solange nur die anderen beiden Zellarten

weiter zur Verfügung standen (Narvaiza et al. 2000). Da bei dem Fehlen einer einzigen Zellart der Einfluß auf das Tumorwachstum jedoch massiv abnimmt, scheint die entscheidende Rolle dem Zusammenspiel aller Immunzellen zuzukommen. Für die Wirkung auf Metastasen wiederum schlagen Siders et al. (1998) einen gänzlich von T- und NK-Zellen unabhängigen Mechanismus vor. Über die Frage, welchen Zellen bei der Antitumorwirkung durch IL-12 die größte Bedeutung zukommt, herrscht demnach nach wie vor Uneinigkeit.

Der Einsatz dieses äußerst effektiven Mediators IL-12 wird in der Praxis durch toxische Nebenwirkungen, die bei höheren Dosen auftreten können, leider erheblich eingeschränkt. Die Symptome reichen von Schüttelfrost, Fieber, Übelkeit und Ohnmacht über Leukopenie, Thrombozytopenie, hepatotoxische Nebenwirkungen, gastrointestinale Blutungen, Diarrhoe und katheterassoziierte Infektionen (Robertson et al. 2002, Robertson et al. 1999, Lenzi et al. 2002) bis zu tödlichen Komplikationen (Leonard et al. 1997). Bei systemischer Gabe lässt sich eine Verringerung der Toxizität durch wiederholte Verabreichung erzielen, doch sinkt gleichzeitig die Wirksamkeit (Portielje et al. 2003), was ein solches Vorgehen in der Praxis unbrauchbar macht. Die lokale IL-12-Produktion stellt folglich eine vielversprechende Alternative dar.

Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) selbst besitzt ebenso wie IL-12 Antitumoraktivität, wie aus Tierstudien bekannt ist (Gee et al. 1999, Brunda et al. 1987, Truitt et al. 1989-90, Brunda et al. 1986). Außerdem ist eine antiangiogenetische Wirkung für IFN $\gamma$  beschrieben (Gee et al. 1999, Coughlin et al. 1998, Majewski et al. 1996), die über IP-10 (IFN $\gamma$ -induzierbares Protein) vermittelt wird (Angiolillo et al. 1996, Sgadari et al. 1996). Die IFN $\gamma$ -Produktion wird posttranskriptional durch IL-12 und IL-2 reguliert (Hodge et al. 2002).

Zusammenfassend sind die Antitumorwirkungen von IL-12 in Abb. 2 dargestellt.

## Antitumorwirkung von IL-12

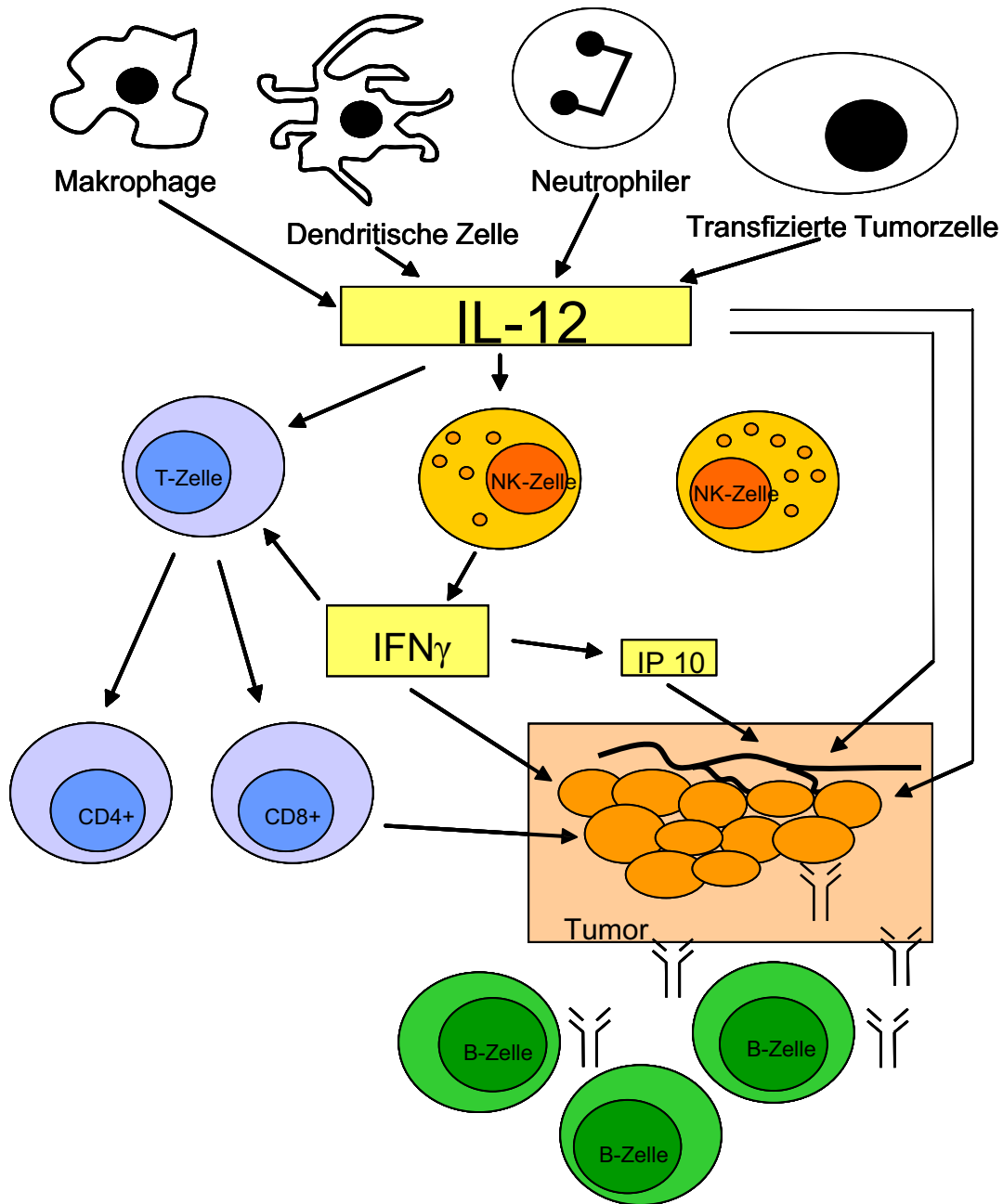


Abb. 2: Antitumorwirkung von IL-12.

IL-12 wird von verschiedenen Zellarten oder im Falle der Genterapie von transfizierten Tumorzellen gebildet (Macatonia et al. 1995, Trinchieri 2003). Es stimuliert die Proliferation und Zytotoxizität von CD8 $^{+}$ - (Martarini et al. 2000, Curtsiger et al. 1999) und NK-Zellen (Kobayashi et al. 1989, Mazzolini et al. 1999) sowie die CD4 $^{+}$ -Zell-Differenzierung (Trinchieri 1995, Hirschowitz et al. 1999); des Weiteren hat es direkte antiangiogenetische Wirkungen (Gee et al. 1999) und zytotoxische Wirkungen auf den Tumor. Das von den NK-Zellen gebildete IFN $\gamma$  stimuliert die T-Zellen (Trinchieri 2003), wirkt zytotoxisch auf die Tumorzellen (Gee et al. 1999) und entfaltet über IP 10 seine antiangiogenetische Wirkung (Sgadari et al. 1996). Als Teil der erworbenen Immunantwort bilden B-Zellen gegen den Tumor gerichtete Antikörper.



### **1.3.4 Interleukin-2**

Bei IL-2 handelt es sich um ein Zytokin, das hauptsächlich von stimulierten T-Zellen gebildet wird. Es gilt als einer der wichtigsten autokrinen Wachstumsfaktoren für T-Zellen und induziert deren Differenzierung zu Effektorzellen. Des Weiteren fördert IL-2 die Proliferation von NK-Zellen, steigert deren zytolytische Aktivität. Synergistisch mit IL-12 wird die IFN $\gamma$ -Produktion angeregt (Chan et al. 1992). Die IL-2-Antitumoraktivität wurde in einer ganzen Anzahl von Studien sowohl am Tiermodell (Tanaka et al. 2000, Addison et al. 1995, Cordier et al. 1995, Truitt et al. 1989-90) als auch am Menschen untersucht (Seidel et al. 1998, Lotze et al. 1986, Rosenberg et al. 1987). Hierbei beschreiben Hirschowitz et al. (1999) einen entscheidenden Einfluss von IL-2 auf die Aktivierung von CD8 $^+$ -Zellen, während Cordier et al. (1995) eine Infiltration des Tumors mit Makrophagen und T-Zellen beobachteten. Sogar eine IFN $\gamma$ -unabhängige NK-Zell-Zunahme ist beschrieben (Fogler et al. 1998). Wie IL-12 ist auch IL-2 in der Lage, eine Antitumorimmunität zu induzieren (Ertage et al. 1998, Addison et al. 1995, Cordier et al. 1995), wenngleich auch nicht in allen Modellen (O'Malley et al. 1997). In Kulturen humaner T-Zellen verhindert IL-2 auch die Ausbildung der Anergie, der antigeninduzierten Unfähigkeit zur Reaktionsbildung (Essery et al. 1988), die sich sonst in der Immunantwort finden kann.

Auch für IL-2 sind schwere toxische Nebenwirkungen beschrieben (Addison et al. 1998, Seidel et al. 1998, Chen et al. 2001, Toloza et al. 1996). So berichten Siegel et al. (1991) von Ödemen, Anämie, Fieber, Übelkeit und Hypotension nach Behandlung mit IL-2. Trudel et al. (2003) beobachteten Haematurie und grippeähnliche Symptome, die sich jedoch klinisch gut beherrschen ließen.

Histologisch führt die Behandlung mit IL-2 zu Nekrosen im Tumorgebiet und zur Infiltration mit Makrophagen und T-Zellen (Cordier et al. 1995).

### **1.3.5 Kombinationstherapie mit IL-12 und IL-2**

IL-2 und IL-12 wurden sowohl einzeln als auch in Kombination mit unterschiedlichem Erfolg eingesetzt. So beschreiben Mazzolini et al. (1999), Hirschowitz et al. (1999), Tanaka et al. (2000), Seidel et al. (1998) und Bramson et al. (1997) übereinstimmend

einen Rückgang im Tumolvolumen bei einer Behandlung mit für IL-12 kodierenden adenoviralen Vektoren, Barajas et al. (2001) und Caruso et al. (1996) beschreiben gar eine Totalremission in einem Teil der Fälle. Auch eine verlängerte Überlebenszeit durch IL-12 wurde beobachtet (Brunda et al. 1993). Für IL-2 beschreiben Hirschowitz et al. (1999), Seidel et al. (1998) und Emtage et al. (1998) übereinstimmend einen zeitweisen Rückgang im Tumolvolumen bei einer Behandlung mit einem für dieses Cytokin kodierenden Vektoren. Auch eine vollständige Remission bei einem Teil der Tiere wird gelegentlich beschrieben (Addison et al. 1995, Cordier et al. 1995). O'Malley et al. (1997) allerdings berichten, dass mit IL-2 allein kein zufriedenstellendes Ergebnis zu erreichen ist. Eine Antitumorimmunität wird ebenfalls für beide Cytokine beschrieben (Addison et al. 1995) und ist für IL-2 vermutlich auf eine CD8+-Reaktion zurückzuführen (Fearon et al. 1990).

Eine Kombination der beiden Cytokine wird in verschiedenen Arbeiten beschrieben und für sinnvoll erachtet (Hirschowitz et al. 1999, Vagliani et al. 1996, Pappo et al. 1995), wobei auch für die Kombinationstherapie mit IL-12 und IL-2 von toxischen Wirkungen berichtet wird (Chen et al. 2001).

### **1.3.6 Kostimulatoren**

Eine weitere Möglichkeit, die Antitumorwirkung von Cytokinen zu verstärken, besteht in der Kombination mit Kostimulatoren. Während das erste Signal für die Aktivierung naiver T-Zellen die Bindung von durch MHC-Moleküle präsentiertes Antigen (Ag) an den T-Zellrezeptor (TCR) ist, wird seit einiger Zeit angenommen, dass die Interaktion zwischen einem Kostimulator und dem jeweiligen Bindungspartner das zur T-Zellaktivierung zusätzlich benötigte zweite Signal stellen (Boussiotis et al. 1994). Das Fehlen eben dieser Kostimulation wird als ein möglicher Entstehungsmechanismus der Defizienz des Immunsystems gegenüber Tumoren diskutiert (Chen et al. 1993, Chen et al. 1992). Des Weiteren kann das Fehlen dieser Kostimulation auch dazu führen, dass T-Zellen ihren autokrinen Wachstumsfaktor IL-2 bei erneuter Stimulierung nicht produzieren können (Schwartz et al. 1990).

In den letzten Jahren wurde eine ganze Anzahl kostimulatorischer Moleküle beschrieben, darunter B7-1, B7-2 und 4-1BBL.

### **1.3.7 B7**

Zu den B7-Rezeptoren zählt man B7-1, B7-2, B7-H2 und B7-H3. B7-1 und seine Interaktion mit CD28 gehören zu den bisher am besten untersuchten Wirkungsweisen von Kostimulatoren (Allison 1994, Linsley et al. 1990).

Für die B7-1- bzw. -2-Expression müssen die meisten antigenpräsentierenden Zellen (APC) erst aktiviert werden (Hathcock et al. 1994), dann jedoch finden sie sich auf Makrophagen, dendritischen Zellen, aktivierten B-Zellen (Hathcock et al. 1994, Razi-Wolf et al. 1992) und T-Zellen (Azuma et al. 1993). Die Wirkungsweise von B7-1 und B7-2 ist von der des T-Zellrezeptors verschieden, obwohl alle drei über eine Tyrosin-Phosphorylierung wirken (Nunès et al. 1996). Über die CD28-Stimulation durch B7 kommt es zur Proliferation und Zytokinsekretion von T-Zellen und gleichzeitig über CTLA4 zur Limitierung der T-Zellexpansion (Gribben et al. 1995). Unabhängig von CD28 und CTLA-4 werden NK-Zellen durch CD80 und CD86 aktiviert (Wilson et al. 1999). B7-1, dessen Wirkung auf T-Zellen größer ist als die von B7-2 (van Dijk et al. 1996), ist stark synergistisch mit IL-12 in der Induktion der Proliferation und Zytokinproduktion durch T-Zellen (Pützer et al. 1997, Kubin et al. 1994). Durch die Kombinationsbehandlung mit B7-1 und IL-12 ließ sich eine vollständige Tumorregression erreichen (Emtage et al. 1998), wenngleich diese Wirkung vermutlich von der Tumorart abhängig ist (Chong et al. 1998). Sogar B7-1 alleine ist in der Lage, eine Tumoreradikation und Antitumorimmunität zu induzieren (Dessureault et al. 1999), wobei auch hier eine starke Abhängigkeit von der Tumorart gegeben ist (Chen et al. 1994). Als Mechanismen gelten hierbei eine Verlängerung der CD4+-Antwort, wobei deren IL-2-Produktion und klonale Expansion gefördert werden, sowie eine vorübergehende CD8+-Antwort (Deeths et al. 1997).

B7-H2 und –H3 werden von nicht lymphoiden Geweben expremiert und beeinflussen periphere Lymphozyten. Kürzlich wurde eine Tumorbehandlung mit B7-H3 beschrieben, die in einigen Tieren zu einer vollständigen Tumorregression führte und

darüber hinaus eine CD8<sup>+</sup>- und NK-Zell-vermittelte Tumormunität hervorrief (Sun et al. 2003).

### **1.3.8 4-1BBL**

4-1BBL, ein bisher weniger erforschter Kostimulator, könnte sogar eine größere Effektivität als B7-1 (CD80) für direkte Antigenpräsentation durch Tumorzellen in der primären Antitumorantwort besitzen (Mogi et al. 2000).

4-1BBL ist ein der Familie der Tumornekrosefaktoren angehörendes Glykoprotein des Typs II (Alderson et al. 1994, Goodwin et al. 1994), das typischerweise an ein auf aktivierten, nicht aber auf ruhenden T-Zellen exprimiertes Transmembranprotein – 4-1BB – (Pollok et al. 1993) bindet. Kommt es nun zusätzlich zur Stimulierung des T-Zellrezeptors (TCR) zu dieser Interaktion, so wird die Proliferation und Cytokinproduktion in T-Zellen angeregt (Hutardo et al. 1995). Besonders zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang die Förderung der Produktion von IL-2 (Hutardo et al. 1995, Chu et al. 1997,) und IFN $\gamma$  (Shuford et al. 1997), die an der Antitumorwirkung maßgeblich beteiligt sein könnten, sind doch beide Mediatoren selbst als gegen Tumoren wirksam bekannt (Tanaka et al. 2000, Addison et al. 1995, Cordier et al. 1995, Gee et al. 1999). Auch eine Antitumorimmunität durch 4-1BBL wird beschrieben, wobei diese durch Koexpression von 4-1BBL zusammen mit B7 die größte Wirkung zeigte (Guinn et al. 1999, Melero et al. 1998).

Bei Behandlung eines Tumors mit einem für 4-1BBL kodierenden Vektor beschreiben nun Melero et al. (1998) und Mogi et al. (2000) übereinstimmend Tumorregression. Die Zellart, deren durch 4-1BBL induzierte Proliferation für die Antitumor-Wirkung die größte Bedeutung zu haben scheint, sind CD8<sup>+</sup>-Zellen (Melero et al. 1998 und Mogi et al. 2000), wobei deren Stimulation IL-2-unabhängig zu sein scheint (Shuford et al. 1997). Auch zeigen Chu et al. (1997), dass sich die Th1- und Th2-Antwort unabhängig von einem CD28-Signal ausbilden kann.

Eine physiologische Expression von 4-1BBL findet sich nur auf einigen antigenpräsentierenden Zellen (APC) (Pollok et al. 1993, Alderson et al. 1994), darunter aktivierte B-Zellen, Makrophagen (Pollok et al. 1994) und dendritische Zellen (Ruiz et al. 2001), wobei es erst nach T-Zellaktivierung durch Stimulierung des TCR in Gegenwart von Cytokinen oder in Kombination mit CD28-Ligandenbindung (Pollok et al. 1993) zur Expression des 4-1BBL auf den T-Zellen kommt.

Ein ernsthafter Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten bezüglich der Rolle der einzelnen Komponenten der Antitumor-Immunreaktion wird dadurch erschwert, dass ein Gutteil der Untersuchungen an unterschiedlichen Tumormodellen mit ungleicher Immunität, Erreichbarkeit durch den jeweiligen Vektor usw. durchgeführt wurden. So werden Zellen des hepatozellulären Karzinoms (Barajas et al. 2001) genauso in Tumormodellen verwendet wie Zellen des follikulären Schilddrüsenkarzinoms (Zhang et al. 2003) und Lebermetastasen des Mammakarzinoms (Martinet et al. 2002). Folglich können die obigen Ausführungen allenfalls einen Überblick über die Immunantwort gegen Tumoren bieten, sie aber nicht erschöpfend behandeln.

#### ***1.4 Durchflusszytometrische Analysen***

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Zellen diskriminiert nach ihrer Granularität oder mit spezifischen Antikörpern nach Oberflächenmolekülen zu zählen. Das zugrundeliegende Prinzip macht sich einerseits die verschiedene Lichtstreuung zunutze, die Zellen verschiedener Größe und Granularität hervorrufen, wenn ein Lichtstrahl auf sie trifft, andererseits die Fluoreszenz mit entsprechenden Farbstoffen markierter spezifischer Antikörper.

In der Durchflusszytometrie wird monochromatisches kohärentes Licht verwendet, wie es von Argon-Lasern produziert wird. Durch eine bestimmte Technik werden die Zellen so in das System des Durchflusszytometers gewirbelt, dass sich die Zellen alle einzeln hintereinander anordnen und so im rechten Winkel den Laserstrahl kreuzen. Um eine optimale Messung durchführen zu können, muß unter anderem

der Durchmesser des Lichtstrahls kleiner als der Zelldurchmesser sein und die Zelle in ihrem Strom mittig fließen, da nur dann die Fluorochrome maximal angeregt werden und das gebeugte Licht ausschließlich partikelabhängig ist. Der Brechungsindex und die Partikelgröße werden nun vom Engwinkelstreulicht (*forward scatter*) erfasst, die Granularität einer Zelle erfasst das Weitwinkelstreulicht (*side scatter*), wodurch sich verschiedene Zellarten unterschiedlich darstellen. Da sich Zellen aber im Flussstrom des Gerätes nicht immer optimal ausrichten, ist das Streulicht variabel, was eine Darstellung der Zellpopulationen als Punktwolken zur Folge hat. Hierbei wandelt das Durchflusszytometer die durch die Messung gewonnenen Spannungsimpulse über analoge schließlich in digitale Signale um, die sich sowohl im Computer speichern als auch weiter bearbeiten lassen. (Nebe 1996)

Der große Vorteil bei der Untersuchung von Zellen mittels Durchflusszytometrie besteht darin, dass sie eine quantitative Beurteilung der betrachteten Zellen erlaubt, wobei innerhalb relativ kurzer Zeit zahlreiche Proben begutachtet werden können. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Histologie dar, die für eine qualitative Aussage zwar gut geeignet ist, allerdings allenfalls eine semiquantitative Beurteilung ermöglicht.

## **1.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von IL-12, IL-2 und 4-1BBL auf das hepatozelluläre Karzinom im Rattenmodell. Die Zytokine IL-12, IL-2 und der Kostimulator 4-1BBL erreichen ihren Wirkort - den Tumor – durch adenovirale Vektoren, die direkt in den Tumor inokuliert werden. Zu diesem Zweck sollen einerseits die Entwicklung der Tumorumfänge mittels MRT beobachtet und ausgewertet werden, andererseits soll die Immunzellinfiltration in das Leber- und Tumorgewebe histologisch untersucht und ein Protokoll zur Zellvereinzelnung aus Geweben etabliert werden, um immunologische Untersuchungen in Zukunft durchflusszytometrisch durchführen zu können. Des Weiteren sollen eventuelle toxische Wirkungen auf die Leber durch diese Behandlungen anhand der

Serumparameter GOT und GPT durch Vergleich der bestimmten Werte zu zwei Behandlungszeitpunkten bestimmt werden.

Eine der Möglichkeiten, toxische Effekte durch die Interleukine zu vermeiden, ist die Dosisreduktion. Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen, die mit Dosen von  $10^8$ - $10^9$  plaque forming units (pfu) (Mazzolini et al. 1999) oder  $5 \times 10^8$  pfu (Addison et al. 1995) arbeiten, ist schon die von Dr. Reinhard Wähler in dieser Arbeitsgruppe in einer vorherigen Studie verwendete Dosis von  $5 \times 10^6$  infectious units (i.u.), bei der noch 80% der behandelten Tiere eine Totalremission zeigten, verhältnismäßig niedrig. Die in der aktuellen Studie verwendete Dosis von nur  $1 \times 10^6$  i.u. soll nun zeigen, ob und gegebenenfalls welche Effekte sich hier noch nachweisen lassen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Verwendete Zellen

Bei den für die Tumoringokulation verwendeten MH-7777A-Zellen handelt es sich um Rattenhepatomzellen, die von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen wurden. Die einem Lebertumor einer Buffalo-Ratte entstammende Zelllinie wächst in Monolayern und zeigt runde polymorphe Zellen.

Diese Zelllinie wurde bisher bereits am UKE zur Tumoringplantation verwendet (Krupski 2001).

Die Zellen sind laut Angabe des Herstellers DSMZ negativ für reverse Transkriptase und frei von Mycoplasmen. Der Zellkulturschrank hat eine Temperatur von 37°C bei einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5%.

#### Material

- Zellen: MH-7777A Rattenhepatomzellen (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, No. ACC 345)
- Waschlösung: Dulbecco's PBS (Invitrogen Corporation, Cat.No.14190-094)
- Medium für MH-7777A-Zellen: 500ml Medium enthalten 370ml Dulbecco's MEM ohne Glutamax (Invitrogen Corporation, Cat.No.41965-039), 100ml Horse Serum, hitzeinaktiviert (GIBCO BRL, Cat.No.26050-047), 25ml FCS (GIBCO BRL, Cat.No. 011-06290), 0,5ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen Corporation, Cat.No.15140-122) und 5ml L-Glutamin 200MM (Invitrogen Corporation, Cat.No. 25030-024)
- Trypsin-EDTA (Invitrogen Corporation, Cat.No. 25300-054)
- FCS –Fetal Calf Serum (GIBCO BRL, Cat.No. 011-16290)



- DMSO –Dimethyl Sulfoxide (Sigma, Cat.No. D-5879)
- Zellkulturflaschen: Nunclon  $\delta$ Surface (Nalge Nunc International, Cat.No. 147589)
- Totfarbstoff: Trypanblau

### **2.1.2 Passagieren der Kultur**

Da Zellen konfluent wachsen und durch Kontaktinhibition in ihrer Teilungsfähigkeit eingeschränkt werden, müssen die Zellkulturen zur Vermehrung regelmäßig geteilt werden.

1. Das Medium wird aus der T75-Zellkulturflasche entfernt.
2. Mit 15 ml PBS (37°C) wird die Kultur vorsichtig gewaschen und das PBS wieder abgesaugt.
3. Es wird 1 ml Trypsin (37°C) zugegeben und mit den Zellen 3-5 min lang inkubiert.
4. Durch leichtes Klopfen werden die Zellen vom Flaschenboden gelöst.
5. Nun werden 7 ml Medium hinzugegeben und der Zellrasen unter mehrmaligem Wiederaufnehmen des Mediums vom Flaschenboden abgespült.
6. Durch erneutes Aufnehmen der Zellsuspension und anschließendes Auspumpen gegen den Widerstand des Flaschenbodens werden die Zellen vereinzelt.
7. Für eine 1:4 Passage werden nun 2 ml in eine mit 15 ml vorgewärmten Mediums bestückte T75-Flasche gegeben.
8. Durch leichtes Bewegen der liegenden Flasche werden die Zellen und das Medium verteilt.
9. Abschließend werden die Zellen mikroskopisch kontrolliert.

### **2.1.3 Einfrieren von Zellen**

Zur Aufbewahrung werden die Zellen mit DMSO stabilisiert und bei –196°C eingefroren.

1. Das Medium wird aus der T300-Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit 15 ml PBS gewaschen; das PBS (37°C) wird entfernt.

2. Es werden 5 ml Trypsin (37°C) zugegeben und mit den Zellen 3-5 min inkubiert.
3. Durch leichtes Klopfen werden die Zellen vom Flaschenboden gelöst.
4. Es werden 15 ml Medium zugegeben und der Zellrasen unter mehrmaligem Wiederaufnehmen des Mediums vom Flaschenboden abgespült.
5. Nun wird die Zellsuspension für 10 min bei 500 X g und 4°C zentrifugiert.
6. Der Überstand wird entfernt.
7. Das Zellpellet wird in 15 ml Medium aufgenommen und gut durchmischt.
8. Erneut wird bei 500 X g und 4°C für 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt.
9. Den Zellen (ca. 1 ml) werden 4ml reines FCS und 600 µl DMSO zugesetzt. Sodann werden sie mit FCS auf 6 ml aufgefüllt.
10. Die Zellen werden in mit Datum, Zellname und Passagenzahl beschrifteten Kryoampullen zuerst bei –20°C, später bei –196°C eingefroren.

#### **2.1.4 Auftauen eingefrorener Zellen**

Das für die Stabilisierung der Zellen bei –196°C benötigte DMSO ist für das Zellwachstum schädlich, weshalb es ausgeschwemmt werden muss.

1. Die Ampulle enthält die Zellen in 90% FCS und 10% DMSO.
2. Die Ampulle wird zügig aufgetaut.
3. Der Ampulleninhalt wird mit 15 ml Medium (37°C) in eine T75-Zellkulturflasche pipettiert.
4. Nach 3-4-stündiger Inkubation wird das Medium entfernt und 15 ml frischen Mediums werden zugegeben (nun ist das DMSO ausgeschwemmt).
5. Es erfolgt eine mikroskopische Kontrolle der Zellen.
6. Am nächsten Morgen wird das Medium erneut gewechselt.

#### **2.1.5 Vorbereitung der Zellen zur Inokulation**

Um eine relativ genau bestimmte Zellzahl inokulieren zu können, müssen die Zellen gezählt und auf eine bestimmte Konzentration gebracht werden.

1. Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen vorsichtig mit 15 ml PBS in der T75-Flasche gespült und anschließend das PBS entfernt.
2. Die Zellen werden mit 1 ml Trypsin überschichtet und 2 min inkubiert.
3. Es werden 6 ml DMEM zugegeben und der Zellrasen unter mehrmaligem Wiederaufnehmen des Mediums vom Flaschenboden abgespült.
4. Die Zellsuspension wird nun 10 min bei 500 X g und 4°C zentrifugiert.
5. Nach Entfernung des Überstandes wird das Zellpellet in 10 ml PBS gelöst und 5 min bei 500 X g und 4°C zentrifugiert.
6. Bis auf einen kleinen Überstand wird das PBS abgesaugt.
7. Das verbliebene PBS wird mit dem Pellet aufgemischt.
8. Es werden 10 µl abpipettiert und mit Trypanblau (mindestens 1:1) gefärbt.
9. Von den gefärbten Zellen werden erneut 10 µl abpipettiert und auf eine Zählkammer gegeben, wo nun die lebenden (nicht angefärbten) Zellen gezählt werden.
10. Ist auf diese Weise die Zellkonzentration bestimmt, so werden die nötigen Verdünnungen berechnet, da die beiden Tumoren durch eine unterschiedliche Zellzahl gebildet werden sollen:
  - rechter Tumor: 20 ml mit einer Zellzahl von  $3,25 \times 10^4$ /ml
  - linker Tumor: 20 ml mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$ /ml

## **2.2 Adenovirale Vektoren**

Bei den verwendeten adenoviralen Vektoren handelt es sich um ein von der Firma Q-BIOgene erworbenes Kontrollvirus (Ad5.Null, Cat.No. ADV0060), im folgenden Ad-0 genannt, sowie um drei von Dr. Reinhard Wähler im Rahmen seiner Doktorarbeit konstruierte Vektoren. Ad-0 ist ein Adenovirus, das keine Transgene oder Expressionskassetten enthält. Der Ad-1 Vektor kodiert für IL12, Ad-2 hingegen für IL12 und 4-1BBL. Ad-3 schließlich führt zur Expression von IL12, 4-1BBL und IL2. Als IL12 wird hier das Einketten-IL12 (scIL 12) bezeichnet. Die Vektoren Ad-1, Ad-2 und Ad-3 bauen auf einem in E<sub>1</sub> und E<sub>3</sub> deletierten Adenovirus auf.

Bei den verwendeten Genen handelt es sich um murine Gene, die auch in der Ratte translatiert werden können. Sie stehen unter der Kontrolle eines Promotors aus dem

humanen Cytomegalievirus und sind in verschiedenen Expressionskassetten lokalisiert. Das Gen für IL-12, das sich in allen drei Vektoren in der ersten Expressionskassette befindet, wird am stärksten exprimiert, während das in der dritten Expressionskassette lokalisierte Gen für IL-2 die geringste Ausprägung erfährt.

Der Aufbau der Vektoren ist im Folgenden schematisch dargestellt.

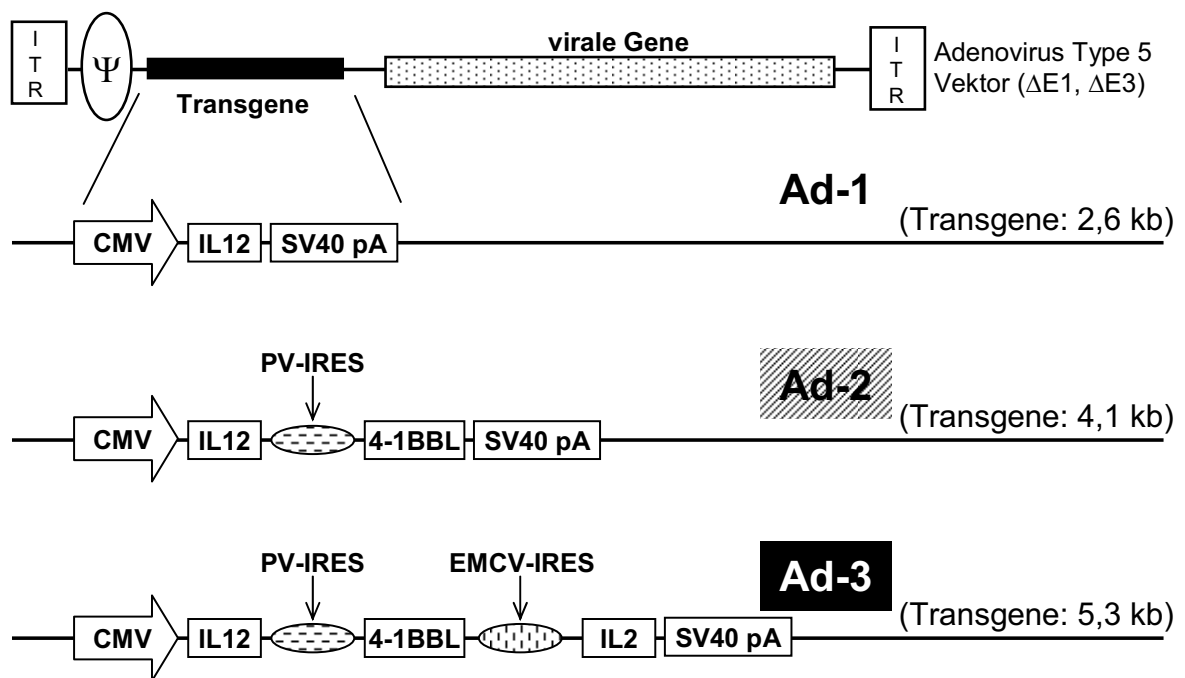


Abb. 3: Die adenoviralen Vektoren Ad-1, Ad-2 und Ad-3 in schematischer Darstellung. Die Größe der gesamten Transgenkassette (inkl. CMV und pA) ist für jeden Vektor rechts angegeben. ITR: Inverted Terminal Repeat;  $\Psi$ : eine als Verpackungssignal bezeichnete DNA-Sequenz des Adenovirus; CMV: Promotor aus dem humanen Cytomegalovirus; 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.

Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. R. Wähler zur Verfügung gestellt. (Wähler 2003)

Das zur Behandlung verabreichte Virusvolumen betrug 30  $\mu$ l mit einer Viruskonzentration von  $1 \times 10^6$  i.u.

## **2.3 HCC-Modell in der Ratte**

In der vorliegenden Arbeit fanden MH-7777A-Zellen Verwendung. Diese niedrig differenzierten, schnell wachsenden Hepatomzellen werden in Kultur vermehrt und sodann auf eine Konzentration von  $3,25 \times 10^4$ /ml Zellen für den rechten bzw.  $5 \times 10^4$ /ml Zellen für den linken Tumor gebracht. Je 20 ml der jeweiligen Zellsuspension werden männlichen Buffalo-Ratten in den rechten bzw. den linken Leberlappen inokuliert. Der rechte Leberlappen dient in diesem Fall als Modell einer Lebermetastase, die nicht direkt behandelt wird.

### **2.3.1 Tiere**

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um einen Inzuchtstamm von Buffaloratten der Art *Rattus norvegicus* (Wanderratte). Die Ratten wurden erworben von der niederländischen Zweigstelle der Firma Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, USA.

Die Tiere wurden in Normalkäfigen gehalten und bekamen Hartfutterpellets als Nahrung. In den ersten vier Wochen nach Tumornokulation wurde den Tieren Wasser mit Novalgin (Novaminsulfon-ratiopharm Tropfen, PZN – 3530402) angeboten; 450 ml enthalten 12 Tropfen Novalgin. In den folgenden zwei Wochen bekamen sie reines Wasser.

Tierversuchsleiter war Dr. Frank Schnieders, Leiter der Arbeitsgruppe Gentherapie des Instituts für Molekulare Zellbiologie, Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Der Tierversuch wurde von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Gesundheits- und Veterinärwesen, Tesdorpfstr. 8, 20148 Hamburg unter der Nummer 56/02 genehmigt.

### 2.3.2 Tumor- und Virusinokulation

#### Material

- Ketamin-Stock: 25 mg/ml (Ketanest, Pfizer; PZN 7829486)
- Rompun-Stock: 20 mg/ml (Rompun 2%, Bayer; PZN 1320422)
- Betäubungsgemisch: 6 mg/ml Ketanest, 1,6 mg/ml Rompun in 0,9% NaCl (für 50 ml: 12 ml Ketanest, 4 ml Rompun und 34 ml 0,9% NaCl)
- BD Micro-Fine U100 Insulinspritzen (Becton Dickinson, Cat.No. Ref 320813)
- Diethylether (Merck, Cat.No. 159016)
- Tumorzellen: MH-7777A Rattenhepatomzellen (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, No. ACC 345)
- Behandlung: als Vektoren dienen die in unserem Labor entwickelten Ad-1, Ad-2, Ad-3
- als Kontrollbehandlungen kommen zum Einsatz: Ad-0 (Ad5.Null, Q-BIOgene, Cat.No. ADV0060) sowie Dulbecco's PBS (Invitrogen Corporation, Cat.No.14190-094)
- Operationsbesteck (Fine Scientific Tools, diverse Instrumente)
- Nahtmaterial: Vicryl (Polyglactin 910, Ethicon, Inc., Johnson & Johnson)
- Histacryl (Aesculap, Cat.No. A191050052)
- Leukosilk

#### Prozedur

1. Die Ratte wird in einen Exsikkator gesetzt, der unter der Bodenplatte mit ethergetränkten Papiertüchern gefüllt ist.
2. Hat das Tier das Bewusstsein verloren, so wird es mit Ketamin/Rompun betäubt (etwa 0,6 ml Narkosemischung auf 10 g Körpergewicht), indem das Betäubungsmittelgemisch subcutan in den Unterbauch injiziert wird.
3. Den Tieren wird Leukosilk um die Beine geklebt und das Tier sodann mit durch das Leukosilk gestochenen Kanülen auf der Unterlage fixiert; während der ganzen Operation liegt vor der Nase des Tieres ein mit ethergetränkten Papiertüchern gefülltes 50 ml-Falcon, wodurch die Dauerhaftigkeit der Narkose gesichert wird.

4. Zeigt das Tier keine Reflexe mehr, so wird der Bauchraum mit einem etwa 3-4 cm langen Schnitt eröffnet, wobei zuerst die Haut, dann auch das Bauchfell durchtrennt wird.
5. Das Omentum majus wird zurückgeklappt und die entsprechenden Leberlappen werden aufgesucht.
6. Als Tumoren werden in den rechten Leberlappen 20 ml MH-7777A-Zellen ( $3,25 \times 10^4/\text{ml}$ ) gespritzt, in den linken Leberlappen 20 ml MH-7777A-Zellen ( $5 \times 10^4/\text{ml}$ ).
7. 30 sec nach dem Einspritzen der Zellen wird die Nadel aus der Leber herausgezogen und in genau diesem Moment auf die Einstichstelle Histacryl gegeben, wodurch ein Rückfluss der Tumorzellen aus der Leber und damit die Bildung von Bauchraummetastasen durch die Inokulation verhindert werden soll.
8. Nun wird das Omentum majus wieder in seine ursprüngliche Lage gebracht und sodann zuerst das Bauchfell und im Anschluß die Haut mit einer fortlaufenden Naht geschlossen.

Zur Behandlung wird anstelle der Tumorzellen der jeweilige Vektor beziehungsweise das PBS verabreicht, wobei die Inokulation nur in den linken Tumor erfolgt. Das verabreichte Virusvolumen beträgt 30  $\mu\text{l}$  mit einer Viruskonzentration von  $1 \times 10^6$  i.u. Direkt vor der Inokulation werden die Viren mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (cell saver tips, Biozym) aufgemischt und sodann in eine Micro-Fine Insulinspritze aufgezogen. Bei der Injektion selbst wird das Gesamtvolumen von 30  $\mu\text{l}$  an der Einstichstelle durch leichtes Zurückziehen und erneutes tieferes Einstechen auf eine größere Fläche verteilt.

### **2.3.3 Magnetresonanztomographie (MRT) der Ratten**

Die magnetresonanztomographische Untersuchung der Ratten dient sowohl der Größenabschätzung der Tumoren als auch der Verlaufskontrolle individueller Tiere.

#### **Material**

- Magnetom Symphony, 1,5 Tesla (Siemens)
- Diethylether (Merck, Cat.No. 159016)

- Betäubungsgemisch: 6 mg/ml Ketanest, 1,6 mg/ml Rompun in 0,9% NaCl (für 50 ml: 12 ml Ketanest, 4 ml Rompun und 34 ml 0,9% NaCl)

#### Prozedur

Die Ratten werden mit Diethylether betäubt, gewogen und bekommen sodann das Ketamin/Rompun-Gemisch injiziert, damit die Betäubung lange genug für die MRT-Messung anhält.

Die verwendete Spulenkombination ist folgende:

1. CP-Head (Kopfspule)
2. Oberflächenspulen (4 Stück):
  - 2 small flex loop coils ventral und dorsal der Untersuchungsregion (Leber)
  - 2 Kiefergelenkspulen (double loop array coils) rechts und links der Untersuchungsregion (Leber)

Darstellung des Spulenaufbaus für die MRT-Untersuchungen:

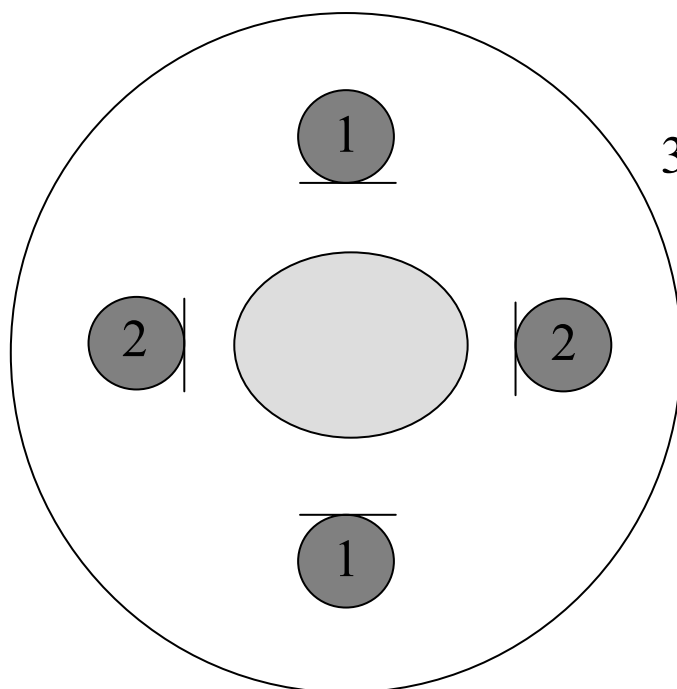


Abb. 4: Darstellung des Spulenaufbaus für die MRT-Untersuchungen:  
 Hellgrau ist der Körper der Ratte dargestellt  
 1: small flex loop coils  
 2: double loop array coils (Kiefergelenksspulen)  
 3: CP-Head (Kopfspule)



Es werden zwei Sequenzen je Ratte aufgenommen:

1. Gradienten-Echo-Sequenz (GRE) T1-gewichtet mit einer Repititionszeit (TR) von 198 ms, einer Echozeit (TE) von 6 ms und einem Field of View (FOV) von 71 mm X 53,3 mm). Die Matrix besteht aus 256 X 96 Pixeln, die Voxelgröße ist 0,6 X 0,3 X 2 mm.
2. Turbo-Spin-Echo (TSE) T2-gewichtet mit einer Repititionszeit (TR) von 3100 ms, einer Echozeit (TE) von 97 ms und einem Field of View (FOV) von 70 mm X 52,5 mm). Die Matrix besteht aus 256 X 96 Pixeln, die Voxelgröße ist 0,5 X 0,3 X 2 mm.

In den T1-gewichteten Sequenzen stellt sich das hepatozelluläre Karzinom im Normalfall hypodens dar, in der T2-gewichteten Sequenz hyperdens. Anhand der gewonnenen Schnittbilder werden die Tumor- und gegebenenfalls Metastasengrößen bestimmt und deren Entwicklung als Graphik dargestellt.

Die Abschätzung der Tumorumfänge erfolgt durch Messung des Tumors in drei Dimensionen und Berechnung nach der Formel:

$V = 4/3 \times \pi \times A \times B \times C$  , wobei A, B und C den Tumorradien entsprechen.

### **2.3.4 Präparation der Ratten zur Gewinnung von Gewebeproben**

Die Präparation der Leber und ihr Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ermöglicht die Konservierung des Gewebes und seine spätere Aufarbeitung für histologische Untersuchungen.

Material

- Ketamin-Stock: 25 mg/ml (Ketanest, Pfizer; PZN 7829486)
- Rompun-Stock: 20 mg/ml (Rompun 2%, Bayer; PZN 1320422)
- Betäubungsgemisch: 6 mg/ml Ketanest, 1,6 mg/ml Rompun in 0,9% NaCl (für 50 ml: 12 ml Ketanest, 4 ml Rompun und 34 ml 0,9% NaCl)
- PBS: Dulbecco's PBS (Invitrogen Corporation, Cat.No.14190-094)
- Tissue Tek O.T.C. Compound (Sakura, Cat.No. 4583)
- Präparationsbesteck (Fine Scientific Tools, diverse Instrumente)

Prozedur

1. Das Tier wird bei einem Gewicht von 250-290 g mit 2,5 ml Ketamin/Rompun-Gemisch durch subcutane Injektion in den Unterbauch betäubt.

2. Ist das Tier reflexfrei, so wird der Bauchraum eröffnet und sodann zügig das Diaphragma (Zwerchfell) durchtrennt und der Brustkorb eröffnet.
3. Der rechte Vorhof wird punktiert und 1 ml Blut entnommen; nach Entfernen der Kanüle ist der rechte Vorhof eröffnet.
4. Das Herz wird mit der Pinzette angehoben und der linke Ventrikel von unten punktiert; auf diesem Weg wird das Tier mit 50-100 ml PBS perfundiert, bis die Leber merklich heller wird.
5. Nun wird die Milz entnommen und für die durchflusszytometrische Analyse weiterverarbeitet. (Siehe 2.4)
6. Vorsichtig wird nun die Leber freipräpariert und entnommen.
7. Die Leber wird einmal in toto und einmal mit den Tumoren im Anschnitt fotografiert.
8. Je ein Stück behandelten und unbehandelten Tumors sowie tumorfreien Leberlappens werden in Tissue Tek eingebettet und in flüssigem Stickstoff auf -196°C heruntergekühlt; die Lagerung erfolgt bei -80°C.
9. Ein etwa 400 mg schweres Stück Gewebe aus dem behandelten Tumor wird für die Durchflusszytometrie vorbereitet. (Siehe 2.4)

## ***2.4 Isolierung von Milz-, Leber-, und Tumorzellen für die Durchflusszytometrie***

Eine Isolierung der Zellen aus Milz, Leber oder Tumor für die Durchflusszytometrie ist nötig, da nur einzelne Zellen korrekt gemessen werden können.

### **Material**

- Medium A: Ansatz für 400 ml: 350 ml RPMI-1640 mit 25 mM HEPES und Glu (Invitrogen Corporation, Cat.No. 52400-025), 2 ml Natrium-Pyruvat (Invitrogen Corporation, Cat.No. 11360-039), 2 ml 100% nichtessentielle Aminosäuren (Invitrogen Corporation, Cat.No. 11140-035), 0,7 µl β-Mercaptoethanol (Sigma, Cat.No. M-6250), 20 ml FCS-Foetal Calf Serum, Mycoplasma & Virus screened (GIBCO BRL, Cat.No. 011-06290), 1 ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen Corporation, Cat.No. 15140-122)

- ACK-Puffer (Lysepuffer): 500 ml ACK-Puffer enthalten 4,012 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,692 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (M(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)=138,21 g/mol), 100 µl 0,5 M EDTA, H<sub>2</sub>O ad 400 ml, der pH wird auf 7,2-7,4 mit 1 N HCl eingestellt, ad 500 ml; der Puffer wird gefiltert (0,2 µm)
- Medium: RPMI-1640 with Glutamax-I (Invitrogen Corporation, Cat.No.61870-010)
- Waschlösung: Dulbecco's PBS (Invitrogen Corporation, Cat.No.14190-094)
- CHD-Gemisch: 9 ml enthalten 450 µl Collagenase IV (Sigma, Cat.No. C 5138), 450 µl Desoxyribonuklease I (Sigma, Cat.No. D 5025), 450 µl Hyaluronidase V (Sigma, Cat.No. H6254) ad 9 ml RPMI-Medium with Glutamax-I (Invitrogen Corporation, Cat.No. 61870-010)
- Knoblauchpresse: Koncis (Ikea, Cat.No. 26116885)
- Filteraufsätze: Filcons, 50 µm (BD Biosciences, Cat.No. 340601)

## Prozedur

### Leber- und Tumorzellen:

1. Der Gewebeblock wird durch die Knoblauchpresse in ein 50 ml Falcon gedrückt.
2. 2 ml des CDH-Gemisches werden zugegeben und die Falcons im Rüttelinkubator bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert.
3. Die gewonnene Zellsuspension wird bei 400 X g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt.
4. Das Pellet wird in 2 ml ACK-Puffer aufgelöst und die Lyse durch die sofortige Zugabe von 3 ml PBS (eiskalt) beendet.
5. Filtern der Zellsuspension durch Filteraufsätze (50 µm).
6. Zentrifugation bei 400 X g und 4°C für 5 min , Entfernen des Überstandes.
7. Aufnehmen der Zellen in 1-2 ml Medium A.
8. Zählen der Zellen im Durchflusszytometer.

Das Protokoll zur Lebendzellgewinnung wurde entwickelt durch Veränderung eines Protokolls von Dessureault et al. (1999).

### Milzzellen:

1. Das ganze Organ wird mit dem Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten.
2. Mit dem Spritzenkolben werden diese Stücke durch ein engmaschiges Metallsieb gedrückt, das sodann mit 10 ml PBS gespült wird.

3. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung auf Eis.
4. Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 200 X g und 4°C, Entfernung des Überstandes.
5. Zugabe von 15 ml ACK-Puffer zur Lyse der Erythrozyten, Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min.
6. Zugabe von 20 ml PBS (eiskalt).
7. Zentrifugation für 10 min bei 200 X g und 4°C, Entfernen des Überstandes.
8. Resuspension des Pellets in 10 ml eiskaltem Medium A.
9. Filtern der Zellsuspension durch Filteraufsätze (50 µm).
10. Zentrifugation für 10 min bei 200 X g und 4°C, Entfernen des Überstandes.
11. Resuspension des Pellets in 5 ml RPMI-Medium.
12. Zählung der Zellen im Durchflusszytometer.

## **2.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Analyse von Zellen und Zellinfiltraten.

### Material

- Totfarbstoff: 7-AAD (Beckman Coulter, Cat.No. IM3422)
- Flow Count Fluorospheres (Becton Dickinson, Cat.No. 7547053)
- Durchflusszytometer: Cytomics FC 500 (Beckman Coulter)

### Prozedur

Es werden 100 µl Zellsuspension und 100 µl Flow Count Fluorospheres und 20 µl 7-AAD gemischt. Im Durchflusszytometer werden die Zellen gezählt.

Zum Auswerten werden die Proben nun mit dem dafür geeigneten Protokoll analysiert. Hierbei macht man sich die monochromatische Laser-Anregung mit dem FC 500 bei bestimmten Farbstoffen zunutze, wobei 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) bei 647 nm angeregt wird.

## **2.6 Blutentnahme bei Buffaloratten**

### Material

- 1M EDTA (Sigma, Cat.No. ED 2 SS)
- Spritzen: Omnifix-F 1ml (Braun, PZN 0569881)
- Kanülen intraoperativ: Sterican 27 G (Braun, PZN 2050864)
- Kanülen bei Präparation: Sterican 20 G (Braun, PZN 2050798)
- Eppendorf-Reaktionsgefäß: 500 PP-Reaktionsgefäß 1,5 ml (Greiner bio-one, Cat.No. 616201)
- Abnahmeröhre (Plexiglas)

Um Blutparameter wie GOT und GPT der Tiere im Behandlungsverlauf beobachten zu können, muss Blut einerseits intraoperativ, andererseits aber auch ohne Operation aus der Schwanzvene entnommen werden.

### Prozedur

#### Intraoperativ:

1. Betäubung des Tieres und anschließende Eröffnung des Bauchraumes.
2. Der Darm wird vorsichtig herausgenommen und auf eine mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) befeuchtete Mullbinde gelegt.
3. Die untere Hohlvene (V. cava inf.) wird aufgesucht und etwa 500 µl Blut mit der Spritze entnommen.
4. Nach Entfernung der Kanüle wird das Blut in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß verbracht, das 10 µl 1M EDTA enthält.
5. Bis zur Weiterverarbeitung der Probe werden diese auf Eis aufbewahrt.
6. Der Darm wird wieder eingebracht und die eigentliche Operation fortgesetzt.
7. Die Blutprobe wird später bei 14 000 rpm und 4°C für 3 min zentrifugiert; das Serum wird abpipettiert und bei -20°C gelagert.

#### Aus der Schwanzvene:

1. Die Ratte wird in die Abnahmeröhre verbracht, wobei diese leicht schräg mit der Öffnung nach unten gehalten wird, so dass das Tier hineinklettert.

2. Nach Fixierung der Ratte in der Röhre wird der Schwanz in warmes Wasser gehalten, um die Gefäße zu dilatieren.
3. Nach 2 min werden mit der Spritze aus einer der lateralen Schwanzvenen etwa 500 µl Blut entnommen.
4. Nach Entfernung der Kanüle wird das Blut in ein 10 µl 1M EDTA enthaltendes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.
5. Die Blutproben werden später 3 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert; das Serum wird abpipettiert und bei –20°C aufbewahrt.

Während der Präparation:

1. Das Tier wird bei einem Gewicht von 250-290 g mit 2,5 ml Ketamin/Rompun-Gemisch betäubt.
2. Ist das Tier reflexfrei, so werden der Bauchraum eröffnet und sodann zügig das Diaphragma (Zwerchfell) durchtrennt und der Brustkorb eröffnet.
3. Der rechte Vorhof wird punktiert und 1 ml Blut entnommen.
4. Das Blut wird in ein 10 µl 1M EDTA enthaltendes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis gelagert.
5. Später werden die Blutproben 3 min bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert; das Serum wird abgenommen und bei –20°C gelagert.

## **2.10 Serumanalysen**

Die Analysen zur Feststellung der GOT- und GPT-Aktivität im Serum wurden im Institut für klinische Chemie des Universitätskrankenhauses Eppendorf mit einem Roche/Hitachi-Modularsystem durchgeführt. Der Enzymgehalt im Serum wird in Units per Liter (U/l) angegeben.

Der GOT/GPT-Quotient errechnet sich durch Teilung des Wertes für die GOT-Aktivität durch den Wert der GPT- Aktivität.

## **2.11 Immunhistologie**

Zum Nachweis verschiedener Immunzellpopulationen in Leber- und Tumorgewebe lässt sich die Immunhistologie verwenden, bei der spezifische Antikörper durch verschiedene Systeme sichtbar gemacht werden können.

### **2.11.1 APAAP-Methode**

#### Material

- CD4 (BD Biosciences, Cat.No. 550297)
- CD8a (BD Biosciences, Cat.No. 550298)
- CD161 - NKR-P1A (Becton Dickinson, Cat.No. 550306)
- Mischung für Primärantikörper: Der Primärantikörper (CD4, CD8a oder NKR) wird mit Tris-Puffer versetzt (1:50) und dies dann mit Kaninchenserum (1:20) gemischt
- APAAP-Dualsystem (Bestandteile: ADS 1013 und ADS 101A; Dianova, Cat.No. ADS 101)
- Tris-Puffer: 4,9 g Tris-Base (Sigma, Cat.No. T-1503), 1,5 g Tris-HCl (Merck, Cat.No.) und 8,7 g NaCl (J.T. Baker, Cat.No. 0278) ad 1 l Aqua bidest; der Puffer wird mit 1 N HCl auf pH 8,7 eingestellt
- Kaninchenserum (in unserem Labor gewonnen)
- Fast Red: Sigma Fast (Sigma, Cat.No. F-4648)
- Meyer's Hematoxilin Solution (Sigma, Cat.No. MHS-16)
- Glycerol Gelantine (Sigma, Cat.No. GG-1)
- Objektträger: HistoBond Adhäsions-Objektträger zur Anheftung von Gewebeschnitten (HistoBond, Cat.No. 901236)
- Mikrotom-Kryostat Cryo-Star HM 560 M (Microm International GMBH, Walldorf, Deutschland)

## Prozedur

1. Die verwendeten Schnitte haben eine Dicke von 5  $\mu\text{m}$  und sind methanolfixiert.
2. Die Schnitte werden mit je 100  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus Kaninchenserum und Tris-Puffer (1:20) überschichtet und 10 min inkubiert.
3. Die Schnitte werden mit Tris-Puffer gewaschen (1 min).
4. Es folgt die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörpergemisch für 1 Stunde.
5. Sämtliche Schnitte werden zweimal etwa 3 min mit Tris-Puffer gewaschen.
6. Nun werden die Schnitte mit je 100  $\mu\text{l}$  Dualsystem-Brückenantikörper (1:100 in Tris-Puffer) für 30 min inkubiert.
7. Erneutes zweimaliges Waschen mit Tris-Puffer (3 min).
8. Es folgt die Inkubation mit dem Dualsystem-APAAP-Komplex (1:100 in Tris-Puffer) für 30 min.
9. Zweimaliges Waschen mit Tris-Puffer (3 min).
10. Inkubation der Schnitte für 15 min mit Dualsystem-Brückenantikörper (1:100 in Tris-Puffer).
11. Erneut folgt zweimaliges Waschen mit Tris-Puffer (3 min).
12. Für weitere 15 min werden die Schnitte mit dem Dualsystem-APAAP-Komplex (1:100 in Tris-Puffer) inkubiert.
13. Die Objektträger werden vorsichtig unter Leitungswasser gespült.
14. Auf jeden Schnitt werden je 100  $\mu\text{l}$  Fast Red-Reagenz (je 1 Tablette Tris und Fast Red auf 1ml Aqua bidest.) gegeben.
15. Wenn eine deutliche Rotfärbung der Gewebe unter dem Mikroskop zu sehen ist (nach etwa 50 min Inkubation), werden die Schnitte erneut mit Leitungswasser gespült.
16. Für 2 min werden die Objektträger in Meyer's Hematoxylin getaucht und anschließend sofort unter Leitungswasser gebläut.
17. Die noch feuchten Schnitte werden mit Glycerol Gelatine eingedeckelt und eventuell vorhandene Luftblasen vorsichtig mit der Pinzette ausgestrichen.



## 2.11.2 Peroxidase

### Material

- CD4 (BD Biosciences, Cat.No. 550297)
- CD8a (BD Biosciences, Cat.No. 550298)
- CD161 - NKR-P1A (Becton Dickinson, Cat.No. 550306)
- CD80 – B7-1 (Becton Dickinson, Cat.No.555012)
- Macrophage Subset (Becton Dickinson, Cat.No.554900)
- Mischung für Primärantikörper: Der Primärantikörper (CD4, CD8a, CD161, CD80 und Makrophage Subset) wird mit PBS versetzt (1:50) und dies dann mit Kaninchenserum (1:20) gemischt.
- Maus-PAP: Mouse PAP (Dako, Cat.No. P 0850)
- Anti-Maus IgG-Biotin: Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins (Dako, Cat.No. E 0354)
- ABC-Komplex: Vectastain ABC-Komplex PK-6100 (Linearis, Cat.No. PK-6100)
- Rezept für 4% PFA: 8 g Paraformaldehyd (Sigma, Cat.No. P-6148) und 100 ml Aqua dest. unter dem Abzug auf 60°C erhitzen und durch Zugabe einiger Tropfen 1 N NaOH auflösen; ist die klare Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, so werden 100 ml zweifaches PBS hinzugegeben.
- Rezept für 1 l PB (0,1 M): 2,49 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Merck, Cat.No. 104873), 14,6 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Cat.No. 6580) ad 1 l Aqua dest.
- Rezept für 5 l zehnfaches PBS: 400 g NaCl (J.T. Baker, Cat.No. 0278), 10 g KCl (Merck, Cat.No.1.04936.1000), 10 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Merck, Cat.No. 104873) und 72 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Cat.No. 6580) ad 5 l Aqua dest. (pH 6,9); nach 1:10 Verdünnung pH 7,4
- Rezept für 500 ml Tris (0,05 M): 3,02 g Tris-Base (Sigma, Cat.No. T-1503) und 4,5 g NaCl (J.T. Baker, Cat.No. 0278) ad 450 ml, dann Einstellung auf pH 7,6 mit 1 N HCl, dann ad 500 ml.
- Rezept für 100 ml DAB: 2,25 g Diaminobenzidin 4 HCl (Sigma, Cat.No. D-5637) werden in 100 ml Tris gelöst und anschließend filtriert; das DAB wird in 1 ml Aliquots eingefroren und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

- Entwicklungslösung für die Peroxidaseaktivität: 45 ml PB, 1 ml DAB (22,5 mg), 18 mg Ammoniumchlorid (Sigma, Cat.No. A-4514), 900 µl Nickelsulfat (1,3 g / 100 ml; Merck, Cat.No. 1.06727.0100), 900 µl 1% Glucose (Sigma, Cat.No. G-8270) und 150 µl Glucose-Oxidase (1,2 mg / ml; Sigma, Cat.No. G-2133).
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid 30% (Merck, Cat.No. 1.08597.1000)
- Rezept für 1 l Kernechtrot: 50 g Aluminiumsulfat (Merck, Cat.No. 1.01211.1000) und 1 g Kernechtrot (Chroma-Gesellschaft Schmid & Co.) in 1 l Aqua dest. heiß lösen und nach dem Erkalten filtrieren.
- Rothihistol (Carl Roth GmbH & Co, Cat.No. 6640.1)
- Entellan neu (Merck, Cat.No. 1.07961.0100)

## Prozedur

1. Fixieren der Schnitte in 4% PFA in PBS für eine halbe Stunde.
2. Blocken der endogenen Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (-20°C) für 30 min.
3. Spülen der Schnitte in Aqua dest. für 30 min.
4. Waschen in PBS für 15 min.
5. 30 min Inkubation mit 2% Kaninchenserum in PBS.
6. Inkubation mit dem Primärantikörper in PBS und 2% Kaninchenserum über Nacht.
7. Am nächsten Morgen wird dreimal für je 10 min in PBS gewaschen.
8. Inkubation mit Anti-Maus IgG-Biotin (60 min).
9. Zweifaches Waschen in PBS (je 10 min).
10. 30 min Inkubation mit Maus-PAP für 30 min.
11. Erneutes zweifaches Spülen der Schnitte in PBS (je 10 min).
12. Es folgt die Inkubation mit dem ABC-Komplex (30 min).
13. Einmaliges Spülen in PBS (10 min).
14. Spülen in PB (10 min).
15. Entwicklung der Peroxidaseaktivität in der Entwicklungslösung für 10-30 min (die Entwicklung wird unter dem Mikroskop beobachtet).
16. Stoppen der Peroxidaseaktivität durch Waschen in PBS (3 X 5 min).
17. Gegenfärben mit Kernechtrot für 1 min.
18. Spülen in PBS (3 X 5 min).
19. Aufsteigende Alkoholreihe:

- 70% 5 min
- 80% 5 min
- 96% 5 min
- 100% 5 min

20. Zweimaliges Spülen in Rothihistol (einmal für 4 min, einmal für 6min).

21. Eindeckeln mit Entellan. Anschließend werden die Schnitte zwei Tage liegend gelagert.

## **2.12 Histologie**

### **2.12.1 Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE)**

Die Färbung histologischer Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin lässt die Zellkerne blau und das Zytoplasma rot erscheinen, wodurch sich ein Überblick über die Zellen eines Gewebes gewinnen lässt.

#### Material

- Meyer's Hematoxylin Solution (Sigma, Cat.No. HHS-16)
- Certistain Eosin G (gelblich) (Merck, Cat.No. 1.15935)
- Rezept für 250 ml 0,1%iges Eosin: 0,25 g gelbes Eosin werden in 250 ml Aqua dest. gelöst.

#### Methode

1. Die Schnitte werden 5 min in Methanol (-20°C) fixiert.
2. Spülen der Objektträger in Aqua dest.
3. Färben der Schnitte in Hämatoxylin für 5 min.
4. Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min.
5. Gegenfärben mit Eosin (5 min).
6. Spülen in Aqua dest.
7. Aufsteigende Alkoholreihe:

- 70%      5 min
- 80%      5 min
- 96%      5 min
- 100%     5 min

8. Zweimaliges Spülen in Rothihistol (einmal für 4 min, einmal für 6 min).

9. Eindeckeln mit Entellan.

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Leica DMLB-Mikroskop begutachtet und mit einer Leica DC100-Kamera aufgenommen.

## **2.13 Liste der Antikörper**

Die Antikörper wurden unverdünnt bei 4°C aufbewahrt.

Primärantikörper

**Maus anti-Ratte CD4**, monoklonal, Isotyp Maus (BALB/c) IgG<sub>2a,k</sub>, Clone OX-38 (BD PharMingen, Cat.No. 550297)

Der Antikörper reagiert mit dem CD4-Antigen, das sich vor allem auf einer Untergruppe der T-Lymphozyten (darunter die meisten T-Helferzellen), Monozyten, Macrophagen und einigen dendritischen Zellen findet.

**Maus anti-Ratte CD8**, monoklonal, Isotyp Maus (BALB/c) IgG<sub>1,k</sub>, Clone OX-8 (BD PharMingen, Cat.No. 550298)

Der Antikörper reagiert mit der 32-kDa alpha-Kette des CD8-Antigens, das sich auf den meisten zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Supressorzellen findet.

**Maus anti-Ratte Macrophagen Subset**, monoklonal, Isotyp Maus IgG<sub>2a,k</sub>, Clone HIS36, Immunogen: nicht genannt (BD PharMingen, Cat.No. 554900)

Der Antikörper reagiert mit einem ED2-ähnlichen Antigen, das sich auf Gewebsmakrophagen, nicht aber auf Monozyten findet.

**Maus anti-Ratte CD80**, monoklonal, Isotyp Maus (BALB/c) IgG<sub>1,κ</sub>, Clone 3H5, Immunogen: HTLV-1-transformierte Ratten T-Zelllinie Lewis-S1 (BD PharMingen, Cat.No. 555012)

Der 3H5-Antikörper reagiert mit CD80 (B7-1), einem Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das sich vornehmlich auf antigenpräsentierenden Zellen findet.

**Maus anti-Ratte CD161**, monoklonal, Isotyp Maus IgG<sub>1,κ</sub>, Clone 10/78, Immunogen: nicht genannt (BD PharMingen, Cat.No. 555009)

Dieser Antikörper bindet an NKR-P1A, ein Homodimer von 60-kDa, das sich auf allen Natürlichen Killer- (NK)-Zellen und einigen T-Lymphozyten findet.

Sekundärantikörper

**Kaninchen anti-Maus Immunglobuline**, biotinyliert, (DAKO, Cat.No. E 0354)

Der biotinylierte Antikörper reagiert mit allen Untergruppen von Mäuse-IgG sowie mit Mäuse-IgM; Reaktionen mit anderen Mausimmunglobulinen über die Leichtketten ist wahrscheinlich. Kreuzreaktionen mit Immunglobulinen anderer Spezies sind möglich.

**Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper**, polyklonal, Isotyp Kaninchen IgG, Antigen Maus IgG (schwere und leichte Kette) (dianova, Cat.No. ADS 101-B)

Tertiärantikörper

**Maus-anti-Radieschenperoxidase**, monoklonal, Isotyp Maus IgG<sub>1,κ</sub>, (DAKO, Cat.No. P 0850)

Es handelt sich bei Maus PAP um lösliche Komplexe aus Radieschenperoxidase und Maus-anti-Radieschenperoxidase-Antikörper.

**Maus-anti-Alkalische Phosphatase**, monoklonal, Isotyp Maus IgG, Antigen Alkalische Phosphatase aus dem Kalbintestinaltrakt (dianova, Cat.No. ADS 101-A)

## **2.14 Statistik**

Die statistische Auswertung geschah durch Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen für die Gewichtsveränderungen und Tumorvolumina unter Verwendung der Software MS Excel. Hierbei wurden die Standardabweichungen mit der Funktion STABW berechnet. Die Korrelation der GOT- und GPT-Werte mit dem Tumorvolumen wurde mit der Funktion KORREL berechnet.

## **3 Ergebnisse**

Um die Wirkung von IL-12, IL-2 und 4-1BBL auf das hepatozelluläre Karzinom bei Verwendung eines adenoviralen Vektors bei einer Viruskonzentration von  $1 \times 10^6$  zu untersuchen, wurde eine Studie mit Buffaloratten durchgeführt. Die untersuchten Parameter waren neben der Immunzellinfiltration in Tumor- und Lebergewebe die Gewichtsentwicklung und die Werte der Serum-GOT und –GPT.

### **3.1 Gewichtsentwicklung**

Das Gewicht der Ratten kann in Grenzen als Indikator für den gesundheitlichen Zustand der Tiere gewertet werden. Die Gewichtsentwicklung der verschiedenen Behandlungsgruppen ist in Abb. 5 dargestellt.

Die Gewichtsbeurteilung beginnt in der Woche der Tumorimplantation. Bis zur dritten Woche, dem Zeitpunkt der Virusinokulation, sind allenfalls geringe Änderungen des Gewichts zu verzeichnen, doch in der dritten Woche nach der Tumorimplantation (Beobachtungszeitpunkt 4) kommt es zu einem klaren Gewichtsverlust in allen Behandlungsgruppen. In den kommenden Wochen nehmen die Tiere der Kontrollgruppen stetig weiter ab, was auch für die Ad-2-behandelten Tiere gilt. In Gegensatz dazu nimmt das Gewicht der Tiere der Ad-1- und Ad-3-Behandlungsgruppen zwischen der vierten und der fünften Woche nach der Tumorinokulation (Beobachtungszeitpunkte 5 und 6) wieder zu und liegt sechs Wochen nach der Tumorimplantation (Beobachtungszeitpunkt 7) im Mittel leicht über dem Wert der dritten Woche (Beobachtungszeitpunkt 4).

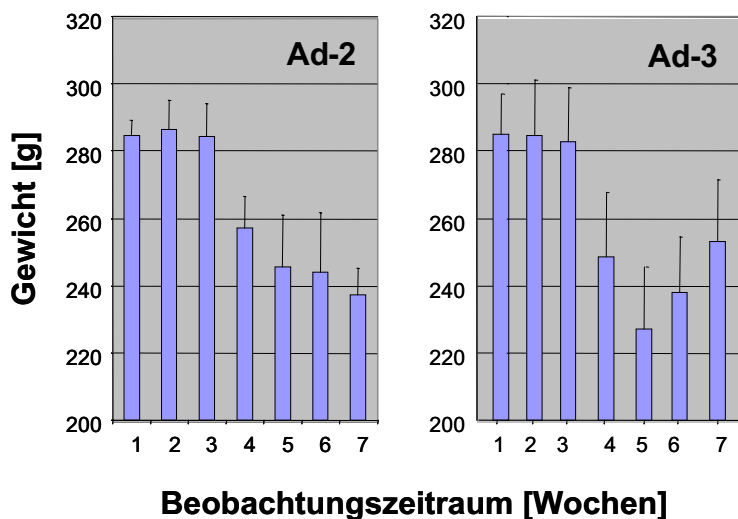
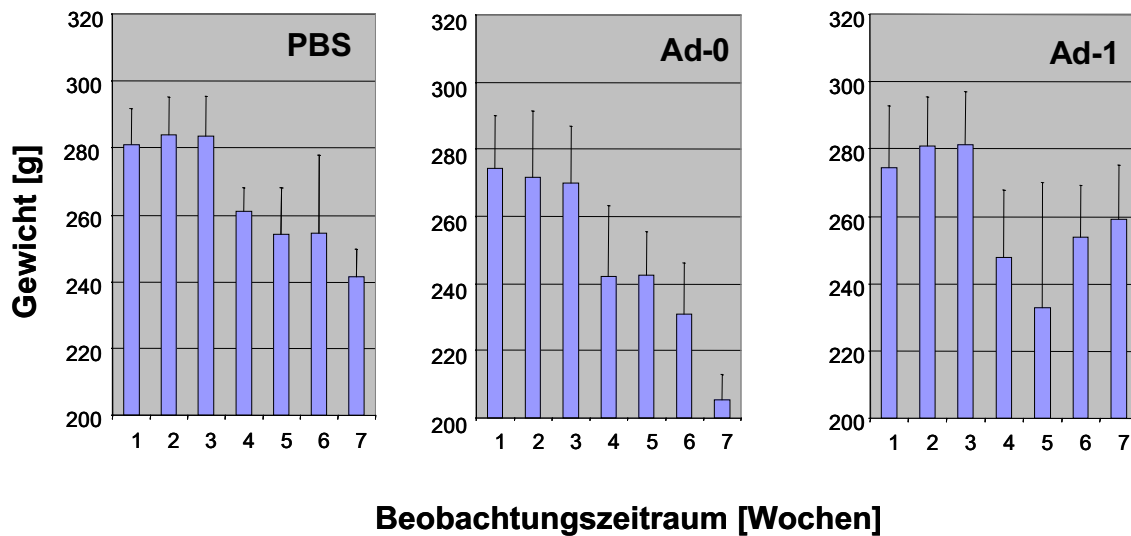


Abb. 5: Mittelwerte der Gewichtsverläufe der verschiedenen Behandlungsgruppen über sieben Wochen. Das Startgewicht der Tiere aller Gruppen liegt dicht bei einander, während die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungsgruppen nach sieben Wochen deutlich verschieden sind. So liegt das Gewicht der Ad-1-Gruppe im Mittel nur etwa 20g, das der Ad-0-Gruppe hingegen rund 70g unter dem Startgewicht.

### 3.2 Tumorumfangentwicklung

Bei der Betrachtung der Tumorumfänge wird deutlich, dass das Startvolumen der verschiedenen Behandlungsgruppen bis auf die PBS-Gruppe etwa gleich ist. Die geringere Startgröße der Tumoren der PBS-Tiere ist auf das Fehlen des linken Tumors zurückzuführen. Die Tumorumfänge der PBS-, Ad-0- und Ad-2-behandelten Tiere nehmen im Mittel kontinuierlich zu. Bei den Ad-1- und den Ad-3-behandelten Tieren ist ab der dritten Woche nach Virusgabe (fünf Wochen nach Tumorumplantation) ein klarer Rückgang des Tumorumfanges zu verzeichnen.



Mittelwerte der Tumorumfänge der überlebenden Tiere

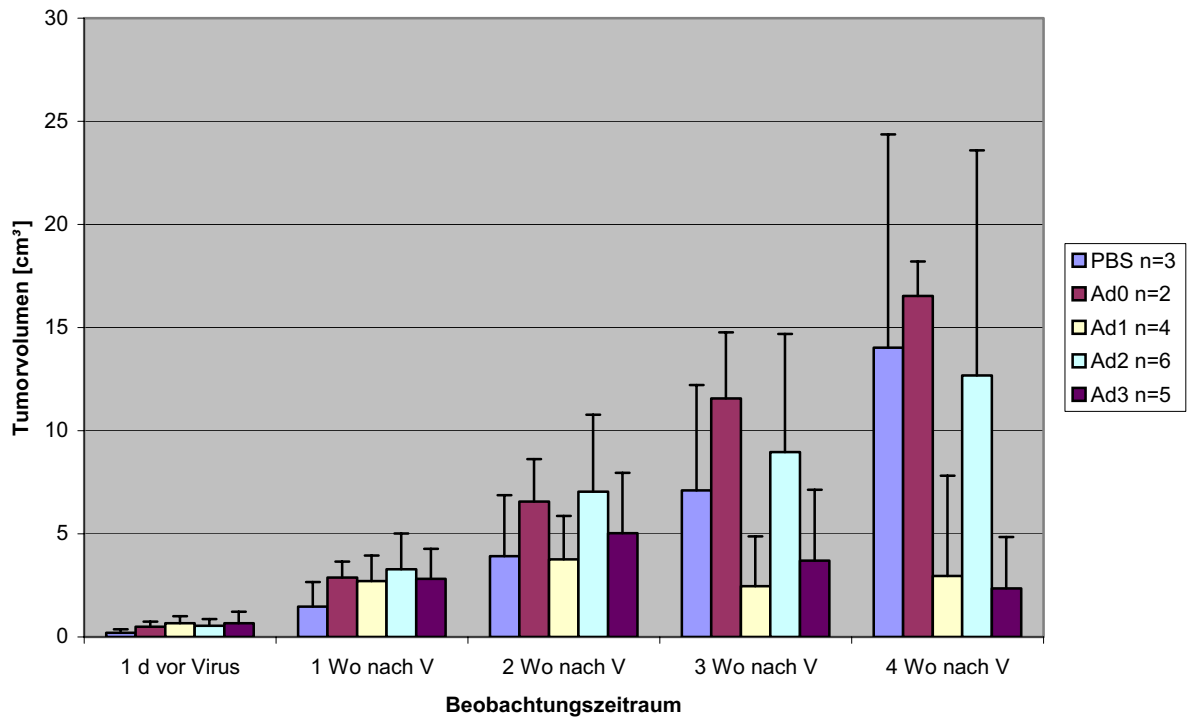


Abb. 6: Mittelwerte der Tumorumfänge der überlebenden Tiere nach Vektortyp über einen Zeitraum von fünf Wochen beginnend mit dem Tag vor der Tumorbehandlung.

Um eine mögliche Abhängigkeit der Tumorentwicklung von der Anfangstumorgroße zu untersuchen, wurden unter den Tieren zwei nach Starttumorumfängen geordnete Gruppen gebildet und dort die Veränderung der Tumoren der einzelnen Tiere beobachtet.

Entwicklung des Tumorzvolumens bei einem Starttumorzvolumen < 0,40 cm<sup>3</sup>

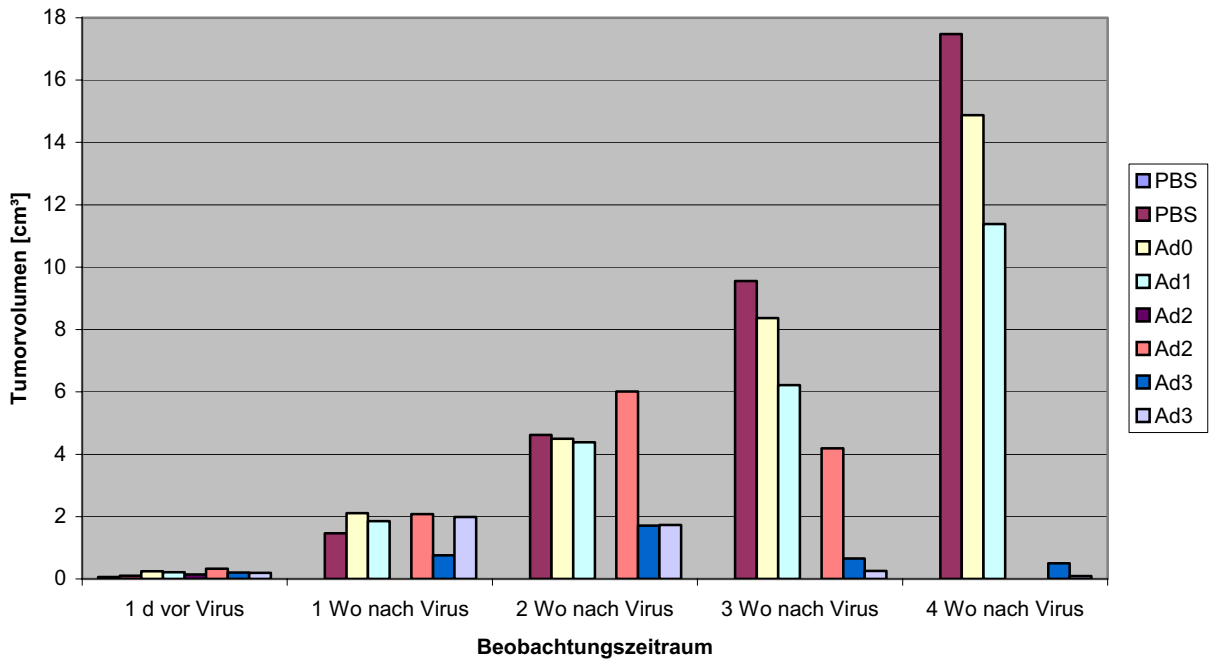


Abb. 7: Individuelle Entwicklung des Tumorzvolumens bei den einzelnen Tieren mit einem Tumorzvolumen < 0,40 cm<sup>3</sup>.

Entwicklung der Tumorzvolumina bei Tieren mit einem Starttumorzvolumen von 0,45-0,75 cm<sup>3</sup>

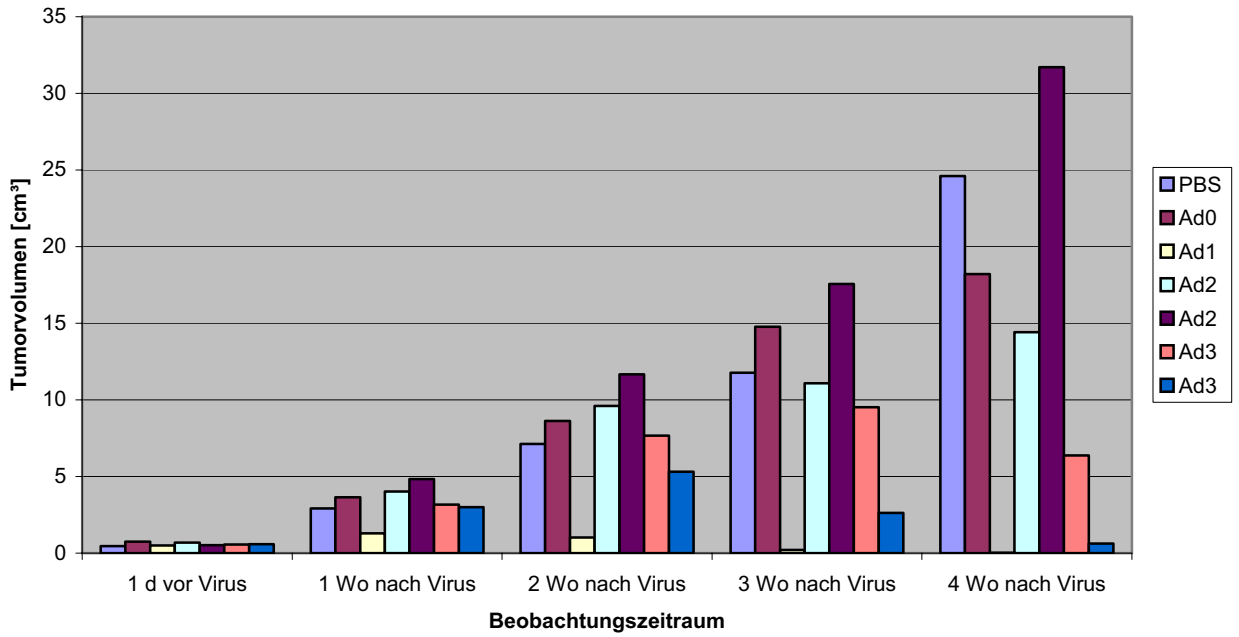


Abb. 8: Individuelle Entwicklung des Tumorzvolumens bei den einzelnen Tieren mit einem Tumorzvolumen von 0,45-0,75 cm<sup>3</sup>.

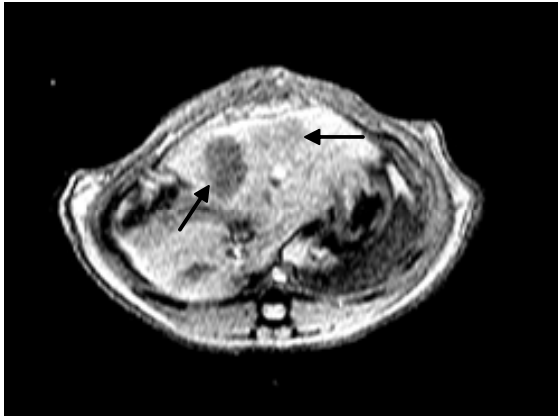
Bei einem Starttumorvolumen  $< 0,40 \text{ cm}^3$  zeigen das Ad-0-Tier und eines der dargestellten PBS-Tiere einen progressiven Verlauf des Tumorwachstums; gleiches gilt für das abgebildete Ad-1-Tier. Das eine dargestellte PBS-Tier allerdings war drei Wochen nach der Tumorimplantation tumorfrei. Die Ad-2- oder Ad-3-behandelten Tiere mit diesem Startvolumen zeigten sämtlich nach anfänglichem Tumorwachstum eine Regression.

Im Gegensatz dazu ist bei Tieren mit einem Tumorstartvolumen von  $0,40\text{-}0,75 \text{ cm}^3$  festzustellen, dass die PBS-, Ad-0- und Ad-2-Tiere einen stetig progressiven Verlauf aufweisen, während das Ad-1-Tier ab der zweiten Woche nach Virusgabe, die Tiere der Ad-3-Gruppe ab der dritten bzw. vierten Woche nach der Virusgabe einen Rückgang im Tumorvolumen aufweisen.

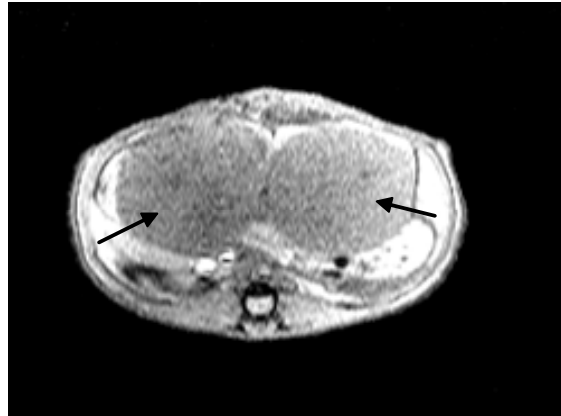
Besonders deutlich lässt sich die Entwicklung der Tumorumfänge anhand der MRT-Bilder darstellen (Abb. 9 und 10). Die Tumoren und Metastasen stellen sich in der T1-gewichteten Sequenz als hypodense, in der T2-gewichteten Sequenz als hyperdense Strukturen dar.

Das Bild, das sich nach der Präparation bei makroskopischer Betrachtung der Tumoren bietet, verdeutlicht noch einmal die großen Unterschiede im Verlauf des Tumorwachstums, die schon in den MRT-Bildern deutlich wurden (Abb. 11).

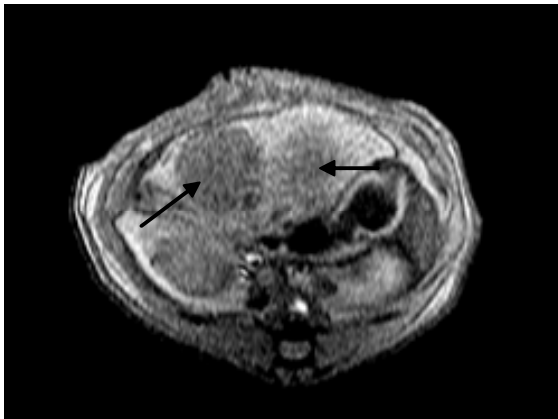
**MRT-Bilder eines mit Ad-0 behandelten Tieres (Kontrolltier)**



Einen Tag vor Virusgabe



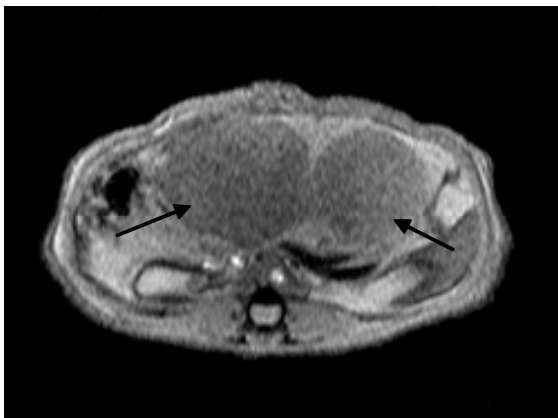
Drei Wochen nach Virusgabe



Eine Woche nach Virusgabe



Vier Wochen nach Virusgabe



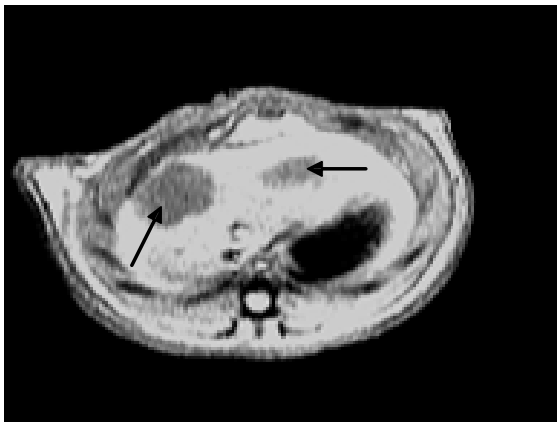
Zwei Wochen nach Virusgabe

Abb. 9: MRT-Bilder eines mit Ad-0 behandelten Tieres über einen Zeitraum von fünf Wochen, beginnend mit dem Tag vor der Virusgabe. Deutlich ist die Progredienz im Tumorwachstum zu erkennen.

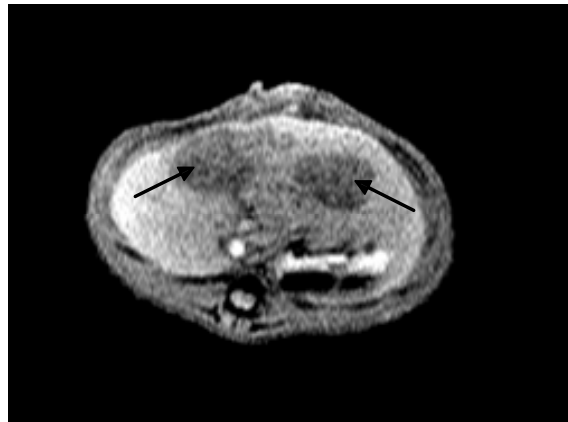
Die Tumoren werden durch einen → markiert.

(MRT-Bilder in Zusammenarbeit mit Dr. H. Ittrich, Prof. Dr. G. Krupski-Berdien, Klinik/Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie)

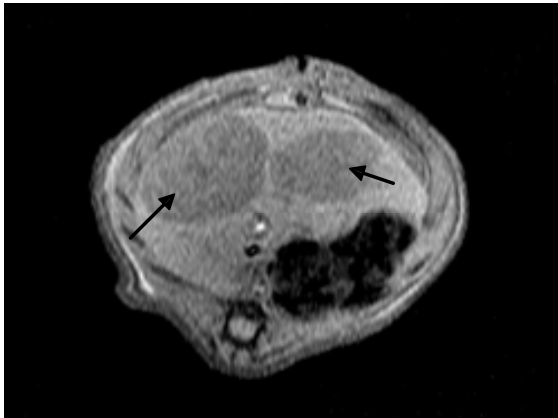
### **MRT-Bilder eines mit Ad3 behandelten Tieres**



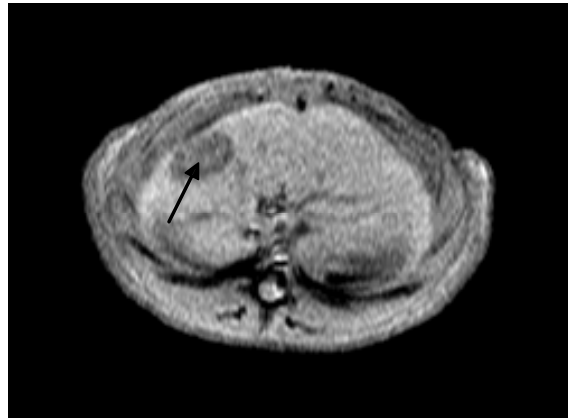
**Einen Tag vor Virusgabe**



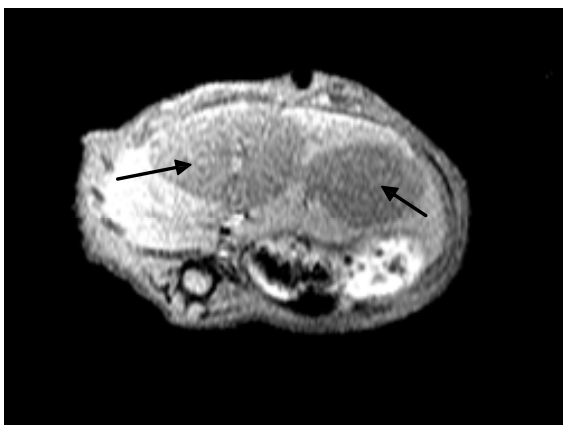
**Drei Wochen nach Virusgabe**



**Eine Woche nach Virusgabe**



**Vier Wochen nach Virusgabe**



**Zwei Wochen nach Virusgabe**

Abb. 9: MRT-Bilder eines mit Ad-3 behandelten Tieres über einen Zeitraum von fünf Wochen, beginnend mit dem Tag vor der Virusgabe. Nachdem in den ersten drei Bildern eine Progredienz des Tumorwachstums zu erkennen ist, nimmt das Tumolvolumen in den folgenden zwei Wochen deutlich ab..

Die Tumoren werden durch einen → markiert.

(MRT-Bilder in Zusammenarbeit mit Dr. H. Ittrich, Prof. Dr. G. Krupski-Berdiem, Klinik/Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie)

## Makroskopische Bilder der Tumoren

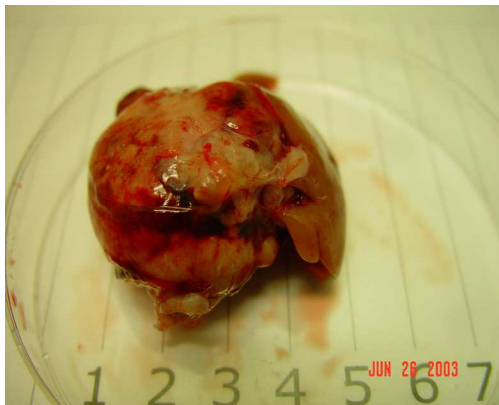


Abb. 11 a/b: Ein PBS-behandeltes Tier mit  $24,60 \text{ cm}^3$  Tumorendvolumen, dessen multiple Lungenmetastasen im rechten Bild dargestellt sind

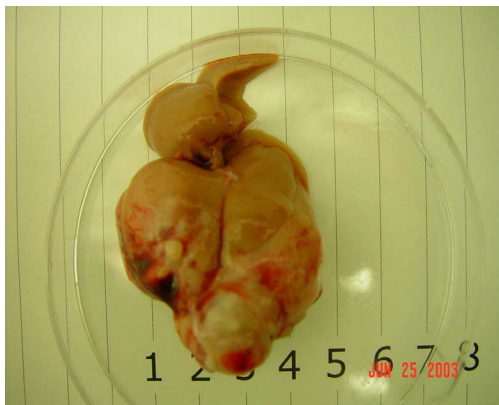


Abb. 12 a/b: Ein Ad-0-behandeltes Tier mit einem Tumorendvolumen von  $18,20 \text{ cm}^3$ ; rechts der Anschnitt des Tumors



Abb. 13 a/b: Ein so gut wie tumorfreies Ad-1-behandeltes Tier ( $0,03 \text{ cm}^3$  Tumolvolumen). Auf dem linken Bild im Vordergrund ist die Histacyl-Pломbe zu sehen; rechts der Anschnitt der Leber

Die auf den Bildern sichtbare Skalierung ist in cm angegeben.

### **3.3 Serumanalysen**

Die Analysen zur Feststellung der GOT- und GPT-Aktivität im Serum wurden im Institut für klinische Chemie des Universitätskrankenhauses Eppendorf unter Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Munif Haddad mit einem Roche/Hitachi-Modularsystem durchgeführt.

Den behandelten Tieren wurde zweimal Blut abgenommen: einmal direkt vor der Virusgabe bei eröffnetem Situs aus der V. cava (große Hohlvene), das andere Mal bei der Präparation vor der Perfusion aus dem rechten Vorhof. Das Bundesamt für Veterinärwesen beschreibt für Ratten mit einem Gewicht von 200 g ein zulässiges Entnahmenvolumen von 2 ml innerhalb zwei Wochen; bei einem Gewicht von 300 g sind es 3 ml (Bundesamt für Veterinärwesen, Information Tierschutz 3.02). Mit 1 ml pro Blutentnahme und einem Rattengewicht von im Mittel etwa 250 g lagen die abgenommenen Blutmengen deutlich unter diesem Wert. Das zur Gewinnung des Normalserums verwendete Blut wurde von zwei gesunden Ratten aus der Schwanzvene entnommen. Da die auf diese Weise gewonnene Blutmenge relativ gering ist (das Bundesamt für Veterinärwesen beschreibt die Schwanzvenenpunktion als Mittel der Wahl für die Gewinnung von bis zu 0,15 ml Blut) und andere Entnahmemethoden wie die Zungenvenenpunktion oder das Legen eines Jugularis- oder Femoraliskatheters, die sämtlich eine Allgemeinanästhesie erfordern, für die einmalige Gewinnung von Normalserum gesunder Tiere unverhältnismäßig ist, wurde das Blut der zwei Tiere vereinigt.

### **3.4 Auswertung der Serumanalysen**

Wie die beiden Abb. 14 und 15 deutlich zeigen, liegen die Serumaktivitäten von GOT und GPT zum Behandlungsbeginn bei allen tumortragenden Tieren in einem Bereich, der nicht wesentlich von 180-200 U/l abweicht. Das Kontrollserum liegt mit jeweils etwa 300 U/l um einiges höher, was aufgrund der kleinen Tierzahl (zwei gesunde Tiere) und der Tatsache, dass es sich um vereinigtetes Serum zweijähriger Tiere handelt, jedoch nicht notwendigerweise als signifikant anzusehen ist. Die Betrachtung der Werte vier

Wochen nach Virusgabe (respektive PBS) hingegen zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen: Während die Enzymaktivitäten im Serum der beiden Kontrollgruppen jeweils sehr hoch sind, findet sich für Ad-1 ein nur mäßiger Anstieg, der für GOT gar kaum über dem Wert des Normalserums liegt; anders ist dies bei der GPT-Aktivität, die sich nicht nur im Schnitt gegenüber dem Wert vor der Behandlung verdoppelt hat, sondern die auch deutlich über der des Normalserums liegt. Anders bei den Ad-2-behandelten Tieren: für GOT zeigt sich eine Verdreifachung der Serumaktivität, für GPT gar ein Anstieg um mehr als das Dreifache. Den im Mittel geringsten GOT- wie auch GPT-Anstieg im Serum verzeichnen die Ad-3-behandelten Tiere, bei denen beide Werte vier Wochen nach der Behandlung beziehungsweise sechs Wochen nach der Tumorimplantation niedriger liegen als im gemessenen Normalserum; dies reflektiert den physiologischen Schwankungsbereich.

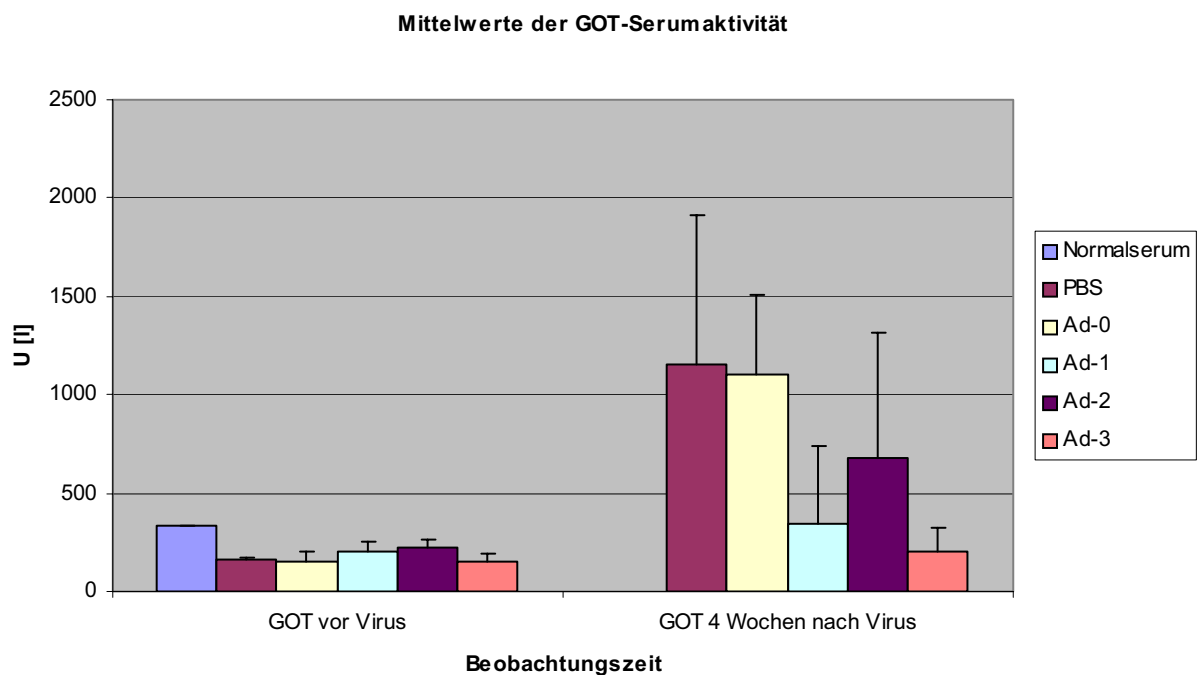


Abb. 14: Mittelwerte der GOT-Serumaktivitäten der verschiedenen Behandlungsgruppen vor und vier Wochen nach der Virus- bzw. PBS-Inokulation.



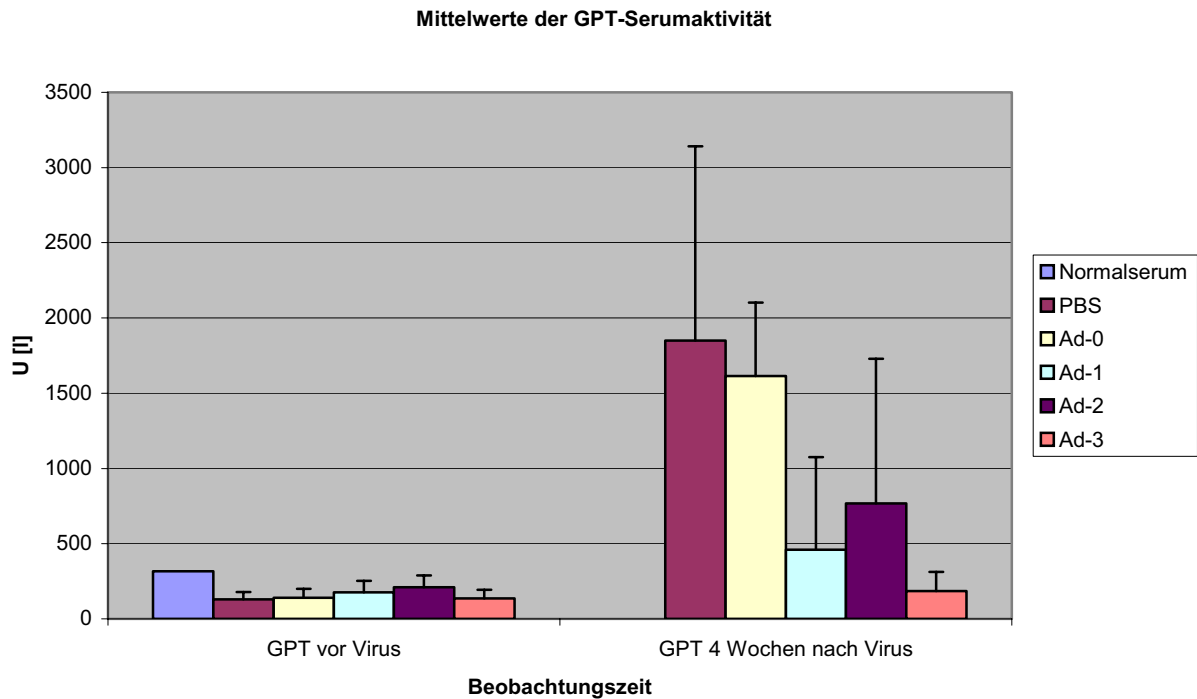


Abb. 15: Mittelwerte der GPT-Serumaktivitäten der verschiedenen Behandlungsgruppen vor und vier Wochen nach der Virus- bzw. PBS-Inokulation.

Die GOT- wie auch die GPT-Aktivität bei Tieren mit einem Tumorendvolumen von unter  $1 \text{ cm}^3$  ist niedriger als vor der Virusgabe (Abb. 16), da zu diesem Zeitpunkt die Tumoren bereits zwei Wochen gewachsen sind und damit im Mittel deutlich größer als  $1 \text{ cm}^3$  sind.

Tiere, die nun mit einem Tumorendvolumen von mehr als  $10 \text{ cm}^3$  eine massive Leberschädigung erfahren haben, weisen auch entsprechend hohe Serumaktivitäten von GOT und GPT auf (Abb. 17 und 18).

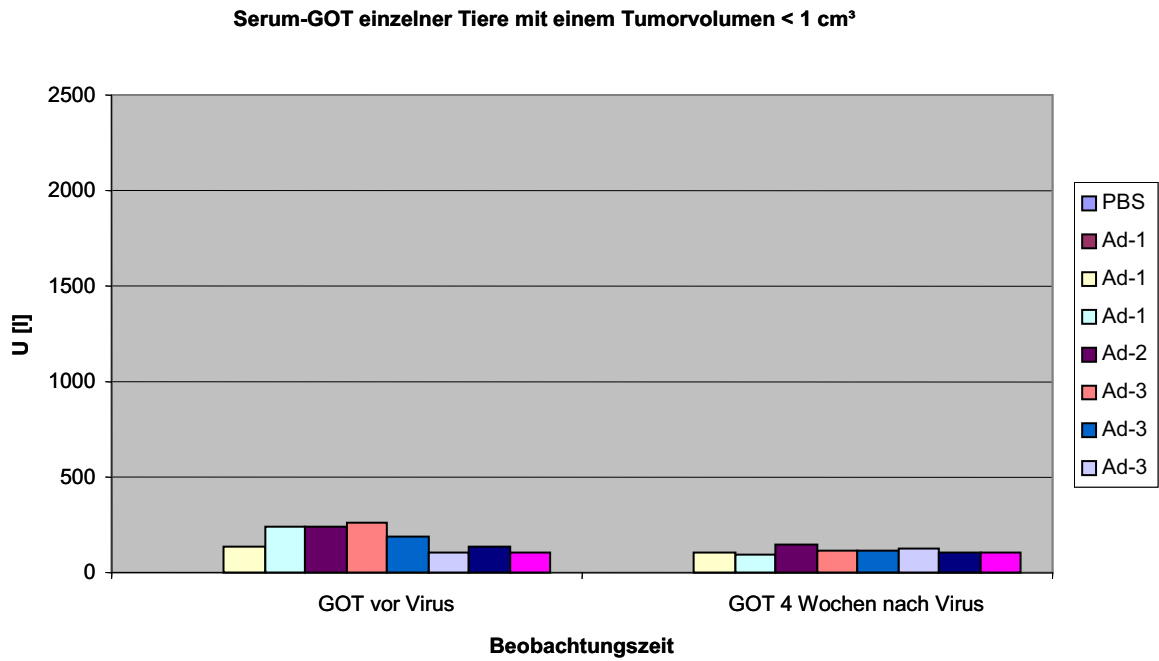


Abb. 16: Individuelle Serum-GOT-Aktivitäten einzelner Tiere mit einem Tumorendvolumen von < 1 cm<sup>3</sup> vor und vier Wochen nach der Virus- bzw. PBS-Inokulation. Die GOT-Werte sinken leicht im Behandlungsverlauf.

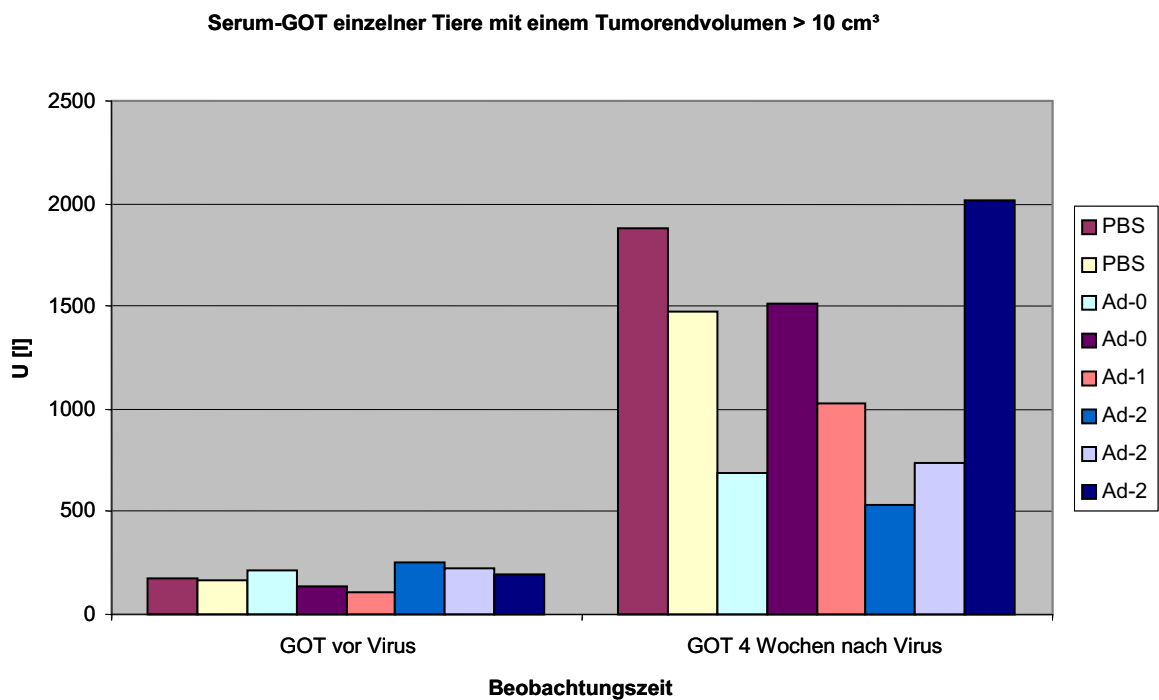


Abb. 17: Individuelle Serum-GOT-Aktivitäten einzelner Tiere mit einem Tumorendvolumen von > 10 cm<sup>3</sup> vor und vier Wochen nach der Virus- bzw. PBS-Inokulation. Deutlich ist der Anstieg der GOT-Serumaktivität im Behandlungsverlauf bei den Tieren mit dem Tumorendvolumen von > 10 cm<sup>3</sup> zu erkennen.

**Serum-GPT einzelner Tiere mit einem Tumorendvolumen > 10 cm<sup>3</sup>**

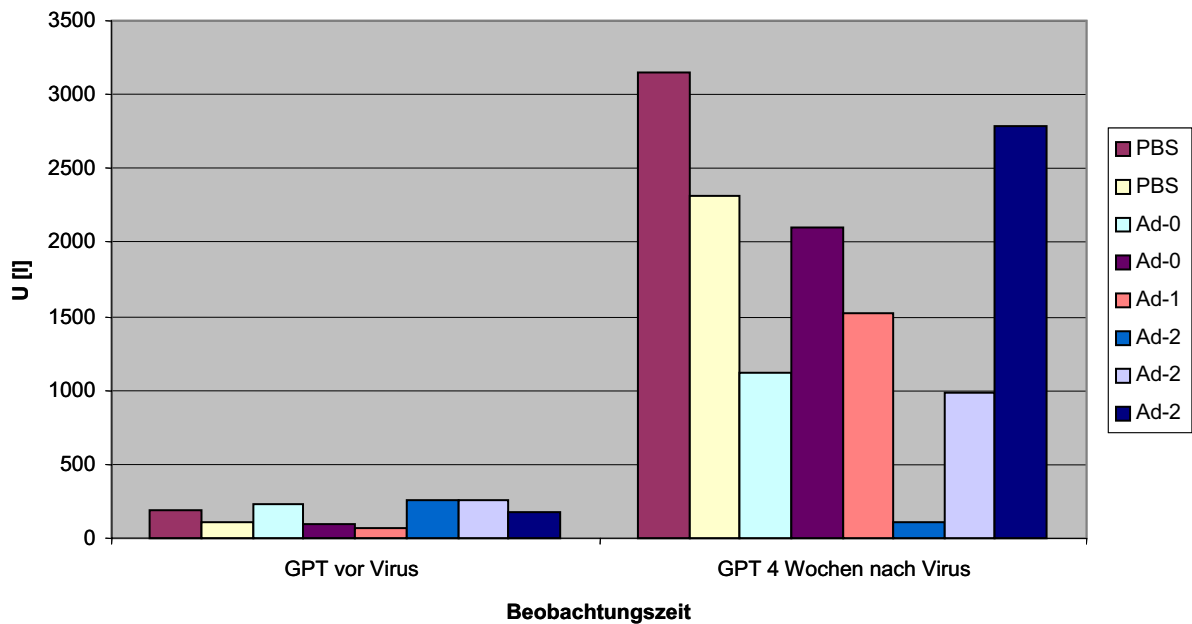


Abb. 18: Individuelle Serum-GPT-Aktivitäten einzelner Tiere mit einem Tumorendvolumen von > 10 cm<sup>3</sup> vor und vier Wochen nach der Virus- bzw. PBS-Inokulation. Deutlich ist auch hier der Anstieg der GPT-Serumaktivität im Behandlungsverlauf bei den Tieren mit dem Tumorendvolumen von > 10 cm<sup>3</sup>, wobei das eine Ad-2-behandelte Tier trotz seines großen Tumors einen leichten Rückgang in der GPT-Aktivität zeigt.

Der GOT/GPT-Quotient erlaubt eine Aussage über den Schweregrad einer Leberschädigung, da die GOT-Aktivität im Zytoplasma 30%, in den Mitochondrien jedoch 70% beträgt, während die GPT-Aktivität zu nahezu 100% im Zytoplasma zu finden ist. Hieraus ergibt sich, dass aufgrund eben dieser Verteilung der Quotient eine Aussage über die Schwere der Zellschädigung erlaubt. Beim Menschen zeigen Werte kleiner 1 einen leichten Leberschaden an, Werte größer 2 stehen für einen schwerwiegenden, eher nekrotisierenden Leberschaden.

	Kontrollen	PBS	Ad-0	Ad-1	Ad-2	Ad-3
GOT/GPT Quotient vor der Behandlung	1,04	1,72	0,95	1,27	1,94	1,18
	2,75	0,89	1,16	0,92	0,86	0,91
	1,98	1,50	1,33	0,94	1,02	0,98
	1,13			1,16	0,89	1,77
				1,60	1,26	1,09
				1,42	1,15	1,47
GOT/GPT Quotient vier Wochen nach der Behandlung		1,24	0,61	2,27	2,07	1,04
		0,6	0,72	0,93	0,95	1,04
		0,64	*	1,05	4,69	1,63
				0,68	0,75	1,09
				*	1,54	1,23
				*	0,72	*

Tabelle 1: GOT/GPT-Quotient der Tiere direkt vor der Vektor- bzw. PBS-Inokulation und vier Wochen nach der Behandlung. Das Blut für die erste Messung wurde intraoperativ aus der großen Hohlvene (V. cava) entnommen, für die zweite Messung wurde das Blut während der Präparation aus dem rechten Vorhof entnommen. Die mit \* markierten Tiere waren zum Zeitpunkt der Präparation bereits verstorben, so dass von ihnen keine Werte vorliegen.

Die Betrachtung des GOT/GPT-Quotienten der verschiedenen Behandlungsgruppen ergibt, dass die Leberzellschädigung sich bei den beiden Kontrollgruppen abzuschwächen scheint (Rückgang von 1,3 auf 0,83 bzw. von 1,2 auf 0,67). Aufgrund der besonders kleinen Gruppengrößen (drei bzw. zwei Tiere) können die Werte zwar kaum als verlässlich gelten, scheinen aber dennoch eine Tendenz aufzuzeigen. Einen deutlichen Anstieg des Quotienten im Mittel verzeichnet die Ad-2-Gruppe (von 1,2 auf 1,8). Für Ad-1 und Ad-3 bleibt der Quotient im Mittel bei 1,2. Nur bei Betrachtung der Mediane des GOT/GPT-Quotienten nimmt dieser bei den Ad-1- und Ad-3-behandelten Tieren ab (für Ad-1 von 1,21 auf 0,99, für Ad-3 von 1,13 auf 1,09).

Die Serumspiegel beider Enzyme und das Tumolvolumen sind – nach Behandlungsgruppen geordnet – in den Abb. 19 und 20 für jedes einzelne Tier dargestellt.

Tumorstadium, Serum-GOT und -GPT der Tiere 1-12 zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen

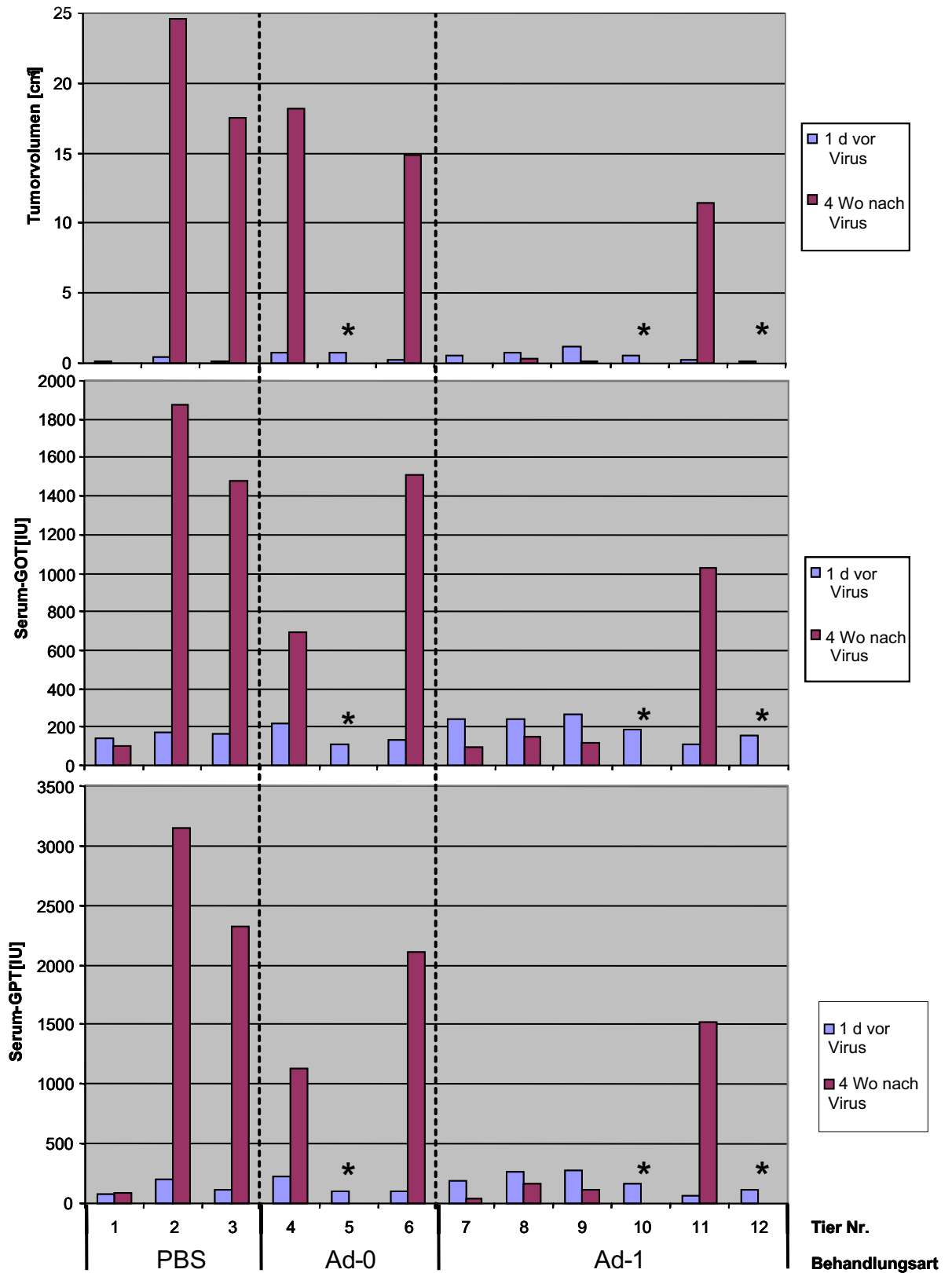


Abb. 19: Tumorstadium, Serum-GOT und -GPT der Tiere 1-12 zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen. Dargestellt sind das Tumorstadium, die Serum-GOT und die Serum-GPT für jedes Tier der Tiere 1-12 zu den Zeitpunkten der beiden Blutentnahmen einen Tag vor der Virusgabe und vier Wochen danach. Unter den Tiernummern findet sich in Klammern die Behandlungsart des jeweiligen Tieres. (Mit \* markierte Tiere sind im Laufe der Studie verstorben.)

Tumorzvolumina, Serum-GOT und -GPT der Tiere 13-24 zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen

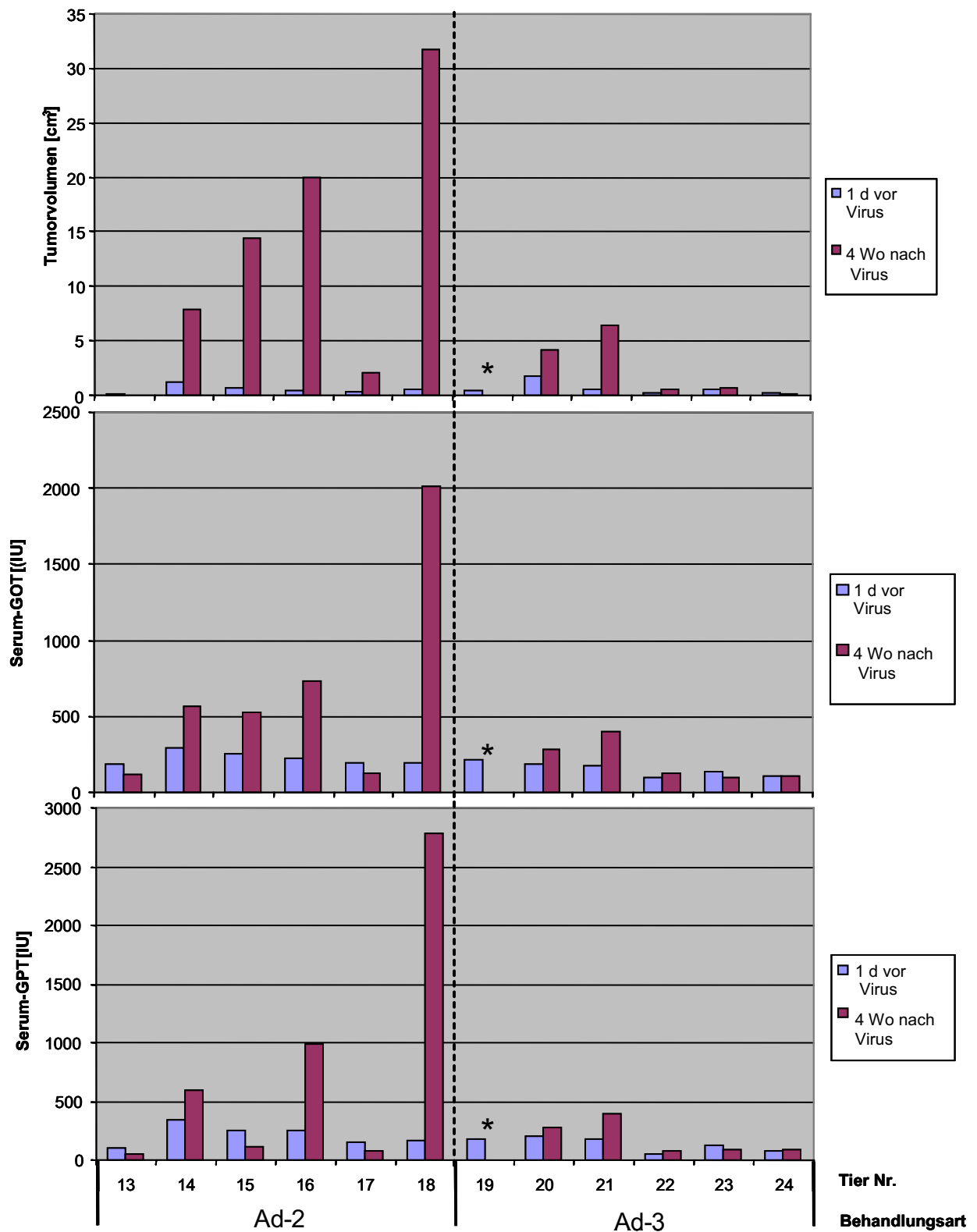


Abb. 20 : Tumorvolumina, Serum-GOT und -GPT der Tiere 13-24 zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen. Dargestellt sind die Werte für jedes der Tiere 13-24 zu den Zeitpunkten der beiden Blutabnahmen einen Tag vor der Virusgabe und vier Wochen danach. Mit einem \* markierte Tiere sind im Laufe der Studie verstorben.

Wie deutlich zu sehen ist, sind die GOT- wie auch die GPT-Werte der einzelnen Tiere der beiden Kontrollgruppen (PBS und Ad-0) vier Wochen nach der Behandlung deutlich höher als zum ersten Entnahmezeitpunkt. Die einzige Ausnahme bildet das PBS-Tier, das bereits eine Woche nach Virusinokulation tumorfrei war. In der Ad-1-Gruppe findet sich ein Tier, das einen klaren Anstieg der GOT- und GPT-Werte zeigt, die anderen überlebenden Tiere zeigen einen Rückgang der Serumwerte. Die Werte der Ad-2-Behandlungsgruppe stellen sich heterogen dar: während zwei der Tiere einen Rückgang der Serum-GOT-Aktivität und drei einen Rückgang der Serum-GPT-Aktivität aufweisen, ist bei den anderen Tieren ein mäßiger bzw. in einem Fall sogar ein massiver Anstieg der Serumenzymwerte zu verzeichnen.

Die Abbildungen 21 und 22 veranschaulichen noch einmal die Abhängigkeit der Serumaktivitäten von GOT und GPT vom Gesamttumorvolumen der Tiere. Wenngleich die Abhängigkeit nicht vollkommen linear ist, so ist die Tendenz doch klar zu erkennen.

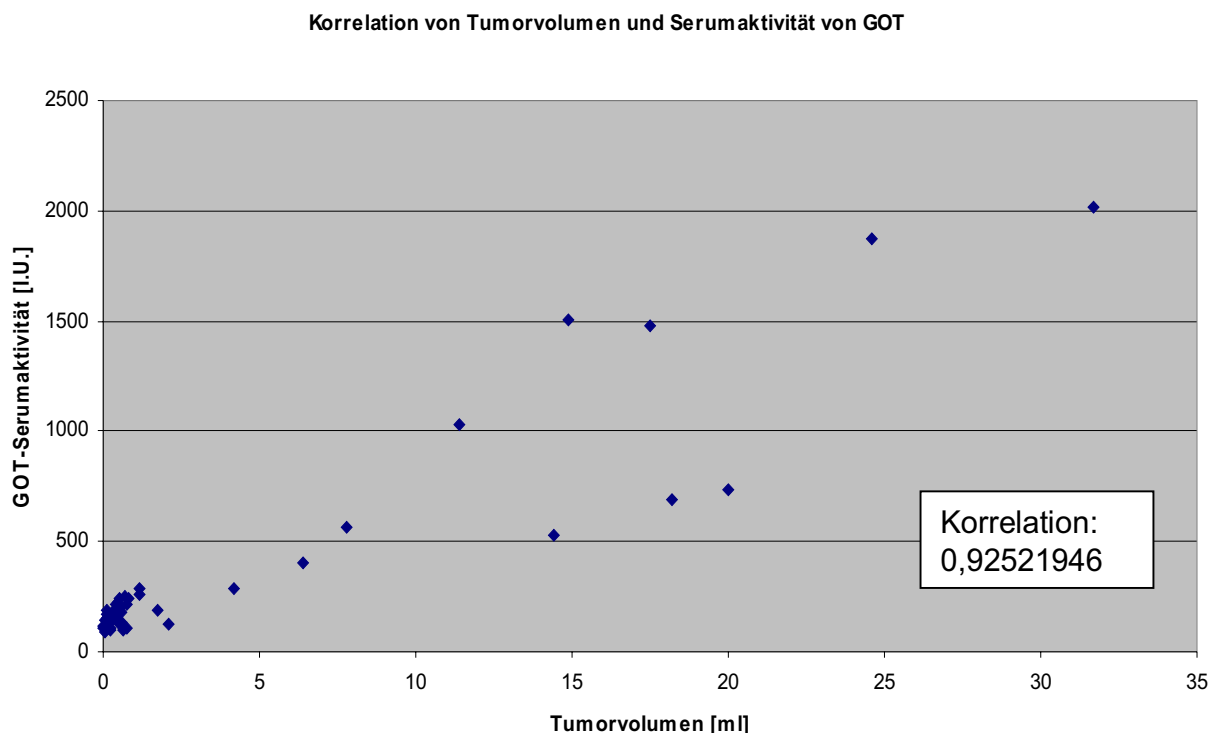


Abb. 21: Die Abbildung zeigt die Korrelation von Tumorvolumen und der Serumaktivität von GOT aller Tiere zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten. Eine Abhängigkeit der Serumaktivität vom Tumorvolumen ist klar zu erkennen.

Korrelation von Tumorzellen und Serumaktivität von GPT

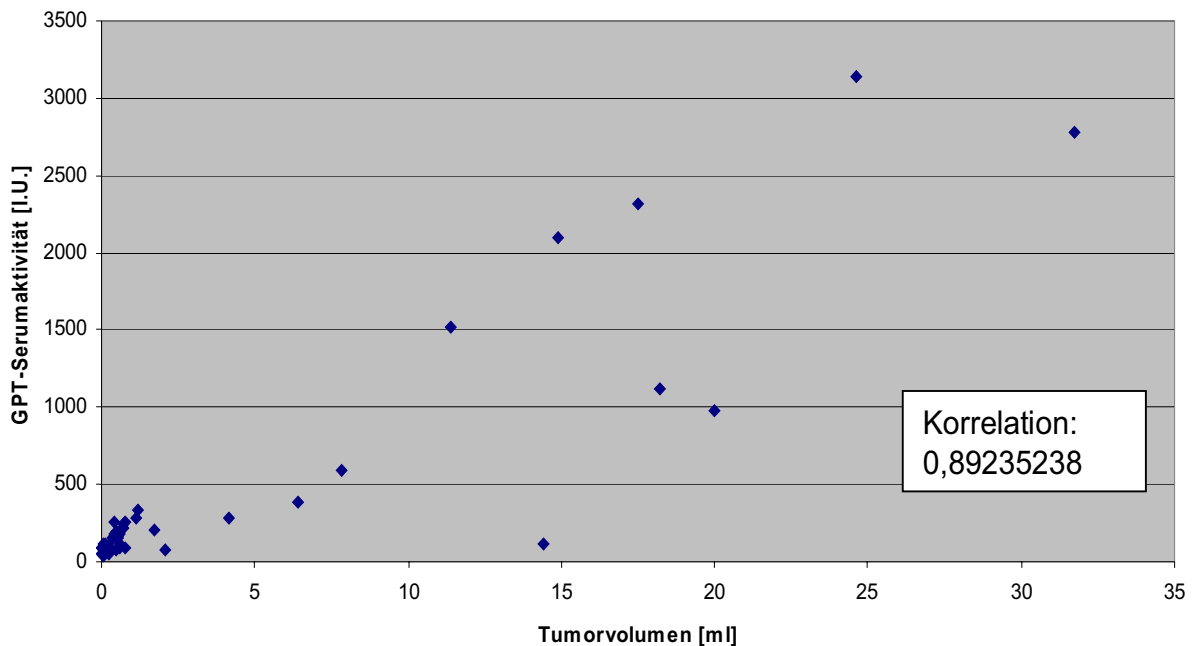


Abb. 22: Die Abbildung zeigt die Korrelation von Tumorzellen und der Serumaktivität von GPT aller Tiere zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten. Eine Abhängigkeit der Serumaktivität vom Tumorzellen ist klar zu erkennen.

Die Korrelation der GOT-Werte mit der Tumorzellen liegt mit 0,925 nahe bei 1, was einer großen linearen Abhängigkeit entspricht. Für die Korrelation der GPT-Werte mit der Tumorzellen ergibt sich mit 0,892 ein Wert, der leicht unter dem für GOT, jedoch noch immer nahe 1 liegt.

### 3.5 Etablierung der Lebendzellpräparation

Die Etablierung einer Methode zur Lebendzellpräparation ist für die Beurteilung der Immunzellinfiltration von Leber- und Tumorgewebe von Interesse, erlaubt sie doch eine durchflusszytometrische Analyse der Infiltrate. Der Vorteil der Durchflusszytometrie gegenüber der Histologie besteht darin, dass eine quantitative Aussage über die verschiedenen Komponenten der Immunantwort möglich ist, während die Histologie nur qualitative und semiquantitative Aussagen erlaubt.



Für die Durchflusszytometrie benötigt man Suspensionen vereinzelter lebender Zellen. Eine solche Suspension galt es zu gewinnen, wobei ein von Desseraut et al. (1999) beschriebenes Protokoll als Grundlage diente. Für unsere Untersuchungen von vorrangigem Interesse war die Untersuchung von Lebergewebe mit den enthaltenen Immunzellen; des Weiteren sollte versucht werden, die Immunzellen aus der Milz zu isolieren. Entscheidend ist hierbei, dass es gelingt, lebende Zellen zu gewinnen.

Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl der Zellsuspension eines bestimmten Gewebes wird bestimmt, indem der Suspension der Totfarbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) zugesetzt wird, der nur in tote Zellen eindringen kann und dort an DNA bindet. Auf diese Weise werden tote und schwer beschädigte Zellen markiert. Nach Anregung durch den monochromen Laser des Durchflusszytometers wird der Farbstoff bei 647 nm detektiert und zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt. Die auf diese Weise durchgeführten Messungen ergaben sehr eindeutige Ergebnisse. Um nicht nur das Verhältnis der lebenden zu den toten Zellen, sondern auch deren absolute Zahl zu bestimmen, werden Flow-Check-Fluorospheres und Flow-Check 770 Fluorospheres im Verhältnis 1:1 gemischt und mit diesen das Durchflusszytometer geeicht. Führt man nun die Messung mit dem Totfarbstoff durch, so setzt das Durchflusszytometer die gemessene Zellzahl zur Eichung ins Verhältnis und berechnet daraus die absolute Zellzahl.

Im Folgenden ist als Beispiel für die durchflusszytometrischen Analysen eine Messung von Tumorzellen und deren Färbung mit 7-AAD dargestellt (Abb. 23 a-c).

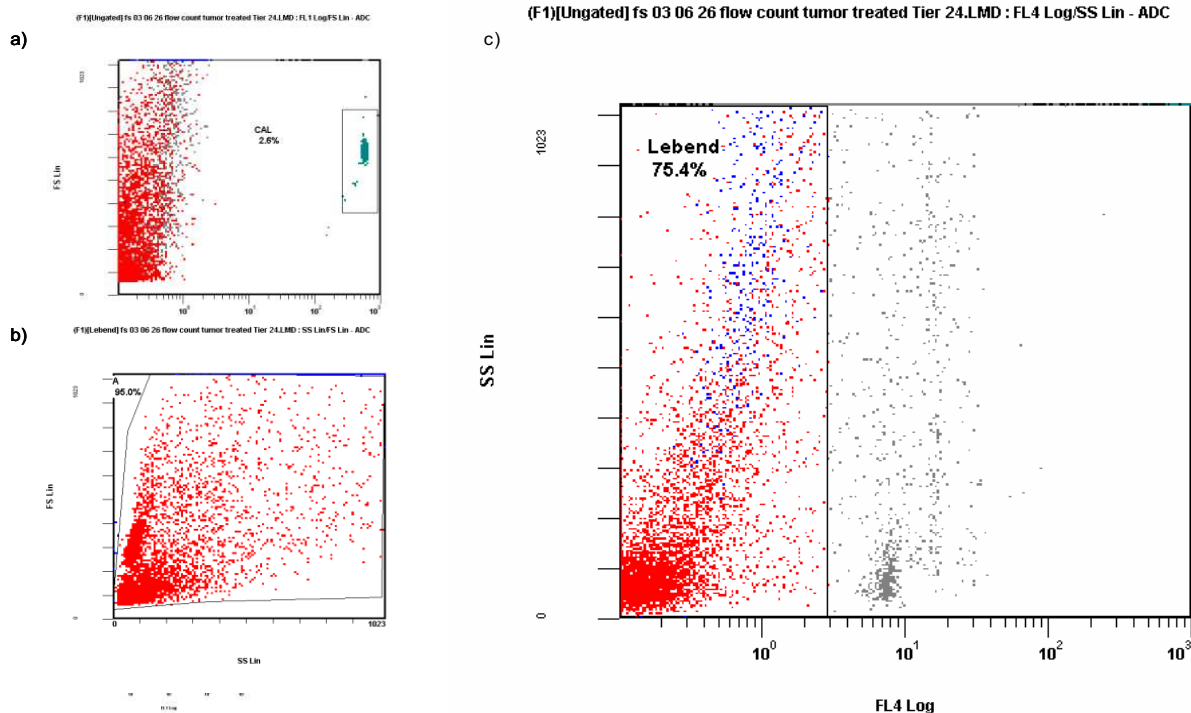


Abb. 23 a-c: Durchflusszytometrische Messungen. a) Einstellung des Durchflusszytometers mit Flow-Chek-Beads. (Die den Flow-Count-Beads entsprechenden grünen Punkte befinden sich in dem kleinen schwarzen Kästchen.) b) Dargestellt ist das *gating*, bei dem die zu untersuchenden Zellen ausgewählt werden. In diesem Fall wurden alle Zellen ausgewählt, wodurch 95% der Zellen im *Gate* sind. c) In einer Lebend-Tod-Färbung wird der Anteil der lebenden Zellen einer Zellsuspension ermittelt. Die farbig dargestellten Zellen auf der linken Seite (75,4%) zeigen keine Fluoreszenz und leben somit. Die auf der rechten Seite grau dargestellten Zellen weisen Fluoreszenz auf, da sie mit 7-AAD, einem die DNA färbenden Fluoreszenzfarbstoff, markiert sind.

Nachdem das Durchflusszytometer mit den Flow-Check-Beads eingestellt ist (siehe Abb. 23 a: die grünen Punkte, die den Flow-Check-Beads entsprechen, befinden sich weitgehend in dem kleinen schwarzen Kästchen rechts im Bild), werden die zu untersuchenden Zellen ausgewählt (so genanntes „*gating*“). In diesem Fall wurden alle Zellen ausgewählt, weshalb sich 95,0% der Zellen im *Gate* befinden (die dünne schwarze Linie umfasst fast alle Zellen), da die Überlebenszahl der Zellen insgesamt und unabhängig von der Zellart bestimmt werden sollte (Abb.23 b).

Die durchgeführte Totfärbung separiert die Zellen klar in zwei Populationen (Abb. 23 c): links im Bild finden sich die lebenden Zellen, die frei von Fluoreszenz sind (hier ist fluoreszenzfrei als Fluoreszenz < 30 definiert). Von der Population der lebenden grenzt sich klar erkennbar die Population der toten Zellen ab.

Um einen ersten Eindruck von den Möglichkeiten der Gewebearbeitung zu gewinnen, wurden als Vorversuche sowohl Leber- als auch Milzproben mit einem Skalpell in etwa 1 mm große Stücke geschnitten und durch ein engmaschiges Metallsieb gedrückt. Nach entsprechender Weiterverarbeitung (vgl. Material und Methoden) und im Falle der Leber- und Tumorverarbeitung nach Enzymverdau wurden beide Gewebearten nach abschließender Zentrifugation durch Filteraufsätze (50 µm) gefiltert. Die auf diese Weise gewonnenen Milzzellen waren zufriedenstellend homogen suspendiert, die Leber- und Tumorzellen hingegen waren trotz des Enzymverdaues nicht ausreichend vereinzelt, wodurch ein großer Teil der Zellen in den Filteraufsätzen zurückblieb; zusätzlich neigten diese Zellen nach dem Filtern so stark zum Verklumpen, dass eine Analyse im Durchflusszytometer nicht möglich war.

Durch Variation der Dauer des Enzymverdaues und Vergleich der ausschließlichen Zellseparation durch Passagieren durch das Sieb mit der Vereinzelnung durch die Behandlung mit dem Enzymgemisch stellte sich heraus, dass eine kurze Behandlung mit den Enzymen sowohl die effektivste als auch schonendste Methode der Zellvereinzelnung darstellt: Nicht nur, dass sich beim Filtern durch die Filteraufsätze kaum Rückstände fanden, die Zahl der lebenden Zellen betrug nach vier Stunden enzymatischer Behandlung im Lebergewebe 27,9% gegenüber nur 19,1% lebender Zellen nach Vereinzelnung mittels des Siebes. Der Vergleich der Zahl lebender Zellen in der Suspension ergab 53% Überlebende nach zweistündigem Verdau gegenüber 25,8% lebenden Zellen nach vierstündigem Verdau. Da dies eine steigende Zahl lebender Zellen mit sinkender Zeit der Enzymbehandlung vermuten lässt, die mechanische Beanspruchung der Zellen beim Pressen durch das Sieb andererseits aber ebenfalls problematisch ist, musste das Gewebe möglichst schonend zerkleinert werden, um die zur Zellvereinzelnung nötige Enzymbehandlung verkürzen zu können.

In einem nächsten Durchgang wurden die Gewebe durch eine Edelstahl-Knoblauchpresse mit gut passendem Stempel gepresst, anstatt sie mit dem Skalpell zu zerkleinern und durch das Sieb zu pressen. Dann wurde nach dem zuvor beschriebenen Protokoll weiter gearbeitet, wobei die Inkubationszeit auf eine Stunde reduziert wurde und dem Filtern der Leber- und Tumorzellsuspension durch die Filteraufsätze nur noch eine Zentrifugation folgte. Die Präparation der Leber- und Tumorzellen auf diese Weise erbrachte deutlich bessere Ergebnisse als bei dem ersten

Versuch: die Zellen waren nach der Inkubation mit den Enzymen besser vereinzelt als nach der vorherigen Bearbeitung mit dem Skalpell und neigten weniger zur Verklumpung. Für die Bearbeitung der Milz hingegen erwies sich die Knoblauchpresse als wenig geeignet, da ein großer Teil des Gewebes in der Presse zurück blieb, weshalb die Milz im Folgenden wie schon zuvor mit dem Skalpell und dem Sieb zerkleinert wurde.

Die Präparation der Tiere ergab im folgenden bis zu 90,5% lebende Zellen aus Tumorgewebe und bis zu 90,3% lebende Zellen aus Milzgewebe. Allerdings fiel eine große Schwankungsbreite der Zahl der überlebenden Zellen der verschiedenen Tiere auf, gab es doch auch Zellsuspensionen, die nur 41,5% lebende Zellen aus Tumorgewebe oder nur 19,5% lebende Zellen aus Milzgewebe enthielten. Beim Auftragen der Zahl der überlebenden Zellen in der Reihenfolge der Präparation der Tiere zeigte sich für die Milzzellen eine deutliche Abhängigkeit des Zellüberlebens von der Zeit, die bis zur Weiterverarbeitung verging.

Tag 1: Überleben der Milzzellen

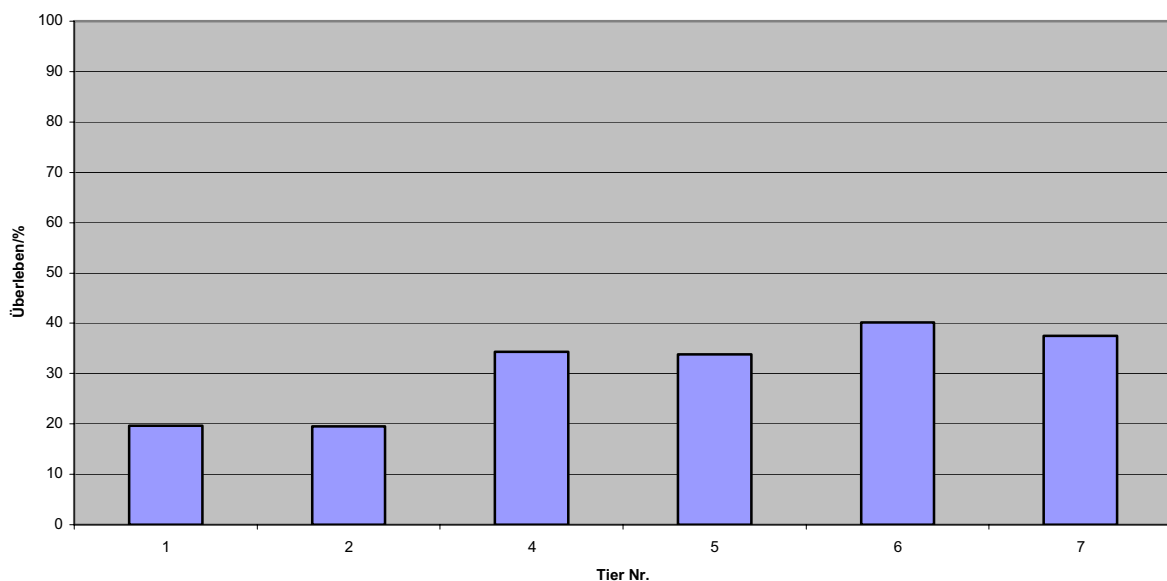


Abb. 24: Überlebende Milzzellen in % nach der Zellseparation in der zeitlichen Reihenfolge der Präparationen (Am ersten Tag wurden sechs Tiere präpariert).

Tag 2: Überleben der Milzzellen

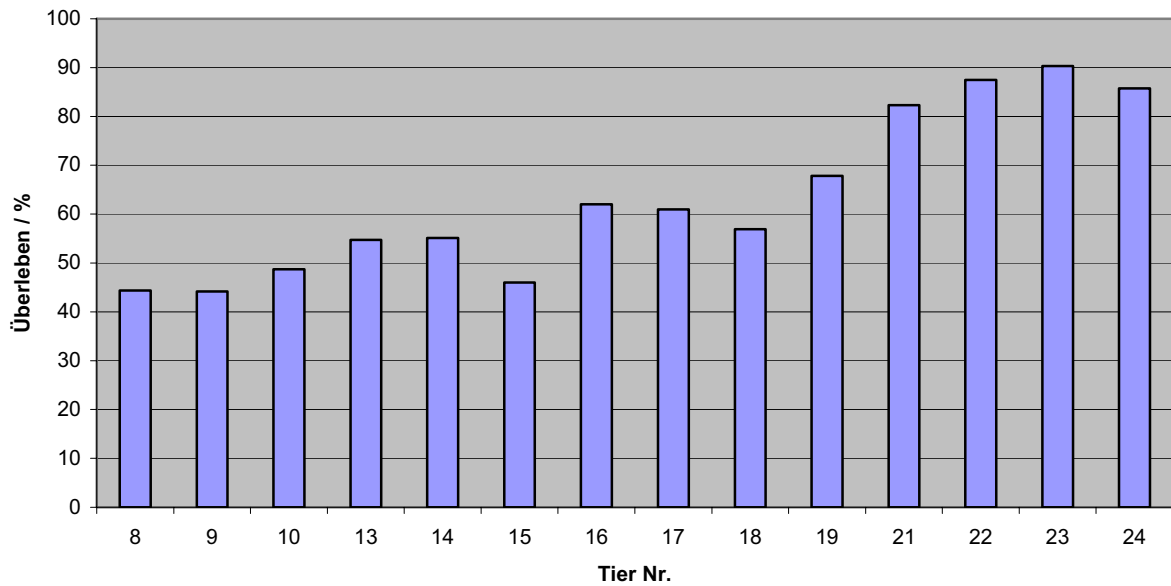


Abb. 25: Überlebende Milzzellen in % nach der Zellseparation in der zeitlichen Reihenfolge der Präparationen am zweiten Tag. Wie schon an den Werten der am ersten Tag präparierten Tiere zu sehen ist, steigt die Überlebensrate der Zellen, je näher der Zeitpunkt der Präparation an dem der Weiterverarbeitung liegt. (Am zweiten Tag wurden vierzehn Tiere präpariert.)

Da die Milzzellen entweder bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt wurden oder aber direkt mit ACK-Puffer die Erythrozyten lysiert wurden und zwischen diesen beiden Behandlungsweisen keine Unterschiede erkennbar waren, liegt die Vermutung nahe, dass das Überleben der Zellen von der Gesamtdauer von der Präparation bis zur durchflusszytometrischen Analyse für das Überleben der Zellen entscheidend ist.

Für die Tumorzellen sieht dies ganz anders aus: Es findet sich auch hier eine Differenz in der Zahl der überlebenden Zellen, die allerdings deutlich kleiner ist als die der Milzzellen und die nicht vom Zeitpunkt der Weiterverarbeitung abzuhängen scheint.

**Tag 1: Überlebende Tumorzellen**

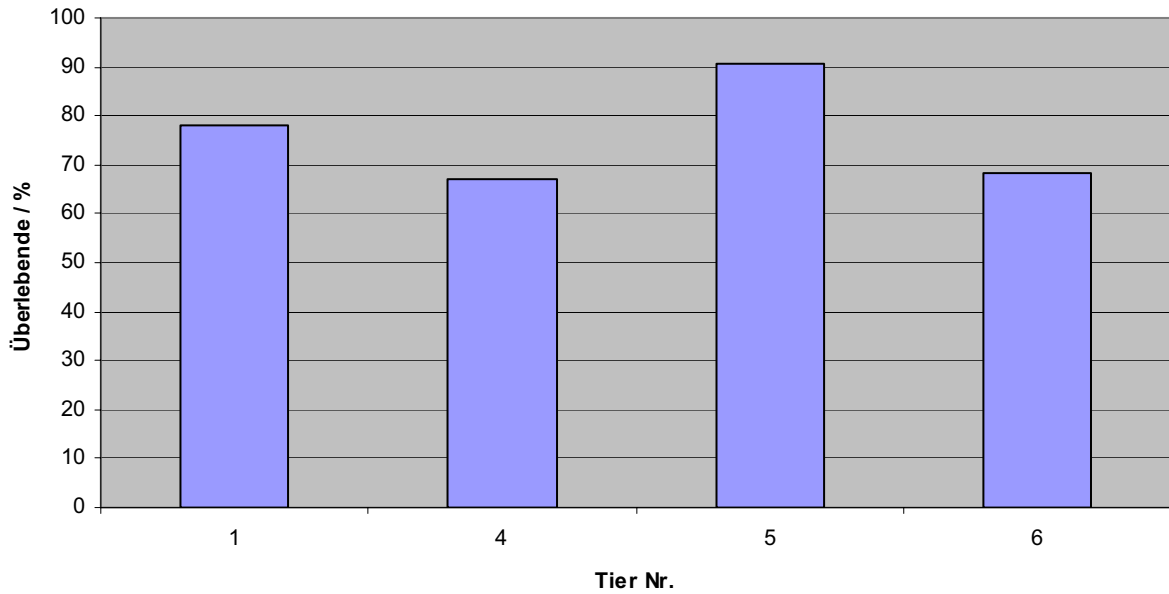


Abb. 26: Überlebende Tumorzellen in % nach der Zellseparation in der zeitlichen Reihenfolge der Präparationen (Am ersten Tag der Präparationen wurden die Tumoren von vier Tieren weiterverarbeitet).

**Tag 2: Überlebende Tumorzellen**

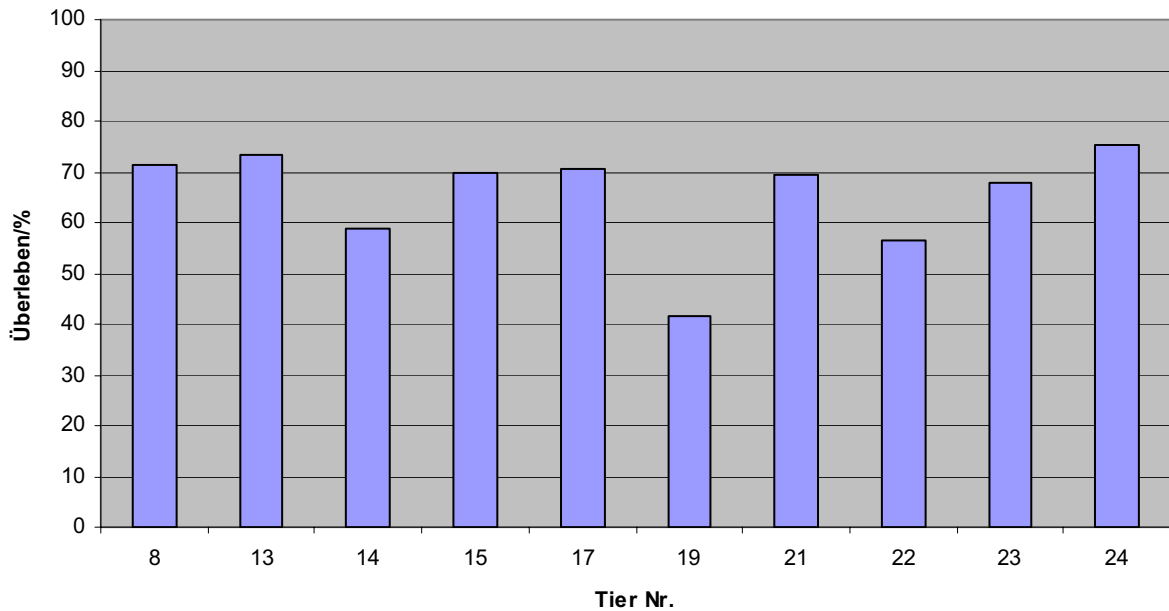


Abb. 27: Überlebende Tumorzellen in % nach der Zellseparation in der zeitlichen Reihenfolge der Präparationen. Es ist kein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Präparation und dem der Weiterverarbeitung in Bezug auf das Überleben der Zellen zu erkennen. (Am zweiten Tag der Präparationen wurden die Tumoren von zehn Tieren weiterverarbeitet.)

In den aufgeführten Graphiken sind die Tiere in der Reihenfolge der Präparation dargestellt. Man kann davon ausgehen, dass für je zwei Tiere etwa eine Stunde Präparationszeit benötigt wurde. Die Tumorzellen wurden nun teils sofort mit den Enzymen verdaut, teils vor dem Verdau eine Stunde auf Eis gelagert. Nach der Enzymbehandlung folgten die Zentrifugation und die Aufnahme in Medium A. Die Zellen wurden nun alle auf Eis gelagert, bis alle Gewebe für die durchflusszytometrische Analyse bereit waren. Weder der Zeitpunkt des Enzymverdaus, noch die Dauer der anschließenden Lagerung auf Eis haben hierbei einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Zellen.

Die weitere Untersuchung der Zellsuspensionen auf das Vorhandensein verschiedener Immunzellen sowie deren Differenzierung führten im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht zu verwertbaren Ergebnissen.

### ***3.6 Histologische Analyse der Immunzellinfiltrate in den Tumoren und dem Lebergewebe***

#### **3.6.1 Etablierung von Histologieprotokollen**

Als Vorversuch wurden Schnitte in zwei Dicken (5 µm und 10 µm) angefertigt und diese dann entweder in 100% Methanol (-20°C), in 30% Aceton / 70% Methanol (-20°C) oder in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min fixiert. Die nun zur Begutachtung der Morphologie durchgeführte Färbung mit Hämatoxylin ließ deutlich erkennen, dass Paraformaldehyd das morphologisch beste Ergebnis brachte. Da es sich bei dem geschnittenen Gewebe hauptsächlich um teils nekrotischen Tumor handelte, sahen die Schnitte bei 10 µm deutlich besser aus als die 5 µm dicken. Reines Lebergewebe hingegen lässt sich gut bei 5 µm schneiden, der Vergleichbarkeit halber wurde bei den vorliegenden Schnitten jedoch auch hier die Dicke von 10 µm gewählt.

Die teils relativ stark aufgeweiteten Sinusoide der Leberschnitte sind möglicherweise auf das verhältnismäßig große Perfusionsvolumen zurückzuführen, durch das andererseits aber die Erythrozyten nahezu restlos entfernt werden konnten.

Für immunhistologische Färbungen sollte in unserem Labor ein Färbeprotokoll unter Verwendung von Fast Red etabliert werden, bei dem mit Hämatoxylin gegengefärbt wird.

Fast Red ist das Substrat der Wahl für Antikörper, die an alkalische Phosphatase gebunden sind, und ergibt eine intensive Rotfärbung der spezifisch angefärbten Bereiche. Hämatoxylin färbt das Chromatin der Zellkerne und einige Bestandteile des Zytoplasmas blau an.

Zur Färbung wurden die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten Schnitte 30 min in 100% Methanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fixiert und anschließend in PBS ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Nun wurden die Schnitte gemäß der Arbeitsanleitung des APAAP-Systems mit Kaninchenserum in Tris-Puffer (1:20) 10 min lang inkubiert, einmal in Tris-Puffer gespült (1 min) und sodann 60 min mit dem primären Antikörper (1:50 in der 1:20-Mischung aus Serum und Tris-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Tris folgten zwei je sechzigminütige Inkubationen: die erste mit dem Dualsystem-Brückenantikörper (1:100 in Tris), die zweite mit dem Dualsystem-APAAP-Komplex (1:100 in Tris), zwischen denen zweimal mit Tris gewaschen wurde. Es folgt eine erneute Inkubation mit dem Dualsystem-Brückenantikörper (1:100 in Tris) - diesmal für 15 min – und nach erneutem zweimaligem Spülen in Tris eine weitere fünfzehnminütige Inkubation mit dem Dualsystem-APAAP-Komplex (1:100 in Tris). Anschließend wurden die Schnitte unter Leitungswasser gespült und im Anschluß bei Raumtemperatur mit Fast Red-Reagenz überschichtet. Die unter dem Mikroskop verfolgte Entwicklung wurde nach 40 min durch Spülen in Leitungswasser beendet und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Nach 6 min in der Färbelösung wurden die Schnitte 10 min lang unter fließendem Leitungswasser gebläut und die Schnitte im Folgenden mit Glycerolgelantine eingedeckelt.

Da das Färbeergebnis nicht zufrieden stellend war, wurden nun nach und nach Veränderungen im Protokoll vorgenommen, um eine deutliche spezifische Anfärbung zu erzielen. Hierzu wurden im ersten Schritt die Inkubationszeiten für die jeweils zweite Inkubation der Dualsystem-Antikörper von 15 min auf 25 min erhöht. Auch die Fast



Red-Entwicklungszeit wurde variiert. Da dies alles keine Veränderung brachte, wurden die Schnitte nun über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert, wobei das Protokoll sonst wie zuvor durchgeführt wurde (1. Inkubation mit Dualsystem-Antikörpern je 30 min, 2. je 15 min). Eine spezifische Anfärbung ließ sich nun zwar erkennen, doch überzeugte das sich ergebende Bild nicht durch seinen Gesamteindruck, erschien doch die spezifische Anfärbung noch immer etwas undeutlich vor einem nur mäßig zu erkennenden Gewebshintergrund. Aus diesem Grund galt es, ein anderes Protokoll zu finden, das zu einer klareren Abhebung der spezifischen Anfärbung vom Gewebshintergrund führt.

Bei dem als Ersatz gewählten Protokoll handelt es sich um ein Peroxidase-Antiperoxidase-Protokoll in Kombination mit einem Avidin-Biotin-Komplex (ABC). Die Gegenfärbung erfolgt mit Kernechtrot.

Durch die Entwicklung der Peroxidaseaktivität stellen sich die spezifisch angefärbten Stellen dunkelbraun bis tief violett dar, während Kernechtrot die Kerne rot und das Zytoplasma leicht rosa anfärbt.

Die für dieses Färbeprotokoll durchgeführten Vorversuche hatten zwei Probleme zum Thema: Die verwendete Antikörperkonzentration sollte überprüft werden und Hintergrundphänomene, die bei der Verwendung eines ähnlichen Protokolls aufgetreten waren, sollten beseitigt werden. Hierzu wurden in 4% PFA fixierte Schnitte teils direkt, teils nach Blocken der endogenen Peroxidase mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (-20°C) sowohl mit als auch ohne Mausserum mit verschiedenen Konzentrationen primärer Antikörper inkubiert. Als Antikörperverdünnungen wurden 1:50, 1:100 und 1:200 gewählt. Die anschließende Begutachtung ergab, dass die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geblockten Schnitte nicht notwendigerweise weniger Hintergrund aufwiesen als die nicht geblockten. Der Zusatz von Mausserum scheint ebenfalls kaum Einfluss auf die Bildqualität zu haben.

Die optimierten Histologieprotokolle finden sich im entsprechenden Abschnitt des Kapitels Material und Methoden.

### **3.6.2 Auswertung der Histologien**

Die Färbung histologischer Schnitte mit spezifischen Antikörpern wurde durchgeführt, um einen Eindruck vom Vorkommen und der Verteilung verschiedener Immunzellen zu erhalten und zu überprüfen, ob der Tumor B7-1-positiv ist und sich gleichzeitig einen Überblick über die Präsenz aktivierter B-Zellen und Monozyten zu verschaffen.

#### **PBS-Gruppe**

Die Tiere der PBS-Gruppe zeigten im behandelten Tumor vereinzelte Makrophagen und in der Leber einige wenige CD4+-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen.

#### **Ad-0-Gruppe**

In der zweiten – mit Ad-0 behandelten – Kontrollgruppe fand sich in der Leber erneut eine Infiltration mit NK-Zellen, diesmal zusammen mit einigen Makrophagen. Der behandelte Tumor wies einige CD8+- und vereinzelte CD4+-Zellen auf; NK-Zellen fanden sich kaum. Im unbehandelten Tumor war eine leichte Infiltration mit CD8+-Zellen und eine mäßige mit NK-Zellen zu erkennen; Makrophagen fanden sich nur vereinzelt.

#### **Ad-1-Gruppe**

Ad-1, der nur für IL-12 kodierende Vektor, sorgte im behandelten Tumor für eine Infiltration mit einigen CD4+-, CD8+- und NK-Zellen. In der direkten Umgebung von Gefäßen und vereinzelt sogar im Gewebe befanden sich Makrophagen. Der unbehandelte Tumor wies im Gefäßbereich einige NK-Zellen und Makrophagen auf. Die Leber zeigte eine massive Infiltration mit Makrophagen, die die Bereiche um die Zentralvene aussparte. Des Weiteren war sie deutlich von NK-Zellen infiltriert und auch CD4+- sowie CD8+-Zellen kamen vor.

#### **Ad-2-Gruppe**

Der an den Schnitten der Ad-2-behandelten Tiere gewonnene allgemeine Eindruck deckte sich mit den anhand der Tumormassen gemachten Beobachtungen: bei den Ad2-behandelten Tieren, deren Tumorumfänge über den gesamten

Beobachtungszeitraum im Mittel progressiv waren, fand sich im behandelten Tumor keine nennenswerte Infiltration mit Makrophagen, CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten; NK-Zellen fanden sich nur vereinzelt. Im unbehandelten Tumor dieser Tiere war eine stellenweise Infiltration durch CD4+-Zellen festzustellen, und es gab vereinzelt Makrophagen. Die Leber dieser Tiere zeigte eine deutliche Anzahl von NK-Zellen sowie eine erneut die Zentralvene aussparende massive Infiltration mit Makrophagen. CD4+- und CD8+-Signale fanden sich nur vereinzelt.

### **Ad-3-Gruppe**

Ad-3 nun schließlich sorgte für eine Infiltration des unbehandelten Tumors mit CD4+-CD8+- und NK-Zellen, der behandelte Tumor war frei von Immunzellen. In der Leber dieser Tiere fanden sich nur einige wenige CD4+- und CD8+-Zellen, jedoch wie schon bei den Ad-1- und Ad-2-Tieren eine deutliche Infiltration mit NK-Zellen und Makrophagen.

Aufgrund der Art der Anfärbung wurde deutlich, dass der Tumor nicht B7-1-positiv ist. Es fanden sich jedoch bei allen Tieren Anfärbungen (häufig den Bereich der Zentralvene aussparend), die auf aktivierte Immunzellen (aktivierte B-Zellen, Monozyten) zurückzuführen sind. Diese waren in den Lebern der behandelten Tiere (Ad-1, Ad-2, Ad-3) deutlich häufiger als in denen der Kontrolltiere (PBS, Ad-0). Im behandelten Tumor zeigte sich eine verstärkte Anfärbung bei Ad-1-behandelten Tieren, die anderen Tiere wiesen eine etwa gleichstarke Infiltration mit aktivierten Immunzellen auf.

# Kontrolle vs Makrophagenantikörper

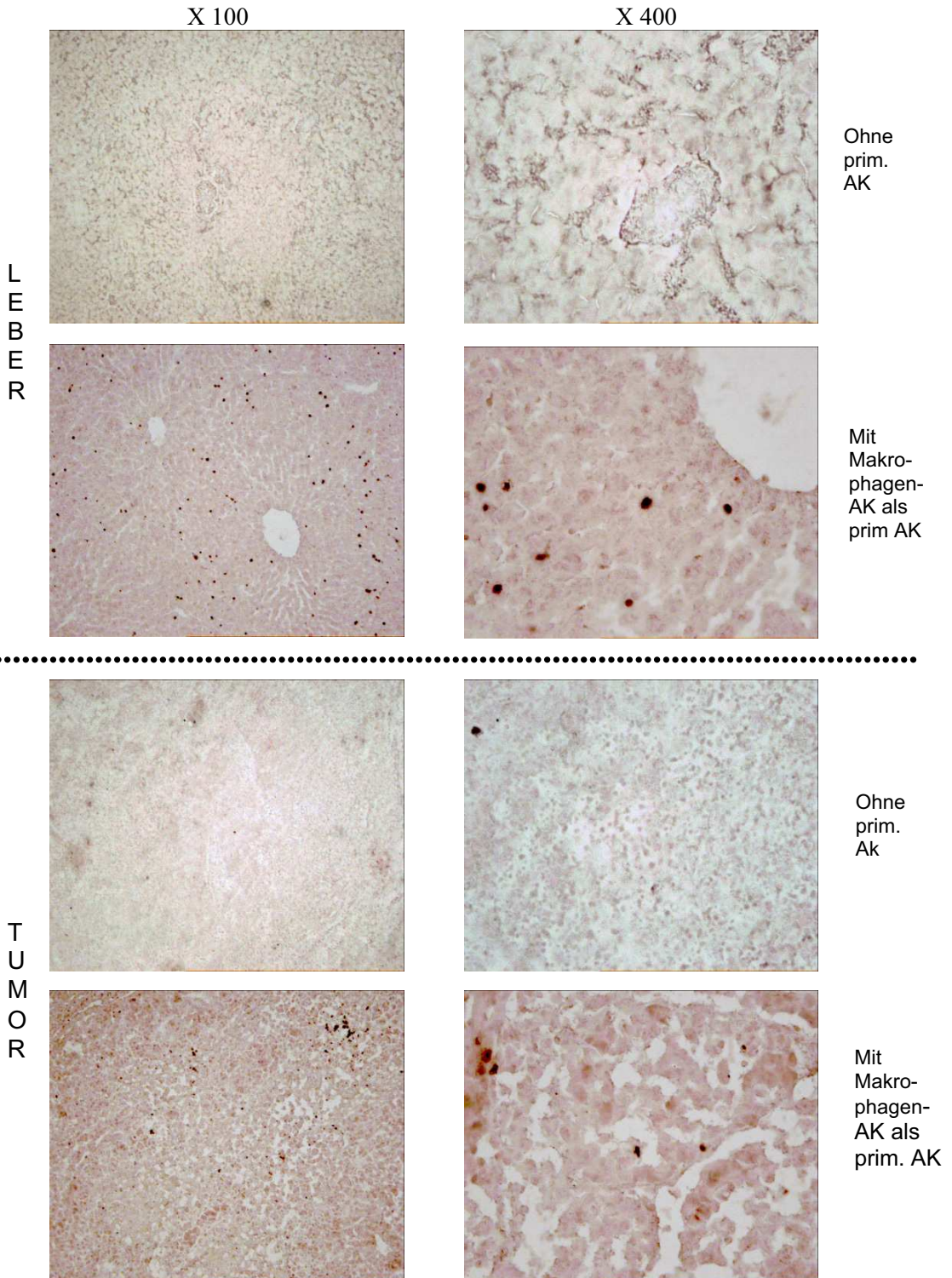


Abb. 28: Dargestellt sind in der oberen Reihe Schnitte der Leber eines Ad-1-behandelten Tieres ohne primären Antikörper, in der Zeile darunter das gleiche Gewebe mit Makrophagenantikörper als primärem Antikörper. Darunter ist in gleicher Weise Tumorgewebe desselben Tieres zu sehen. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

## CD4+ Leber

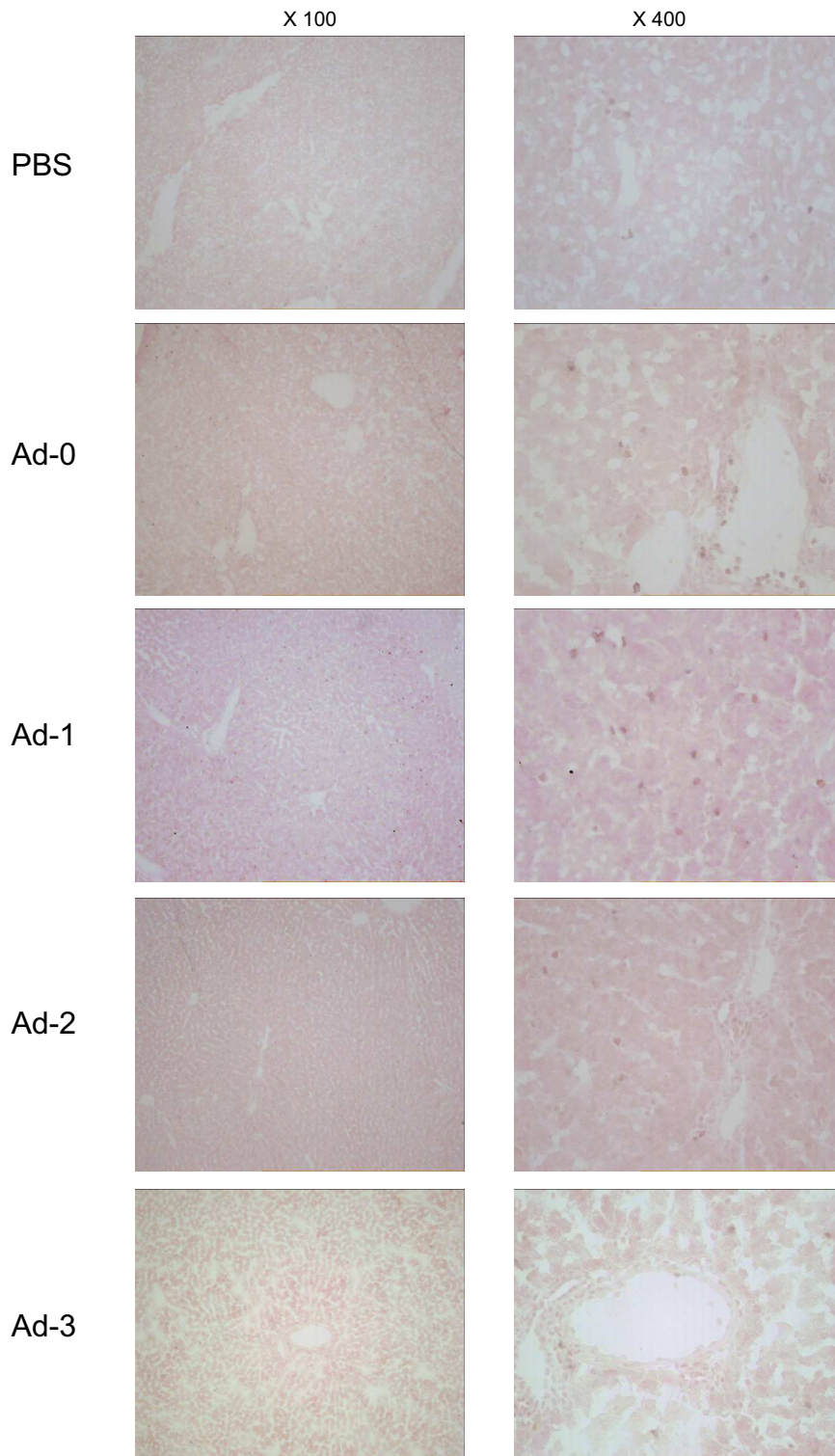


Abb. 29: CD4+ Leber. Dargestellt ist die Infiltration der Leber mit CD4+-Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung

# CD4+ Tumor

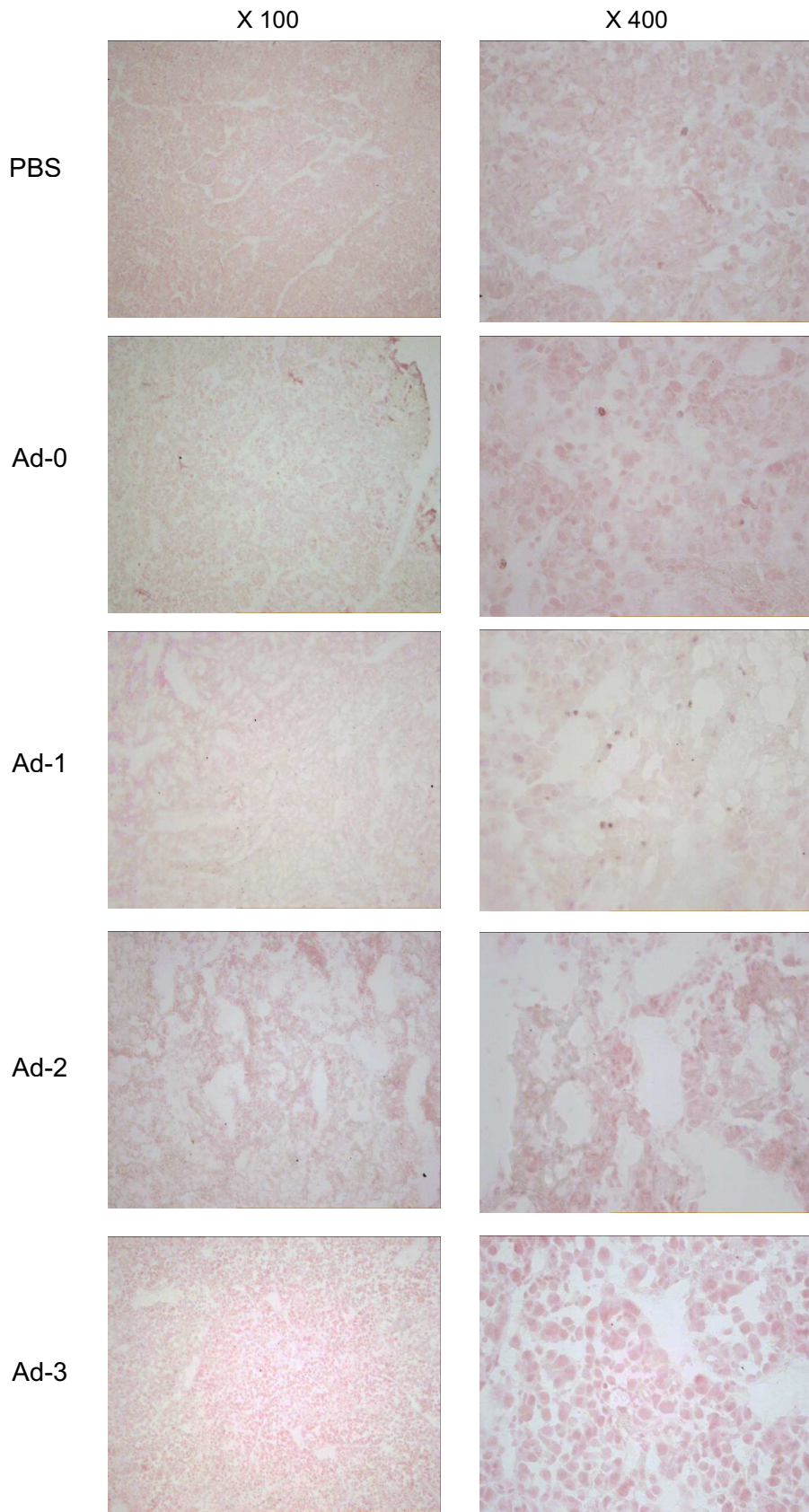


Abb. 30: CD4+ Tumor. Dargestellt ist die Infiltration des Tumors mit CD4+ Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

## CD8+ Leber

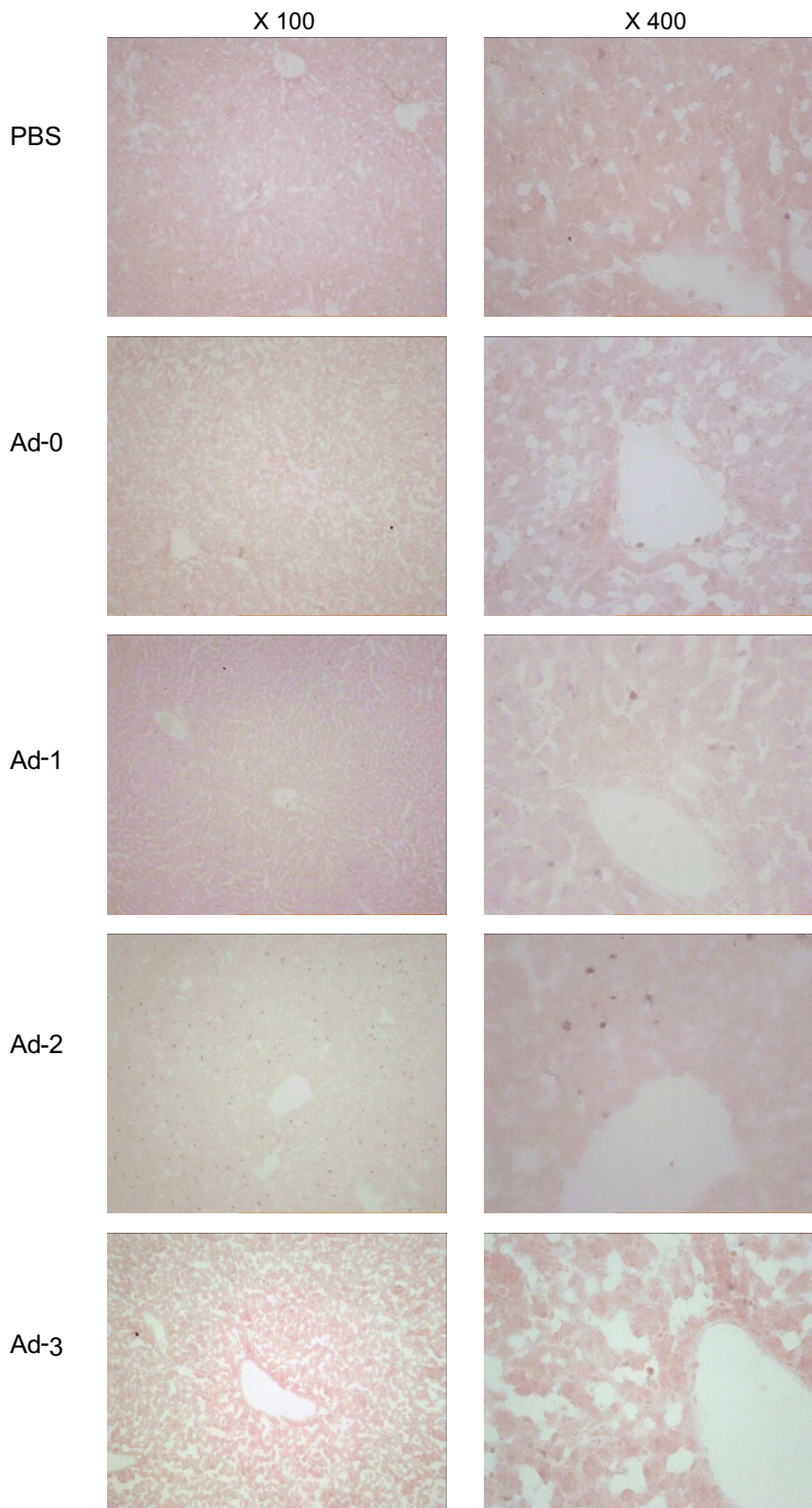


Abb. 31: Dargestellt ist die Infiltration der Leber mit CD8+-Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

# CD8+ Tumor

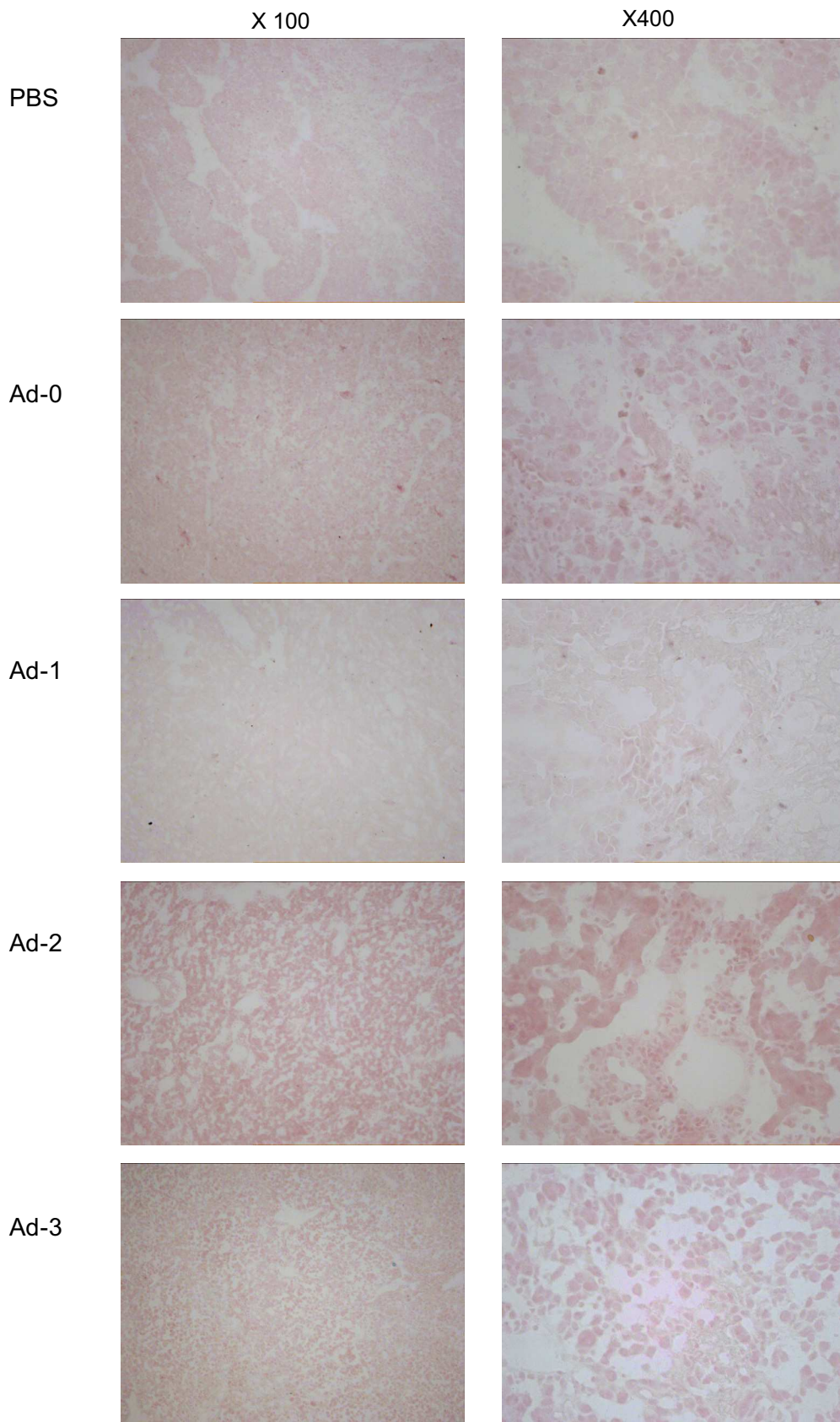


Abb. 32: Dargestellt ist die Infiltration des Tumors mit CD8+-Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.



## CD161+ Leber

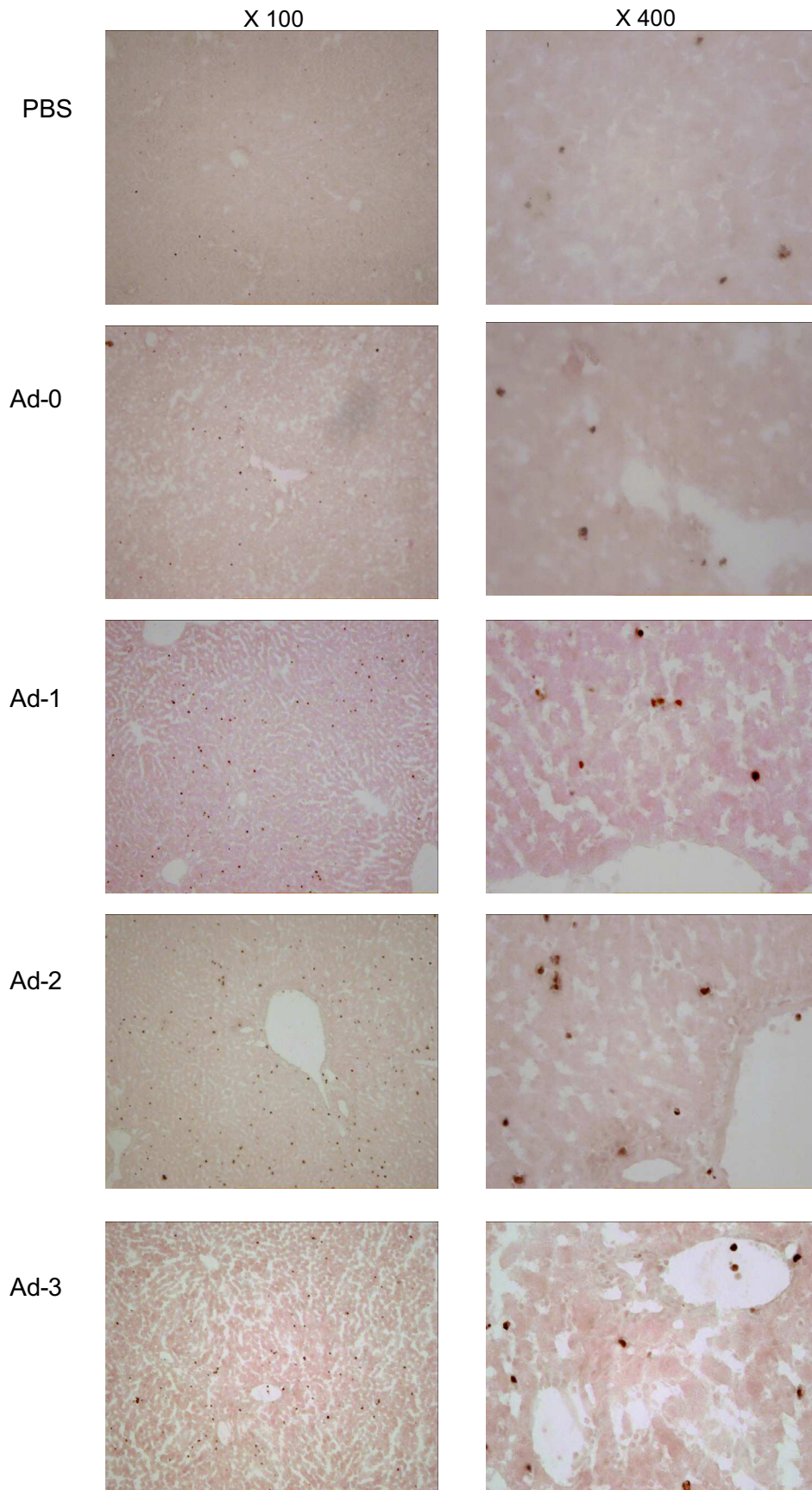


Abb. 33: Dargestellt ist die Infiltration der Leber mit CD161-positiven Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

## CD161+ Tumor

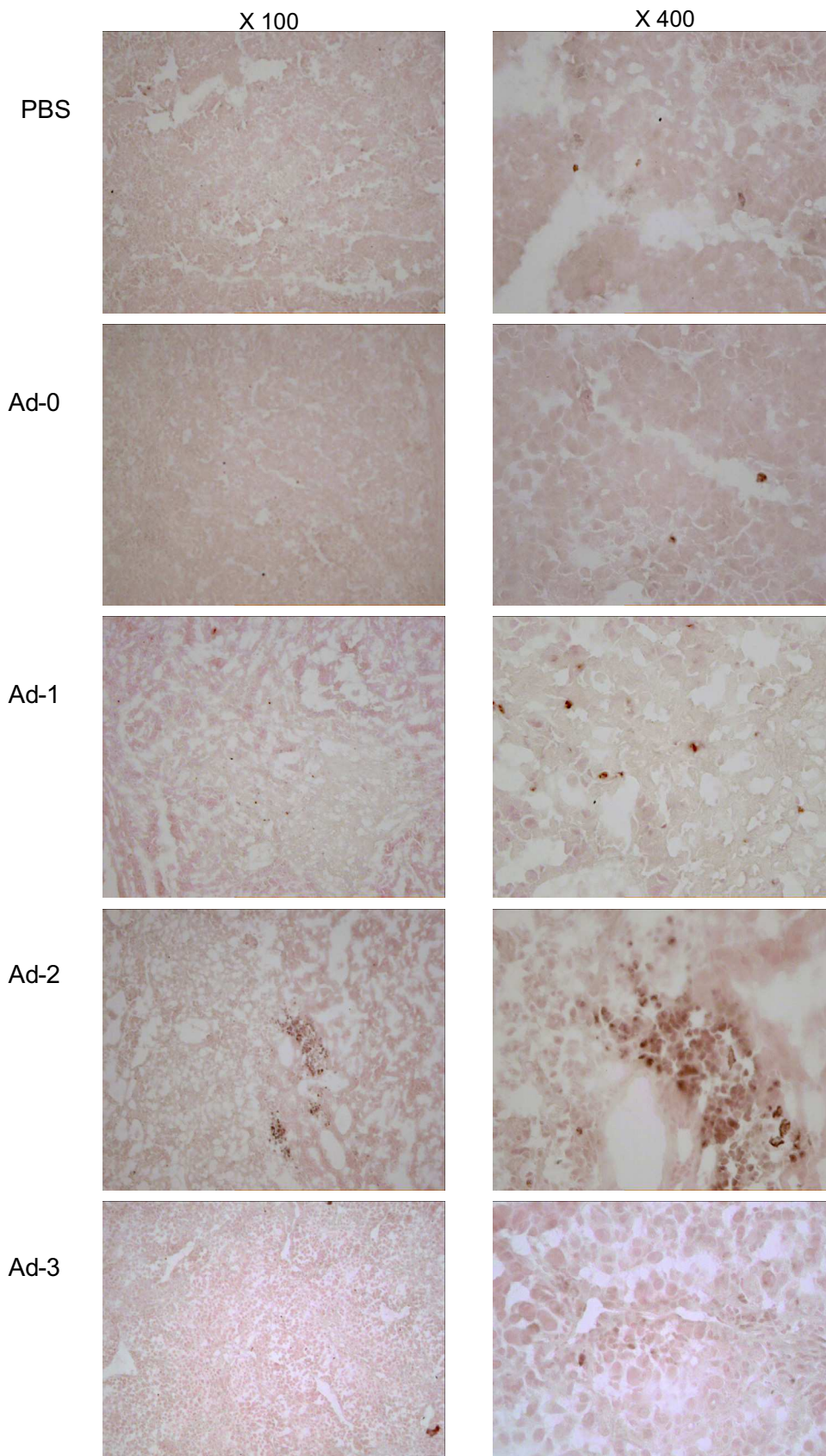


Abb. 34: Dargestellt ist die Infiltration des Tumors mit CD161-positiven Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

# Makrophagen Leber

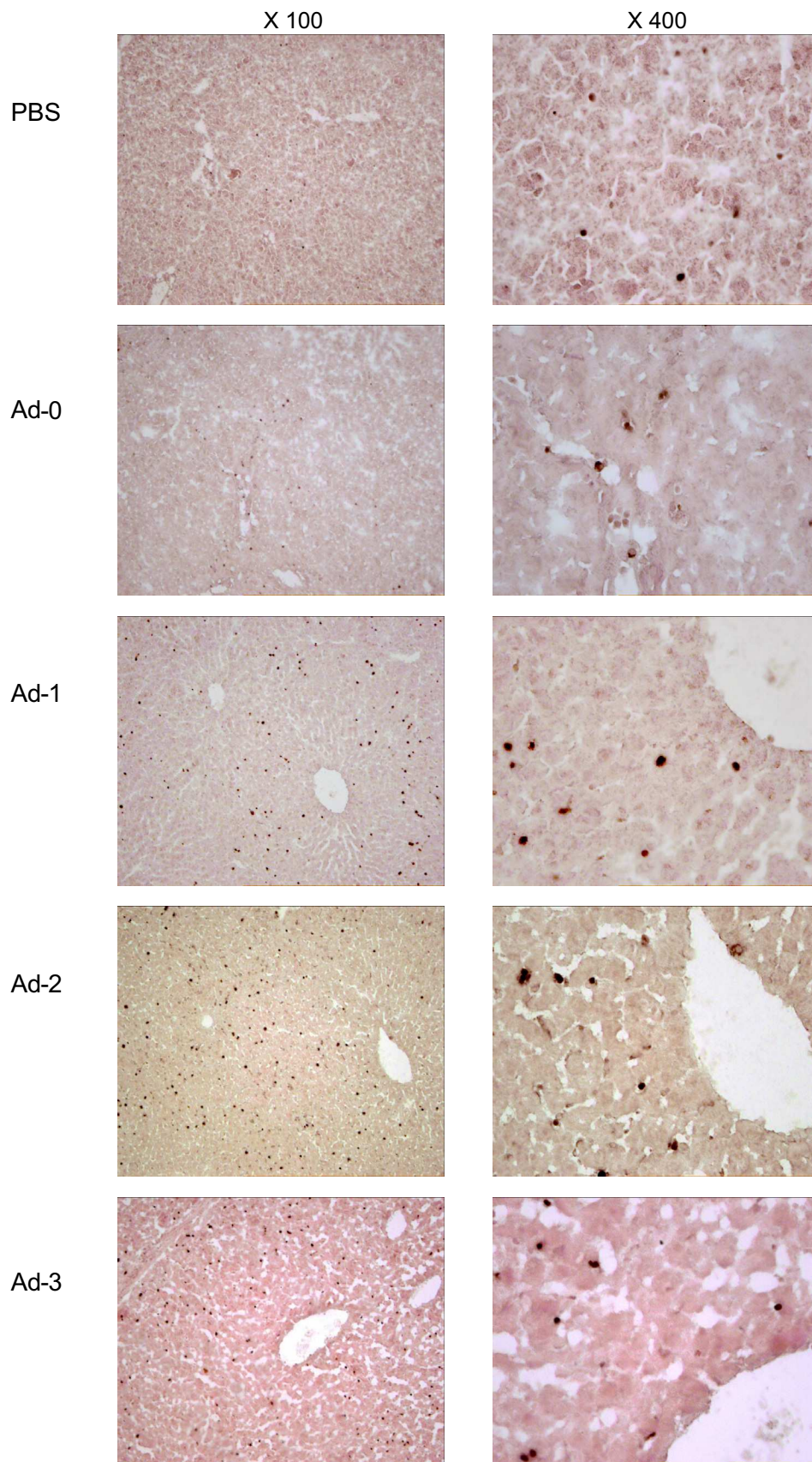


Abb. 35: Dargestellt ist die Infiltration der Leber mit Makrophagen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

# Makrophagen Tumor

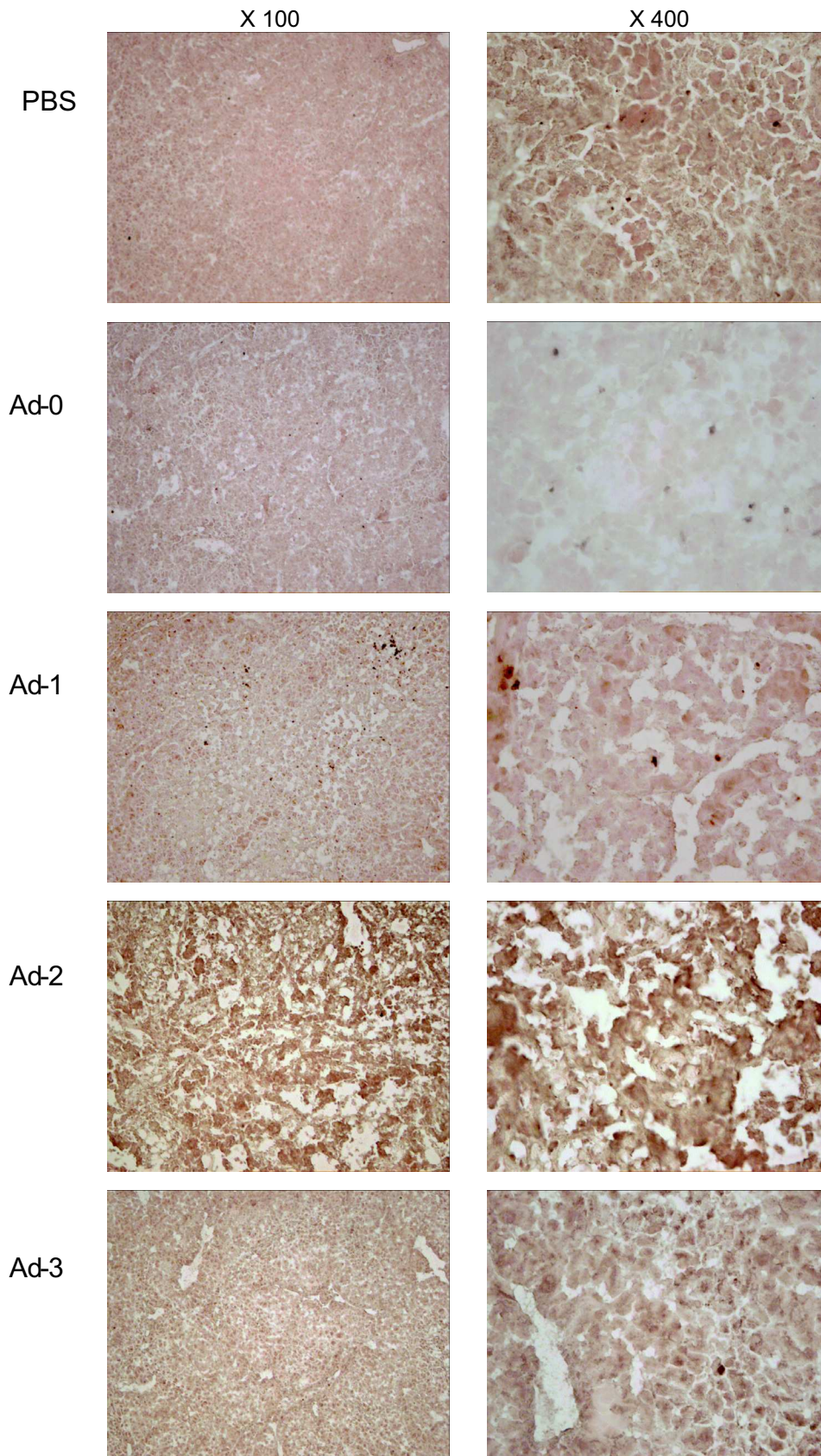


Abb. 36: Dargestellt ist die Infiltration des Tumors mit Makrophagen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

# CD80+ Leber

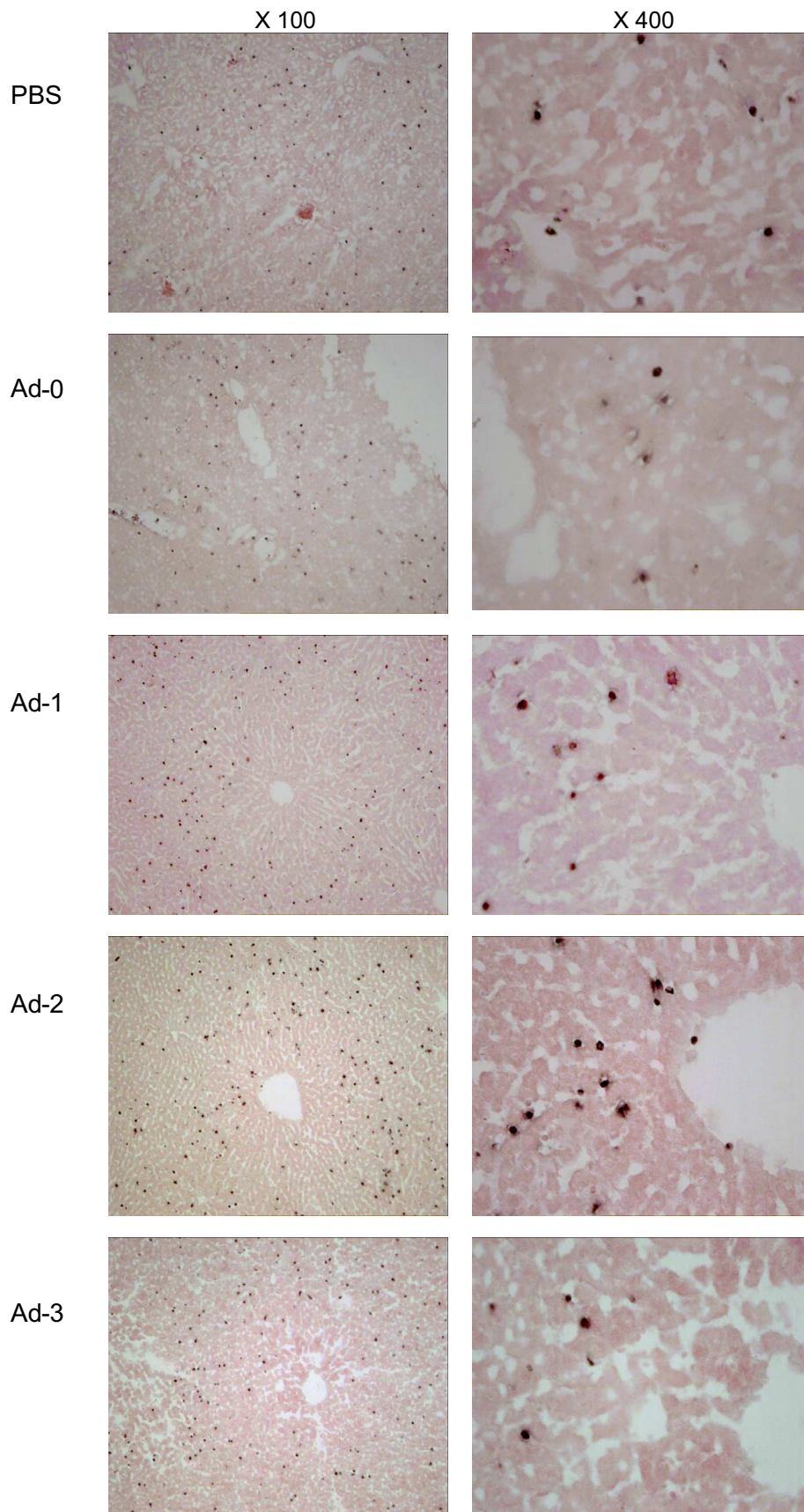


Abb. 37: Dargestellt ist die Infiltration der Leber mit CD80+-Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

# CD80+ Tumor

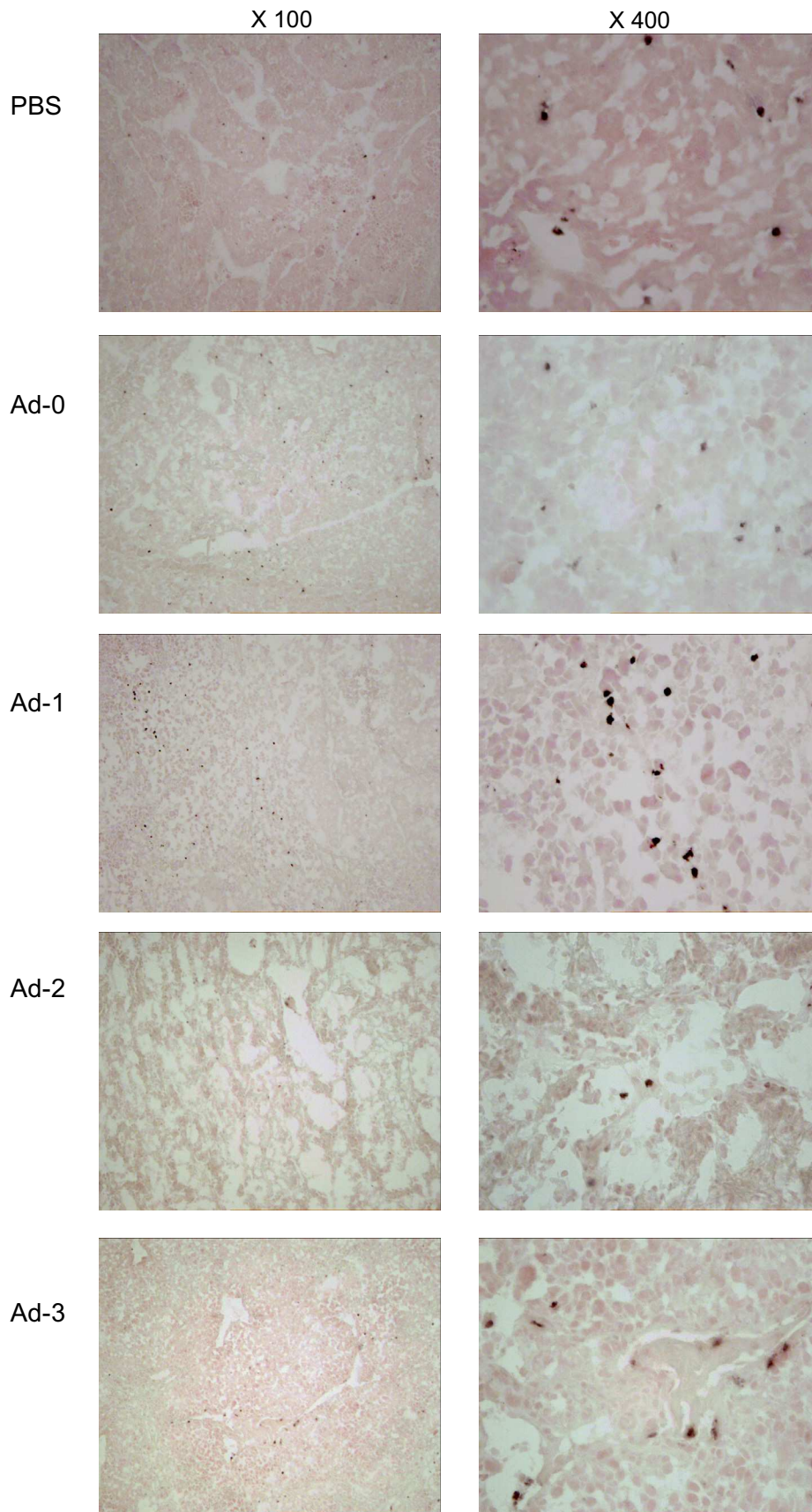


Abb. 38: Dargestellt ist die Infiltration des Tumors mit CD80+-Zellen bei den unterschiedlichen Behandlungsarten. In der linken Spalte sieht man Schnitte in 100facher Vergrößerung, auf der rechten in 400facher Vergrößerung.

## **4 Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Daten über die Entwicklung des Tumorummens, der Leberenzyme GOT und GPT sowie über den Gewichtsverlauf der behandelten Tiere erhoben. Des Weiteren wurden immunhistochemische Färbungen von Leber- und Tumorgewebe angefertigt, um einen Überblick über die Infiltration mit Immunzellen zu gewinnen und ein Protokoll zur Lebendzellpräparation etabliert.

### **4.1 Gewichtsverläufe**

Veränderungen des Körpergewichtes können als Indikator für den Allgemeinzustand der Ratten gewertet werden. Die Ergebnisse der Gewichtsbeobachtung zeichnen die anhand der Entwicklung der Tumorummina gemachten Beobachtungen nach: Die Tiere der PBS-, Ad-0- und Ad-2-behandelten Gruppen, die ein im Mittel verhältnismäßig großes Tumorummen hatten, zeigen eine stetige Gewichtsabnahme. Im Gegensatz dazu ist in den Ad-1- und Ad-3-Behandlungsgruppen ab der fünften Woche nach der Tumorumplantation (drei Wochen nach der Vektorgabe) eine Gewichtszunahme festzustellen, die auf eine Verbesserung des Allgemeinzustandes der Tiere schließen lässt und mit einer Abnahme des Tumorummens einhergeht.

### **4.2 Behandlungsverlauf anhand der Tumorummina**

Bis auf die PBS-Gruppe ist das Startvolumen der Tumoren in den verschiedenen Behandlungsgruppen etwa gleich. Die geringere Startgröße der Tumoren der PBS-Tiere ist auf das Fehlen des linken Tumors zurückzuführen. Diese Tiere wurden als PBS-Gruppe gewählt, um sicherzustellen, dass keine der Behandlungsgruppen einen Vorteil gegenüber der anderen hat. Ein Vorteil einer Kontrollgruppe gegenüber den Behandlungsgruppen ist hingegen durchaus zu akzeptieren. Die Tumorummina der PBS-, Ad-0- und Ad-2-behandelten Tiere nehmen im Mittel kontinuierlich zu, wobei sich die Ad-2-Gruppe nicht wesentlich von den Kontrolltieren unterscheidet. Bei den Ad-1-

und den Ad-3-behandelten Tieren ist ab der dritten Woche nach Virusgabe (fünf Wochen nach Tumorimplantation) ein klarer Rückgang des Tumorumfanges zu verzeichnen.

Da die Entwicklung der Tumoren bei den Ad-2-behandelten Tieren anders verlief als in den beiden Studien bei höherer Dosis – ein Verlauf ähnlich dem der Ad-1 oder Ad-3-Gruppe schien danach wahrscheinlicher als der gefundene Verlauf, der eine große Ähnlichkeit mit den Kontrollgruppen aufweist –, wurde der Verlauf mit den Starttumorumfängen korreliert. Es war keine direkte Abhängigkeit des Krankheitsverlaufes von der Starttumorgroße festzustellen, wobei die Verläufe der Tiere mit einem Starttumorumfang von 0,40-0,75 cm<sup>3</sup> genau den im Mittel gemachten Beobachtungen entsprachen. Bei den Startumfängen <0,40 cm<sup>3</sup> bestätigt sich diese Tendenz mit der Ausnahme eines Ad-2-behandelten Tieres, das eine vollständige Tumorregression aufweist und eines Tieres, das eine Woche nach PBS-Gabe tumorfrei war. Zu bemerken ist hierbei, dass das geheilte Ad-2-Tier mit einem Tumorstartumfang von 0,14 cm<sup>3</sup> deutlich unter 0,40 cm<sup>3</sup> lag. Viel erstaunlicher jedoch erscheint die Heilung des Tieres nach PBS-Gabe, die sicher durch das extrem kleine Tumorstartumfang von nur 0,06 cm<sup>3</sup> begünstigt wurde und möglicherweise durch eine allgemeine Stimulierung des Immunsystems durch die Operationen zur Tumor- und Virusinokulation oder aber durch eine vorbestehende Fähigkeit dieses Tieres, eine Immunantwort gegen diese Tumorzelllinie auszubilden, schließlich zur Heilung führte. Auch wurde in mehreren Studien eine nicht tumorspezifische Immunstimulation - zum Beispiel durch bakterielle Infektionen oder Komponenten von Bakterienzellmembranen - beobachtet (Thatcher et al. 1979), die zum Teil eine vollständige Tumorregression hervorrufen konnte (Nagorsen et al. 2002, Ehrenfeld et al. 1994).

Weshalb der Ad-2-Vektor so schlecht im Verhältnis zu Ad-1 und Ad-3 abschneidet, lässt sich nicht einwandfrei klären. Da bei höheren Dosen gerade für Ad-2 und Ad-3 ähnliche Wirksamkeiten gefunden wurden (Wähler 2003), wäre es möglich, dass Ad-2 bei einer Dosis von  $1 \times 10^6$  für die Induktion einer Antitumorantwort nicht ausreicht, wenn nicht der Tumor besonders klein ist. Aufgrund der kleinen Gruppen von nur je sechs Tieren wurde allerdings nur eine Ad-2-Charge verwendet, so dass auch die Möglichkeit besteht, dass die verwendeten Vektoren ihre Aktivität verloren haben.



Bei einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe mit  $2,3 \times 10^7$  i. u. fand sich bei einer Gruppengröße von zehn Tieren eine Überlebensrate von 90%, die überlebenden Tiere waren nach sieben Wochen tumorfrei (Waehler et al. 2005). Im Vergleich dazu erzielten Barajas et al. (2001) z.B. mit einer Dosis von  $5 \times 10^9$  pfu eines adenoviralen Vektors, der für IL-12 (AdCMVIL-12) kodierte, eine totale Tumorregression in nur 50% der behandelten Tiere mit einer Langzeitüberlebensrate von 60%. In der vorliegenden Studie wurde nun mit einer Virusdosis von  $1 \times 10^6$  teils eine nahezu vollständige Tumorreduktion mit dem für *single-chain* IL-12 kodierenden Ad-1 erzielt. Im Einzelnen fand sich eine fast vollständige Tumorreduktion bei 50% der Tiere bei einer Überlebensrate von 67%. Ein Tier zeigte ein deutlich progressives Tumorwachstum.

Einer der Hauptgründe für die guten Erfolge mit den verwendeten Vektoren mag in der Verwendung von *single-chain* IL-12 (scIL-12) liegen. Der Vorteil hierbei könnte u. a. sein, dass beim scIL-12 die Bildungsrate bei nahe 100% liegen dürfte, was sich bei nativem IL-12 durchaus anders darstellt, muss dieses sich doch erst aus den beiden Untereinheiten (p40 und p35) bilden (vgl. Wolf et al. 1991), woraus eine niedrigere Bildungsrate resultieren mag. Auch eine höhere Rezeptoraffinität für *single-chain* IL-12 als für natives IL-12 ist denkbar, jedoch noch nicht ausreichend untersucht; gleiches gilt für die *in vivo* Halbwertszeit von scIL-12.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen lässt sich in dieser Studie nicht nachweisen, was aufgrund der geringen Gruppenstärken allerdings nicht erlaubt, auf ein Fehlen eines solchen Unterschiedes zu schließen.

### **4.3 Serumanalysen**

Den Erwartungen entsprechend sinkt die Serumaktivität von GOT und GPT bei Tieren mit einem Tumorendvolumen  $< 1 \text{ cm}^3$  unter die Werte derselben Tiere zwei Wochen nach Tumorinokulation, da die Tumoren zu diesem Zeitpunkt größer waren als vier Wochen nach der Behandlung. Ebenso den Erwartungen entsprechend waren die Ergebnisse der Tiere mit einem Tumorendvolumen  $> 1 \text{ cm}^3$ , weil bei diesen Tieren die Tumoren vier Wochen nach der Behandlung in den meisten Fällen um ein Vielfaches

größer sind als direkt vor der Behandlung. Dies zeigt deutlich die Abhängigkeit der Serumenzymaktivität von der Größe der Tumoren und der damit verbundenen Leberschädigung. Laut dem Ergebnis des GOT/GPT-Quotienten, der eine Aussage über die Schwere einer Leberzellschädigung erlaubt, ergibt sich für die Ad-2-Gruppe eine schwerer werdende Leberschädigung. Für die Ad-1- und Ad-3-Tiere bleibt die Schädigung im Mittel gleich, wohingegen die Schwere der Zellschädigung bei den Kontrolltieren trotz stetig steigender Serum-GOT- und GPT-Aktivität nach dem GOT/GPT-Quotienten abnimmt. Hier stellt sich die Frage, wie aussagekräftig der GOT/GPT-Quotient bei Ratten ist bzw., ob sich die Verteilung der Enzyme auf die Zellkompartimente nicht deutlich von der des Menschen unterscheidet, so dass jedenfalls eine Aussage gemäß der Regel „Werte größer 1 entsprechen einer schweren, Werte kleiner 1 einer leichten Leberzellschädigung“ nicht notwendigerweise möglich ist.

Die Untersuchung der Serum-GOT- und GPT-Werte ist besonders deshalb von Bedeutung, weil sich bei einigen Tieren eine teils massive Infiltration der Leber und der Tumoren mit Immunzellen findet, die zu starken Leberschädigungen führen könnte. Da nun aber die Serumwerte der Tiere mit einem Tumorendvolumen  $< 1 \text{ cm}^3$  eine sehr niedrige GOT- und GPT-Aktivität aufweisen, scheint dies bei den Tieren, die erfolgreich behandelt wurden, nicht der Fall zu sein. Die Immunzellinfiltration scheint auch nicht für die bei Tieren mit einem Tumorendvolumen  $> 1 \text{ cm}^3$  teils sehr hohen GOT- und GPT-Werte verantwortlich zu sein, finden sich diese doch genauso bei Kontrolltieren, deren Leber und Tumoren kaum eine Infiltration mit Immunzellen aufweisen. Hier ist die Schädigung der Leberzellen wohl eher auf das destruktive Tumorwachstum zurückzuführen.

#### ***4.4 Methodenvalidierung der Zellpräparation und Lebend-Tod-Färbung***

Die Gewinnung und Vereinzelung lebender Zellen aus Milz, Leber und Tumor erbrachte die gewünschten Ergebnisse, lag das Überleben der Tumorzellen doch bei bis zu 90,5%. Bis auf die Zellen eines Tieres (41,5% lebende Zellen) fanden sich für alle anderen Tumoren Überlebensraten von über 50%. Dies sind Ergebnisse, die es wahrscheinlich erscheinen lassen, dass man diese Zellen erneut in Kultur nehmen könnte, um erneut Untersuchungen an ihnen durchführen zu können (verändertes Protokoll nach Dessureault et al. 1999).

Die langfristig angestrebte Untersuchung dieser Zellen auf bestimmte Oberflächenmoleküle mit spezifischen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie führte im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht zu Ergebnissen.

#### ***4.5 Histologische Untersuchungen zur Infiltration des Tumor- und Lebergewebes mit Immunzellen***

In den histologischen Schnitten lässt sich teilweise eine deutliche Infiltration mit Immunzellen nachweisen.

Wie erwartet zeigen die Kontrolltiere (PBS- und Ad-0-Gruppe), die ein stetiges Tumorstadium aufwiesen, kaum infiltrierende Immunzellen in der Leber oder dem Tumor. Der Ad-2-Vektor zeigt eine ähnlich geringe Wirksamkeit wie der Ad-0-Vektor und PBS. Da Ad-1 im Gegensatz dazu eine deutliche Infiltration hervorruft, wird deutlich, dass durch das vektorkodierte IL-12 allein eine effektive Antitumorimmunantwort induziert werden kann. Die Kombination aus IL-12, 4-1BBL und IL-2, für die Ad-3 kodiert, bewirkt ebenfalls eine klare Tumorstadiumsregression, was die Möglichkeit, IL-12 und 4-1BBL könnten in diesem Fall antagonistisch wirken, sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt, zumal Mogi et al (2000) für 4-1BBL eine größere

Effektivität für die direkte Antigenpräsentation durch Tumorzellen in der primären Antitumorantwort als durch CD80 für möglich halten.

Die Fähigkeit des IL-12, die Proliferation von NK-Zellen zu induzieren (Prussia et al. 1992) und deren Reaktion mit dem Gefäßendothel zu fördern (Allavena et al. 1994), zeigt sich in den Gewebeschnitten der Ad-1-Gruppe, die sämtlich NK-Zellen aufwiesen. Ähnlich war dies bei Ad-3-behandelten Tieren, wobei sich im behandelten Tumor selbst allerdings keine NK-Zellen fanden. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den PBS-Tieren im Tumor keine, in der Leber nur vereinzelt NK-Zellen, und auch die Ad-0-Tiere wiesen eine geringere NK-Zell-Infiltration der Leber und des Tumors auf als Ad-1- oder Ad-3-behandelte Tiere.

Ebenso verhält es sich mit den CD4<sup>+</sup>- und den CD8<sup>+</sup>-Zellen: sie scheinen im Rahmen einer leichten Entzündungsreaktion durch die Inokulation des Vektors vereinzelt einzuwandern (Ad-0-Gruppe), finden sich bei behandelten Tieren (Ad-1 und Ad-3) jedoch in größerer Zahl. Da beide Zellarten durch IL-12 angeregt werden können, IFN $\gamma$  zu produzieren (Manetti et al. 1994), das seinerseits sowohl auf Tumorzellen (Gee et al. 1999) als auch die Angiogenese wirkt (Voest et al. 2003), erscheint eine wesentliche Bedeutung für die Tumorregression wahrscheinlich. Die möglichen Gründe für die bei der Ad-2-Gruppe nur äußerst geringe Infiltration mit Immunzellen (vergleichbar der Reaktion der Ad-0-Gruppe) wurde oben bereits ausführlich erläutert, wobei zu bemerken ist, dass die Infiltration mit NK-Zellen kaum schwächer ausfällt als die der Ad-1- und Ad-3-Tiere. Die im Verhältnis zur PBS-Gruppe leicht stärkere Immunreaktion der Ad-0- und der Ad-2-Gruppe kann auf eine Immunreaktion gegen die adenovirale Vektorenhülle zurückzuführen sein (Jooss et al. 2003); ob auch die NK-Zell-Antwort der Ad-2-Tiere darauf zurückzuführen ist, ist hingegen unklar.

Die Anfärbung der Makrophagen wie auch die Färbung auf aktivierte CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, NK- und B-Zellen sowie Monozyten (CD80<sup>+</sup>) erbrachte bei den Ad1-, Ad-2- und Ad-3-Tieren regelmäßig das Bild den Bereich der Zentralvene aussparender Zellen; beide Kontrollgruppen wiesen eine bedeutend geringere Zahl dieser Zellen auf.

Möglicherweise deutet das bei den behandelten Tieren insgesamt eher spärliche Vorkommen von CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und NK-Zellen einerseits und die große Zahl von Makrophagen andererseits für eine im Wesentlichen bereits abgelaufene Immunantwort, nach der nun Zelltrümmer in großen Mengen durch die Makrophagen

beseitigt werden. Gestützt wird diese Vermutung von der Beobachtung, dass das Tumorgewebe dieser Tiere zum größten Teil nekrotisch ist, was auch von Cordier et al. (1995) bei Behandlung mit IL-2 beobachtet wurde. Die von Mazzolini et al. (1999) gemachten Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Hauptteil der Antitumor-Immunantwort innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen nach Behandlung abläuft, waren doch zu diesem Zeitpunkt die meisten Tiere bereits tumorfrei. Dies deckt sich auch mit der von unserer Arbeitsgruppe gemachten Beobachtung einer massiven NK-Zellinfiltration nach zwei Wochen bei mit  $2,3 \times 10^7$  i. u. Ad.sclL-12 behandelten Tieren (Waehler et al. 2005).

Eine Potenzierung der Fähigkeit des Vektors zur Induktion einer Antitumorantwort von dem für IL-12 kodierenden Ad-1 zu dem für IL-12, 4-1 BBL und IL-2 kodierenden Ad-3 lässt sich in dieser Studie nicht nachweisen. Eine solche Verstärkung des Effektes erscheint plausibel, sind doch IL-12 (Hirschowitz et al. 1999, Mazzolini et al. 1999) wie auch IL-2 (Hirschowitz et al. 1999, Seidel et al. 1998) allein bekannt dafür, eine Tumorregression induzieren zu können. Darüber hinaus wird die Kombination von IL-12 und IL-2 vielfach als Erfolg versprechend angesehen (Hirschowitz et al. 1999, Caruso et al. 1996) und sogar in einigen Fällen beschrieben (Addison et al. 1998, Soiffer et al. 1993, Rossi et al. 1994, Lode et al. 1999). Wenn Hill et al. (2002) von einer verminderten Antitumorwirkung von IL-12 mit IL-2 zusammen berichten, so mag dies eher auf eine zeitlich verschiedene Gabe der beiden Interleukine zurückzuführen sein als auf ein generelles Problem bei der Kombination der Interleukine.

Zu bemerken ist bei dieser Auswertung, dass die Untersuchung der Infiltration des Tumorgewebes in den drei Behandlungsgruppen (Ad-1, Ad-2, Ad-3) an Tieren durchgeführt wurde, die keine übermäßig gute Antitumorreaktion zeigten, da nur bei diesen Tieren noch genug Tumormasse für die Histologie vorhanden war. (Zum Zeitpunkt der Präparation waren bereits zwei der drei Ad-1-Tiere nahezu tumorfrei, zwei weitere waren verstorben. In der Ad-2-Gruppe war die Situation für die Präparatgewinnung deutlich besser: nur ein Tier war tumorfrei, so dass hier die Betrachtung wohl auf jeden Fall als repräsentativ zu gelten hat. Ad-3 wiederum sorgte bei drei Tieren für einen fast vollständigen Rückgang des Tumors; ein Tier kam nicht-tumorbedingt um.)

## **Ausblick**

Um eine klare Unterscheidung in der Wirksamkeit der drei Vektoren (Ad-1, Ad-2 und Ad-3) zu ermöglichen, gilt es, in einem nächsten Schritt die Homogenität in Bezug auf die Starttumorgrößen zu erhöhen. Dazu können Untersuchungen dienen, die an solitären transplantierten Tumoren im gleichen HCC-Modell in der Ratte durchgeführt werden.

Schließlich bleibt die Möglichkeit, die Virusmenge auf  $1 \times 10^5$  i. u. zu reduzieren, um auf diese Weise eventuell eine klarere Diskriminierung zu erreichen, in der ggf. curative Effekte durch IL-12-Expression alleine nicht mehr erreicht werden.

## **Aktuelle klinische Ergebnisse genetischer Immuntherapie mit Zytokinen**

Seit der Fertigstellung der experimentellen Arbeit im Jahre 2003 wurden verschiedene klinische Studien zur Tumorentherapie veröffentlicht, deren Ergebnisse im Folgenden kurz umrissen werden sollen.

So berichten Sangro et al. (2004) über eine Untersuchung an Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren des Magen-Darm-Traktes, die mit einem IL-12 exprimierenden Adenovirus behandelt wurden. Der Behandlungserfolg reichte bei den untersuchten 21 Patienten von einem Stillstand der Erkrankung (48%) bis zu einer Teilremission; in 38% der Fälle schritt die Erkrankung weiter fort.

In einer weiteren Studie behandelten Heinzerling et al. (2005) neun Melanompatienten mit Plasmiden, die für IL-12 kodierten. Hier zeigten fünf Patienten ein deutliches Ansprechen des Tumors, das bei zwei Patienten zu einer Totalremission, bei zweien zu einer Teilremission und bei einem zu einem gestoppten Tumorwachstum führte.

In einer zweiten Studie mit Melanompatienten verwendeten Triozzi et al. (2005a) ein für IL-12 kodierendes Kanarienvirus zur Behandlung. Die an den neun Patienten beobachteten Ergebnisse ohne deutlichen Therapieerfolg (sieben Patienten mit fortschreitender Erkrankung, nur ein Patient ohne fortschreitende Krankheit sowie einer

mit Tumorregression) führen die Autoren auf eine zu geringe IL-12-Expression als wahrscheinlichste Ursache zurück.

Allen oben genannten Studien ist gemein, dass keine dosislimitierende Toxizität für die Behandlung beobachtet wurde, unabhängig davon, ob mit viralen Vektoren oder Plasmiden gearbeitet wurde und ob diese für IL-12 oder IL-2 kodierten. Gleiches gilt auch für den Kostimulator B7.1 (Triozi et al. 2005b). Vielmehr fanden sich in den meisten Fällen nur leichtere Nebenwirkungen wie Fieber, Schwitzen (Sangro et al. 2004), Myalgien und Schüttelfrost (Triozi et al. 2005). Gelegentlich fand sich unter der Behandlung auch eine Lymphopenie (Sangro et al. 2004), wie auch schon Trudel sie in einem Fall bei der Behandlung des Prostatakarzinoms mit adenoviral exprimiertem IL-2 beschrieben hatte (Trudel et al. 2003).

Weiter gestützt werden diese Beobachtungen durch Studien von Pantuck et al. (2004), Colombo et al. (2005) und O'Malley et al. (2005), die ebenfalls übereinstimmend über keine dosislimitierende Toxizität berichten, sondern nur die im Verhältnis zur systemischen Zytokingabe (Lenzi et al. 2002, Leonard et al. 1997) vergleichsweise milden Nebenwirkungen beschreiben.

Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass mit der geringen Toxizität der beschriebenen Behandlungsformen eine wichtige Voraussetzung für die breitere klinische Erprobung genetischer Zytokintherapiekonzepte gegeben ist, die Wirksamkeit der verwendeten Vektoren jedoch ausführlich in klinischen Studien an Patienten evaluiert werden muß, arbeiten doch die meisten Tiermodelle – einschließlich dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten – mit monoklonalen transplantierten Tumoren, während man es der Klinik mit polyklonalen Tumoren zu tun hat. Deren Behandlung stellt sich als deutlich komplexer dar als die monoklonaler Tumoren, jedoch zeigten die oben angeführten Studien durchaus schon vielversprechende Resultate.

Neben der erzielten Sicherheit der genetischen Zytokinexpression wurden auch Hinweise auf eine Wirksamkeit der Zytokine erhalten, die jedoch in den genannten Studien noch nicht zu den erwünschten durchschlagenden Ergebnissen geführt hat. Die Optimierung der Vektoren und die Optimierung der Applikation stehen hier im

Mittelpunkt des Interesses. Die in diesem Projekt gewählte Kombination synergistisch wirksamer Immunstimulatoren kann ein wesentlicher Schritt auf dem Weg zu diesem Ziel sein, wie die hier durchgeführten Studien am Tiermodell suggerieren. Eine Reihe von Fragen bleiben auch auf der immunologischen Seite innerhalb der klinischen Studien zu klären. In klinischen Studien müssen neue Endpunkte definiert werden, die diese Fragen beantworten können. Einerseits bleibt abzuwarten, welche Ergebnisse weiterführende Studienphasen der zitierten Studien ergeben. Andererseits soll auf diesem Hintergrund auch für die adenovirale Zytokintherapie dieses Projektes eine klinische Erprobung vorbereitet werden.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung immunstimulatorischer Gentherapie auf das hepatozelluläre Karzinom (HCC) am Rattenmodell untersucht. Hierzu wurden den Ratten mittels Inokulation von MH-7777A-Zellen je zwei Tumoren in die Leber implantiert. Direkt in die Tumoren wurden zwei Wochen später die Therapeutika (Ad-1, Ad-2 oder Ad-3) bzw. die Kontrollen (Ad-0 oder PBS) appliziert. Die TumorgroÙe aller Tiere wurde während des Beobachtungszeitraumes von sechs Wochen im MRT verfolgt. Um den Einfluss der Behandlung auf die Leber abschätzen zu können, wurden Veränderung der Serumaktivität von GOT und GPT anhand von Blutproben ermittelt, die direkt vor und vier Wochen nach Virusapplikation gewonnen wurden. Nach Ablauf des Behandlungszeitpunktes wurden Leber- und Tumorproben für die histologischen Untersuchungen entnommen.

In der Untersuchung wurde deutlich, dass die eingesetzten Vektoren – insbesondere Ad1 (IL-12 exprimierend) und Ad3 (IL-12, IL-2 und 4-1BBL exprimierend) – eine deutliche Reduktion des Tumolvolumens bis hin zu einer vollständigen Remission bewirken können. Die Veränderung des Tumolvolumens korreliert weitestgehend mit der Höhe der Serumaktivitäten der Leberenzyme GOT und GPT, die zunächst mit steigender TumorgroÙe deutlich ansteigen, bei einsetzendem Behandlungserfolg jedoch wieder sinken. Das Gewicht im Gegensatz dazu sinkt zunächst mit steigendem Tumolvolumen, nimmt aber bei Tieren mit sinkender Tumorlast schließlich wieder zu.



Histologisch findet sich vier Wochen nach der Behandlung bei den Tieren der beiden Kontrollgruppen (PBS und Ad0) wie auch bei den mit Ad2 behandelten Tieren kaum eine Infiltration mit Immunzellen. Im Gegensatz dazu weisen die Ad1- und die Ad3-behandelten Tiere eine Infiltration mit CD4+-, CD8+- und NK-Zellen auf. Die Anfärbung auf Makrophagen wie auch auf aktivierte CD4+-, CD8+-, NK- und B-Zellen sowie Monozyten (CD80+) zeigte bei den Ad1-, Ad-2- und Ad-3-Tieren regelmäßig eine Aussparung der Gewebsinfiltration der Zentralvene mit diesen Zellen; beide Kontrollgruppen wiesen eine bedeutend geringere Zahl dieser Zellen auf.

Eine klare Unterscheidung der Wirksamkeit der drei Vektoren Ad1, Ad2 und Ad3 ist in dieser Studie nicht möglich, wenngleich es in diesem Fall scheint, als sei Ad2 deutlich weniger wirksam als Ad3 aber auch als Ad1. Dies unterscheidet sich von in einer vorherigen Studie gemachten Beobachtungen (Waebler 2003), die bei einer geringeren Wirksamkeit von Ad1 eine ähnliche Wirksamkeit von Ad2 und Ad3 nahe legten. Ob eine Unterscheidung bezüglich der Wirksamkeit möglich ist, werden zukünftige Untersuchungen zeigen müssen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD:	7-Aminoactinomycin D
Abb.:	Abbildung
ABC:	Avidin-Biotin-Komplex
Ad:	Adenovirus
Ag:	Antigen
AIDS:	Aquired Immuno Deficiency Syndrome
APAAP:	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
CAR:	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CD:	Cluster of Differentiation
CMV:	Cytomegalivirus
d:	Tag
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EBV:	Eppstein Barr Virus
EDTA:	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EMCV:	Encephalomyocarditis Virus
FCS:	Fetal Calf Serum
GOT:	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (Syn.: ASAT)
GPT:	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Syn.: ALAT)
HCC:	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES:	N-2-Hydroxy-Ethylpiperazin-N-2-Ethan-Sulfonsäure
HSV-tk:	Herpes Simplex Virus-Thymidinkinase
IFN $\gamma$ :	Interferon $\gamma$
Ig:	Immunglobulin
IL:	Interleukin
IRES:	Interne ribosomale Eintrittsstelle
ITR:	Inverted Terminal Repeat
i. u.:	infectious units

i. v.	Intravenös
kD:	kilo-Dalton
MHC:	Major histocompatibility complex
MRT:	Magnetresonanztomographie
NK:	Natural killer cells
PBS :	Phosphatgepufferte Salzlösung
pfu:	Plaque forming units
pH :	Negativer dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ - Ionenkonzentration
PV:	Poliovirus
rpm:	rounds per minute
scIL-12:	single chain IL-12
TCR:	T-Zellrezeptor
Th:	T-Helfer (Zelle)
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TRIS:	Tris[Hydroxymethyl]aminomethan
Wo:	Woche

## 7 Abbildungsverzeichnis und Verzeichnis der Tabellen

- Abb. 1: Inzidenz des HCC weltweit
- Abb. 2: Antitumorwirkung von IL-12
- Abb. 3: Die adenoviralen Vektoren Ad-1, Ad-2 und Ad-3 in schematischer Darstellung
- Abb. 4: Darstellung des Spulenaufbaus für die MRT-Untersuchungen
- Abb. 5: Mittelwerte der Gewichtsverläufe der verschiedenen Behandlungsgruppen über sieben Wochen
- Abb. 6: Mittelwerte der Tumorumfänge der überlebenden Tiere
- Abb. 7: Entwicklung des Tumorumfanges bei einem Starttumorumfang von  $< 0,40 \text{ cm}^3$
- Abb. 8: Entwicklung der Tumorumfänge bei Tieren mit einem Starttumorumfang von  $0,40\text{-}0,75 \text{ cm}^3$
- Abb. 9: MRT-Bilder eines mit Ad-0 behandelten Tieres (Kontrolltier)
- Abb. 10: MRT-Bilder eines mit Ad-3 behandelten Tieres
- Abb. 11: Makroskopische Bilder der Tumoren
- Abb. 12: Makroskopische Bilder der Tumoren
- Abb. 13: Makroskopische Bilder der Tumoren
- Abb. 14: Mittelwerte der GOT-Serumaktivität
- Abb. 15: Mittelwerte der GPT-Serumaktivität
- Abb. 16: Serum-GOT einzelner Tiere mit einem Endtumorumfang  $< 1 \text{ cm}^3$
- Abb. 17: Serum-GOT einzelner Tiere mit einem Endtumorumfang  $> 10 \text{ cm}^3$
- Abb. 18: Serum-GPT einzelner Tiere mit einem Endtumorumfang  $> 10 \text{ cm}^3$
- Abb. 19: Tumorumfänge, Serum-GOT und GPT der Tiere 1-12 zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen
- Abb. 20: Tumorumfänge, Serum-GOT und GPT der Tiere 13-24 zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen
- Abb. 21: Korrelation von Tumorumfang und Serumaktivität von GOT
- Abb. 22: Korrelation von Tumorumfang und Serumaktivität von GPT
- Abb. 23: Durchflusszytometrische Messungen
- Abb. 24: Überleben der Milzzellen

Abb. 25: Überleben der Milzzellen

Abb. 26: Überlebende Tumorzellen

Abb. 27: Überlebende Tumorzellen

Abb. 28: Kontrolle vs Ad-1-Makrophagenantikörper (oben Leber-, unten Tumorgewebe)

Abb. 29: CD4+ Leber

Abb. 30: CD4+ Tumor

Abb. 31: CD8+ Leber

Abb. 32: CD8+ Tumor

Abb. 33: CD161 Leber

Abb. 34: CD161 Tumor

Abb. 35: Makrophagen Leber

Abb. 36: Makrophagen Tumor

Abb. 37: CD80+ Leber

Abb. 38: CD80+ Tumor

Tbl. 1: GOT/GPT Quotient der Tiere direkt vor und vier Wochen nach Vektorinokulation

## 8 Literaturverzeichnis

- Addison CL, Braciak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL (1995) Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:8522-8526
- Addison CL, Bramson JL, Hitt MM, Gauldie J, 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 Therapy* 5:1400-1409
- Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, Din WS (1994) Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol* 24/9:2219-2227
- Alemany R, Suzuki K, Curiel DT (2000) Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *Journal of General Virology* 81:2605-2609
- Allavena P, Paganin C, Zhou D, Bianchi G, Sozzani S, Mantovani A (1994) Interleukin-12 Is Chemotactic for Natural Killer cells and Stimulates Their Interaction With Vascular Endothelium. *Blood* 7:2261-2268
- Allison JP (1994) CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol.* 6/3:414-419
- Angiolillo AL, Sgadari C, Tosato G (1996) A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Annals of the New York Academy of Sciences* 795/1:158-167
- Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G (1998) Molecular Mechanisms of the Induction of IL-12 and Its Inhibition by IL-10. *The Journal of Immunology* 160:5936-5944
- Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier L (1993) Functional Expression of B7/BB1 on Activated T Lymphocytes. *J.Exp.Med* 177:845-850
- Barajas M, Mazzolini G, Genové G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J (2001) Gene Therapy of Orthotopic Hepatocellular Carcinoma in rats Using Adenovirus Coding for Interleukin 12. *Hepatology* 33/1:52-61

- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie b viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275/5304:1320-1323
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8802-8806
- Bilbao R, Bustos M, Alzuguren P, Pajares MJ, Drozdik M; Qian C, Prieto J (2000) A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds. *Gene Therapy* 7:1824-1832
- Boussiotis VA, Gribben JG, Freeman GJ, Nadler LM (1994) Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr Opin Immunol.* 6/5:797-807
- Bramson JL, Graham FL, Gauldie J (1995) The use of adenoviral vectors for gene therapy and gene transfer in vivo. *Curr Opin Biotechnol* 6:590-595
- Bramson JL, Hitt M, Gauldie J, Graham FL (1997) Pre-existing immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Therapy* 4:1069-1076
- Breyer B, Jiang W, Cheng H, Zhou L, Paul R, Feng T, He T-C (2001) Adenoviral Vector-Mediated Gene Transfer for Human Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 1:149-162
- Brunda MJ, Wright RB (1986) Differential antiproliferative effects of combinations of recombinant interferons alpha and gamma on two murine tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 37/2:287-291
- Brunda MJ, Sulich V, Bellantoni D (1987) The anti-tumor effect of recombinant interferon alpha or gamma is influenced by tumor location. *Int. J. Cancer* 40/6:807-810
- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK (1993) Antitumor and Antimetastatic Activity of Interleukin 12 against Murine Tumors *J.Exp.Med.* 178:1223-1230
- Bundesamt für Veterinärwesen (2002) Blutentnahme bei Labornagetieren und Kaninchen zu Versuchszwecken. *Information Tierschutz* 3.02

- Car BD, Eng VM, Schnyder B, LeHir M, Shakhov An, Woerly G, Huang S, Aguet M, Anderson TD, Ryffel B (1995) Role of interferon-gamma in interleukin 12-induced pathology in mice. *Am. J. Pathol.* 147/6:1534-1538
- Caruso M, Pham-Nguyen K, Kwong Y-L, Xu B, Kosai K-I, Finegold M, Woo SLC, Chen S-H (1996) Adenovirus-mediated interleukin-12 therapy for metastatic colon carcinoma *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:11302-11306
- Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, 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.* 173/4:869-879
- Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G (1992) Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.* 148/1:92-98
- Chen B, Timiryasova TM, Gridley DS, Andres ML, Dutta-Roy R, Fodor I (2001) Evaluation of Cytokine Toxicity induced by Vaccinia Virus-mediated IL-2 and IL-12 Antitumor Immunotherapy. *Cytokine* 15/6:305-314
- Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS (1992) Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* 71/7:1093-1102
- Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE (1993) Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14/10:483-486
- Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE (1994) Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J.Exp.Med.* 179/2:523-532
- Chen S, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SLC (1994) Gene Therapy for Brain Tumors: Regression of Experimental Gliomas by Adenovirus-Mediated Gene Transfer in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:3054-3057
- Chond H, Todryk S, Hutchinson G, Hart IR, Vile RG (1998) Tumor cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage



colony-stimulating factor induces a local antitumor response and may generate systemic protective immunity. *Gene Therapy* 5:223-232

- Chu NR, DeBenedette MA, Stiernholm N, Barber BH, Watts TH (1997) Role of IL-12 and 4-1BB Ligand in Cytokine Production by CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> T Cells. *The Journal of Immunology* 158:3081-3089
- Cohen J (1995) IL-12 Deaths: explanation and a puzzle. *Science* 270:908
- Cohen CJ, Shieh JTC, Pickles RJ, Okegawa T, Hsieh J-T, Bergelson M (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *PNAS* 98/26:15191-15196
- Colombo F, Barzon L, Franchin E, Pacenti M, Pinna V, Danieli D, Zanusso M, Palu G (2005) Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results. *Cancer Gene Therapy* 12: 835-848
- Colombo M (2001) Treatment of hepatocellular carcinoma. *Antiviral Res.* 52/2:209-215
- Colombo MP, Trinchieri G (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13/2:155-168
- Cordier L, Duffour MT, Sabourin JC, Lee MG, Cabannes J, Ragot T, Perricaudet M, Haddada H (1995) Complete recovery of mice from a pre-established tumor by direct intratumoral delivery of an adenovirus vector harboring the murine IL-2 gene. *Gene Therapy* 2/1:16-21
- Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G, Lee WM (1998) Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9/1:25-34
- Cousens LP, Peterson R, Hsu S, Dorner A, Altman JD, Ahmed R, Biron CA (1999) Two Roads Diverged: Interferon  $\alpha/\beta$ - and Interleukin 12-mediated Pathways in Promoting T Cell Interferon  $\gamma$  Responses during Viral Infection. *Journal of Experimental Medicine* 189/8:1315-1328
- Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF (1999) Inflammatory Cytokines Provide a Third Signal for Activation of Naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology* 162:3256-3262

- Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang WW, Sarvetnick N, Verma IM (1995) Cellular and humoral immun responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term exposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92/5:401-1405
- Dal Maso L, Serraino D, Franceschi S (2001) Epidemiology of AIDS-related tumors in developing countries. *Eur. J. Cancer* 37/10:1188-1201
- Dal Maso L, Franceschi S, Polesel J, Braga C, Piselli P, Crocetti E, Falcini F, Guzzinati S, Zanetti R, Vercelli M, Rezza G (2003) Risk of cancer in persons with AIDS in Italy, 1985-1998. *British Journal of Cancer* 89:94-100
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal of Experimental Medicine* 178:1041-1048
- Deeths MJ, Mescher MF (1997) B7-1-dependent co-stimulation results in qualitatively and quantitatively different responses by CD4+ and CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 27/3:598-608
- Dessureault S, Graham FL, Gallinger S (1999) Autologous lymphocyte responses to adenovirus-B7-1-transduced human cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 6/3:195-208
- Dhillon AP, Colombari R, Savage K, Scheuer PJ (1992) An immunohistochemical study of the blood vessels within primary hepatocellular tumors. *Liver* 12/5:311-318
- Ehrenfeld U, Haas R (1994) Complete remission of metastatic breast cancer by non-specific immunostimulation with a *Nocardia opaca* cell-wall extract after failure of conventional therapy. *Sb Lek.* 95/1:1-5
- Emtage PCR, Wan Y, Bramson JL, Graham FL, 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. *The Journal of Immunology* 160:2531-2538
- Essery G, Feldmann M, Lamb JR (1988) Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* 64/3:413-417

- Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein b, Frost P (1990) Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60/3:397-403
- Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, SchultheissHP, Lamers J, Poller W (1999) Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Therapy* 6/9:1520-1535
- Fogler WE, Volker K, Watanabe M Wigginton JM, Roessler, Brunda MJ, Ortaldo JR, Wiltout RH (1998) Recruitment of Hepatic NK Cells by IL-12 Is Dependent on IFN- $\gamma$  and VCAM-1 and Is Rapidly Down-Regulated by a Mechanism Involving T Cells and Expression of Fas. *The Journal of Immunology* 161:6014-6021
- Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Podlaski FJ, Familletti PC, Sinigaglia F, Chizzonite R, Gubler U, et al. (1991) Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* 147/3:874-882
- Gee MS, Koch CJ, Evans SM, Jenkins WT, Pletcher CH, Moore JS, Koblisch HK, Lee J, Lord EM, Trinchieri G, Lee WMF (1999) Hypoxia-mediated Apoptosis from Angiogenesis Inhibition Underlies Tumor Control by Recombinant Interleukin 12. *Cancer Research* 59:4882-4889
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G (2002) Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195/3:327-333
- Gerber SA, Moran JP, Frelinger JA, Fenton BM, Lord EM (2003) Mechanism of IL-12 mediated alterations in tumor blood vessel morphology: analysis using whole-tissue mounts. *British Journal of Cancer* 88:1453-1461
- Gilgenkrantz H, Duboc D, Juillard V, Couton D, Pavirani A, Guillet JG, Briand P, Kahn A (1995) Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum. Gene Ther.* 6/10:1265-1274

- Goedert JJ, Cote TR, Virgo P, Scoppa SM, Kingma DW, Gail MH, Biggar RJ (1998) Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 351/9119:1833-1839
- Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, 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* 23/10:2631-2641
- Graham FL, Prevec L (1992) Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* 20:363-390
- Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, Barber M, Restivo VA Jr, Ke X, Gray GS, et al. (1995) CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci* 92/3:811-815
- Grulich AE, Li Y, McDonald A, Correll PK, Law MG, Kaldor JM (2002) Rates of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection before and after AIDS diagnosis. *AIDS* 16/8:1155-1161
- Guglielmi A, Ruzzenente A, Battocchia A, Tonon A, Fracastoro G, Cordiano C (2003) Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 50/50:480-484
- Guinn B-A, DeBenedette MA, Watts TH, 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. *The Journal of Immunology* 162:5003-5010
- Gyorffy S, Palmer K, Poder JP, Hitt M, Gauldie J (2001) Combined Treatment of a Murine Breast Cancer Model with Type 5 Adenovirus Vectors Expressing Murine Angiostatin and IL-12: A Role for Combined Anti-Angiogenesis and Immunotherapy *The Journal of Immunology* 166:6212-6217
- Hall AJ (2003) Liver cancer in low and middle income countries. *B. M. J.* 326:994-995
- Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ (1994) Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180/2:631-640
- Heinzerling L, Burg G, Dummer R, Maier T, Oberholzer PA, Schultz J, Elzaouk L, Pavlovic J, Moelling K (2005) Intratumoral Injection of DNA Encoding

Human Interleukin 12 into Patients with Metastatic Melanoma: Clinical Efficacy. *Human Gene Therapy* 16: 35-48

- Heubner RJ, Rowe WP, Ward TG, Parrot RH, Betts JA (1954) Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *New England Journal of Medicine* 251:1077
- Hill HC, Conway TF, Jr., Sabel MS, Jong YS, Mathiowitz E, Bankert RB, Egilmez NK (2002) Cancer Immunotherapy with Interleukin 12 and Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor-encapsulated Microspheres: Coinduction of Innate and Adaptive Antitumor Immunity and Cure of Disseminated Disease. *Cancer Research* 62:7254-7263
- Hilleman MR, Werner JH, Dascomb HE, Butler RL (1955) Epidemiologic Investigations with Respiratory Disease Virus RI-67. *Am. J. Pub. Health* 45:203
- Hirschowitz EA, Naama HA, Evoy D, Lieberman MD, Daly J, Crystal RG (1999) Regional treatment of hepatic micrometastasis by adenovirus vector-mediated delivery of interleukin-2 and interleukin-12 cDNAs to the hepatic parenchyma *Cancer Gene Therapy* 6:491-498
- Hodge DL, Martinez A, Julias JG, Taylor LS, Young HA (2002) Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Mol. Cell Biol.* 22/6:1742-17533
- Hutado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS (1995) Potential role of 4-1BBL in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 155/7:3360-3367
- Jooss K, Chirmule N (2003) Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Therapy* 10:955-963
- Kaufman HL, Swartout BG, Horig H, Lubensky I (2002) Combination interleukin-2 and interleukin-12 induces severe gastrointestinal toxicity and epithelial cell apoptosis in mice. *Cytokine* 17/1:43-52
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 170:827-845

- Krupski G, Ameis D, Cataldegirmen G, Herbst H, Henschel MG, Nicolas V, Rogiers X, Bucheler E (2001) Negative magnetic resonance tomography of the Morris hepatoma (MH-7777A) in the rat. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 173/7:639-642 (german)
- Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G (1994) Interleukin 12 Synergizes with B7/CD28 Interaction in Inducing Efficient Proliferation and Cytokine Production of Human T Cells. *Journal of Experimental Medicine* 180:211-222
- Kuriyama S, Masui K, Kikukawa M, sakamoto T, Nakatani T, Nagao S, Yamazaki M, Yoshiji H, Tsujinoue H, Fukui H, Yoshimatsu T, Ikenaka K (1999) Complete cure of established murine hepatocellular carcinoma is achievable by repeated injections of retroviruses carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Therapy* 6/4:525-533
- Laumay O, Guillevin L (2003) Epidemiology of HIV-associated malignancies. *Bull. Cancer* 90/5:387-392 (french)
- Lenzi R, Rosenblum M, Verschraegen C, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Hicks ME, Lang EA, Nash MA, Levy LB, Garcia ME, Platsoucas CD, Abbruzzese JL, Freedman RS (2002) Phase I Study of Intraperitoneal Recombinant Human Interleukin 12 in Patients with Müllerian Carcinoma, Gastrointestinal Primary Malignancies, and Mesothelioma. *Clinical Cancer Research* 8:3686-3695
- Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL; Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ, Ryan JL (1997) *Blood* 90/7:2541-2548
- Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA (1990) T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci* 87/13:5031-5035
- Lode HN, Xiang R, Duncan SR, Theofilopoulos AN, Gillies SD, Reisfeld RA (1999) Tumor-targeted IL-2 amplifies T cell-mediated immune response induced by gene therapy with single-chain IL-12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:8591-8596
- Lotze MT, Matory YL, Rayner AA, Ettinghausen SE, Vetto JT, Seipp CA, Rosenberg SA (1986) Clinical effects and toxicity of interleukin-2 patients with cancer. *Cancer* 58(12):2764-2772
- Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G (1996) The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *Journal of Experimental Medicine* 183:147-157

- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4+ T cells. *The Journal of Immunology* 154/10:5071-5079
- Majewski S, Marczak M, Szmurlo A, Jablonska S, Bollag W (1996) Interleukin-12 inhibits angiogenesis induced by human tumor cell lines in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 106/5:1114-1118
- Manetti R, Gerosa F, Guidizi MG, Biagiotti R, Parronchi P, Piccinni MP, Sampognaro S, Maggi E, Romagnani S, Trinchieri G (1994) Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established TH2 cell clones. *Journal of Experimental Medicine* 179:1273-1283
- Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, Sauter B, Mandeli J, Chen L, Chen S-H (2000) Immunomodulatory Gene Therapy With Interleukin 12 and 4-1BB Ligand: Long-Term Remission of Liver Metastases in a Mouse Model. *Journal of the National Cancer Institute* 92/11:931-936
- Martinet O, Divino CM, Zang Y, Gan Y, Mandeli J, Thung S, Pan P-Y, Chen S-H (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 Therapy* 9:786-792
- Mazzolini G, Qian C, Xie X, Sun Y, Lasarte JJ, Drozdik M, Prieto J (1999) Regression of colon cancer and induction of antitumor immunity by intratumoral injection of adenovirus expressing interleukin-12 *Cancer Gene Therapy* 6/6:514-522
- Melero I, Bach N, Hellström KE, Aruffo A, Mittler RS, Chen L (1998) Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur. J. Immunol.* 28:1116-1121
- Mogi S, Sakurai J, Kohsaka T, Enomoto S, Yagita H, Okumura K, Azuma M (2000) Tumor rejection by gene transfer of 4-1BB ligand into a CD80<sup>+</sup> murine squamous cell carcinoma and the requirements of co-stimulatory molecules on tumor and host cells. *Immunology* 101:541-547
- Mortarini R, Borri A, Tragni G, Bersani I, Vegetti C, Bajetta E, Pilotti S, Cerundolo V, Anichini A (2000) Peripheral Burst of Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocytes

and Infiltration of Metastatic Lesions by Memory CD8+ T Cells in Melanoma Patients Receiving Interleukin 12. *Cancer Research* 60:3559-3568

- Nagorsen D, Marincola FM, Kaiser HE (2002) Bacteria-related spontaneous and therapeutic remission of human malignancies. *In Vivo* 16/6:551-556
- Narvazia I, Mazzolini G, Barajas M, Duarte M, Zaratiegui M, Qian C, Melero I, Prieto J (2000) Intratumoral Coinjection of Two Adenoviruses, One Encoding the Chemokine IP-10 and Another Encoding IL-12, Results in Marked Antitumoral Synergy. *The Journal of Immunology* 164:3112-3122
- Naume B, Gately M, Espevik T (1992) A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells. *J. Immunol.* 148/8:2429-2436
- Nunes JA, Truneh A, Olive D, Cantrell DA (1996) Signal transduction by CD28 Costimulatory Receptor on T Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271/3:1591-1598
- Okegawa T, Li Y, Pong R-C, Bergelson JM, Zhou J, Hsieh J-T (2000) The Dual Impact of Coxsackie and Adenovirus Receptor Expression on Human Prostate Cancer Gene Therapy. *Cancer Research* 60:5031-5036
- Okegawa T, Pong R-C, Li Y, Bergelson JM, Sagalowsky AI, Hsieh J-T (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 Research* 61:6592-6600
- Okuda K (2000) Hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 32/1:225-237
- Okuda K (2002) Where we go with hepatocellular carcinoma: past, present, and future perspectives. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 9:683-685
- O'Malley BW, Li D, McQuone SJ, Ralston R (2005) Combination Nonviral Interleukin-2 Gene Immunotherapy For Head and Neck Cancer: From Bench Top to Bedside. *Laryngoscope* 115(3): 391-404
- O'Malley Jr., BW, Sewell DA, Li D, Kosai K, Chen S-H, Woo SLC, Duan L (1997) The Role of Interleukin-2 in Combination Adenovirus Gene Therapy for Head and Neck Cancer. *Molecular Endocrinology* 11/6:667-673
- Orange JS, Salazar-Mather TP, Opal SM, Spencer RL, Miller AH, McEwen BS, Biron CA (1995) Mechanism of Interleukin 12-mediated Toxicities during



Experimental Viral Infections: Role of Tumor Necrosis Factor and Glucocorticoids. *Journal of Experimental Medicine* 181:901-914

- Pandha HS, Stockwin LH, Eaton J, Clarke J, Dalglish AG, Todryk SM, Blair GE (2003) Coxsackie B and adenovirus receptor, integrin and major histocompatibility complex class I expression in human prostate cancer cell lines: implications for gene therapy strategies. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 6:6-11
- Pantuck AJ, van Ophoven A, Gitlitz BJ, Tso CL, Acres B, Squiban P, Ross ME, Beldegrun AS, Figlin RA (2004) Phase I trial of antigen-specific gene therapy using a recombinant vaccinia virus encoding MUC-1 and IL-2 in Muc-1-positive patients with advanced prostate cancer. *J Immunother.* 27(3):240-53
- Pappo I, Tahara H, Robbins PD, Gately MK, Wolf SF, Barnea A, Lotze MT (1995) Administration of systemic or local interleukin-2 enhances the anti-tumor effects of interleukin-12 gene therapy. *J. Surg. Res.* 58/2:218-226
- Pertl U, Luster AD, Varki NM, Homann D, Geadicke G, Reisfeld RA, Lode HN (2001) IFN- $\gamma$ -Inducible Protein-10 Is Essential for the Generation of a Protective Tumor-Specific CD8 T Cell Response Induced by Single-Chain IL-12 Gene Therapy. *The Journal of Immunology* 166:6944-6951
- Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, Young D, Wolf SF, Trinchieri G (1992) Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *The Journal of Immunology* 149/11:3495-3502
- Pham-Nguyen KB, Yang W, Saxena R, Thung SN, Woo SLC, Chen S-H (1999) Role of NK and T Cells in IL-12-Induced Anti-Tumor Response Against Hepatic Colon Carcinoma. *Int. J. Cancer* 81:813-819
- Pollok KE, Kim Y-J, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, Kwon BS (1993) Inducible T Cell Antigen 4-1BB: Analysis of Expression and Function *The Journal of Immunology* 150/3:771-781
- Pollok KE, Kim Y-J, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS (1994) 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages and costimulates anti- $\mu$  primed splenic cells. *Eur J Immunol* 24:367-374

- Portielje JEA, Lamers CHJ, Kruit WHJ, Sparreboom A, Bolhuis RLH, Stoter G, Huber C, Gratama JW (2003) Repeated Administration of Interleukin (IL)-12 Are Associated with Persistently Elevated Plasma Levels of IL-10 and Declining IFN $\gamma$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 Responses Clinical cancer Research 9:76-83
- Pützer BM, Hitt M, Muller WJ, Emtage P, Gauldie J, Graham FL (1997) Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:10889-10894
- Pützer BM, Stiewe T, Rödicker F, Schildgen O, Rühm S, Dirsch O, Fiedler M, Damen U, Tennant B, Scherer C, Graham FL, Roggendorf M (2001) Large Nontransplanted Hepatocellular Carcinoma in Woodchucks: Treatment With Adenovirus-Mediated Delivery of Interleukin 12/B7.1 Genes Journal of the National Cancer Institute 93/6:472-479
- Razi-Wolf Z, Freeman GJ, Galvin F, Benacerraf B, Nadler L, Reiser H (1992) Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exsudate cells. Proc Natl Acad Sci 89/9:4210-4214
- Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, Herrmann SH, Ritz J (1992) Response of human natural killer (NK) cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. J. Exp. Med. 175/3:779-788
- Robertson MJ, Cameron C, Atkins MB, Gordon MS, Lotze MT, Sherman ML, Ritz J (1999) Immunological Effects of Interleukin 12 Administered by Bolus Intravenous Injection to Patients with Cancer. Clinical Cancer Research 5:9-16
- Robertson MJ, Pelloso D, Abonour R, Hromas RA, Nelson RP, Jr., Wood L, Cornetta K (2002) Interleukin 12 Immunotherapy after Autologous Stem Cell Transplantation for Hematological Malignancies. Clinical Cancer Research 8:3383-3393
- Rosenberg SA, Speiss P, Lafreniere R (1986) A new approach to the adaptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. Science 233/4770:1318-1321

- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT et al. (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Eng J Med* 316:889-897
- Rossi AR, Pericle F, Rashleigh S, Janiec J, Djeu JY (1994) Lysis of Neuroblastoma Cell Lines by Human Natural Killer Cells Activated by Interleukin-2 and Interleukin-12. *Blood* 5:1323-1328
- Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, Qian C, Prieto J (2001) Gene Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Digestive Diseases* 19:324-332
- Sacco S, Heremans H, Echtenacher B, Buurman WA, Amraoui Z, Goldman M, Ghezzi P (1997) Protective Effects of a Single Interleukin-12 (IL-12) Predose Against the Toxicity of Subsequent Chronic IL-12 in Mice: Role of Cytokines and Glucocorticoids. *Blood* 90/11:4473-4479
- Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olagüe C, Sola J, Sadaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J (2004) Phase I Trial of Intratumoral Injection of an Adenovirus Encoding Interleukin-12 for Advanced Digestive Tumors. *J. Clin. Oncol.* 22(8): 1389-1397
- Schiedner G, Morral N, Parks RJ et al. (1998) Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 18:180-183
- Schwartz RH (1990) A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248/4961:1349-1356
- Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher M, Reis e Sousa C (2000) CD40 Triggering of Heterodimeric IL-12 p70 Production by Dendritic Cells In Vivo requires a Microbial Priming Signal. *Immunity* 13:453-462
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE (1993) Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90/21:10188-10192
- Seidel M, Freissmuth M, Pehamberger H, Micksche M (1998) Stimulation of natural killer activity in peripheral blood lymphocytes of healthy donors and

melanoma patients in vitro: synergism between (IL)-12 and IL-15 or IL-12 and IL-2 Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 358:382-389

- Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G (1996) Inhibition of Angiogenesis by Interleukin-12 Is Mediated by the Interferon-Inducible Protein 10. *Blood* 87/9:3877-3882
- Shuford WW, Klussman K, Trichler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS (1997) 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 186/1:47-55
- Siapati KE, Barker S, Kinnon C, Michalski A, Anderson R, Brickell P, Thrasher AJ, Hart SL (2003) Improved antitumor immunity in murine neuroblastoma using a combination of IL-2 and IL-12. *British Journal of Cancer* 88:1641-1648
- Siders WM, Wright PW, Hixon JA, Alvord WG, Back TC, Wiltout RH, Fenton RG (1998) T Cell- and NK Cell-Independent Inhibition of Hepatic Metastases by Systemic Administration of an IL-12-Expressing Recombinant Adenovirus. *The Journal of Immunology* 160:5465-5474
- Siegel JP, Puri RK (1991) Interleukin-2 toxicity. *J Clin Oncol.* 9/4:694-704
- Soiffer RJ, Robertson MJ, Murray C, Cochran K, Ritz J (1993) Interleukin-12 Augments Cytolytic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes From Patients With Hematologic and Solid Malignancies. *Blood* 9:2790-2796
- Soudais C, Boutin S, Hong SS, Chillon M, Danos O, Bergelson JM, Boulanger P, Kremer EJ (2000) Canine Adenovirus Type 2 Attachment and Internalisation: Coxsackievirus-Adenovirus Receptor, Alternative receptors, and an RGD-Independent Pathway. *Journal of Virology* 74/22:10639-10649
- Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, et al. (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87/17:6808-6812
- Su W, Ito T, Oyama T, Kitagawa T, Yamori T, Fujiwara H, Matsuda H (2001) The direct effect of IL-12 on tumor cells: IL-12 acts directly on tumor cells to activate NF-kappaB and enhance IFN-gamma-mediated STAT1 phosphorylation. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 280/2:503-512

- Su W, Kitagawa T, Ito T, Oyama T, Lee CM, Kim YK, Matsuda H (2002) Antitumor effect of IL-12 administration into the portal vein on murine liver metastasis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 9/4:503-510
- Sun X, Vale M, Leung E, Kanwar JR, Gupta R, Krissansen GW (2003) Mouse B7-H3 induces antitumor immunity. *Gene Therapy* 10:1728-1734
- Tanaka M, Saijo Y, Sato G, Suzuki T, Tazawa R, Satoh K, 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 Therapy* 7:1481-1490
- Thatcher N, Swindell R, Crowther D (1979) Effects of repeated *Corynebacterium parvum* and BCG therapy on immune parameters: a weekly sequential study of melanoma patients. I. Changes in non-specific (NK, K and T cell) lymphotoxicity, peripheral blood counts and delayed hypersensitivity reactions. *Clin Exp Immunol.* 36/2:227-236
- Toloza Em, Hunt K, Swisher S, McBride W, Lau R, Pang S, Rhoades K, Drake T, Beldegrun A, Glaspy J, Economou JS (1996) In vivo cancer gene therapy with a recombinant interleukin-2 adenovirus vector. *Cancer Gene Therapy* 3/1:11-17
- Trinchieri G. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251-276
- Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity. *Immunology* 3:133-146
- Triozzi PL, Strong TV, Bucy RP, Allen KO, Carlisle RR, Moore SE, LoBuglio AF, Conry RM (2005a) Intratumoral Administration of a Recombinant Canarypox Virus Expressing Interleukin 12 in Patients with Metastatic Melanoma. *Human Gene Therapy* 16: 91-100
- Triozzi PL, Allen KO, Carlisle RR, Craig M, LoBuglio AF, Conry RM (2005b) Phase I Study of the Intratumoral Administration of Recombinant Canarypox Viruses Expressing B7.1 and Interleukin 12 in Patients with Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 11(11): 4168-4175
- Trudel S, Trachtenberg J, Toi A, Sweet J, Li ZH, Jewett M, Tshillias J, Zhuang LH, Hitt M, Wan Y, Gauldie J, Graham FL, Dancey J, Stewart AK (2003) A phase

I trial of adenovector-mediated delivery of interleukin-2 (AdIL-2) in high-risk localized prostate cancer. *Cancer Gene Therapy* 10:755-763

- Truitt GA, Bontempo JM, Stern LL, Sulich V, Bellantoni D, Trown PW, Brunda MJ (1989-1990) Efficacy and toxicity elicited by recombinant interferons alpha and gamma when administered in combination to tumor-bearing mice. *Biotechnol. Ther.* 1/1:1-16
- Vagliani M, Rodolfo M, Cavallo F, Parenza M, Melani C, Parmiani G, Colombo MP (1996) Interleukin 12 potentiates the curative effect of a vaccine based on interleukin 2-transduced tumor cells. *Cancer Res.* 56/3:467-470
- van Dijk AM, Otten HG, Vercauteren SM, Kessler FL, de Boer M, Verdonck LF, de Gast GC (1996) Human B7-1 is more efficient than B7-2 in providing co-stimulation for alloantigen-specific T cell. *Eur. J. Immunol.* 26/9:2275-2278
- Venook AP (1994) Treatment of hepatocellular carcinoma: too many options? *J. Clin. Oncol.* 12/6:1323-1334
- Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J (2003) Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *Journal Of The National Cancer Institute* 87:581-586
- Vorburger SA, Hunt KK (2002) Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist* 7:46-59
- Wadhwa PD, Zielske SP, Roth JC, Ballas CB, Bowman JE, Gerson SL (2002) *Cancer Gene Therapy: Scientific Basis.* *Annu. Rev. Med.* 53:437-452
- Wähler R (2003) Adenovirale Immuntherapie solider Tumore am HCC-Modell der Ratte. *Biol. Dissertation.* Universität Hamburg
- Waehler R, Ittrich H, Mueller L, Krupski G, Ameis D, Schnieders F (2005) Low-dose adenoviral immunotherapy of rat hepatocellular carcinoma using single-chain interleukin-12. *Human Gene Therapy* 16(3): 307-317
- Wang K, Huang S, Kapoor-Munshi A, Nemerow G (1998) Adenovirus Internalisation and Infection Require Dynamin. *Journal of Virology* 72/4:3455-3458
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalisation but not virus attachment. *Cell* 73/2:309-319

- Wigginton JM, Park J-W, Gruys ME, Young HA, Jorcyk CL, Back TC, Brunda MJ, Streiter RM, Ward J, Green JE, Wiltrout RH (2001) Complete Regression of Established Spontaneous Mammary Carcinoma and the Therapeutic Prevention of Genetically Programmed Neoplastic Transition by IL-12/Pulse IL-2: Induction of Local T Cell Infiltration, Fas/Fas Ligand Gene Expression, and Mammary Epithelial Apoptosis. *The Journal of Immunology* 166:1156-1168
- Wilson JL, Charo J, Martin-Fontecha A, Dellabona P, Casorati G, Chambers BJ, Kiessling R, Bejarano M-T, Ljunggren H-G (1999) NK Cell Triggering by the Human Costimulatory Molecules CD80 and CD86. *The Journal of Immunology* 163:4207-4212
- Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Diczig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, et al. (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* 146/9:3074-3081
- Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y, Grizzle WE, Curiel DT (2001) Characterisation of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of 9 in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol. Ther.* 3/3:385-394
- Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4407-4411
- Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM (1995) Cellular and humoral immune response to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* 69/4:2004-2015
- Yao L, Sgadari C, Furuke K, Bloom ET, Teruya-Feldstein J, Tosato G (1999) Contribution of Natural Killer Cells to Inhibition of Angiogenesis by Interleukin-12. *Blood* 93/5:1612-1621
- Yao L, Pike SE, Setsuda J, Parekh J, Gupta G, Raffeld M, Jaffe ES, Tosato G (2000) Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood* 96/5:1900-1905
- Yoon SK, Armentano D, Wands JR, Mohr L (2001) Adenovirus-mediated gene transfer to orthotopic hepatocellular carcinomas in athymic nude mice. *Cancer Gene Therapy* 8/8:573-579

- Zhang R, DeGroot LJ (2003) Gene Therapy of a Rat Follicular Thyroid Carcinoma Model with Adenoviral Vectors Transducing Murine Interleukin-12. *Endocrinology* 144/4:1393-1398



## **Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Ermöglichung der Durchführung sowie die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Schnieders sowohl für die Aufgabenstellung als auch für die Einführung in die Arbeitstechniken und die stets freundliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Der Arbeitsgruppe Beisiegel danke ich für die freundliche Aufnahme und dauernde Hilfsbereitschaft sowie Herrn Dr. Reinhard Wähler für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Harald Ittrich für die Hilfe bei der Anfertigung der MRT-Bilder der Ratten, Herrn Dr. Lars Müller für die Unterstützung bei den Operationsterminen, Herrn PD Dr. Süleyman Ergün für die Unterstützung bei den histologischen Aufnahmen und Herrn Dr. Munif Haddad für die Messung der Serumenzyme.

## Lebenslauf

- 21.3.1979 in Köln geboren
- 1981 Umzug nach Berlin
- 1986-1990 Besuch der Rudolf Steiner Schule Berlin/Dahlem
- 1990 Umzug nach Hamburg
- 1990-1998 Besuch der Rudolf Steiner Schule Hamburg/Wandsbek
- 1998 Abschluß der Schule mit allgemeiner Hochschulreife
- 1998-1999 Wehersatzdienst in Thornbury (England)
- Seit 1999 Studium der Medizin an der Universität Hamburg
- September 2005: 2. Staatsexamen
- Seit Oktober 2005 Praktisches Jahr:
  - Innere Medizin: Evangelisches Amalie Sieveking Krankenhaus, Hamburg
  - Chirurgie: Universität von Otago, Wellington/Neuseeland
  - Urologie: Asklepios Klinik Harburg, Hamburg

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

Unterschrift:.....